



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Desarrollo de estrategias de ingeniería
de tejidos para la regeneración ósteo-
cartilaginosa***

Tesista: Lic. María Laura Lastra

**Directoras: Dra. María Susana Cortizo
Dra. María Silvina Molinuevo**

Año: 2018

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido desarrollado para acceder al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas bajo la dirección de la Dra. María Susana Cortizo y la Dra. María Silvina Molinuevo. El mismo se realizó en el Grupo Macromoléculas del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, CONICET-UNLP) y en el Laboratorio de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM, CIC-UNLP) ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Buenos Aires, Argentina.

Su realización ha sido posible gracias a las becas doctorales otorgadas por la UNLP y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A su vez, una parte de esta tesis ha sido desarrollada durante una estancia de investigación bajo la dirección de la Dra. Carmen Mijangos Ugarte en el grupo NanoPoly&Gel del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España, dependiente del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).



RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que involucra el diseño y desarrollo de biomateriales que puedan funcionar como sustitutos biológicos para la reparación o sustitución de tejidos u órganos dañados. Este enfoque evita el gran inconveniente de las técnicas de implantes como la escasez de donantes de tejidos y órganos, el rechazo inmunológico, entre otros. La evidencia acumulada hasta este momento ha demostrado que la estrategia basada en el uso de matrices tridimensionales (*scaffolds*) para ingeniería de tejidos tiene potencial para ser utilizada en la regeneración de una serie de tejidos y órganos y, en particular, es una alternativa prometedora para la reparación de lesiones osteocondrales, ya que podría utilizarse para regenerar tanto el hueso subcondral y el cartílago articular así como la interfaz hueso-cartílago.

La hipótesis de este trabajo es que la combinación de materiales naturales y sintéticos permite lograr materiales con propiedades fisicoquímicas y biológicas adecuadas para la regeneración ósteo-cartilaginosa. Para probar nuestra hipótesis, diseñamos y desarrollamos un biomaterial, basado en un polímero sintético derivado de un polifumarato compatibilizado con un polímero natural (quitosano), el cual se estudió *in vitro* con distintos linajes celulares e *in vivo* en animales de experimentación, con el fin de evaluar su potencial aplicación como *scaffold* para la reparación de lesiones osteocondrales. Esta mezcla compatibilizada de polímeros permite combinar las ventajas de cada tipo de material. En particular, el quitosano presenta muy buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad pero sus propiedades mecánicas y tasa de degradación no son las adecuadas para su aplicación en ingeniería tejidos óseo o cartilaginosa; mientras que los polímeros derivados de polifumarato han demostrado presentar mejores propiedades mecánicas y tasa de degradación regulable por la selección adecuada de la composición de comonomeros, pero poseen menor biocompatibilidad, motivo por el cual necesitan combinarse con otros materiales en vista a su aplicación.

Como primer objetivo se propuso sintetizar un copolímero fumárico por copolimerización radical empleando energía de microondas a partir de acetato de vinilo y fumarato de diisopropilo, el mismo fue caracterizado utilizando diversas técnicas como: cromatografía de exclusión molecular (SEC), espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Este copolímero se compatibilizó con quitosano por entrecruzamiento con adición de bórax. El biomaterial obtenido (PFVH-CHI-B) fue estudiado por espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier y sistema de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR), microscopia electrónica de barrido (SEM), DSC y TGA. Además, se realizaron pruebas mecánicas, de hinchamiento y de degradación; encontrándose propiedades mecánicas del orden de las propias del hueso trabecular, un comportamiento de hinchamiento comparable con un hidrogel (como lo es el cartílago) y una buena tasa de degradación. Además, el material mostró una buena capacidad de estructuración logrando obtener *scaffolds* tanto por *solvent casting* o liofilización como por nanoestructuración mediante la infiltración en plantilla de óxido de aluminio anodizado (AAO) de distintas dimensiones. En particular, los *scaffolds* nanoestructurados presentaron una morfología de nanofibras homogénea como se demostró mediante SEM y espectroscopia Raman.

A continuación, se realizaron estudios *in vitro* que mostraron que tanto el material obtenido por *solvent casting* (SC) como el nanoestructurado (SN) presentaban una muy buena biocompatibilidad, permitiendo la adhesión, proliferación y la diferenciación osteogénica de células progenitoras de médula ósea (CPMO), como así también el crecimiento de condrocitos primarios y la deposición de la matriz extracelular cartilaginosa. Estos resultados fueron demostrados mediante ensayos bioquímicos y la expresión de diferentes marcadores de fenotipo específicos evaluados por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Estos estudios *in vitro* mostraron además, que el cambio en la topografía de la superficie del *scaffolds* tiene influencia sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Por otro lado, se evaluó la capacidad de producir respuesta inflamatoria, como medida de citotoxicidad, empleando un modelo de macrófagos en cultivo, encontrando que ni el material ni su nanoestructuración presentaban evidencias de efectos citotóxicos. Por último, para evaluar este biomaterial como sustituto óseo se empleó un modelo *in vivo* de lesión en calotas de ratas. Para ello, se realizó un defecto de craneotomía en cada hueso parietal, en el cual se implantó el biomaterial estructurado por liofilización. Luego de 30 días post-cirugía, se realizó una evaluación histológica donde se encontró una buena regeneración del tejido e integración de las células con el *scaffold* sin signos que evidencien el rechazo de dicho material.

En conjunto, nuestros resultados indican que el biomaterial desarrollado combina adecuadamente las propiedades de los polímeros individuales, desde el punto de vista tanto fisicoquímico como de biocompatibilidad, mostrando su potencialidad en la regeneración óseo-cartilaginosa.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral es el producto de muchos años de trabajo, que fueron posibles gracias a la colaboración, el apoyo y la compañía de muchos. Por ello quiero agradecer a todos los que hicieron posibles que hoy pueda llegar a este momento.

Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras, Susana y Silvina, porque ellas confiaron en mí, me dieron el lugar de trabajo y eligieron un plan de tesis que me cautivo desde el primer día. Fueron mis guías no solo en el escritorio sino también en la mesada, me tuvieron paciencia y me dieron su tan preciado tiempo. Además me brindaron la posibilidad de viajar, congresiar, publicar y formarme en lo profesional. Gracias a Ana y Antonio por abrirme las puertas de su laboratorio, por su apoyo financiero y por formar este grupo maravilloso, muy rico no sólo en lo profesional sino y sobre todo en lo humano, gracias por los valores que siempre inculcan.

A mis compañeros y amigos del laboratorio gracias por formar parte fundamental de este camino, con ustedes crecí a diario y colaboraron para que ame este trabajo. Los integrantes de Macromoléculas: Tama, Pablo, Sole, Negro, Fer, Leti, Lara y Sofi; y a los del LIOMM: Juanma, Vir, Luz, Lucas, Agus, Ayer y Lucia. También a los que formaron parte y ahora están en otros caminos: Maga, Sari, Marix, Malala, Juani, Marcos, Gime y Vero. Gracias a todos ustedes por sus enseñanzas, sus charlas, sus mates y su compañía. Gracias especiales a esos con los que la relación trasciende las paredes del lab: Pablo y Vir mis pas adoptivos que me cuidan y comparten conmigo sus dos tesoros más preciados; Luz y Luc dúo especialmente hermoso gracias por siempre rodearme de su energía positiva; Leti por tu risa y dulzura; Tama, un alma gemela, que nunca me falten tus audios compañeros; y Juanma gracias por tus consejos y tu guía. Gracias chicos por todo y especialmente por el aguante.

A mis compañeros de la cátedra de Fisiología: Gustavo, Ale, Belu, Nico, Fede, Romi, Pao y Malala por ayudarme a crecer como docente, por las tertulias y los ratos compartidos.

A todos los miembros del grupo de NanoPoli&Gel del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP) de Madrid, España: Iwona, Nicoletta, Belén, Merari, Miryam, Talitha, Juansito, Rebeca y muy especialmente a su directora, la Dra. Carmen Mijangos por recibirme, aceptarme, brindarme su tiempo y guiarme en el día a día. Gracias a los chicos del tupper que compartimos mucho dentro y fuera de las paredes del insti, gracias a Susana, Isa, Virginia, Ansel, Antonio y Clara. Gracias a Marina por sus charlas y muy preciados mates. Cada uno de ustedes aportó para que durante mi estancia allí me sintiera como “en casa”. Gracias miles a Tali, a ti chica que fuiste una gran compañera de tiempo completo, gracias por tanto.

A mis amigos, que nunca dejaron de acompañarme y sin los que la vida sería más difícil. Soy muy afortunada por tener mis grandes amigas desde las distintas etapas de mi vida: Samy “my sister” juntas desde los pañales, Sil mi fiel “compañera de banco”, Gabiota juntas desde que jugaba a ser grande y mis amigas desde el ingreso May, Vicky y Estefi. Gracias a ustedes por quererme como soy, apoyarme, ayudarme a crecer y prestarme su oído siempre. También gracias a las biotec: Ferni, Belu, Jesi, Pau y Belén; compartiendo más que la carrera de grado. Y a los chicos del barrio, una gran familia, a Jorge, Romi, Gasti, Juan y a mi compadrito Copis. Gracias a todos, una vida sin amigos sin duda no tendría sentido de ser.

Gracias a los más peques, esos que aún en mis peores momentos con su luz sacan de mí una sonrisa. Mis princesas: Giuly, Pía, Delfi, Emi y Clari; y mis superhéroes: Franchu, Lulo, Benja y Fran. Gracias también a Brunito, mi angelito, un principito que se fue demasiado pronto.

A mis papas gracias por todo, son sin duda los responsables principales que hoy sea quien soy. Agradezco su gran esfuerzo para poder brindarme la educación. Gracias mami por trasmitirme tu amor por la química y por ser una gran mujer. Gracias papi por mostrarme tu esfuerzo diario y acompañarme hasta el otro lado del charco. Ustedes son mis referentes y les debo mucho más que la vida. Gracias a mis hermanos, gracias a Nico y Bochi, hombres que amo y que siempre tengo cerca. Gracias por cuidarme, guiarme y aconsejarme. Gracias a "la tía", mi reina, gracias por tus enseñanzas y tus ganas de vivir. Gracias a los maponos, Clau y Dani, que me miman y cuidan como su hija, siempre aprendo de su fortaleza. A los que tengo siempre cerca: los primos Catri y Lari, el tío Dani y la tía Mirta, desde donde estés. Gracias a toda mi familia que siempre me contienen y apoyan, los amo y feliz estoy de tenerlos.

Y a vos amor, Maxi mi fiel compañero de aventura, 14 años y contando... gracias por el apoyo incondicional, la paciencia, cuidarme, mimarme, alentarme y elegirme cada día. Gracias porque a tu lado todo es más fácil, sos mi pilar fundamental y a vos debo el nunca sentirme sola.

Quiero agradecerle también, a la Universidad Nacional de La Plata y al CONICET por las becas y financiamiento necesario para llevar a cabo este trabajo de tesis. A la Facultad de Ciencias Exactas por darme el lugar, brindarme la posibilidad de un título de grado y posgrado, por su educación gratuita y de excelente calidad. Gracias a todos los miembros del INIFTA, a todos los que hacen posible el trabajo allí diario y a los de las charlas del pasillo. Gracias también a los secretarios departamentales, de posgrado y a la secretaria de Cs. y técnica por su buena predisposición siempre.

¡A todos eternamente GRACIAS! Este fue un camino con altos y bajos, pero que seguro volvería a tomar, gracias por todo y por tanto.

Y a Dios siempre inmensamente agradecida por cruzar seres tan especiales en mi camino.

INDICE

CAPÍTULO I: Introducción, Hipótesis y Objetivos	10
I.1 INTRODUCCION GENERAL	11
I.1.1 Tejido óseo	11
I.1.1.1 Composición del tejido óseo	11
I.1.1.2 Osteogénesis	12
I.1.1.3 Estructura del hueso	13
I.1.1.4 Reparación ósea	15
I.1.1.5 Lesiones del tejido óseo y tratamiento	15
I.1.2 Tejido cartilaginoso	17
I.1.2.1 Composición del cartílago articular	17
I.1.2.2 Condrogénesis	19
I.1.2.3 Estructura del cartílago articular	19
I.1.2.4 Lesiones del cartílago articular y tratamiento	20
I.1.3 Ingeniería de tejidos	24
I.1.3.1 Células	25
I.1.3.2 Factores de crecimiento	26
I.1.3.3 <i>Scaffolds</i>	27
I.2 HIPÓTESIS	29
I.3 OBJETIVOS	30
I.3.1 Objetivo General	30
I.3.2 Objetivos específicos	30
CAPÍTULO II: Síntesis y caracterización polimérica	31
II.1 INTRODUCCIÓN	32
II.1.1 Quitosano	32
II.1.2 Polímeros fumáricos	33
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS	35
II.2.1 Reactivos y drogas	35
II.2.2 Monómeros	35
II.2.2.1 Acetato de vinilo	35
II.2.2.2 Fumarato de diisopropilo	35
II.2.3 Quitosano	36
II.2.4 Síntesis del copolímero fumárico	36
II.2.5 Hidrólisis del copolímero fumárico	37
II.2.6 Técnicas de caracterización	37
II.2.6.1 Cromatografía de exclusión molecular	37
II.2.6.2 Espectroscopia FTIR	37
II.2.6.3 Espectroscopia ¹ H-RMN	37
II.2.6.4 Análisis térmico	38
II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
II.3.1 Monómeros	39
II.3.1.1 Acetato de vinilo	39
II.3.1.2 Fumarato de diisopropilo	39
II.3.2 Quitosano	40
II.3.3 Síntesis del copolímero fumárico	41

II.3.4 Hidrólisis del copolímero fumárico	42
II.3.5 Caracterización del copolímero fumárico	43
II.3.5.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)-----	43
II.3.5.2 Espectroscopia FTIR -----	43
II.3.5.3 Espectroscopia ¹ H-RMN -----	44
II.3.5.4 Análisis térmico-----	47
II.4 CONCLUSIONES PARCIALES	50
<i>CAPÍTULO III: Diseño, caracterización y propiedades del scaffold</i>	<i>51</i>
III.1 INTRODUCCIÓN	52
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	54
III.2.1 Reactivos y drogas	54
III.2.2 Obtención de las películas	54
III.2.3 Estudio de las películas	54
III.2.3.1 Espectroscopia ATR-FTIR -----	54
III.2.3.2 Análisis térmico-----	55
III.2.3.3 Apariencia y morfología -----	55
III.2.3.4 Estudio de hinchamiento-----	55
III.2.3.5 Estudio de degradación-----	56
III.2.3.6 Pruebas mecánicas-----	56
III.2.4 Ensayos <i>in Vitro</i>	57
III.2.4.1 Cultivos celulares-----	57
III.2.4.2 Viabilidad celular -----	58
III.2.4.3 Evaluación de la capacidad osteogénica-----	59
III.2.4.4 Evaluación de la capacidad condrogénica-----	61
III.2.4.5 Evaluación de la citotoxicidad-----	62
III.2.5 Análisis estadístico.....	63
III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
III.3.1 Estudio de las películas.....	64
III.3.1.1 Espectroscopia ATR-FTIR -----	64
III.3.1.2 Análisis térmico-----	64
III.3.1.3 Apariencia y morfología -----	67
III.3.1.4 Estudio de hinchamiento-----	68
III.3.1.5 Estudio de degradación-----	70
III.3.1.6 Pruebas mecánicas-----	71
III.3.2 Ensayos <i>In Vitro</i>	73
III.3.2.1 Viabilidad celular -----	73
III.3.2.2 Evaluación de la capacidad osteogénica-----	75
III.3.2.3 Evaluación de la capacidad condrogénica-----	76
III.3.2.4 Evaluación de la citotoxicidad-----	78
III.4 CONCLUSIONES PARCIALES	80
<i>CAPÍTULO IV: Nanoestructuración del scaffold, caracterización y propiedades</i>	<i>81</i>
IV.1 INTRODUCCIÓN	82
IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
IV.2.1 Reactivos y drogas.....	84
IV.2.2 Fabricación de las plantillas de óxido de aluminio anodizado	84

IV.2.3 Infiltración de PFVH-CHI-B en las plantillas AAO	87
IV.2.4 Estudio de la nanoestructura	87
IV.2.4.1 Espectroscopía Raman Confocal	87
IV.2.4.2 Microscopía SEM	88
IV.2.4.3 Medidas de ángulo de contacto	88
IV.2.5 Estudios <i>in vitro</i> en los SN	88
IV.2.5.1 Viabilidad celular	89
IV.2.5.2 Evaluación de la capacidad osteo- y condrogénica	89
IV.2.5.3 Evaluación de la citotoxicidad	90
IV.2.6 Análisis estadístico	90
IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	91
IV.3.1 Fabricación de las plantillas de óxido de aluminio anodizado	91
IV.3.2 Infiltración de la película	92
IV.3.3 Estudio de la nanoestructura	92
IV.3.3.1 Espectroscopia Raman Confocal	93
IV.3.3.2 Apariencia y morfología	94
IV.3.3.3 Medidas de ángulo de contacto	95
IV.3.4 Estudios <i>in vitro</i> en los SN	97
IV.3.4.1 Viabilidad celular	97
IV.3.4.2 Evaluación de la capacidad osteo- y condrogénica	99
IV.3.4.3 Evaluación de la citotoxicidad	100
IV.4 CONCLUSIONES PARCIALES	103
<i>CAPITULO V: Estudios in vivo</i>	104
V.1 INTRODUCCIÓN	105
V.2 MATERIALES Y MÉTODOS	107
V.2.1 Animales	107
V.2.2 Obtención de las películas liofilizadas	107
V.2.3 Craneotomía	107
V.2.4 Postoperatorio	108
V.2.5 Estudio histomorfométrico	108
V.2.5.1 Obtención de cortes histológicos	108
V.2.5.2 Coloración histológica	108
V.2.5.3 Histomorfometría ósea	109
V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	110
V.3.1 Estudio de las películas	110
V.3.2 Estudio <i>in vivo</i>	110
V.4 CONCLUSIONES PARCIALES	114
<i>CAPITULO VI: Conclusiones generales</i>	115
REFERENCIAS	119
ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS	133
ABREVIATURAS	139
PUBLICACIONES	140

CAPÍTULO I: Introducción, Hipótesis y Objetivos



I.1 INTRODUCCION GENERAL

I.1.1 Tejido óseo

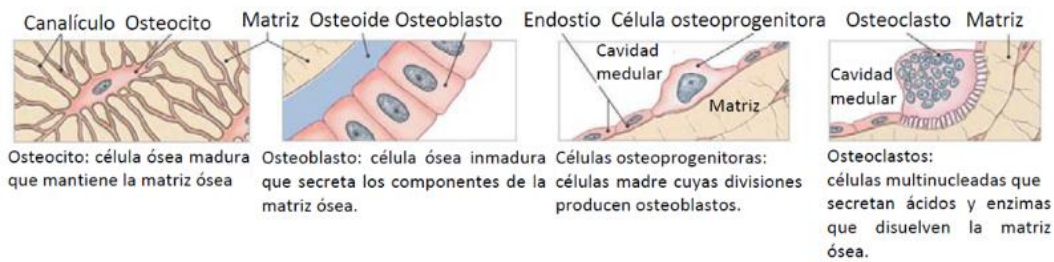
El tejido óseo, constituyente principal de los huesos, es un tejido conjuntivo especializado denso y dinámico, debido a que se encuentra en constante remodelado. Desde el punto de vista biomecánico, el tejido óseo proporciona la fortaleza necesaria al esqueleto para cumplir con su función de órgano de sostén y locomoción, dado que provee los sitios de inserción de los músculos brindando en simultáneo cierta rigidez al organismo para permitir la posición erecta. El esqueleto también tiene importantes funciones protectoras ya que rodea distintos órganos vitales como el cerebro, la médula ósea hematopoyética, órganos de la cavidad torácica y pélvica. Metabólicamente mantiene la homeostasis mineral del organismo, principalmente de calcio y fósforo [Duplomb et al., 2007]. Además, funciona como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento, y provee el microambiente para la hematopoyesis en los espacios donde se aloja la médula ósea [Clarke, 2008].

I.1.1.1 Composición del tejido óseo

El tejido óseo está compuesto por diversas células y por una matriz extracelular, cuyos principales componentes son colágeno tipo I, hidroxapatita y agua.

Dentro del componente celular que constituye el tejido óseo encontramos: osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, células de revestimiento y células osteoprogenitoras (esquema I.1); además en la médula ósea encontramos células madres mesenquimales, denominadas células progenitoras de médula ósea (CPMO) por su ubicación anatómica. Con excepción del osteoclasto, cada una de las células que constituyen el tejido óseo puede considerarse como una forma diferenciada de las células CPMO. Los osteoclastos son las células encargadas de la resorción ósea y derivan de precursores de la línea monocítica, son células grandes que tienen entre 5 y 10 núcleos por célula con citoplasma acidófilo. Los osteoblastos son los responsables de la síntesis y secreción de la matriz ósea orgánica (fibras de colágeno, proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, etc.) y además producen la fosfatasa alcalina (FAL), esta enzima favorece la deposición de fosfato de calcio, siendo su actividad uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico. Los osteoblastos son células cúbicas con citoplasma bien basófilo, pero luego de quedar rodeados por la matriz disminuyen su tamaño convirtiéndose en osteocitos alojados en espacios lagunares. Las células osteoprogenitoras presentan una morfología similar a la de los fibroblastos, con núcleos aplanados y citoplasma claro; éstas en el adulto son importantes frente a la reparación de fracturas [Ross & Pawlina, 2013]. Las células CPMO tienen la habilidad de auto-renovarse o bien pueden diferenciarse generando varios tipos celulares como el tejido cartilaginoso, óseo, y adiposo; el compromiso de las células CPMO hacia un tipo celular u otro, depende de la acción de diferentes factores de transcripción así como también de señales extracelulares e intracelulares [Spencer et al., 2011].

Esquema I.1 Células del tejido óseo. Adaptado de Martini [Martini et al., 2009]



La matriz ósea extracelular se compone por una fase orgánica (40% del peso seco) formada por fibras de colágeno tipo I en un 90%, proteoglucanos, glicoproteínas, fosfolípidos y fosfoproteínas; y el 60% restante se corresponde a sales inorgánicas compuestas en su mayor parte por depósitos de fosfato de calcio cristalino, casi idénticos a los del mineral hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ y en menor medida otros iones como carbonatos, citratos, magnesio, sodio y potasio [Fernández-Tresguerres Hernández-Gil et al., 2006]. La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso; las fibras de colágeno le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tracción mientras que las sales inorgánicas le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión del tejido óseo [Geneser, 2006].

La matriz orgánica es sintetizada por células óseas y está compuesta por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en una sustancia fundamental, formada esencialmente por proteoglucanos. Además del colágeno tipo I (Col I), proteína principal del hueso, se encuentran otros colágenos como el tipo V y en muy baja proporción el tipo II, XI y XIII. Entre las proteínas no colágenas encontramos: las proteínas glicosiladas (como la fosfatasa alcalina y la osteonectina), proteínas dependientes de vitamina K (como la osteocalcina) y glucoproteínas multiadhesivas. Las proteínas no colágenas asisten al colágeno y modulan la calcificación, por tanto desempeñan un papel importante en la osteogénesis y la remodelación ósea [Golub, 2009]. Además en el hueso encontramos citoquinas y factores de crecimiento, entre estos podemos encontrar las proteínas morfogénicas óseas (BMP), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y factores de crecimiento insulino similares (IGF), que juegan un papel importante en el mantenimiento del tejido.

La mineralización de la matriz tiene lugar en pequeñas vesículas extracelulares que poseen muchas enzimas (como la FAL) que incorporan Ca^{+2} y PO_4^{-3} . La calcificación comienza cuando los fosfatos de calcio cristalino que se encuentran nucleados en el interior de estas vesículas, crecen y, finalmente, rompen la membrana para salir de las mismas; estos fosfatos de calcio se observan al microscopio dispuestos en estructuras esféricas denominadas “nódulos mineralizados”. A partir de entonces, los fosfatos de calcio hacen contacto con las fibrillas de colágeno y continúan el proceso de mineralización a lo largo del eje longitudinal de las mismas, proceso llamado “mineralización del colágeno”. En conjunto estos procesos se conocen como “mineralización primaria asociada con la formación ósea” [Ross & Pawlina, 2013].

I.1.1.2 Osteogénesis

Los huesos del esqueleto se originan por dos procesos: osificación endocondra u osificación intramembranosa. La principal diferencia entre estos dos tipos de formación ósea radica en la ausencia o presencia de tejido cartilaginoso como intermediario. Durante la embriogénesis el desarrollo normal del esqueleto comienza con el reclutamiento y la agregación de células madre mesenquimales (MSCs, del inglés mesenchymal stem cells), dentro de estas agregaciones las células se diferencian en condrocitos en la osificación endocondral o directamente en osteoblastos en la vía de la formación ósea intramembranosa. Por medio de osificación intramembranosa se originan los huesos planos del cráneo, parte de la mandíbula y la clavícula; mientras que la mayoría de los huesos del cuerpo (huesos cortos, huesos largos, columna vertebral y huesos de la base del cráneo) se originan a partir de la osificación endocondral [Geneser, 2006].

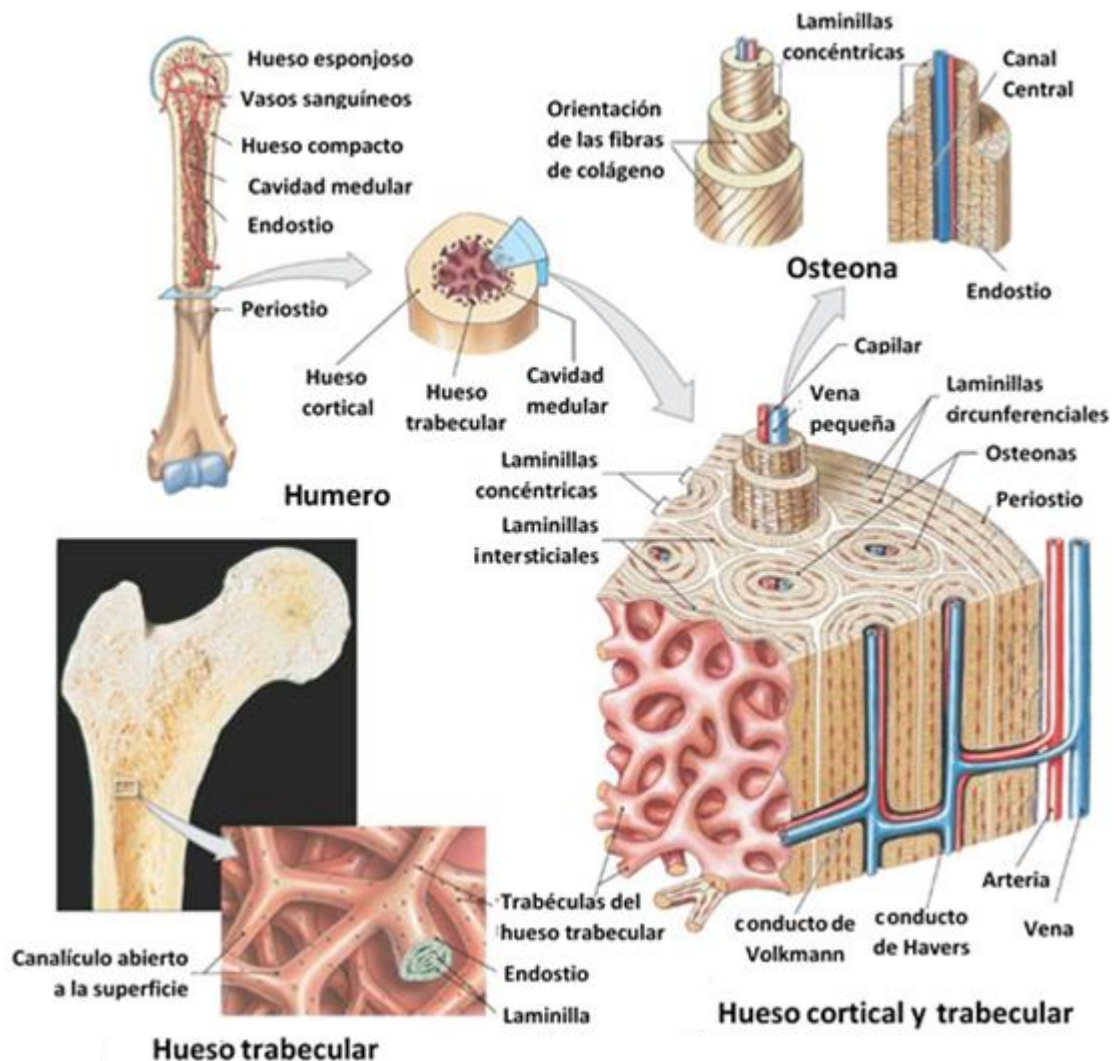
Se denomina osteogénesis al proceso de formación de tejido óseo nuevo, para que ocurra este proceso se requiere una población de células capaces de responder a estímulos moleculares que direccionen la diferenciación a células formadoras de hueso (osteoblastos), el principal regulador de este proceso es el factor Runx-2 [Dalle Carbonare et al., 2012]. En situaciones normales, además del desarrollo de tejido óseo durante la embriogénesis, la osteogénesis ocurre por el proceso de modelado y remodelado óseo. El proceso de modelado óseo, donde los huesos son esculpidos, ocurre durante el período de crecimiento y conduce al incremento constante de masa ósea; este proceso tiene como característica que la formación y resorción son independientes entre sí, con un gran predominio de la primera. Por su parte, el proceso de remodelado óseo, por el cual se reemplaza tejido óseo formado por tejido nuevo, ocurre de manera continua durante toda la vida e involucra una serie de procesos celulares dirigidos hacia la resorción ósea seguidos de una fase de formación de hueso nuevo [Duplomb et al., 2007]. Este proceso es necesario para el mantenimiento estructural y funcional de la matriz ósea mineralizada; y depende de un equilibrado acoplamiento entre la formación de hueso por parte de los osteoblastos y la reabsorción por los osteoclastos, además de una importante regulación del proceso por parte de los osteocitos [Bellido, 2014; Niedźwiedzki & Filipowska, 2015]. El remodelado óseo es un proceso importante por tres razones: en primer lugar el hueso, debido a su función de soporte estructural está sometido a fatigas que producen microfracturas que, de no ser reparadas, conducen a fallas estructurales; en segundo lugar, permite adaptar las propiedades materiales del hueso a las exigencias mecánicas variables y, por último, desempeña un papel crítico en la homeostasis del calcio debido a que representa el mayor reservorio de calcio [Dunstan et al., 2007].

I.1.1.3 Estructura del hueso

El hueso típicamente se compone por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos, como el adiposo y el hematopoyético, junto con vasos sanguíneos y nervios. Además, los huesos están cubiertos de periostio excepto en las regiones donde se articulan con otros huesos que se cubren de cartílago hialino. El periostio es una vaina de tejido conjuntivo denso (fibroso) que contiene células osteoprogenitoras; sus fibras colágenas se disponen de forma paralela a la superficie del hueso. Internamente se encuentra la cavidad medular, un espacio ubicado en la parte central del hueso que contiene la médula ósea roja encargada de la hematopoyesis y tejido adiposo.

El tejido óseo se puede clasificar, según su estructura, en cortical (o compacto), que constituye cerca del 80% del total del esqueleto, y trabecular (o esponjoso), que corresponde al 20% restante. Mientras que el hueso cortical es casi sólido y posee un 10% de porosidad, el hueso trabecular posee una porosidad que varía entre el 50-90%, y presenta una estructura esponjosa formada por las trabéculas, que se entrecruzan en distintas direcciones formando el reticulado, entre las cuales queda contenida la médula ósea. Todos los huesos tienen componente cortical y trabecular, aunque las proporciones varían en los diferentes huesos del organismo o incluso entre regiones de un mismo hueso [Clarke, 2008]. El tejido que reviste tanto el hueso compacto que limita la cavidad medular como las trabéculas del hueso esponjoso se denomina endostio; el mismo consiste en una capa de células osteoprogenitoras que se pueden diferenciar a osteoblastos o células de revestimiento, bajo el microscopio óptico suele ser difícil diferenciar entre éstas últimas y las células osteoprogenitoras porque ambas son de forma aplanada y núcleo alargado [Ross & Pawlina, 2013]. Además, el endostio también tapiza los conductos que se encuentran en el interior del tejido (conductos de Havers y de Volkmann) [Geneser, F., 2006].

Esquema I.2 Estructura del tejido óseo. Adaptado de Martini [Martini et al., 2009]



El hueso cortical está compuesto por una unidad estructural llamada osteona cortical o sistema de Havers, éstas consisten en laminillas concéntricas de matriz ósea que rodean a un conducto central, conducto de Havers, por el que transcurren vasos sanguíneos y nervios. Estos conductos se comunican entre sí a través de conductos perpendiculares a las osteonas, los conductos de Volkmann, por los que también transcurren vasos sanguíneos y nervios. En las laminillas hay espacios denominados lagunas donde se alojan osteocitos. Estas células óseas poseen numerosas prolongaciones que transcurren por espacios en la matriz ósea, denominados canalículos, que permiten establecer comunicación con otras lagunas y también con los conductos de Havers y Volkmann. Entre las osteonas se encuentran zonas de tejido óseo irregular, denominadas laminillas intersticiales, que corresponden a restos de laminillas concéntricas degradadas. Por fuera de la osteona, y siguiendo la circunferencias externas e internas de la zona central de los huesos largo, se encuentran también laminillas denominadas circunferenciales (esquema I.2).

I.1.1.4 Reparación ósea

El tejido óseo es el único tejido capaz de repararse a sí mismo sin dejar cicatrices, desde el momento en que se produce el daño [Liu et al., 2010]. El restablecimiento del hueso como consecuencia de una lesión o fractura se asemeja mucho al proceso de osteogénesis normal del esqueleto, aunque difiere en algunos aspectos tales como la inflamación y el aumento de fuerzas mecánicas en los adultos [Hutchinson et al., 2007]. La reparación de los daños se puede dividir en etapas secuenciales que involucran varios tipos celulares y factores de crecimiento. Una primera etapa involucra una repuesta inflamatoria, con la formación de un hematoma que es seguido por una cascada pro-inflamatoria que involucra la liberación de distintos tipos de citoquinas, como IL-1, IL-6 y TNF- α , de manera temporal y especialmente regulada durante la primer semana después del daño [Mountziaris & Mikos, 2008]. Luego células osteoprogenitoras cercanas al sitio de la lesión, expresan y liberan proteínas morfogénicas óseas (BMP), que junto con la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias, reclutan más células mesenquimales. Si la fractura es mecánicamente estable, las células osteoprogenitoras se diferencian a osteoblastos para regenerar el hueso pero si la fractura es inestable se diferencia a condrocitos para formar una capa de colágeno que actúa como puente entre los extremos de la fractura, constituyéndose así lo que se conoce como callo blando; luego es calcificado para formar un callo óseo y posteriormente se remodela para formar hueso laminar [Deschaseaux et al., 2009; Liu et al., 2010]. En este proceso de reparación participan coordinadamente diferentes tipos celulares (células osteoprogenitoras, fibroblastos, macrófagos, condroblastos, osteoblastos, osteoclastos) así como vías moleculares de señalización involucradas (proteínas inflamatorias, factores de crecimiento (TGF- β e IGF), BMP, y factores angiogénicos, entre otros) [Deschaseaux et al., 2009].

I.1.1.5 Lesiones del tejido óseo y tratamiento

En las últimas décadas hay un aumento en la incidencia de las lesiones en hueso, que se dan como consecuencia de una población cada vez más senil, enfermedades degenerativas, fallas terminales o accidentes traumáticos, que comprometen de manera significativa la calidad de vida resultando en un creciente problema socio-económico [Lorentzon & Cummings, 2015]. Las lesiones más frecuentes en el tejido óseo son las

fracturas. Las lesiones óseas comprometen principalmente el rol biomecánico del hueso afectado. A pesar de que el hueso es capaz de repararse a sí mismo, existe un gran número de situaciones en las cuales los mecanismos de reparación ósea no pueden llevarse a cabo; por ejemplo, si las lesiones son extensas, como en grandes fracturas, por tumores o malformaciones congénitas; en esos casos, se debe recurrir a una intervención quirúrgica para reparar los huesos dañados [Khan et al., 2008]. Estas lesiones se pueden tratar con implantes de tejido autólogo (tejido del mismo paciente), alogénico (tejido de un donante de la misma especie) o xenogénico (tejido de un organismo de una especie diferente a la del receptor), o implantando materiales como sustitutos para la estabilización mecánica de la herida [Estrada et al., 2006].

A la hora de calificar un sustituto óseo hay una lista de requisitos biológicos fundamentales a evaluar; estos incluyen: a) la biocompatibilidad: actividad celular normal y falta de respuesta inmunogénica; b) la osteogénesis: capacidad para generar hueso a partir de las células contenidas en el injerto; c) la osteoconducción: capacidad de servir como molde para la incorporación de capilares y células osteoprogenitoras; d) la osteoinducción: capacidad de inducir la progresión de células MSCs y células osteoprogenitoras hacia el linaje de osteoblastos; y e) la osteointegración: el tejido mineralizado recién formado debe ser capaz de formar una unión íntima con el material del implante [Khan et al., 2008].

El implante de hueso es un tratamiento comúnmente utilizado para sustituir el defecto del esqueleto. Para ello se prefiere el hueso trabecular por poseer un efecto osteoinductivo mucho más pronunciado que en el hueso cortical, dada su elevada porosidad que permite que el tejido que rodea al injerto se vascularice en cuestión de semanas y el hueso nuevo crezca en cuestión de meses. El trasplante de hueso autólogo suele ser el más exitoso (buena osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis) pero a menudo existe el problema de que el suministro sea inadecuado por la baja disponibilidad y por la falta de forma y geometría deseada, lo que lleva al uso de aloinjerto óseo como alternativa. Además, para este tipo de trasplante, se requieren dos intervenciones sobre el paciente: una para extraer el hueso autólogo y otra para injertarlo en la lesión, lo que conduce a un aumento en la morbilidad del paciente, en el riesgo a infecciones y de los costos. El aloinjerto es normalmente osteoconductor y osteoinductivo pero no osteogénico; además posee las desventajas de problemas en transmisión de enfermedades, costos elevados, doble cirugía (paciente y donador) y escases de donantes. Los xenoinjertos por su parte no son osteogénicos ni osteoinductivos, suelen generar reacciones inflamatorias, transmisión de enfermedades y costos elevados. Por otro lado, en el caso del empleo de prótesis artificiales estas ayudan a cumplir el rol mecánico del tejido pero no cumplen con ninguno de los requisitos biológicos. Además de estos motivos, su éxito se ve limitado por la calidad de hueso remanente, la posibilidad de rechazo por parte del paciente, infecciones debidas al mal procedimiento quirúrgico y la durabilidad de las mismas [Fuchs et al., 2001]. Debido a esto, se buscan otras alternativas de terapias sobre todo para pacientes jóvenes.

En este contexto, frente a las desventajas de las terapias médicas actuales para el tratamiento de lesiones del tejido óseo, surge la ingeniería de tejidos como una alternativa para generar sustitutos biodegradables que puedan actuar como un sustituto temporal en los sitios defectuosos, con el fin de soportar y estimular la regeneración de tejido óseo

mientras se degradan gradualmente y son reemplazadas por tejido nuevo. Unos de los principales desafíos de la ingeniería del tejido óseo es desarrollar un *scaffold* que cumpla con la lista de requisitos biológicos detallada anteriormente y además con otras consideraciones generales de diseño que pueden alterar la idoneidad del mismo para su aplicación prevista, como la rugosidad superficial, biodegradabilidad, integridad mecánica y la porosidad general de la matriz [Khan et al., 2008; Bose et al., 2012].

I.1.2 Tejido cartilaginoso

El tejido cartilaginoso es un tejido conjuntivo avascular compuesto por condrocitos y una matriz extracelular (MEC) abundante, la misma se corresponde con más del 95% del volumen del cartílago. Dependiendo de la composición de la MEC este tejido se clasifica en cartílago elástico, fibrocartílago y cartílago hialino. El cartílago elástico contiene haces de elastina dispersos en la MEC que le proporcionan rigidez y elasticidad al tejido; se encuentra en el pabellón auricular y en la epiglotis. El fibrocartílago contiene una MEC fibrosa rica en colágeno de tipo I y se encuentra en aquellas zonas que requieren amortiguación, por ejemplo formando los discos intervertebrales o los meniscos articulares. Por su parte, el cartílago hialino posee una MEC rica en fibras de colágeno tipo II y el proteoglicano agregán, y se localiza en las epífisis de los huesos que forman las articulaciones, en los extremos ventrales de las costillas, en la laringe, la tráquea y los bronquios. El cartílago hialino que se encuentra cubriendo las articulaciones sinoviales (móviles) recibe el nombre de cartílago articular y carece de pericondrio. Las funciones principales del cartílago articular son proveer de un bajo coeficiente de fricción durante el movimiento entre los extremos óseos para soportar y distribuir las cargas mecánicas sobre toda la superficie de contacto [Ross & Pawlina, 2013].

I.1.2.1 Composición del cartílago articular

La composición de la MEC permite que el tejido funcione en los rigurosos entornos mecánicos de las articulaciones, como la rodilla, la cadera y el tobillo; en donde está expuesto a diferentes cargas mecánicas como fuerzas de compresión, tensión y cizallamiento. El cartílago es un tejido con una baja relación células-MEC. Los condrocitos representan el único componente celular del tejido, residen en lagunas y constituyen aproximadamente entre el 2-5% del volumen total del cartílago. Los condrocitos maduros presentan una limitada capacidad para proliferar y su función se basa sobre todo en ayudar a mantener la integridad de la superficie articular mediante actividades sintéticas y catabólicas [Martin et al., 2013]. La MEC del cartílago hialino constituye más del 95% de su volumen; siendo su contenido en peso: 70-80% de agua, 15% de colágenos totales y 6% de proteoglicanos, aproximadamente. Sin embargo, los porcentajes de colágeno y proteoglicanos, así como el grado de sulfatación de estos últimos, varían según la zona en que se encuentre dentro del tejido y la edad del individuo [Athanasίου et al., 2009]. Esta mezcla de colágenos y proteoglicanos forma una red integrada que permite la hidratación del tejido y le provee las propiedades mecánicas observadas para este tejido.

El colágeno desempeña un papel primordial en la estructura del hueso y cartílago; se compone de tres cadenas polipeptídicas, denominadas α , las cuales se enrollan entre sí para formar una triple hélice. En asociación con la hélice hay grupos sacáridos que son los responsables de la clasificación del colágeno como glucoproteína. Las cadenas α no son

todas igual, sus diferencias y sus combinaciones halladas han llevado a categorizar 28 tipos de colágenos en el organismo. Por su parte, el colágeno tipo II está formado por tres cadenas α entrelazadas idénticas (homotrímico) y es predominante en el cartílago hialino, constituye alrededor del 80% del colágeno total el cual comprende más de la mitad del peso seco del tejido. Esta es una proteína fibrilar, sus fibras muy finas se alinean de acuerdo con la dirección de la carga soportada por el cartílago, proporcionando rigidez. El colágeno tipo X también es un homotrímico producido por los condrocitos. Su función es organizar las fibrillas de colágeno tipo II, IX y XI en una red hexagonal tridimensional en la zona calcificada del cartílago articular, ayudando a la mineralización entre el cartílago y el hueso subyacente. En este tejido encontramos también, pero en menor proporción, colágeno tipo VI, IX, y XI [Eyre et al., 2002; Ross & Pawlina, 2013].

Los proteoglicanos son otro componente principal de la MEC del cartílago y están compuestos por una cadena central proteica a la cual se unen de manera perpendicular los glicosaminoglicanos (GAG). Los GAG son hidratos de carbono formados por unidades repetidas de disacáridos, por lo general altamente sulfatados; en el cartílago articular se encuentra: condroitín sulfato, queratán sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato y el hialuronato (o ácido hialurónico). Los GAG poseen carga negativa por lo que se repelen entre sí pero atraen iones con carga positiva (como Ca^{+2} y Na^{+}) y agua, asegurando sus principales características funcionales de absorción de agua y ayudando al mantenimiento de las propiedades mecánicas y de hidratación de la MEC [Carballo et al., 2017]. El proteoglicano más importante del cartílago articular es el agregán, compuesto por una proteína central de 210 a 250 kDA que contiene varios dominios globulares donde se unen los GAG. Los polisacáridos dominantes en esta macromolécula son el condroitín sulfato y el queratán sulfato. El hialuronato se une no covalentemente mediante proteínas de enlace con una gran cantidad de agregán para formar grandes aglomeraciones de proteoglicanos. Estas aglomeraciones están unidas a su vez con fibras de colágeno de la MEC por interacciones electroestáticas y glucoproteínas multiadhesivas, creando así una estructura molecular entrecruzada resistente a las fuerzas de tensión. La formación de estas aglomeraciones con muchos proteoglicanos mantiene la distancia entre las células y le confiere al tejido la resistencia característica para una funcionalidad adecuada frente a las fuerzas de compresión. Otros proteoglicanos de menor peso molecular presentes en el cartílago son la decorina y la fibromodulina, que también están compuestos por proteínas centrales con diversas especies de GAG unidos pero no forman aglomeraciones. Estos se unen con otras moléculas y contribuyen a estabilizar la matriz [Athanasίου et al., 2009; Ross & Pawlina, 2013].

A lo largo de la vida, el cartílago sufre un continuo remodelado interno conforme los condrocitos reemplazan moléculas de la MEC que se pierden por degradación. Este recambio depende de la capacidad de estas células de sentir los cambios en la composición de la MEC y, de este modo, la matriz actúa como un transductor de señales para los condrocitos inmersos en ella. Así, las compresiones aplicadas al cartílago, crean señales mecánicas, eléctricas y químicas que controlan las síntesis de las moléculas de la MEC por parte de los condrocitos. A medida que el organismo envejece, la composición de la MEC cambia y los condrocitos pierden su capacidad de responder a estos estímulos [Ross & Pawlina, 2013].

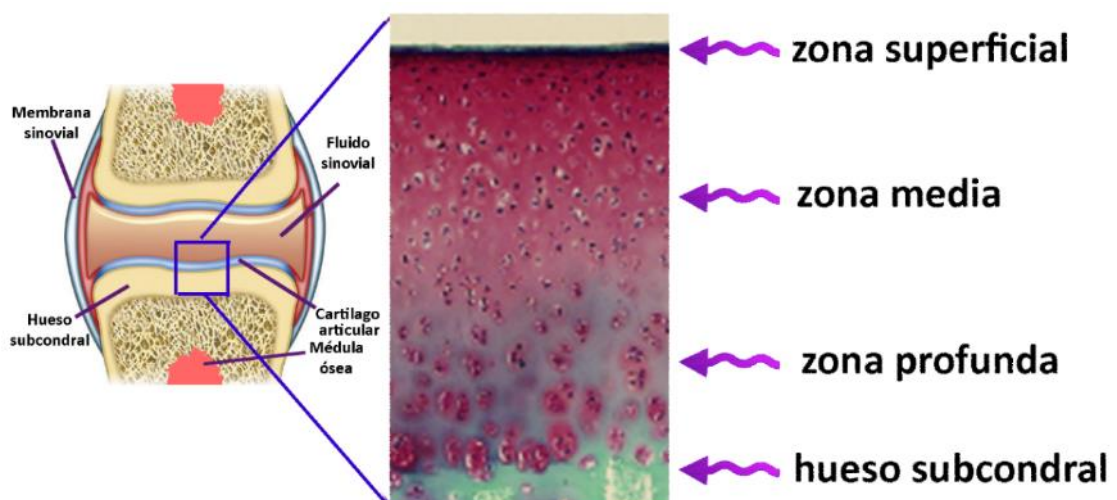
I.1.2.2 Condrogénesis

La mayor parte del cartílago se origina a partir de condensaciones de células MSCs, durante el desarrollo embriológico [Karsenty et al., 2009]. Este proceso se inicia con el reclutamiento de las células MSCs hacia el sitio donde posteriormente se originarán los elementos del esqueleto. Las células entonces migran originando una condensación celular, esta agregación facilita la regulación selectiva de genes específicos para la condro u osteogénesis [Hall & Miyake, 2000]. Un aumento en la expresión del factor de transcripción SOX-9 desencadena en estas células la diferenciación a condroblastos, los cuales secretan una MEC rica en proteoglicanos y colágeno tipo II. Cuando la matriz rodea a estas células completamente reciben el nombre de condrocitos, formando así un molde cartilaginoso. Este molde cartilaginoso sufre posteriormente un proceso de osificación para dar paso a la formación de la mayor parte de los huesos del cuerpo humano, excepto en los extremos (zonas articulares) donde persistirá como cartílago articular [Bobick & Kulyk, 2008]. La diferenciación de las células MSCs a condrocitos durante la condrogénesis es modulada por factores de transcripción que controlan la expresión de las principales proteínas que componen la MEC del cartílago articular [Karsenty & Wagner, 2002]. Dentro de estos se destacan el SOX9, L-Sox5 y Sox6, que son factores de transcripción esenciales para la diferenciación de condroprogenitores y regulan la expresión de colágeno tipo II, IX y XI, y agregan [Demoor et al., 2014].

I.1.2.3 Estructura del cartílago articular

La zona osteocondral es la zona interfacial entre el hueso y el cartílago articular, que está altamente organizada y desempeña un papel crítico en el mantenimiento de estos tejidos [Seo et al., 2014]. La región más importante es la capa del cartílago articular, en los adultos mide entre 2 y 5 mm de espesor y se puede dividir en cuatro zonas como se muestra en el esquema I.3, según la disposición de cada componente.

Esquema I.3 Estructura del cartílago articular



La primera es la zona superficial muy delgada, que constituye el 10-20% superior del cartílago articular, es resistente a la compresión y está en contacto con el fluido sinovial. Esta zona contiene abundantes condrocitos alargados y aplanados rodeados por una condensación de fibras de colágeno II distribuidas de forma paralela a la superficie. Las

células encontradas en esta zona secretan proteínas especializadas que pueden facilitar las propiedades de fricción del tejido [Flannery et al., 1999]. Además, la zona superficial tiene una pequeña cantidad de proteoglicanos, baja permeabilidad y alta lubricación. La segunda zona es la zona media, que consiste en el siguiente 40-60% hacia abajo, se caracteriza por tener abundante cantidad de proteoglicanos, bajo número de condrocitos con forma redondeada y fibras de colágeno tipo II menos organizadas orientadas al azar en forma de arco. Esto le otorga al tejido un módulo de compresión alto, lo que permite una buena recuperación frente a los impactos que soportan las articulaciones. A continuación encontramos la zona profunda donde tanto las células como las fibras de colágeno están orientadas perpendicularmente a la superficie, y las fibras están ancladas al hueso subcondral subyacente. Las células en esta zona son ligeramente alargadas, pequeñas y a menudo se agrupan en una organización columnar. Esta zona tiene también un módulo de compresión alto, pero tiene menos proteoglicanos que la zona media y menos densidad celular que las zonas anteriores. La zona profunda se separa con la zona calcificada por una línea muy delgada llamada "*tidemark*" o marca de marea que tiene una importante función biomecánica al adaptarse a las microlesiones [Madry et al., 2010]. Esta zona tiene una pequeña cantidad de células, y las fibrillas de colágeno de la zona profunda atraviesan esta área. En la renovación del cartílago articular los condrocitos migran desde esta región hacia la superficie articular libre. La zona calcificada posee condrocitos pequeños y es esencial en su papel de transición entre el cartílago flexible y el hueso subcondral rígido, porque permite minimizar el gradiente de rigidez entre estos tejidos [Athanasίου et al., 2009; Nukavarapu & Dorcenus, 2013; Ross & Pawlina, 2013].

A continuación del cartílago calcificado encontramos el hueso subcondral. Esta lámina ósea es una masa sólida de hueso con espesores variables de entre 0,2 a 0,4 mm en los seres humanos. La trabécula del hueso subcondral está altamente vascularizada y contiene nutrientes tanto para sí mismo como para el cartílago articular adyacente. Las funciones principales del hueso subcondral son: dar soporte al cartílago articular, distribuir la carga mecánica a la diáfisis cortical subyacente, absorber la tensión de los impactos mecánicos continuos y nutrir las capas profundas del cartílago hialino, especialmente en el período de crecimiento. Aunque el cartílago articular proporciona una cierta resistencia a la compresión, el hueso subcondral proporciona la mayor parte de la amortiguación de la articulación, ya que es más grande en área y tiene un módulo de elasticidad relativamente bajo. Sin embargo, dado que el grosor y la densidad de la placa ósea subcondral no es uniforme en todas partes, la resistencia mecánica real en diferentes puntos de la articulación varía [Nukavarapu & Dorcenus, 2013].

I.1.2.4 Lesiones del cartílago articular y tratamiento

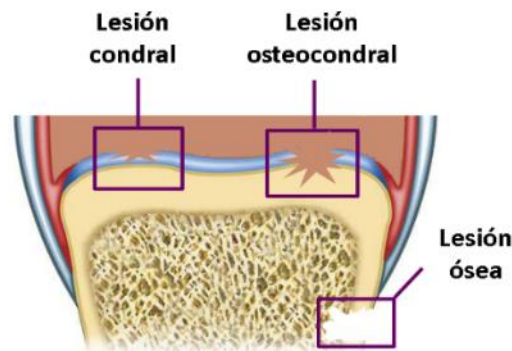
La integridad del cartílago articular se mantiene mediante la liberación regulada de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas producidas por los condrocitos (tabla I.1), que a su vez regulan la división celular y la síntesis de la MEC [Athanasίου et al., 2009; Vinatier et al., 2009; Panseri et al., 2012; Demoor et al., 2014]. Cuando el cartílago articular se lesiona, tiene una capacidad muy limitada de auto-reparación, debida a que no es penetrado por vasos sanguíneos ni linfáticos, tiene una baja relación célula-MEC y a que los condrocitos maduros tienen una actividad metabólica relativamente baja. Cada una de estas cualidades deja al cartílago articular adulto altamente susceptible al daño mientras que el tiempo progresa [Athanasίου et al., 2009].

Tabla I.1 Factores involucrados en el desarrollo y mantenimiento del tejido cartilaginoso

Familia de factores	Sigla	Función
<i>Factores transformantes del crecimiento tipo beta</i>	TGF-β	Intervienen en la reparación y la respuesta inflamatoria después de una lesión. Favorecen la síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos. Estimulan la condrogénesis y proliferación de las MSCs e inhiben la osificación endocondral.
<i>Proteínas morfogénicas óseas</i>	BMP	Desempeñan un papel esencial en la condrogénesis y la osteogénesis durante el desarrollo esquelético. Tiene efectos condrogénicos a dosis bajas y efectos osteogénicos a altas concentraciones. Además de efectos positivos en la maduración de los condrocitos.
<i>Factores del crecimiento de fibroblastos</i>	FGF	Regulan la mitosis, la diferenciación y expresión génica en varios tipos de células. Tienen efectos negativos sobre el depósito y acumulación de matriz extracelular. Promueven las actividades anabólicas y catabólicas en los condrocitos.
<i>Factores de crecimiento insulino similares</i>	IGF	Juega un rol muy importante en el mantenimiento del esqueleto y en la formación del hueso y cartílago. En particular para la homeostasis del cartílago, estimula la síntesis de proteoglicanos, promueve la supervivencia y la proliferación de condrocitos; y también induce la condrogénesis en MSCs.
<i>Factor de crecimiento epidermal</i>	EGF	Estimula de forma sinérgica la síntesis de proteoglicanos. Induce la proliferación de los condrocitos.
<i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas</i>	PDGF	Facilita el depósito de proteoglicanos, pero con menor eficiencia que los otros factores.

Las lesiones de este tejido pueden agruparse entre las lesiones que afectan sólo al cartílago (lesión condral) o aquellas que afectan a todo el espesor del cartílago hasta penetrar en el hueso subcondral (lesión osteocondral) (esquema I.4). Dentro de las primeras podemos encontrar las lesiones que alteran y deterioran la MEC del tejido. En este tipo de heridas los condrocitos viables restantes aumentan su actividad sintética y reparan las zonas afectadas. También, dentro de este grupo, están las alteraciones en el espesor del cartílago que generan fisuras en la superficie del cartílago; y por lo explicado anteriormente, la reparación será limitada. En los casos de las lesiones que involucran defectos osteocondrales; se accede a las células madres de la médula ósea, incluyendo las células madre mesenquimales, y también factores de crecimiento y citoquinas. Sin embargo, la respuesta de reparación típicamente conduce a la formación de fibrocartílago en el vacío del defecto [Mano & Reis, 2007]. Este tejido fibroso no tiene las mismas propiedades que el cartílago original, en especial por sus características mecánicas, ya que es más permeable y menos rígido, lo que genera un cartílago más propenso a la degradación con el tiempo. Por tanto, es necesario encontrar opciones terapéuticas apropiadas para reparar estas lesiones osteocondrales y para tal fin deben tenerse en cuenta las necesidades tanto del cartílago como las del hueso y las de la interfaz hueso-cartílago.

Esquema I.4 Lesión osteocondral



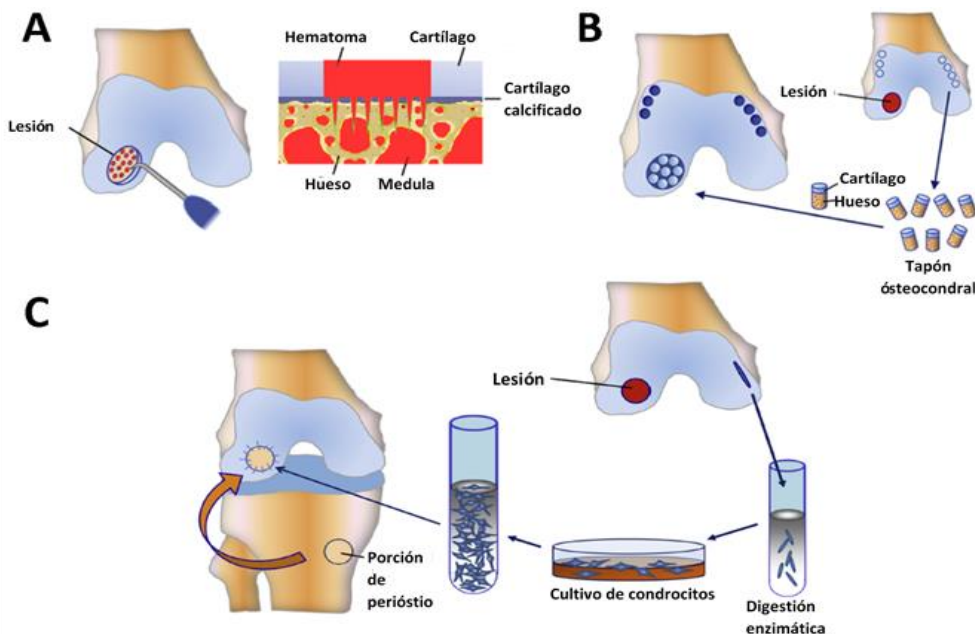
Las lesiones osteocondrales están ocasionadas con frecuencia por lesiones traumáticas, tumores o desgaste, lo que conlleva a la disfunción de la articulación. En este tipo de lesiones la pérdida de cartílago articular expone al hueso subcondral subyacente a las diversas fuerzas circundantes [Moisio et al., 2009]. Además, debido al hecho de que el hueso subcondral contiene terminaciones nerviosas libres no mielinizadas, esta área es una fuente de generación de dolor en las lesiones osteocondrales [Burr, 2004]. La osteoartritis es la patología degenerativa más frecuente del cartílago articular, que afecta tanto a los condrocitos como a la MEC, e involucra también la sinovia, la cápsula articular y el hueso subcondral. La osteoartritis representa una carga económica para el sistema sanitario y un problema de salud pública. Se ha reportado que la osteoartritis sintomática afecta al 9,6% de los hombres y al 18% de las mujeres mayores de 60 años, que manifiestan limitación en sus actividades. Además, se especula que en el año 2020 será la cuarta causa de discapacidad a nivel mundial [Woolf & Pfleger, 2003].

Antiguamente, las lesiones del cartílago articular se dejaban evolucionar hasta llegado el momento de realizar una sustitución articular; en los últimos años, se ha producido un cambio de paradigma, dado que lesiones aisladas y no tratadas del cartílago hialino articular pueden llevar a un daño grande del tejido y concluir fácilmente en el desarrollo de enfermedades degenerativas del tejido cartilaginoso, como osteoartritis temprana [Sgaglione et al., 2002; Gründer et al., 2004]. El tratamiento de las lesiones del cartílago depende de varios factores, por ejemplo, del tamaño de la lesión, disponibilidad de tratamiento particular, edad y los requisitos del paciente [Panseri et al., 2012; Abdel-Sayed & Pioletti, 2015]. Actualmente, en lesiones menores a 2,5 cm² se utilizan las técnicas de condroplastías, microfractura y mosaicoplastía. La condroplastía se realiza cuando la lesión es de espesor parcial, es decir, que no compromete a todo el espesor del cartílago; la misma consiste en regularizar la superficie del cartílago cuando esta se encuentra irregular y con fragmentos inestables. La microfractura consiste en realizar pequeños orificios en el cartílago hasta perforar el hueso subcondral para que las células madres mesenquimales, provenientes de la médula ósea, migren hacia la superficie de la lesión y se diferencien a condrocitos para reparar la zona lesionada (esquema I.5 A); esta técnica al igual que la anterior se realiza sólo para lesiones pequeñas. En cambio, la mosaicoplastia es una técnica más sofisticada y se utiliza en lesiones de espesor total o de tamaño mediano. Esta consiste en tomar pequeños cilindros de tejido sano, de la misma u otra articulación del paciente, e insertarlos en pequeñas perforaciones previamente realizadas en la zona afectada para que el tejido cartilaginoso se regenere (esquema I.5 B). Pero

debido a la limitada disponibilidad de tejido donante y a la morbilidad inducida en el sitio donante, el límite de tamaño recomendado de la zona dañada es sólo de unos 2 cm².

Para lesiones mayores a 2,5 cm², se utiliza implante de condrocitos y/o trasplante de tejidos osteocondrales. El implante de condrocitos autólogos consiste en aislar enzimáticamente condrocitos articulares sanos de una pequeña porción de cartílago extraída del paciente. Estas células se expanden *in vitro*, hasta que existe un número suficiente para asegurar una cicatrización adecuada, y por último son reinsertadas en el sitio de la lesión debajo del periostio (esquema I.5 C). Desde el punto de vista quirúrgico, la principal limitación de esta técnica está relacionada con el mecanismo de fijación del injerto; este problema se vuelve aún más relevante cuando se deben tratar defectos osteocondrales grandes [Cancedda et al., 2003]. Otra alternativa es el trasplante de tejidos, consiste en aislar pequeñas porciones de tejido y ajustarlos a presión dentro de perforaciones en el lugar de la lesión para producir tejido cartilaginoso; este tejido puede ser autólogo, alogénico o xenoinjerto (como se explicó para el trasplante óseo). Aunque con esta técnica se disminuyen los problemas relacionados con la integración del injerto, las complicaciones como infecciones, falla en la integración o rechazo son muy frecuentes; y la principal limitante de este tipo de procedimientos es la disponibilidad, compatibilidad del tejido del donante y la obtención de un fragmento de tamaño y forma adecuados. Además, tanto el paciente como el donante se exponen a un alto riesgo de morbilidad e infección posteriores a la intervención quirúrgica, lo cual puede causar daño en la articulación afectada.

Esquema I.5 Representación de la A) Microfractura, B) Mosaicoplastia y C) implantes de condrocitos autólogos. Adaptado de Hunziker [Hunziker et al., 2015]



Para lesiones de mayor tamaño se requiere en la actualidad el uso de prótesis artificiales para reemplazo de la zona dañada. Las prótesis, por lo general, eliminan el dolor pero restablecen sólo en forma parcial la funcionalidad. Por eso, es importante identificar procedimientos alternativos para reparar, de forma permanente, las lesiones del cartílago

y grandes defectos óseos o, por lo menos, para retrasar el implante de una articulación artificial.

Los tratamientos mencionados son deficientes e inconsistentes en la reparación a largo plazo; por otra parte, también presentan efectos secundarios indeseables y los tratamientos se limitan generalmente a lesiones pequeñas, lo que hace que el resultado sea habitualmente inadecuado [Frenkel & Di Cesare, 2004; Gomoll et al., 2010; Hunziker et al., 2015]. Por tanto, se continúa en la búsqueda de opciones terapéuticas, donde la ingeniería de tejidos ha incursionado en el diseño y construcción de *scaffolds*, con fines terapéuticos para estimular la recuperación del tejido osteocondral.

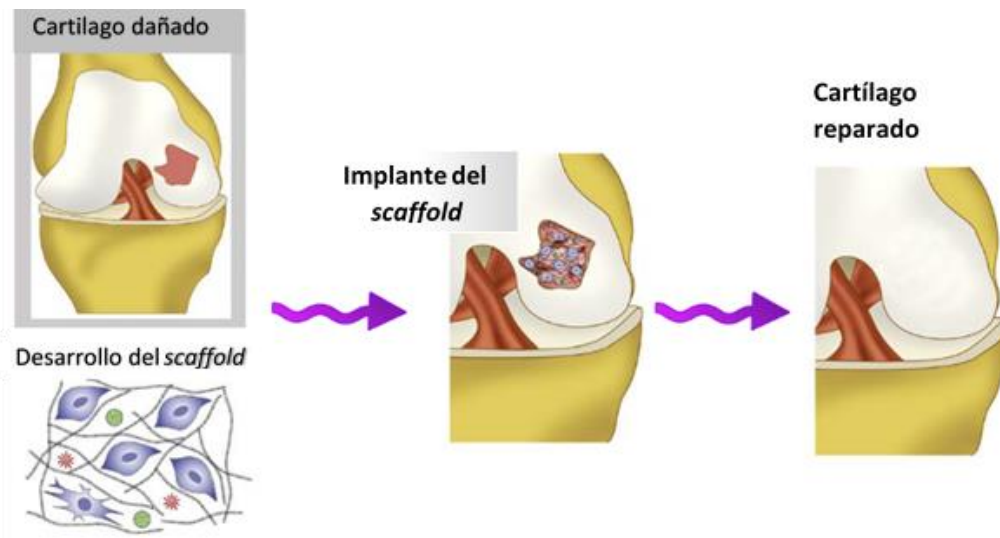
I.1.3 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que aplica principios y métodos de la ingeniería de los materiales y la biología molecular para el diseño y desarrollo de materiales funcionales en los que se pueda sembrar células y posteriormente crear sustitutos biológicos que restauren/repáren, mantengan o mejoren la función biológica de un tejido u órgano dañado [Shalak & Fox, 1988]. El enfoque que plantea la ingeniería de tejidos evita muchos de los inconvenientes de las técnicas de implantes, como son la escasez de donantes de tejidos y órganos, la morbilidad del sitio donante (en caso de donantes vivos), el rechazo inmunológico y la transferencia de patógenos. Langer y Vacanti reportaron que el enfoque más común hacia el desarrollo de sustitutos biológicos está basado principalmente en tres componentes: las células, los factores de crecimiento y los *scaffolds* [Langer & Vacanti, 1993]. Se utiliza el término “*scaffolds*” para nombrar a las matrices tridimensionales que ayudan, no sólo a controlar la liberación de los factores de crecimiento y el contenido celular, sino que también proporcionan un soporte estructural para rellenar el sitio de la lesión.

Los resultados acumulados hasta este momento han demostrado que la estrategia basadas en el uso de *scaffolds* para ingeniería de tejidos tiene potencial para ser utilizada en la regeneración de una serie de tejidos y órganos [Atala, 2007; Zhang & Webster, 2009; Bose et al., 2012; LogithKumar et al., 2016; Rai et al., 2017] y, en particular, es una alternativa prometedora para la reparación de lesiones osteocondrales, ya que podría utilizarse para regenerar tanto el hueso subcondral y el cartílago articular así como la interfaz hueso-cartílago. El esquema I.6 es una representación esquemática “ideal” del implante de un *scaffold* a medida sobre una lesión en el cartílago; el mismo está cargado con células crecidas *ex vivo* y factores de crecimiento específicos asociados con la reparación de la lesión osteocondral. Luego de la maduración del injerto e integración en el tejido lo que se busca lograr es la restauración del cartílago intacto en el paciente.

Como se comentó, el enfoque más común de la ingeniería de tejidos está basado principalmente en tres componentes: las células, los factores de crecimiento y los *scaffolds* [Langer & Vacanti, 1993].

Esquema I.6 Representación de un implante en ingeniería de tejido cartilaginoso.
Adaptado de Vinatier [Vinatier et al., 2009]



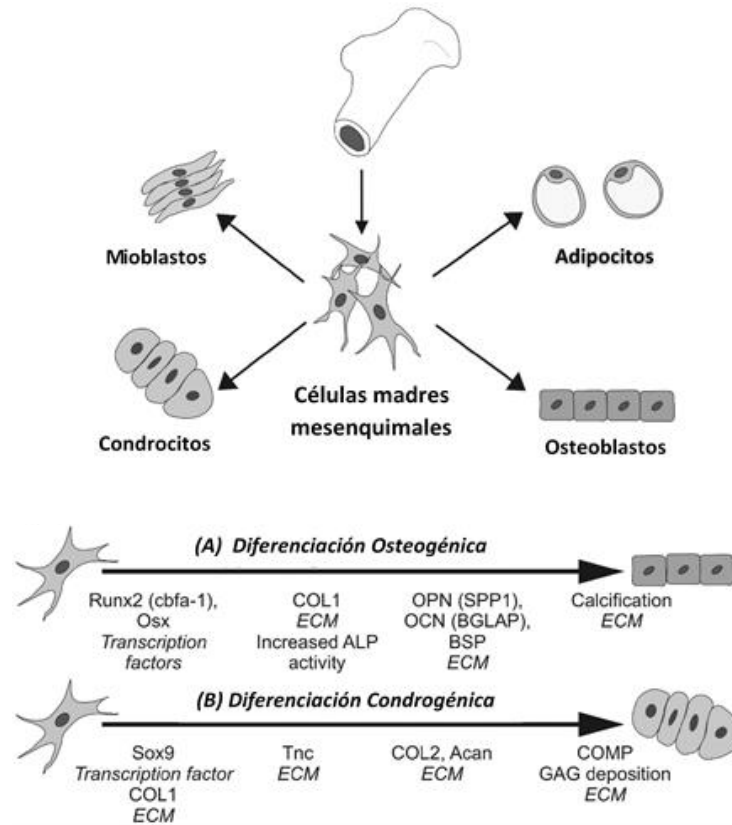
I.1.3.1 Células

En la ingeniería de tejido se suele agregar células a los *scaffolds ex vivo* para favorecer la restauración de la lesión a tratar; para esto se pueden aislar células propias del paciente, las cuales se crecen sobre el *scaffold* que luego se va a implantar en el sitio a reparar. La elección de una fuente celular adecuada es crítica en cualquier estrategia de ingeniería de tejidos. En particular, la reparación de lesiones osteocondrales está limitada por la necesidad de crecimiento y función de dos tejidos diferentes, el cartilago y el hueso. Algunos de los enfoques reportados para este tipo de lesión utilizan sólo condrocitos, en la región del *scaffold* que se integrarán con el cartilago [Moriyama et al., 2002; Guo et al., 2004; Li et al., 2006]; mientras que otros, especialmente en defectos grandes, emplean *scaffolds* sembrados con células tanto osteoprogenitoras como condroprogenitoras, como son las células MSCs, para lograr una integración mejorada con los tejidos del huésped y la restaurar la función mecánica del tejido [Chen et al., 2006; Arthur et al., 2009]. Una desventaja del uso de células para desarrollo del tejido *ex vivo* previo al implante se debe a las grandes cantidades de células que se necesitan y su mantenimiento [Ren et al., 2016].

Las células MSCs tienen el potencial de diferenciarse a condrocitos, osteoblastos, adipocitos, fibroblastos y otros tejidos de origen mesenquimal; están presentes en muchos tejidos adultos además de en la médula ósea, como en el tejido adiposo, periostio, la dermis o la sangre [Tuan et al., 2002]. Las presentes en la médula ósea, CPMO, pueden obtenerse *in vitro* en grandes cantidades y diferenciarse a varios linajes celulares si se proporcionan las condiciones adecuadas (esquema I.7). Por esta razón las células CPMO se potencian como una fuente muy interesante de células regenerativas para reparar numerosos tejidos, incluyendo hueso, cartilago y ligamentos [Cancedda et al., 2003; Arthur et al., 2009]. El éxito de las terapias con CPMO se basa en una mejor comprensión y control de las vías de diferenciación; y se sabe que tanto el ambiente bioquímico como el mecánico gobiernan la diferenciación de estas células [Potier et al., 2010; Thompson et al., 2015]. Por lo tanto, el mejoramiento de las propiedades estructurales, mecánicas y bioquímicas del

scaffold puede mejorar la supervivencia y diferenciación de las CPMO y conducir a una mejora en la ingeniería de tejidos.

Esquema I.7 Células progenitoras de médula ósea A) Potenciales linajes celulares de diferenciación. B) principales cascadas de señales involucradas en la osteogénesis y la condrogénesis. [Potier et al., 2010]



I.1.3.2 Factores de crecimiento

Algunas estrategias en ingeniería de tejidos han encontrado el empleo de ciertos factores de crecimiento que pueden inducir y/o acelerar el crecimiento celular en una determinada dirección. Algunos de los factores de crecimiento que se han estudiado para su empleo en ingeniería de tejido sobre lesiones osteocondrales son: los factores transformantes del crecimiento tipo beta (TGF- β), proteínas morfogénicas óseas (BMP), factores de crecimiento insulino similares (IGF) o factores del crecimiento de fibroblastos (FGF) (vistos en la tabla I.1) [Mano & Ries, 2007; Nukavarapu & Dorcemus, 2013; Seo et al., 2014]. Hay muchas maneras de incorporar estos factores, algunos métodos comunes implican administración sistémica o inyección directa en el sitio del defecto cerca o en contacto con el *scaffold*, claro que también el propio *scaffold* puede usarse para incorporar uno o más tipos de factores de crecimiento [Lee & Shin, 2007]; en estos sistemas, las propiedades del *scaffold*, tales como el tamaño de poro o la densidad de entrecruzamiento pueden regular su liberación [Panseri et al., 2012].

Particularmente, entre los factores empleados en regeneración osteocondral mucho interés se ha centrado en la familia de proteínas morfogénicas de hueso (BMP), que tienen un poderoso efecto en la estimulación de la nueva formación de cartílago y hueso

[Sekiya et al., 2001; Miljkovic et al., 2008]. En la actualidad, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado dos BMP para su uso en defectos óseos: la BMP-2 y -7. Sin embargo, luego de su uso se han reportado complicaciones tales como inflamación de tejidos blandos, formación de hueso ectópico, resorción de hueso adyacente y efectos a largo plazo en el crecimiento maxilar [Ren et al., 2016]. Estas pruebas y la falta de evidencias de tratamientos efectivos en la clínica ponen en discusión la necesidad de métodos alternativos para aumentar la osteogénesis sin depender de dosis suprafisiológicas de factores de crecimiento.

I.1.3.3 Scaffolds

El *scaffold ideal* deber ser biocompatible, biodegradable, debe integrarse correctamente con el tejido que lo rodea, de fácil fabricación y debe proporcionar el apoyo mecánico para estimular la reparación y la proliferación celular [Bose et al., 2012; Ravichandran et al., 2012; Rai et al., 2017]. Una buena biocompatibilidad revela que el material es aceptado por el organismo, y que por lo tanto no hay rechazo del material o de sus productos de degradación. Por otro lado, el *scaffold* debe tener una adecuada resistencia mecánica para garantizar el espacio entre las células necesarias para la posterior formación de la matriz extracelular. Además, el material debe tener propiedades mecánicas similares a las del tejido huésped, sino también ser capaz de degradarse con el tiempo *in vivo*; esta tasa de degradación debe ser a una velocidad de reabsorción controlada de manera tal que mientras el tejido se regenera, las cargas producidas sobre el tejido son soportadas por el *scaffold* y eventualmente se crea espacio para que el nuevo tejido se regenere [Bose et al., 2012]. Un requisito no menor para los *scaffolds* es su accesibilidad de fabricación, con la posibilidad de darle una arquitectura tridimensional y factible de esterilizar, al mismo tiempo poseer potencial comercialización. Adicionalmente, los materiales deben ser reconocidos por el medio ambiente tisular, y reaccionar en consecuencia, además deben imitar la MEC para permitir que las células colonicen el *scaffold* y que se produzca la vascularización para la correcta regeneración tisular y reparación del tejido. De modo que el diseño y fabricación de materiales bioinspirados para aplicaciones de ingeniería de tejidos requiere una comprensión fundamental de las interacciones entre polímeros, estructuras y células [Carrow & Gaharwar, 2015].

Un requisito crítico en la ingeniería de tejido es la elección correcta de los materiales y el diseño de la estructura del *scaffold*. Se han propuesto muchos tipos de materiales para favorecer la regeneración del cartílago y el hueso, la mayoría se basa en polímeros biocompatibles y biodegradables [Cancedda et al., 2003; Mano & Ries, 2007; Panserri et al., 2012; Cortizo & Belluzo, 2017]. Estos materiales pueden ser divididos en tres grandes grupos:

1. Polímeros naturales. Una gran variedad de polímeros que abundan en la naturaleza se han propuesto para su empleo en ingeniería de tejidos como el colágeno, la quitina, alginatos, etc. La ventaja de estos es su disponibilidad, buena biocompatibilidad y que generalmente presentan baja toxicidad.
2. Polímeros sintéticos. Dentro de estos podemos encontrar una gran gama con propiedades muy variadas que pueden seleccionarse según las especificaciones del tejido. Los más comunes incluyen al poliláctico, poli(etilenglicol), poli(ϵ -caprolactona), poli(propilen fumarato), etc.

3. Cerámicos, cristales y composites. Muchos estudios se han dedicado a la comprensión de los fundamentos de la biomineralización y el uso de tal conocimiento en el desarrollo de biomateriales con propiedades mejoradas. Por ejemplo, en ingeniería de tejido óseo se han estudiado *scaffolds* con hidroxiapatita. Sin embargo, la fragilidad y la baja biodegradabilidad restringen las aplicaciones clínicas de estas biocerámicas.

Aunque muchos de los biomateriales utilizados en la reparación de tejido óseo y cartilaginoso se basan en homopolímeros varios autores proponen el empleo de mezclas físicas o polímeros entrecruzados. Como hemos destacado, una ventaja de los polímeros naturales es su buena biocompatibilidad; sin embargo, sus débiles propiedades mecánicas y la velocidad de degradación no controlada lleva a la alternativa de diseñar materiales compuestos entre polímeros sintéticos y naturales [Gomes et al., 2008; Wu et al., 2008; Panseri et al., 2012]. La mezcla de dos o más polímeros, naturales o sintéticos, se ha convertido gradualmente en un enfoque importante para desarrollar nuevos biomateriales; dado que la mezcla resultante exhibe propiedades que son una combinación de las propiedades de los materiales primarios [Chen et al., 2008]. De este modo, la combinación adecuada de polímeros puede reunir las ventajas de cada tipo de material, ofreciendo más posibilidades de producir uno que reúna las características que necesitamos para la restauración de un tejido en particular. Sin embargo, un problema importante a considerar es que en la mayoría de los casos hay incompatibilidad entre los diferentes polímeros lo que conduce a una mezcla de mala calidad debido a la separación de microfases. En tales casos, una estrategia para mejorar la compatibilidad de los materiales es el entrecruzamiento polimérico conseguido mediante el uso de agentes entrecruzantes o técnicas de compatibilización ultrasónica [Fernández et al., 2010; Bispo et al., 2010; Ghosh et al., 2014; Maitra & Shukla, 2014; Radhakrishnan et al., 2015].

En el campo de la ingeniería de tejidos se han hecho grandes progresos para la reparación y restauración de los defectos tanto óseos, cartilaginosos como osteocondrales mostrando grandes ventajas sobre las terapias convencionales, sin embargo, más investigación debe llevarse a cabo para hacer de esta estrategia una realidad clínica [Rai et al., 2017]. Un importante problema no resuelto posiblemente radica en el desarrollo de un *scaffold* más adecuado que sea biodegradable pero resistente, permita la infiltración celular, la supervivencia, proliferación y diferenciación adecuadas de las células y también proporcione integración con la matriz del tejido; particularmente, en las lesiones osteocondrales la integración con la matriz ósea y cartilaginosa preexistente [Cancedda et al., 2003]. Todavía no existe, incluso para un solo tejido, el "*scaffold* ideal" y se necesita mucho más trabajo de investigación sobre diferentes combinaciones de materiales para conseguir propiedades adecuadas para su empleo, por lo que el diseño de nuevos materiales continúa estableciendo un desafío.

En este trabajo de tesis tomamos el desafío y proponemos el desarrollo y caracterización de un nuevo *scaffold* empleando un copolímero fumárico, sintetizado a partir de acetato de vinilo y fumarato de diisopropilo, entrecruzado con quitosano para su empleo en la regeneración ósteo-cartilaginosa.

I.2 HIPÓTESIS

Se propone el desarrollo de un nuevo biomaterial basado en un polímero sintético, derivado de un polifumarato, combinado con un polímero natural, como el quitosano, para su uso en la regeneración ósteo-cartilaginosa. La mezcla de un polímero natural con un polímero sintético para fabricar un nuevo *scaffold* puede reunir las ventajas de cada tipo de material. En particular, el quitosano presenta muy buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad pero sus propiedades mecánicas y tasa de degradación no son las adecuadas para el desarrollo de *scaffolds* que puedan ser empleados en ingeniería tejidos óseo o cartilaginosa. Por su parte, polímeros derivados de polifumaratos han demostrado presentar adecuadas propiedades mecánicas y tasa de degradación regulable por la selección adecuada de la composición de comonomeros. De este modo proponemos la combinación de estos polímeros para generar un material con propiedades mejoradas que pueda ser usado para la regeneración en las lesiones en estos tejidos. Estos materiales serán estudiados *in vitro* con distintos linajes celulares para evaluar su potencial como *scaffolds* para su empleo en ingeniería de tejidos.

I.3 OBJETIVOS

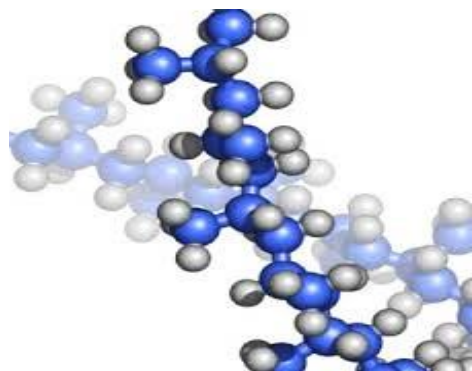
I.3.1 Objetivo General

El Objetivo General de esta tesis doctoral es el desarrollo de estrategias de tratamiento basadas en matrices poliméricas que permitan la regeneración ósteo-cartilaginosa.

I.3.2 Objetivos específicos

1. Síntesis y caracterización de un copolímero de fumarato de diisopropiloacetato de vinilo (FIP-co-AcV).
2. Desarrollo, caracterización y evaluación de las propiedades de matrices poliméricas combinando el polímero sintético FIP-co-AcV y un polímero natural (quitosano), que puedan ser empleadas como molde para la regeneración ósteo-cartilaginosa.
3. Evaluación de la biocompatibilidad de las matrices desarrolladas empleando células progenitoras de médula ósea (CPMO) y un cultivo primario de condrocitos.
4. Investigación de la producción de marcadores osteogénicos en CPMO crecidas y diferenciadas sobre las matrices.
5. Investigación de la producción de marcadores condrogénicos con condrocitos primarios crecidos sobre las matrices.
6. Evaluación de la citotoxicidad de los biomateriales desarrollados empleando un modelo de macrófagos murinos en cultivo.
7. Estudio de la nanoestructuración de las matrices usando un molde de óxido de aluminio anodizado (AAO). Evaluación de la capacidad osteo- y condrogénica de las matrices desarrolladas por este método y su citotoxicidad.
8. Evaluación *in vivo* de la capacidad del material desarrollado para regeneración ósea.

CAPÍTULO II: Síntesis y caracterización polimérica



II.1 INTRODUCCIÓN

Los polímeros son macromoléculas sintéticas o naturales constituidas por la unión de un gran número de subunidades denominadas “monómeros”. Aún en su forma más pura los polímeros, a diferencia de las moléculas de pequeño tamaño, son mezclas de moléculas de diferente peso molecular. Por ello, para caracterizar un polímero se estudia la distribución de los diferentes pesos moleculares dentro del polímero (polidispersidad), y se determina el peso molecular promedio. La razón de la polidispersidad de los polímeros radica en las variaciones estadísticas presentes en los procesos de polimerización.

Los polímeros constituyen un grupo muy diverso de macromoléculas con variada naturaleza química, composición y arquitectura; de los que se pueden obtener una gran gama de materiales con distintas propiedades, que a su vez, se pueden modificar por métodos tanto químicos como físicos. Además, la combinación de polímeros sintéticos y naturales constituye una alternativa versátil y eficiente para desarrollar novedosos materiales con propiedades variadas que no se pueden alcanzar mediante el uso de polímeros individuales. Varias revisiones han abordado exhaustivamente combinaciones de distintos biomateriales, así como su investigación *in vitro* o *in vivo* para su uso potencial en ingeniería de tejidos [Park & Lakes, 2007; Stevens et al., 2008; Bose et al., 2012; Panseri et al., 2012; Musumeci et al., 2014]. Estos estudios señalan dentro de los polímeros naturales más comúnmente utilizados para ingeniería de tejidos óseo y cartilaginoso al colágeno, la fibrina, el alginato, la seda, el ácido hialurónico y el quitosano. Mientras que dentro de los polímeros sintéticos biodegradables más populares se incluyen ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y sus copolímeros (PLGA), poli(metilmetakrilato) (PMMA), poli(etilenglicol) (PEG), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), poli(propileno fumarato) (PPF) y el poli(alcohol vinílico) (PVA). Estos materiales se han combinado para dar distintos tipos de estructuras como porosas, fibrosas, nanoesferas o hidrogeles y se han obtenido muy buenos resultados en cuanto a su biocompatibilidad [Panseri et al., 2012; Musumeci et al., 2014]. Para el desarrollo de este trabajo de tesis nos ha interesado combinar el polímero natural quitosano con un polímero sintético fumárico estudiado ampliamente en nuestro grupo.

II.1.1 Quitosano

El quitosano (CHI) es una forma desacetilada de la quitina, un polímero glucopeptídico presente en el exoesqueleto de los artrópodos como la langosta y el cangrejo, o en el esqueleto de los moluscos cefalópodos como el calamar; que representan materiales de desechos comunes de la industria pesquera [Kurita et al., 2006]. La obtención del CHI a partir de pluma de calamar es una fuente importante de materia prima para su obtención y una alternativa interesante para nuestro país, dado que la especie de calamar *Illex argentinus* constituye una de las principales explotaciones pesqueras según un informe del Ministerio de Agroindustria de la Nación Argentina [ACUICULTURA, 2007].

El CHI es un polisacárido lineal compuesto de unidades con distribución al azar de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -(1,4)-glicosídicos, la relación entre estas subunidades determina el grado de acetilación del quitosano. La elección del CHI se basa en su baja toxicidad, no inmunogenicidad, biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad para formación de películas y su fácil accesibilidad [Kurita, 2006; Rinaudo, 2006].

Este polímero es soluble en agua en medios ácidos, o en condiciones precisas a pH neutro, lo que permite un gran desarrollo en los dominios de soluciones e hidrogeles.

La biocompatibilidad del CHI, y por tanto gran parte del interés como biomaterial, se debe principalmente a la similitud estructural y bioquímica de las unidades estructurales que lo conforman con varias de las biomoléculas que forman parte de los tejidos del cuerpo humano. En particular con los glicosaminoglicanos, que se sabe están implicados en una amplia variedad de procesos biológicos que incluyen la migración, diferenciación y proliferación celular, la respuesta inmune y la organización citoesquelética [Khan et al., 2000].

La presencia del grupo amino protonable a lo largo de los residuos de glucosamina permite comprender la mayoría de las propiedades del CHI [Croisier & Jérôme, 2013]. Su naturaleza catiónica le permite interactuar con polímeros cargados negativamente y moléculas estructurales presentes en la matriz extracelular de diversos tejidos del cuerpo humano [Kim et al., 2008]. Por otro lado, su naturaleza química ofrece muchas posibilidades de modificación covalente e iónica permitiendo el ajuste de sus propiedades, y la combinación con otros materiales, promoviendo aún más el gran interés en la elección del CHI como biomaterial en ingeniería de tejidos [Kim et al., 2008; Croisier & Jérôme, 2013; LogithKumar et al., 2016]. *Scaffolds* derivados de CHI han sido utilizados en la regeneración de varios tejidos en los que se pueden incluir: el tejido óseo, el cartílago, los vasos sanguíneos, el hígado, la regeneración de nervios, la regeneración de la piel, entre otros [Kim et al., 2008]. A pesar de la gran cantidad de aplicaciones exitosas en diferentes campos biomédicos, la resistencia mecánica del CHI se convierte en una preocupación principal cuando se utiliza *in vivo*. La estrategia más común para mejorar sus propiedades mecánicas es combinarlo con otros polímeros sintéticos o naturales [Wu et al., 2008]. En nuestro grupo, previamente, también se ha desarrollado un *scaffold* de CHI combinado con poli(ϵ -caprolactona) (PCL) para ingeniería de tejido óseo, el cual presentó una estructura ligeramente porosa con buenas interacciones interpoliméricas. Además se estudió su biocompatibilidad con células osteoblásticas, encontrando que las células fueron capaces de proliferar sobre estas matrices mostrando una morfología normal [Berghoff, 2011].

II.1.2 Polímeros fumáricos

Los polímeros fumáricos son de origen sintético, derivados de ésteres fumáricos, que pueden obtenerse fácilmente a partir de anhídrido maléico el cual es un subproducto de la industria petrolera, con gran desarrollo en nuestro país. Su elección para este trabajo se basó en su disponibilidad local, el conocimiento de sus propiedades y de su reactividad en reacciones de polimerización [Otsu et al., 1992; Al-Arbash et al., 1999].

Algunos autores han explorado ampliamente el uso del poli(propileno fumarato) (PPF) como biomaterial para ingeniería de tejidos [He et al., 2001; Díez-Pascual & Díez-Vicente, 2016; Ahn et al., 2017]; sin embargo, su empleo tiene como desventaja una alta degradabilidad, lo que puede conducir a una respuesta tóxica indeseable [Timmer et al., 2003]. En comparación con el poliéster, los polifumaratos de alquilo exhiben menor degradabilidad como consecuencia de un esqueleto compuesto por una estructura lineal de C-C. Además, se sabe que los polifumaratos muestran mejores propiedades mecánicas que los poliésteres; en general exhiben una respuesta mecánica muy similar a la de los

polímeros metacrílicos. Se ha demostrado que el homopolímero poli(diisopropil fumarato) (PFIP) es un material con alta estabilidad térmica pero frágil, presentando una alta resistencia a la tracción. Sin embargo las propiedades mecánicas pueden ser modificadas por mezcla con otros polímeros [Koinuma et al., 1997] o mejor aún, mediante la copolimerización combinándolo con otros comonómeros [Pasqualone et al., 2013]. La copolimerización, por su parte, permite obtener un número casi ilimitado de productos diferentes variando la naturaleza y las cantidades relativas de los monómeros a emplear.

Desde hace varios años, en nuestro grupo se sintetizan y estudian diversas propiedades de estos polímeros; entre ellas, su capacidad para combinarse de manera estable con otros polímeros, su reactividad química para producir derivados y sus propiedades tanto mecánicas como biológicas [Cortizo, 2007; Cortizo et al., 2008; Oberti et al., 2010; Oberti et al., 2012]. En particular, algunos fueron investigados como biomateriales para aplicaciones médicas, tales como sistemas de liberación transdérmicos y *scaffolds* para ingeniería de tejido óseo [Cortizo et al., 2008; Fernández et al., 2010; Fernández et al., 2011a; Pasqualone et al., 2013; Fernández et al., 2014]. En el trabajo de Cortizo [Cortizo et al., 2008] se desarrollaron películas basadas en polifumaratos (PFIP y poli(diciclohexilfumato)) o poliésteres (PCL y poli(β -propiolactona)), y se evaluó su capacidad para actuar como *scaffolds* en ingeniería de tejido óseo; encontrándose que eran biodegradables y soportan el crecimiento y la diferenciación de células osteoblásticas. Por otro lado, se desarrolló una mezcla polimérica de PFIP y PCL, compatibilizada por sonicación, cuyas propiedades mecánicas se asemejan al hueso trabecular y presenta mejores características de superficie y biocompatibilidad que sus homopolímeros. Se demostró además, que esas matrices eran capaces de soportar el crecimiento osteoblástico [Fernández et al., 2010]. En estudios adicionales, la inclusión de nanohidroxiapatita en la mezcla, mejoró significativamente la biocompatibilidad celular y la osteogenicidad de los *scaffolds* [Fernández et al., 2011a].

Para el desarrollo de este trabajo se propuso la síntesis de un novedoso copolímero sintetizado a partir de fumarato de diisopropilo y el acetato de vinilo. Este último monómero vinílico fue seleccionado a partir de su extenso empleo en reacciones de copolimerización para producir matrices para aplicaciones biomédicas [Tan & Pfister, 1999; Babensee et al., 2000; Kenawy et al., 2002; Zhou et al., 2014; Pasqualone et al., 2013].

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Reactivos y drogas

- Ácido fumárico, Maleic S.A. (Buenos Aires, Argentina).
- Solventes: isopropanol (99,9% RA (ACS), Anedra), cloroformo (99,5%, Anedra), hexano (99,4%, Anedra), acetona (99,8%, Anedra), metanol (99,8%, Merck), Benceno puro (Sintogan).
- Hidróxido de sodio (NaOH 99,2%, Anedra)
- Iniciador radicalario: se empleó peróxido de benzoílo (PB) (Merck, PA) el cual fue purificado por recristalización de metanol previo a su uso [Armarego et al., 1997].

Todos los otros productos químicos y reactivos se adquirieron de fuentes comerciales y son de grado analítico.

II.2.2 Monómeros

A continuación se describen las síntesis y/o purificaciones y posterior caracterización de los monómeros empleados en las reacciones de polimerización radicalaria de este trabajo de tesis.

II.2.2.1 Acetato de vinilo

El acetato de vinilo (AcV, $\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich) utilizado en las reacciones de polimerización fue purificado previo a su uso para eliminar las trazas de inhibidor. La purificación se realizó por destilación a presión reducida, recolectándose el destilado en un balón protegido de la luz y sumergido en un baño de hielo para evitar la homopolimerización del monómero. Luego el mismo se conserva en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La pureza del monómero destilado se evidencio por cromatografía en capa fina en placas Sílica gel 60 F254 (Merck) sobre las cuales se sembraron AcV antes y después de la destilación. Se utilizó cloroformo (99,98%, Dorwill) como fase móvil y como revelador una lámpara UV-vis.

II.2.2.2 Fumarato de diisopropilo

El fumarato de diisopropilo (FIP) fue sintetizado mediante una reacción de esterificación de Fischer a partir de ácido fumárico e isopropanol siguiendo la metodología ampliamente usada en nuestro grupo [Cortizo, 2007].

El control de pureza del monómero y su caracterización se realizaron mediante la determinación de las señales en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones ($^1\text{H-RMN}$), donde las señales de los hidrógenos pertenecientes al FIP (en particular la señal de los hidrógenos vinílicos) se consideran como referencia para el control de pureza. El equipo utilizado fue un Bruker 300 MHz, las medidas se realizaron a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ empleando CDCl_3 como solvente y seleccionando 32 scans de acumulación.

II.2.3 Quitosano

Se utilizó quitosano comercial (Sigma-Aldrich, de alto peso molecular), al cual se le determinó el grado de acetilación (DA) mediante FTIR basado en la relación de absorbancia a 1320 cm^{-1} y 1456 cm^{-1} , correspondiente a las bandas de amida III y CH_2 , respectivamente, como sugiere Brugnerotto [Brugnerotto et al., 2001].

$$DA (\%) = 31.92 \left(\frac{A_{1320}}{A_{1456}} \right) - 12.2 \quad \text{Ecuación II.1}$$

El peso molecular promedio viscosimétrico (M_η) del quitosano se evaluó mediante viscosimetría capilar usando buffer ácido acético 0,3 M/acetato de sodio 0,2 M como disolvente. La temperatura de las medidas se mantuvo a $25,00 \pm 0,02\text{ }^\circ\text{C}$. El M_η se evaluó siguiendo la ecuación:

$$[\eta] \left(\frac{\text{ml}}{\text{g}} \right) = K M_\eta^a \quad \text{Ecuación II.2}$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y K y a son parámetros característicos para cada sistema polímero-disolvente. Los parámetros K y a se tomaron del trabajo de Rinaudo y colaboradores que emplean el mismo sistema polímero-disolvente y son de 0,082 ml/g y 0,76, respectivamente [Rinaudo et al., 1993].

II.2.4 Síntesis del copolímero fumárico

La copolimerización radical de AcV con FIP, se realizó en masa mediante energía de microondas, empleando PB como iniciador radicalario, de manera similar a una metodología informada anteriormente [Pasqualone et al., 2013]. Para llevar a cabo la copolimerización se colocaron en un erlenmeyer de 25 ml los monómeros en relación volumétrica 75:25 (FIP:AcV), junto con la masa previamente pesada del PB (40 mM) en un volumen total de 6,0 ml. Para alcanzar una atmósfera inerte en el recipiente de reacción se adaptó un septum al estándar y se realizó un burbujeo con N_2 durante 30 minutos en baño de hielo, liberando la presión por medio de una aguja hipodérmica. Luego la mezcla de reacción se llevó a temperatura ambiente y se irradió a una potencia de 140 W por 25 min en un horno microondas doméstico (ZENITH, ZVP-2819, 2450 MHz de frecuencia de microondas y 700 W de potencia máxima).

Transcurrido el tiempo de reacción y después de alcanzar la temperatura ambiente, el copolímero se aisló por adición de 6 ml de hexano. A continuación, se purificó mediante disolución en cloroformo con agitación durante toda la noche y posterior precipitado desde ampolla de decantación sobre hexano en un baño de hielo. Por último, se separó el sobrenadante del producto sólido y se secó en tambor de vacío hasta peso constante. El copolímero obtenido, poli(fumarato de diisopropilo-co-acetato de vinilo), se denominó PFV.

El porcentaje de conversión (%C) de la reacción de copolimerización se calculó gravimétricamente a partir de la siguiente ecuación:

$$\%C = \frac{\text{masa PFV}}{(\text{masa AcV} + \text{masa FIP})} \times 100 \quad \text{Ecuación II.3}$$

Con el fin de obtener una masa adecuada para realizar los ensayos estipulados para esta tesis la síntesis del PFV se repitió diez veces en las mismas condiciones.

II.2.5 Hidrólisis del copolímero fumárico

Con el fin de introducir grupos hidroxilo en la cadena macromolecular principal, el PFV se sometió a una reacción de hidrólisis básica. Para ello se preparó una solución del copolímero al 15% p/v y una solución de NaOH al 1% p/v, ambas en metanol. Se realizó una mezcla de ambas soluciones de modo de obtener una relación 30% p/p de hidróxido respecto del polímero. Dicha mezcla se calentó a 50 °C durante 1 h en un erlenmeyer con refrigeración a reflujo y agitación magnética. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se llevó al rotavapor para eliminar el metanol, el sólido resultante se lavó con agua y se secó hasta peso constante. El copolímero obtenido luego de la reacción de hidrólisis se denominó PFVH.

II.2.6 Técnicas de caracterización

II.2.6.1 Cromatografía de exclusión molecular

El peso molecular promedio en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (M_w/M_n) para el polímero sinterizado se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) empleando un equipo LKB-2249 a 25 °C. Se utilizó un set de 4 columnas μ -Styragel® en serie, con un tamaño de poro 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 Å utilizando cloroformo (99,99% (ASC), J.T. Baker) como eluyente. La concentración del polímero analizado fue de 7 mg/ml en cloroformo y la velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se emplearon dos detectores en serie: uno UV-Vis Shimadzu SPD-10A a una longitud de onda de 254 nm (que permite evidenciar el monómero residual) y otro detector infrarrojo Miram IA seleccionado a $5,75 \mu\text{m}$, frecuencia característica del grupo carbonilo presente a lo largo de la cadena del polímero [Cortizo et al., 1989]. La calibración se realizó a partir de estándares de poli(metacrilato de metilo) (Polymer Laboratories y Polysciences, Inc) utilizando acetato de etilo como estándar interno.

II.2.6.2 Espectroscopia FTIR

El análisis de los grupos funcionales se realizó mediante espectroscopia infrarroja con transformadas de fourier (FTIR) empleando un equipo Nicolet 380 FTIR (Thermo Electron Corporation, Madison WI, USA) entre 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y 32 scans de acumulación. Para este ensayo, se preparó una solución polimérica en cloroformo (5,0 % p/v) y se vertió sobre una pastilla de cloruro de sodio, con posterior evaporación del disolvente a temperatura ambiente y secado en estufa. El análisis del espectro se efectuó mediante el software EZ-OMNIC 7.4.127 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA).

II.2.6.3 Espectroscopia ^1H -RMN

La identificación estructural y la composición de los copolímeros, calculada a partir de los desplazamientos de los distintos tipos de hidrógenos presentes en los comonomeros, se realizó utilizando Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN) en

un equipo Varian-200MHz (Mercury 200) a 35 °C, solubilizados en cloroformo-d₃ y acetona-d₆ para PFV y PFVH, respectivamente. Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

II.2.6.4 Análisis térmico

El estudio del comportamiento térmico de los copolímeros sintetizados, PFV y PFVH, se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA).

Empleando un equipo de DSC Shimadzu-TA60, se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g). Para las medidas, las muestras de alrededor de 5 mg se colocaron en capsulas de aluminio selladas y se llevan al soporte de muestras del DSC. Para borrar el historial térmico se realizaron ciclos térmicos que consistieron en una rampa de calentamiento, seguida por una rampa de enfriamiento y una rampa de calentamiento final, utilizando procesos de calentamiento y enfriamiento de 10 °C/min desde -50 °C a 200 °C bajo atmósfera de nitrógeno (30 ml/min). Para calcular la T_g se empleó la curva correspondiente al segundo calentamiento.

Con el TGA se midió la variación en la masa de las muestras sometidas a un programa de calentamiento controlado en una atmósfera de nitrógeno, aplicando un flujo de gas de 90 ml/min. Se estudió la estabilidad térmica de los copolímeros, empleando un equipo Q500-TA, realizando una rampa de calentamiento desde temperatura ambiente hasta 700 °C, y a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min.

II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

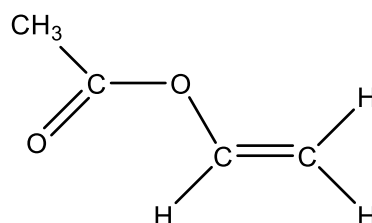
II.3.1 Monómeros

La selección de los co-monómeros empleados en este estudio fue en base al conocimiento previo de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la relación hidrofobicidad / hidrofiliidad, la estabilidad y temperatura de transición vítrea, extensamente estudiadas en el grupo Macromoléculas de INIFTA y otros grupos [Otsu et al., 1992; Baruah et al., 2011; Oberti et al., 2012; Pasqualone et al., 2013]. En particular, los polímeros fumáricos presentan buena degradabilidad, alta estabilidad térmica y propiedades mecánicas que pueden ser bien ajustadas por mezcla con otros polímeros [Koinuma et al., 1997; Cortizo et al., 2008; Oberti et al., 2012]. Precisamente es por sus propiedades que los monómeros fumáricos pueden ser considerados como potenciales candidatos para reemplazar a los ésteres metacrílicos, remarcando además la importancia a nivel local debido a su fácil obtención y gran disponibilidad en nuestro país. A continuación se muestran los resultados de la síntesis para el FIP y la purificación del AcV.

II.3.1.1 Acetato de vinilo

El estudio de la pureza del AcV (esquema II.1), obtenido luego de la destilación fraccionada, fue realizado por Cromatografía en Capa Fina. La purificación se confirmó por la aparición de una única mancha en la siembra del producto de destilación.

Esquema II.1 Estructura del AcV



II.3.1.2 Fumarato de diisopropilo

La reacción de síntesis del monómero arrojó un buen rendimiento del 66%, valor similar al obtenido en otras reacciones de síntesis de dialquil fumaratos mediante esterificación de Fischer [Cortizo, 2007; Cortizo et al., 2007].

Las señales obtenidas por ^1H -RMN en la caracterización y el control de pureza del FIP sintetizado se muestran en la Tabla II.1, junto con sus correspondientes asignaciones en la estructura del monómero. Las mismas se correlacionan con el espectro obtenido que se muestra en la figura II.1.

Tabla II.1 Asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del FIP

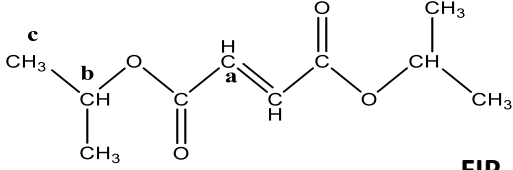
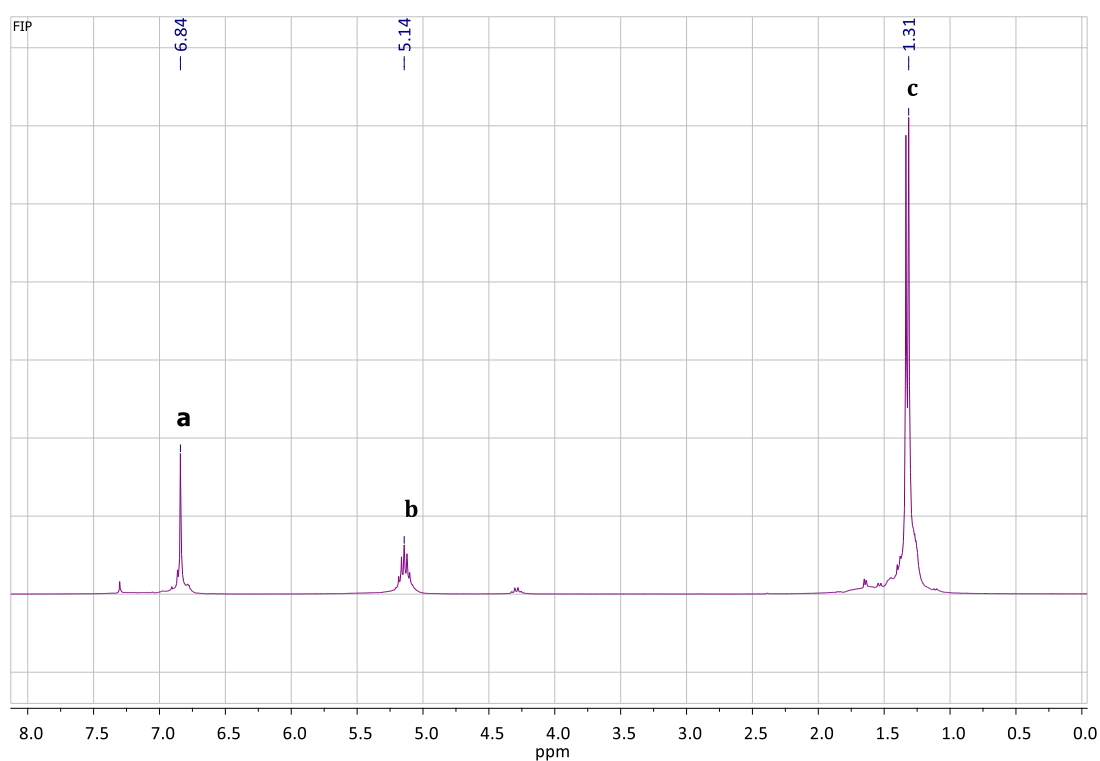
Estructura	δ (ppm)	multiplicidad	integración	asignación
 <p style="text-align: center;">FIP</p>	6,84	singlete	2H	a
	5,14	multiplete	2H	b
	1,31	doblete	12H	c

Figura II.1 Espectro $^1\text{H-RMN}$ del FIP

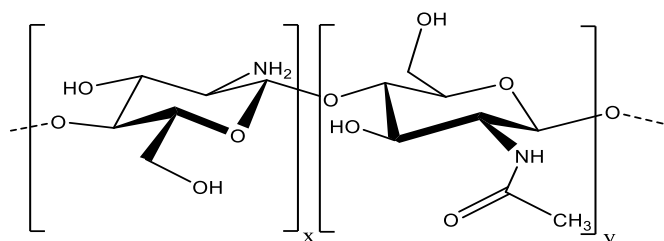


II.3.2 Quitosano

El quitosano (CHI) es un copolímero compuesto por unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -(1,4) -glicosídicos (esquema II.2), la relación molar de estas unidades va a estar representada por el grado de acetilación (DA) del polímero. Así dependiendo de la fuente y los parámetros de procesamiento, las diferentes formas de CHI difieren entre sí, en el grado de acetilación y sus pesos moleculares; y se ha propuesto que estos parámetros podrían influir en el uso del quitosano en muchas de sus aplicaciones [Croisier & Jérôme, 2013; Bof et al., 2015]. En este sentido, Bof y colaboradores estudiaron cómo se ven afectadas algunas propiedades fisicoquímicas en las películas de CHI con distinto peso molecular, como la apariencia, la estructura y las propiedades mecánicas. Estas diferencias pueden ser

relevantes para su empleo como material biodegradable y estarían atribuidas a un efecto del peso molecular sobre la interacción polímero-polímero y polímero-solvente. Además, se encontró que el CHI de mayor peso molecular da lugar a matrices más homogéneas, fuertes y resistentes con altos valores de módulo elástico y Tg alta [Bof et al., 2015].

Esquema II.2 Estructura del CHI



Basados en estos estudios, y dado que la información respecto al DA y peso molecular promedio del CHI empleado en este estudio (Sigma-Aldrich, alto peso molecular) no fue proporcionada por el proveedor, determinamos ambos parámetros. El DA, determinado por FTIR siguiendo la ecuación II.1, fue del 24%; mientras que el peso molecular promedio viscosimétrico (M_{η}), calculado a partir de la ecuación II.2, fue igual a 511 KDa.

II.3.3 Síntesis del copolímero fumárico

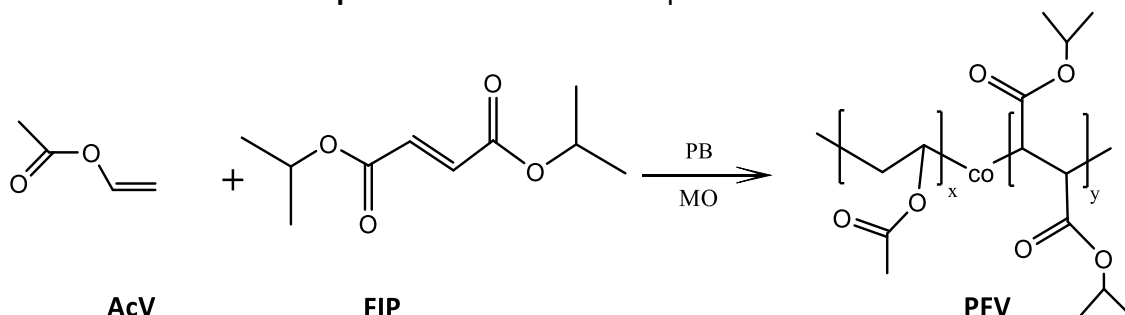
En este trabajo de tesis, se realizó la síntesis del poli(fumarato de diisopropilo-co-acetato de vinilo) (PFV) por copolimerización radicalaria empleando energía de microondas. Entre las principales ventajas del uso de energía de microondas respecto a los métodos convencionales pueden mencionarse: la disminución en los tiempos de reacción, la mejora en los rendimientos y en algunos casos, selectividad en los productos obtenidos [Loupy, 2004]. Especialmente, la disminución en los tiempos de reacción conlleva a una disminución en el consumo de energía, lo que es favorable para el cuidado del medio ambiente. En nuestro grupo se han estudiado previamente diversas reacciones de copolimerización radicalaria de monómeros fumáricos empleando energía de microondas como una fuente alternativa de energía. En particular, se demostró que la tasa de polimerización ha sido significativamente más alta que en condiciones térmicas [Cortizo, 2007; Oberti et al., 2010; Oberti et al., 2012]. Además, en este trabajo estas reacciones de copolimerización se llevaron a cabo en masa y se empleó PB como iniciador radicalario.

Se seleccionó la técnica de polimerización en masa, ausencia de solvente, para evitar posibles explosiones y/o proyecciones del sistema de trabajo; que pueden producirse por un aumento de temperatura durante la reacción, que pueden llevar al solvente a alcanzar su punto de ebullición. El PB se seleccionó en base a resultados obtenidos previamente en nuestro grupo, donde se estudió la homopolimerización radical del FIP empleando energía de microondas [Cortizo, 2007]. En este trabajo, se comparó además al PB con el 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciadores radicalarios, y se encontró un aumento significativo en el porcentaje de conversión

cuando se utiliza PB, atribuido a la mayor eficiencia del PB hacia el monómero fumárico en comparación con el AIBN.

La reacción general de obtención para el copolímero fumárico se representa en el esquema II.3 junto con su estructura.

Esquema II.3. Síntesis del copolímero PFV

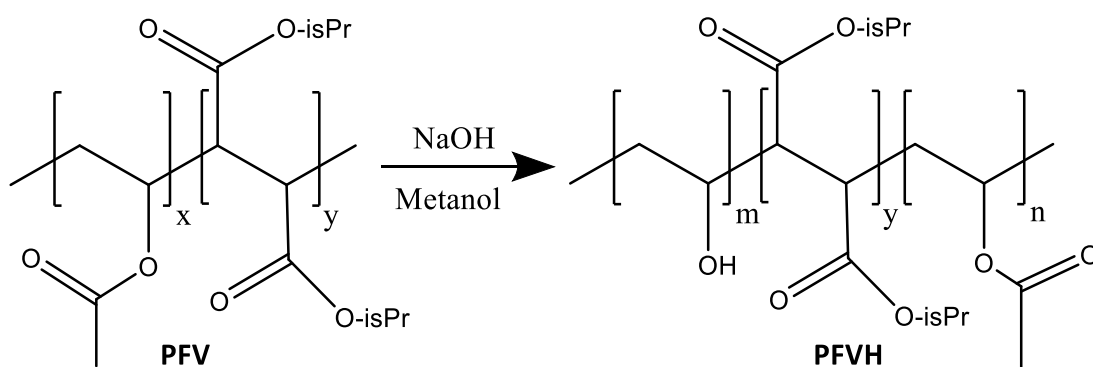


En las condiciones de trabajo empleadas (140 W, 25 min y PB 40 mM), la síntesis para el PFV arrojó una conversión de reacción del $39 \pm 3\%$; calculada a partir de la ecuación II.3 y considerando la masa final obtenida luego de la purificación del copolímero por disolución / precipitación. Además, la medición de la temperatura al final de la reacción, obtenida sobre la muestra con un termómetro de mercurio, alcanzó un valor de 99 ± 4 °C. Estos datos están expresados como la media \pm SEM considerando las 10 síntesis realizadas bajo las mismas condiciones.

II.3.4 Hidrólisis del copolímero fumárico

Luego de la síntesis y purificación del PFV, este copolímero se hidrolizó parcialmente con el fin de aumentar su hidrofiliidad para una mejor interacción con el quitosano. La hidrólisis de los grupos acetato del poli(acetato de vinilo) es una reacción de derivatización fácil y ampliamente usada para dar lugar al poli(alcohol vinílico) [Debuigne et al., 2005]. Por otro lado, anteriormente fue reportado que, debido al efecto estérico del grupo voluminoso en la cadena macromolecular, las hidrólisis ácidas y alcalinas de poli(FIP) para obtener poli(hidroxicarbonilmetileno) son muy difíciles [Otsu et al., 1985]. De modo, que bajo las condiciones experimentales seleccionadas, sólo los grupos éster del AcV serían susceptibles a la hidrólisis (esquema II.4).

Esquema II.4. Hidrólisis del copolímero PFV



II.3.5 Caracterización del copolímero fumárico

II.3.5.1 Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Se ha propuesto que una desventaja en el uso de equipos de microondas domésticos es que no presentan un control estricto en las condiciones de reacción, lo cual implica una reproducibilidad incierta [Díaz-Ortiz et al., 2011]. Entonces, con la finalidad de evaluar el grado de reproducibilidad del método empleado, se compararon las características evaluadas por SEC de cada uno de los copolímeros PFV, obtenidos en las 10 repeticiones de la reacción de copolimerización llevadas a cabo. La evaluación estadística se realizó sobre la dispersión de pesos moleculares e índices de polidispersidad entre los distintos productos, mediante el programa GraphPad InStat. El análisis estadístico de las fracciones arrojó los siguientes valores expresados como la media \pm SEM:

$$M_w = 51830 \pm 4034 \quad M_w/M_n = 13,8 \pm 1,7$$

Estos valores corresponden a una variación, en las repeticiones de la copolimerización, del 7,8% en el peso molecular promedio en peso (M_w) y de 12,5% en el índice de polidispersidad (M_w/M_n). Considerando que las síntesis anteriores se efectuaron en un microondas doméstico, una variación de alrededor del 8% en el peso molecular y de 12,5% en su distribución podría considerarse que el método consta de reproducibilidad suficiente para la obtención de fracciones con similares características.

Adicionalmente, la pureza de los copolímeros obtenidos se controló por SEC mediante la ausencia de las señales de monómeros en la detección UV-vis e IR durante la medida de los pesos moleculares. Para esto se tiene en cuenta que los monómeros fumáricos presentan absorción en las longitudes de onda de los detectores mencionados, debido a su estructura conjugada (detector UV-vis) y su grupo carbonilo (detector IR).

II.3.5.2 Espectroscopia FTIR

La estructura del copolímero obtenido PFV se estudió mediante análisis espectroscópico FTIR, como se muestra en la figura II.2. En el espectro se observan las bandas características correspondientes al enlace C-H alifático en 2977, 2934 y 2870 cm^{-1} la señal del grupo carbonilo (C=O) en 1731 cm^{-1} y, en 1233 y 1106 cm^{-1} , las bandas del grupo acilo (RO-C=O).

Igualmente se estudió la estructura del copolímero luego de la hidrólisis alcalina, PFVH, por espectroscopia FTIR, (figura II.3). Donde se encontraron las bandas características: 3443 (O-H), 2958, 2925, 2851 (C-H alifático), 1731 (C=O), 1230 y 1107 (CO-OR). La aparición de la banda -OH en el espectro FTIR del PFVH es evidencia de una reacción de hidrólisis exitosa.

Figura II.2 Espectro FTIR del PFV

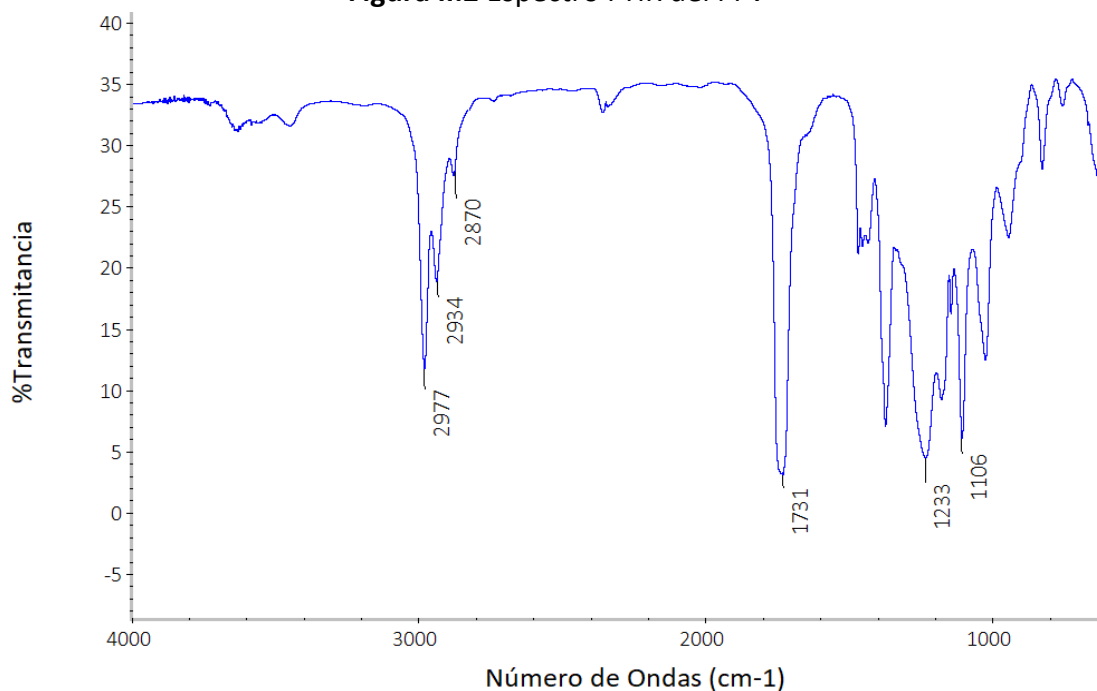
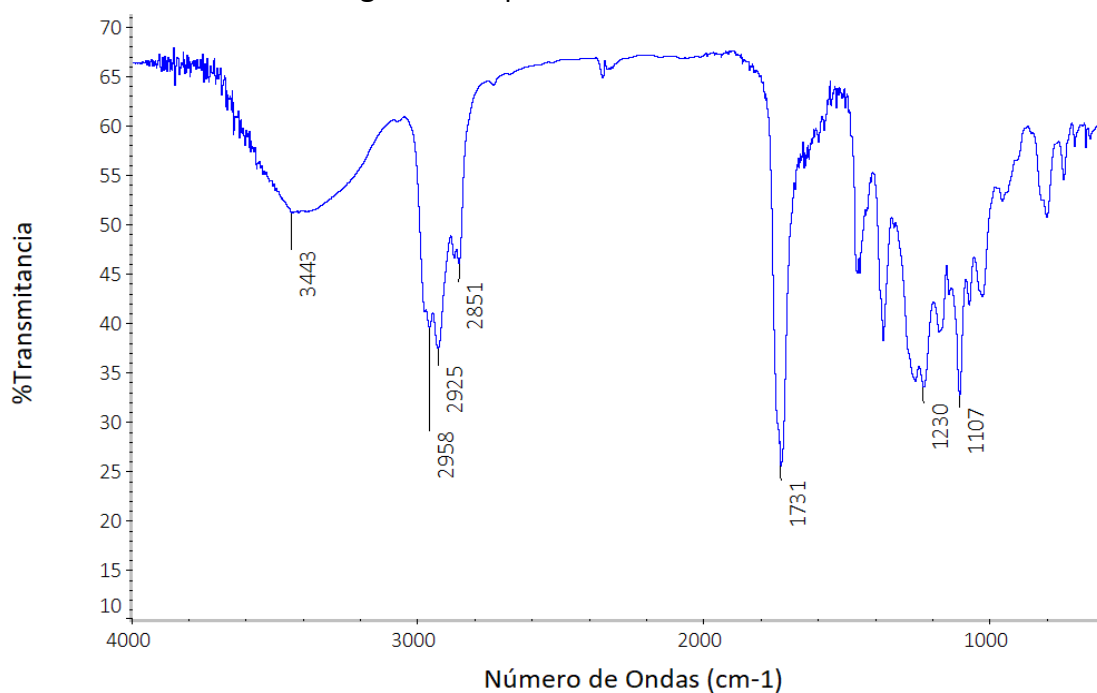


Figura II.3 Espectro FTIR del PFVH



II.3.5.3 Espectroscopia ¹H-RMN

La composición final de los co-monómeros en el copolímero suele ser diferente de la composición de la mezcla inicial; esto se debe a que los monómeros generalmente presentan distinta reactividad hacia la copolimerización. Se ha observado que algunos monómeros tienen más tendencia a homopolimerizar que a copolimerizar, lo que define un parámetro de relación de reactividad, el cual se obtiene a partir del modelo terminal de copolimerización. En este modelo, la reactividad química de una cadena en

crecimiento depende solamente de la unidad final y no de la composición de la cadena que le precede [O dian, 2004].

La estructura del copolímero (PFV) se presenta en la tabla II.2, en donde se muestra además la asignación de la señal de los picos de ^1H -RMN a la estructura, basado en los correspondientes espectros de los homopolímeros. Por su parte, la figura II.4 muestra el espectro obtenido por ^1H -RMN para el PFV.

Tabla II.2 Asignación de señales del espectro ^1H -RMN (CDCl_3) del PFV

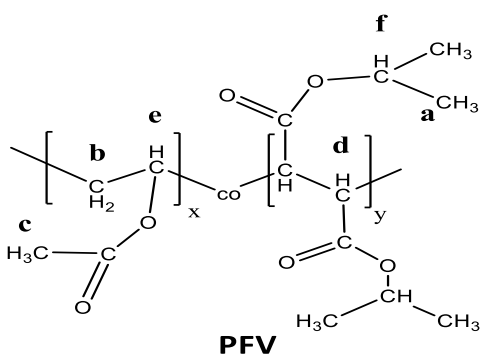
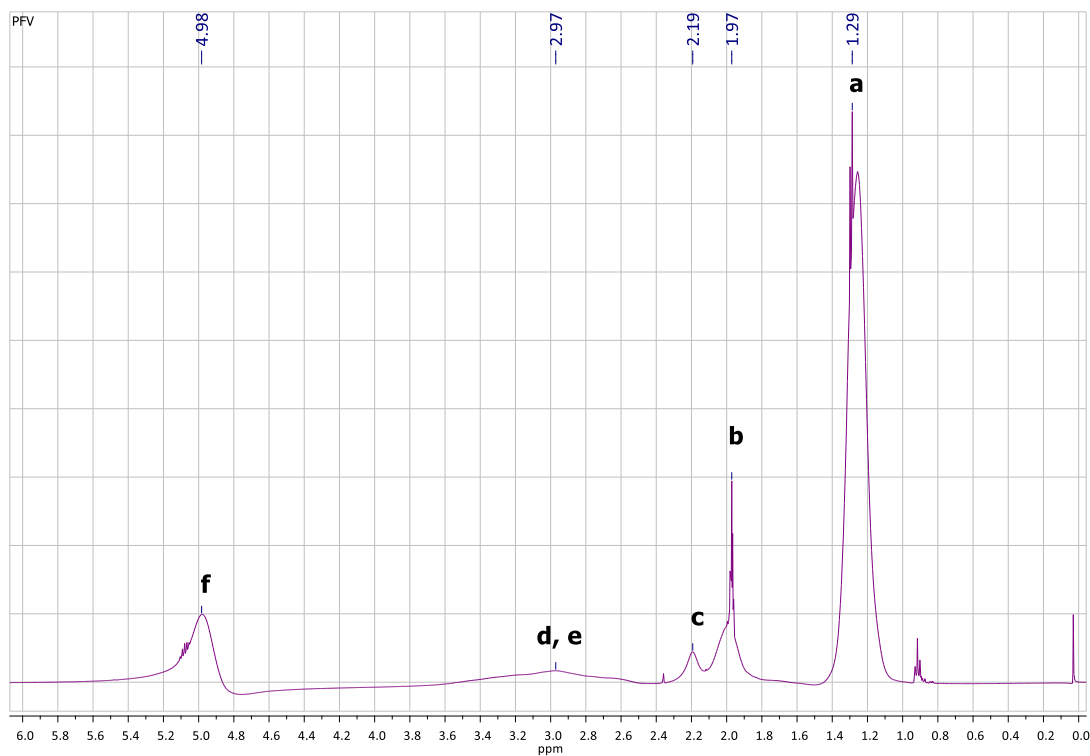
Estructura	δ (ppm)	integración	asignación
	1,29	12H	a
	1,97	2H	b
	2,19	3H	c
	2,97	3H	d, e
	4,98	2H	f

Figura II.4 Espectro ^1H -RMN del PFV



Con este ensayo la composición de PFV se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$F_{FIP} = \frac{I_1/12}{I_1/12 + I_2/5} \quad \text{Ecuación II.4}$$

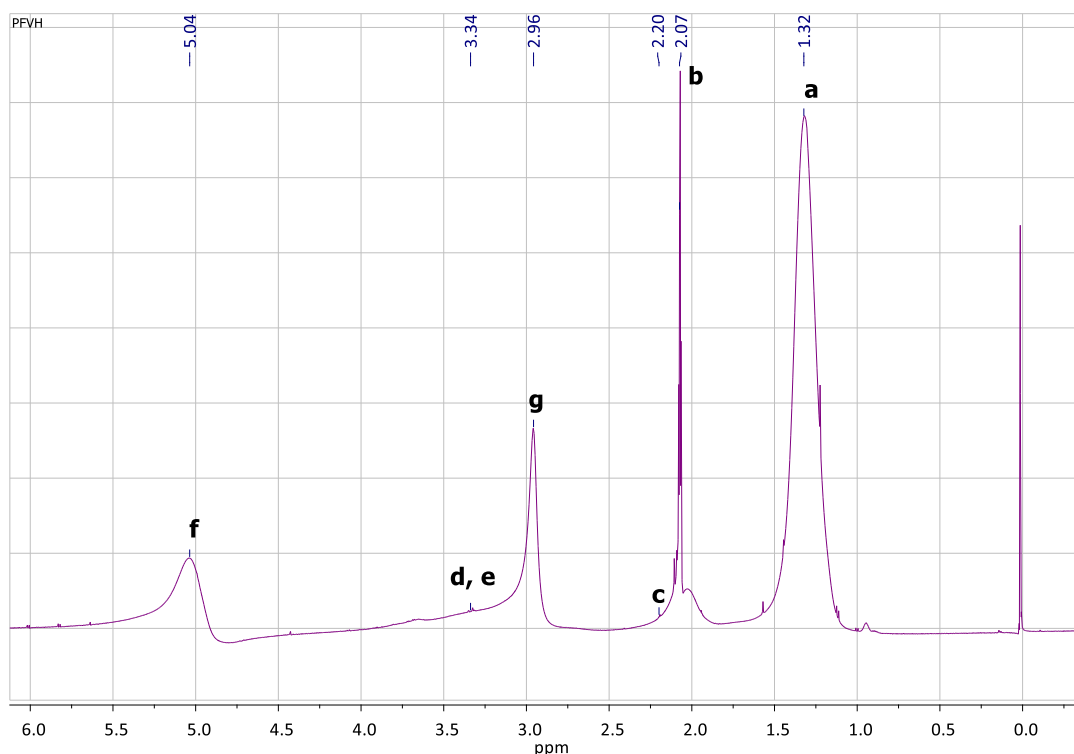
Donde F_{FIP} es la fracción molar del FIP en el copolímero, I_1 corresponde a la integración de los hidrógenos metílicos (CH_3) de la unidad repetitiva FIP ($\delta = 1,27$ ppm), mientras que I_2 es la integración de las señales de los hidrógenos metilenos y metílicos (CH_2 y CH_3) de la unidad repetitiva del AcV ($1,4 \text{ ppm} < \delta < 2,2 \text{ ppm}$). Sobre la base de este análisis, la fracción molar del FIP (F_{FIP}) en el copolímero PFV fue de 0,68. Por lo tanto la composición final de los co-monómeros en el copolímero es de 68% de FIP y 32% de AcV.

En la tabla II.3 se muestra la asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ y la estructura del copolímero hidrolizado (PFVH), y el espectro se presenta en la figura II.5. En esta figura aparece un pico amplio cercano a 3 ppm similar al pico que aparece en el espectro $^1\text{H-RMN}$ para el PFV (figura II.4). Sin embargo, éste se superpone con otro pico agudo asignado a la unidad AcV hidrolizada que junto con la casi desaparición de la señal $-\text{CH}_3$ a 2,2 ppm evidencian la hidrólisis del copolímero. Estas observaciones junto con la banda $-\text{OH}$ a 3443 cm^{-1} del espectro FTIR, confirman la eficacia de la reacción de hidrólisis.

Tabla II.3 Asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del PFVH

Estructura	δ (ppm)	integración	asignación
<p style="text-align: center;">PFVH</p>	1,32	12H	a
	2,07	2H	b
	2,20	3H	c
	2,96	1H	g
	3,34	3H	d, e
	5,04	2H	f

Figura II.5 Espectro ^1H -RMN del FPVH

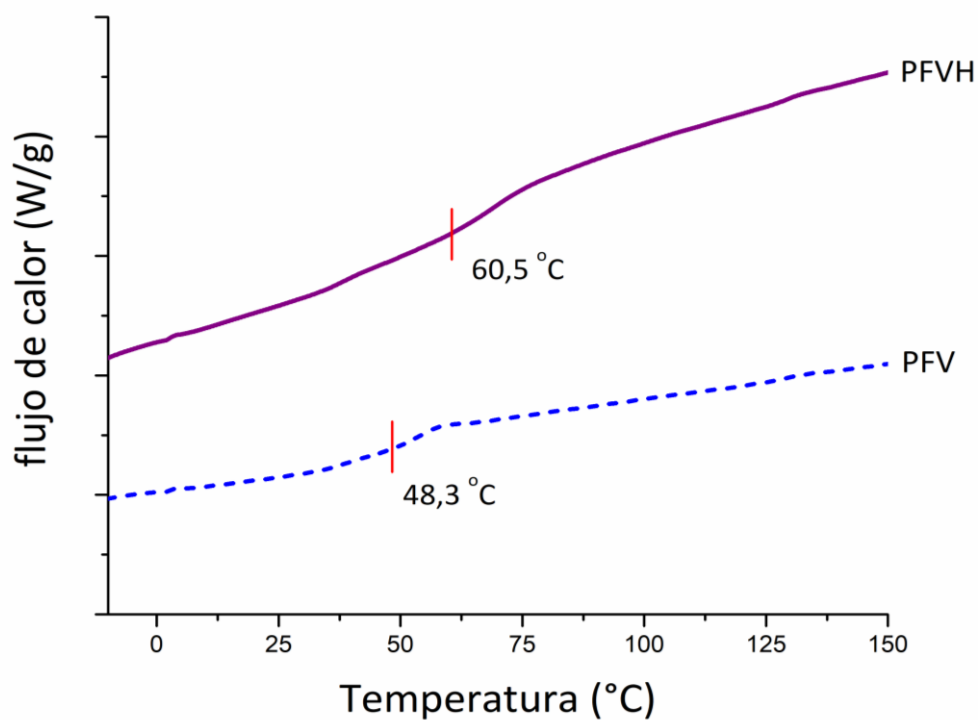


II.3.5.4 Análisis térmico

La temperatura de transición vítrea (T_g) para PFV y PFVH se estudió por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en atmósfera inerte (flujo de nitrógeno). Esta temperatura caracteriza a la mayoría de los polímeros y se debe a un aumento significativo de movimientos a gran escala de las cadenas macromoleculares cuando el sistema alcanza cierta temperatura, de manera que a esa temperatura el material pasa del estado vítreo o rígido a un estado flexible (elastomérico). La T_g es un parámetro que afecta directamente las propiedades finales del material y su valor depende de las características del polímero como: simetría estructural, flexibilidad de la cadena principal, ramificaciones, interacciones entre cadenas de polímero y tamaño de los grupos pendientes [Heath & Cooper, 2013]. En la figura II.6 está representada la curva obtenida del flujo de calor frente al aumento de la temperatura (termograma) del segundo calentamiento para los copolímeros hidrolizado PFVH y sin hidrolizar PFV, obtenida por DSC.

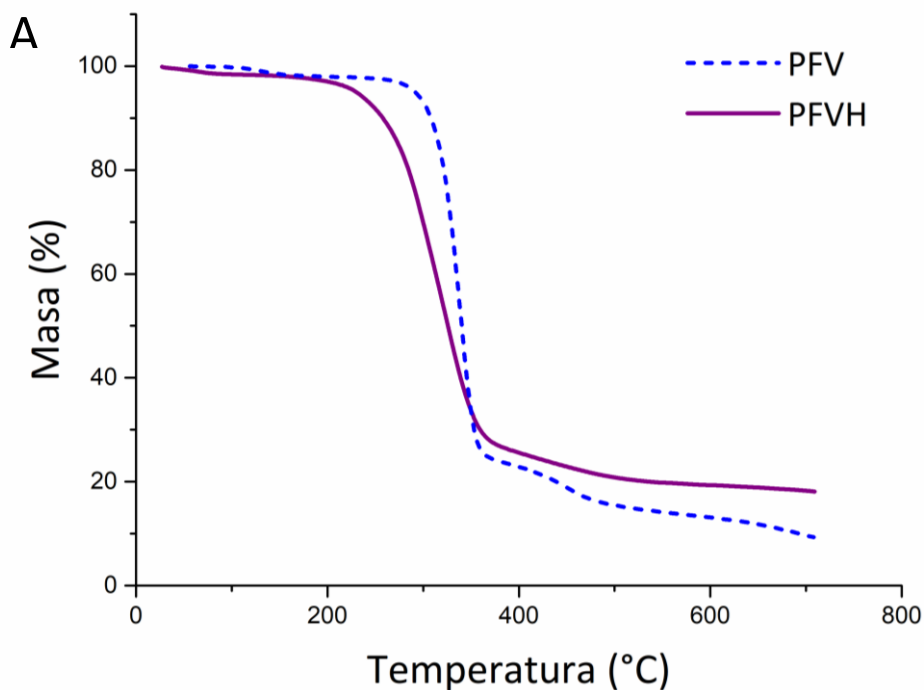
Se encontró que PFVH exhibió un aumento en la T_g ($60,5\text{ }^\circ\text{C}$) en comparación con PFV ($48,3\text{ }^\circ\text{C}$), esto se puede atribuir a una disminución en la flexibilidad de la estructura de la cadena, debido a los enlaces de hidrógeno que pueden darse intra e intercatenarios. No se observan picos de fusión en las curvas de DSC, lo cual sugiere que estos copolímeros no presentan zonas cristalinas.

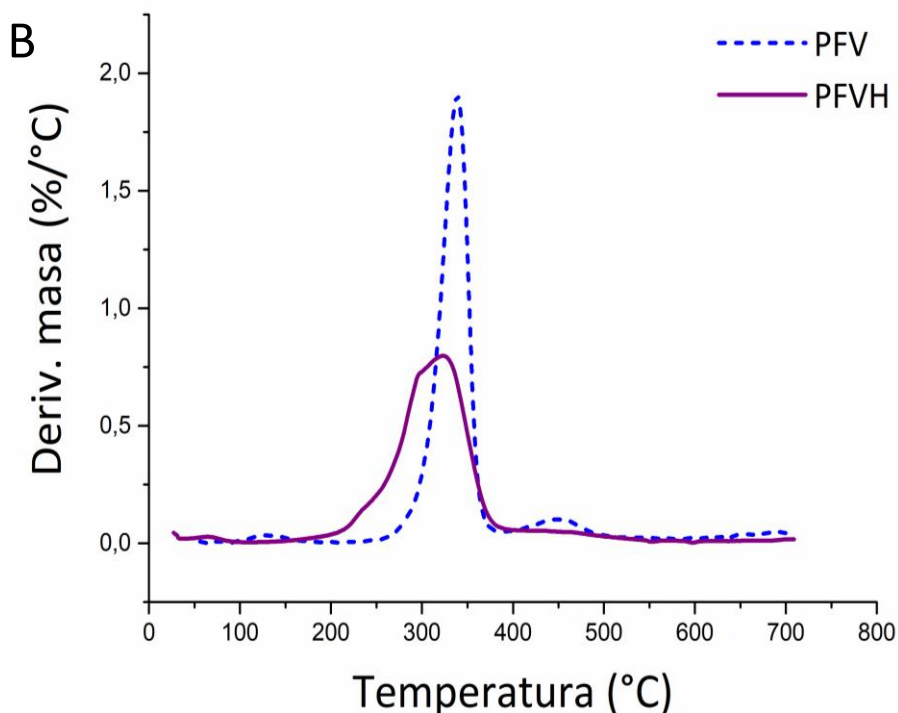
Figura II.6 Termograma observado por DSC para PFV y PFVH



La estabilidad térmica de los copolímeros fue analizada mediante TGA en atmósfera de nitrógeno. En la figura II.7 A se muestran las curvas de pérdida de masa de cada copolímero y en la figura II.7 B las correspondientes derivadas de las curvas (DTG).

Figura II.7 Perfiles de descomposición por TGA para PFV y PFVH, A) pérdida de masa y B) DTG





Encontramos con este ensayo que la temperatura de descomposición inicial (TDI) para el PFV es de 260 °C (figura II.7 A), mostrando una descomposición en dos etapas y con una temperatura de máxima velocidad de descomposición de 339 °C (figura II.7 B). El PFV presentó una TDI más alta para que la del poli(diisopropil fumarato); el cual comienza a descomponerse a 250 °C de acuerdo a lo previamente observado [Oberti et al., 2012]; indicando una mayor estabilidad térmica para el copolímero que la del homopolímero. Se observa una situación ligeramente diferente para el caso del copolímero hidrolizado. El PFVH comienza a descomponerse antes (190 °C) y lo hace en una sola etapa mostrando una velocidad máxima de descomposición de 323 °C.

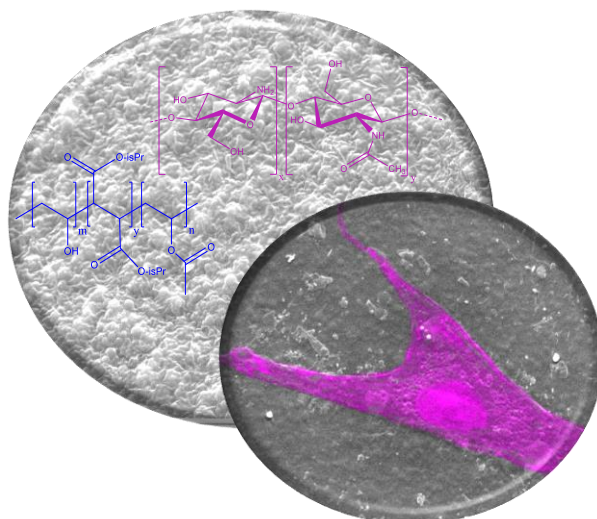
En un trabajo previamente reportado, se encontró una disminución en la estabilidad térmica estudiada por TGA en un copolímero derivado de AcV luego de someterlo a hidrólisis. Además, en ese trabajo también se reportó un aumento en la T_g debido a la hidrólisis, estudiada por DSC [Debuigne et al., 2005]. Por lo tanto, lo reportado es coincidente con nuestros resultados hallados para el copolímero luego de la hidrólisis.

II.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este trabajo se logró sintetizar un poli(fumarato de diisopropilo-co-acetato de vinilo) (PFV) por copolimerización radicalaria empleando peróxido de benzoílo como sistema de iniciación y una fuente de energía alternativa como es la microondas; con buen rendimiento y alta reproducibilidad en la síntesis. El copolímero obtenido presenta un peso molecular alto ($M_w = 51830$) con distribución acorde a lo esperado para un mecanismo de polimerización radical. El PFV pudo ser identificado correctamente por espectroscopia FTIR y $^1\text{H-RMN}$, y el análisis térmico permitió conocer su temperatura de transición vítrea ($T_g = 43,8\text{ }^\circ\text{C}$) y su buena estabilidad térmica mediante DSC y TGA, respectivamente.

El copolímero PFV se sometió a una reacción de hidrólisis básica, logrando así introducir grupos hidroxilos a la estructura polimérica que fueron confirmados por espectroscopia FTIR y $^1\text{H-RMN}$. Para este copolímero hidrolizado (PFVH) se encontró un aumento en la temperatura de transición vítrea ($T_g = 60,5\text{ }^\circ\text{C}$) y una estabilidad térmica algo menor respecto al PFV. El aumento en la hidrofiliidad del material, causado por la introducción de grupos hidroxilo, lo transforman en un copolímero potencialmente más compatible con macromoléculas naturales, tales como el quitosano.

CAPÍTULO III: Diseño, caracterización y propiedades del *scaffold*



III.1 INTRODUCCIÓN

Como se indicó previamente, la ingeniería de tejidos se basa en el uso de *scaffolds* que crean un entorno tridimensional y actúan como sustitutos biológicos para la reparación de los tejidos dañados. Los requisitos que debe cumplir un material para su uso como tal son múltiples y altamente desafiantes. Entre estos se incluyen: buena biocompatibilidad, fácil fabricación, ser esterilizable, biodegradación con una tasa de degradación adecuada, que pueda soportar las cargas mecánicas propias del tejido a reparar, que permita la formación de MEC, induzca formación de tejido nuevo y que éste sea capaz de formar una unión íntima con el tejido que lo rodea [Khan et al., 2008; Bose et al., 2012; Rai et al., 2017]. Además, a la hora del diseño de un *scaffold* existen otras consideraciones que pueden alterar la habilidad de la matriz para la aplicación prevista, tales como la rugosidad superficial, la integridad mecánica y la porosidad [Khan et al., 2008; Thompson et al., 2015]. Por estos requisitos es que existe una extensa lista de criterios que un polímero debe cumplir para ser aplicado de manera segura como agente en la regeneración de tejidos [Park & Lakes, 2007]. Al momento no se ha encontrado ningún polímero que individualmente pueda cumplir con estos criterios, por ello la mezcla de polímeros se ha convertido en una alternativa prometedora en ingeniería de tejidos para desarrollar nuevos *scaffolds* para la regeneración de tejidos [Bose et al., 2012; Panseri et al., 2012; Musumeci et al., 2014]. En particular, la buena biocompatibilidad y la biodegradabilidad de los polímeros naturales pueden combinarse con la amplia gama de técnicas de procesamiento y propiedades fisicoquímicas que provienen de los polímeros sintéticos.

Como se mencionó anteriormente, para este trabajo de tesis nos resultó interesante la mezcla de quitosano con un polímero sintético derivado de un polímero fumárico. El quitosano ha sido ampliamente utilizado de manera individual para el desarrollo de *scaffolds* para su uso en ingeniería de tejidos [Tuzlakoglu et al., 2004; García Cruz et al., 2008]. Particularmente, se ha encontrado que es un sustrato adecuado para la adhesión y proliferación de células osteoblásticas, así como para la formación y mineralización de la matriz ósea *in vitro* e *in vivo* [Costa-Pinto et al., 2011; Ferrand et al., 2014; Levengood & Zhang, 2014]. En ocasiones sus aplicaciones en la regeneración de tejidos se ven restringidas no sólo por las pobres propiedades mecánicas de los *scaffolds* de quitosano puro, propias de su alta temperatura de transición vítrea y su cristalinidad, sino también por su hidrofiliidad y su elevada tasa de degradación [Madihally et al., 1999]. Con el objetivo de modificar y mejorar las propiedades del quitosano para su empleo en ingeniería de tejidos muchos investigadores han optado por la combinación con una gran variedad de materiales, entre los que se puede destacar la utilización de polímeros tanto de origen natural como sintético [Wu et al., 2008; Croisier & Jérôme, 2013; Levengood & Zhang, 2014]. En especial, la mezcla de quitosano con un polímero sintético hidrofóbico constituye una manera sencilla de equilibrar sus pobres propiedades mecánicas y su fuerte carácter hidrofílico.

Una de las cuestiones más importantes relacionadas con la preparación de mezclas de polímeros es su compatibilidad física, que está estrechamente relacionada con las interacciones polímero-polímero. Salvo raras excepciones, la mezcla de dos polímeros conduce a separación de fases y pérdida de las propiedades mecánicas. Con el objetivo de salvar este problema para compatibilizar numerosas mezclas basadas en quitosano se

aplicaron diferentes metodologías, entre las que se puede destacar el uso de agentes entrecruzantes [Berger et al., 2004]. El entrecruzamiento, en general, permite modificar el comportamiento mecánico del material y por ende la integridad estructural del *scaffold* así también como modificar la bioactividad y el patrón de degradación del mismo. En el presente trabajo hemos seleccionado el bórax como agente entrecruzante, dado que este reactivo es capaz de formar un complejo entre el ion tetrahidroxiboruro y varios polioles, una especie de interacción que no se limita a los grupos hidroxilo en los átomos de carbono adyacentes, sino que también puede implicar a los átomos de carbono alternos [Dawber & Green, 1986]. Por lo tanto, esperamos que el bórax actúe como agente entrecruzante formando un complejo entre los grupos hidroxilo de ambos polímeros, PFVH y CHI.

Por otra parte, actualmente los avances en química orgánica sintética y las innovaciones tecnológicas permiten el desarrollo de una amplia gama de materiales poliméricos inteligentes como candidatos para el desarrollo de dispositivos biomédicos, implantes transitorios y vehículos para administración de fármacos. Un desafío es lograr que el diseño de los materiales y los procesos de fabricación puedan satisfacer mejor las necesidades del tejido afectado. Se han desarrollado numerosos métodos de estructuración para cumplir con los distintos requisitos; entre ellos se utilizan diferentes técnicas basadas en la evaporación de solvente (*solvent casting*), liofilización, lixiviación de partículas, separación de fases, prototipado tridimensional y *electrospinning*. Cada método de elaboración posee ventajas y desventajas, y confiere al *scaffold* características estructurales diferentes [Mano et al., 2007; Ravichandran et al., 2012; Levengood & Zhang, 2014]. La técnica de *solvent casting* es el método más sencillo y ampliamente utilizado; consiste en el vertido de la solución de polímero sobre una superficie que lo contenga y posterior evaporación completa del solvente mediante secado al aire o al vacío. Las condiciones de aplicación de esta técnica, elegida para la formación de las películas de la mezcla de PFVH y CHI, son la cohesión adecuada entre las moléculas, la suficiente difusión y completa evaporación del disolvente, de modo tal que las cadenas de polímeros se unan para formar películas.

Como se indicó previamente, una propiedad fundamental de un biomaterial para ser empleado como *scaffold* en ingeniería de tejidos es la biocompatibilidad; es decir, que soporte la actividad celular normal sin inducir una respuesta inflamatoria o inmune inadecuada [Williams, 2008]. Los cultivos celulares *in vitro* son modelos ideales, y el primer paso antes de los estudios *in vivo*, para la observación y el análisis de las interacciones célula-*scaffold* y la influencia de los materiales en el comportamiento celular respecto a su biocompatibilidad y citotoxicidad. Es muy importante entonces estudiar los biomateriales a ser empleados en ingeniería de tejidos *in vitro*; estos deben garantizar la interacción celular, la proliferación y la diferenciación, con el mantenimiento de un fenotipo y función celular deseados [Thompson et al., 2015]. Para estos estudios algunos investigadores emplean cultivo de células madres o directamente cultivos celulares propios del tejido que se quiere reparar [Biggs et al., 2009; Costa-Pinto et al., 2011; Levengood & Zhang, 2014]. Por otro lado, para estudiar la citotoxicidad de los biomateriales un buen modelo celular son los macrófagos; estas células son los actores principales del sistema inmune que van a reaccionar frente a cuerpos extraños aumentando marcadamente los niveles de citoquinas proinflamatorias como interleuquina-1 β (IL1 β) y factor de necrosis tumoral (TNF α), así como la producción de óxido nítrico (NO) [Fernández et al., 2014].

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 Reactivos y drogas

- Solventes: metanol (99.8%, Merck), dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), ácido acético glacial (Anedra), ácido clorhídrico (HCl 37%, Anedra).
- Borato de sodio (Bórax, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), Timper Laboratorios (Buenos Aires, Arg.).
- Hidróxido de sodio (NaOH 99,2%, Anedra).
- Cultivo celular: medio de cultivo celular de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Laboratorio Microvet S.A. (Buenos Aires, Arg.). Suero Fetal Bovino (SFB), Natacor (Córdoba, Arg.). Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Biopack, (Buenos Aires, Arg.). Tripsina – EDTA, Gibco, Invitrogen (Buenos Aires, Arg.). Material de cultivo celular, Nunc, Elessar Científica (CABA, Arg.).
- Antibióticos/antimicótico: Estreptomina (1.000 U.I.) y Penicilina G. sódica (3.000.000 U.I.), Laboratorios Richet S.A. (Buenos Aires, Arg.); fungizona (Anfotericina B), Merck.

III.2.2 Obtención de las películas

Previo al casting de las películas se preparó una solución de quitosano (CHI) al 1% p/v disuelta en ácido acético diluido (3% v/v) y sobre ésta se goteó en agitación una solución al 1% p/v del PFVH previamente sintetizado disuelto en ácido acético glacial. Todas las soluciones poliméricas se prepararon 24 horas antes de la formación de las mezclas para asegurar la correcta disolución de los polímeros. La mezcla se realizó 50% p/p de CHI y el PFVH. Con el objetivo de obtener los geles con propiedades mejoradas y adecuadas para los ensayos posteriores se realizó un entrecruzamiento por incorporación de bórax adaptando una metodología previamente publicada [Sreedhar et al., 2005]. Para ello, manteniendo la agitación sobre la mezcla se adicionó el bórax en una relación de 4% p/p respecto a la mezcla de PFVH y CHI. Finalmente, la solución obtenida se sonicó durante 5 min (Bandelin ultrasonic cleaner, sonorex RK 100) y se volcó sobre moldes de Teflón o placas de cultivo (para los ensayos biológicos). Los recipientes conteniendo las mezclas se dejaron a temperatura ambiente hasta evaporación completa del solvente. Luego las películas obtenidas se tratan con una solución de NaOH (5% p/v) durante 2 horas para neutralizar el pH y posteriormente se lavan con agua destilada para retirar los restos de solvente hasta alcanzar la neutralidad. Esta muestra se denominó PFVH-CHI-B. Para fines comparativos, también se preparó una mezcla física entre PFVH y CHI sin bórax que se denominó PFVH-CHI. Las películas así obtenidas fueron esterilizadas por la exposición a luz UV durante 30 min previo a su uso.

III.2.3 Estudio de las películas

III.2.3.1 Espectroscopia ATR-FTIR

Con el fin de caracterizar la mezcla se realizó espectroscopia infrarroja con transformadas de fourier y sistema de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) sobre las películas obtenidas. Los espectros ATR-FTIR del PFVH-CHI y de PFVH-CHI-B se registraron a temperatura ambiente en un espectrómetro Spectrum One FTIR de Perkin Elmer equipado con un elemento de reflexión interno de diamante usando 4 scans de acumulación, de 4000 a 400 cm^{-1} y con la misma presión del cristal sobre la superficie en cada muestra. Estos se compararon con espectros obtenidos del mismo modo para el CHI y el PFVH.

III.2.3.2 Análisis térmico

El estudio del comportamiento térmico de las películas obtenidas se realizó, del mismo modo que para el estudio de los polímeros, mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g) de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B por DSC bajo una atmósfera de nitrógeno (flujo 20 ml/min), en un equipo DSC 8500 Hyper DSC-Perkin Elmer. Los ciclos térmicos consistieron en una rampa de calentamiento, seguida por una rampa de enfriamiento y una rampa de calentamiento final, utilizando procesos de calentamiento y enfriamiento de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde -20°C a 150°C . Para los cálculos se consideró la curva correspondiente al segundo calentamiento. Por otra parte, mediante TGA se analizó la estabilidad térmica de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B, con un equipo TGA Q500-TA Instruments, bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de 90 ml/min y rampa desde temperatura ambiente hasta 700°C a una velocidad de calentamiento de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

III.2.3.3 Apariencia y morfología

La apariencia de las películas se evaluó macroscópicamente a través de una observación visual y el espesor de las mismas fue determinado empleando un micrómetro Mahr (MarStand 821 FG/NG). Así mismo, mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) se analizó la morfología de la superficie y del corte transversal en un equipo Philips 505 (The Netherlands); con una aceleración de voltaje de 20 kV. Para estudiar el corte de las películas las fracturas se realizaron con bisturí previa congelación con nitrógeno líquido, luego se metalizaron con oro y se examinó su morfología.

III.2.3.4 Estudio de hinchamiento

La capacidad máxima de hinchamiento y absorción de agua del material se determinó mediante el siguiente procedimiento: porciones de membrana previamente secadas en tambor de vacío hasta peso constante fueron pesadas (w_0) y posteriormente inmersas en solución salina de buffer fosfato (PBS, 0.01 M, $\text{pH}=7,4$) a 37°C ; a intervalos regulares de tiempo, las películas fueron retiradas y pesadas nuevamente esta vez en estado húmedo (w_s). El contenido de agua absorbida por la película se calculó como la diferencia entre w_s y w_0 , mientras que el porcentaje de hinchamiento (*swelling*, S_w) se definió como:

$$\%S_w = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad \text{Ecuación III.1}$$

El mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de transporte de agua a través de la película PFVH-CHI-B se estimó analizando los datos experimentales mediante el empleo del modelo de Ritger-Peppas [Ritger & Peppas, 1987] utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = k t^n \quad \text{Ecuación III.2}$$

Donde k es una constante característica del sistema, que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el disolvente, n es el exponente de hinchamiento, que describe el mecanismo de transporte de agua en la membrana, mientras que W_t y W_∞ representan la cantidad de agua absorbida en el tiempo t y en el tiempo de equilibrio, respectivamente. El valor de n puede obtenerse a partir de la pendiente, mientras que k se obtiene a partir de la intersección del gráfico de $\log(W_t/W_\infty)$ frente a $\log t$ de los datos experimentales, hasta el 60% del hinchamiento máximo. En la ecuación III.2 el valor numérico de n proporciona información sobre el mecanismo de transporte de agua. Un valor de $n = 0,5$ se corresponde con la cinética de Fick, donde la velocidad de difusión del agua es el proceso limitante, mientras que un valor de $0,5 < n < 1$ indica un proceso de difusión no fickiano en el que la relajación de las cadenas poliméricas determina la velocidad de absorción del agua. El caso límite (denominado transporte de Caso II en el que $n = 1$) corresponde a condiciones en las que la velocidad de difusión del agua es superior a la velocidad de relajación de la cadena del polímero; en esta condición, la tasa de captación de masa es directamente proporcional al tiempo [Ganji et al., 2010].

III.2.3.5 Estudio de degradación

Se evaluó la degradación de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B sumergiendo las membranas, previamente secadas a peso constante y pesadas, en placas de 6 pocillos con 10 ml de PBS con o sin el agregado de Lipasa 115 U/L (EC 3.1.1.3, de *Pseudomonas* sp., Sigma). Las muestras fueron incubadas en estufa de cultivo a 37 °C, con una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ durante 7, 15 y 45 días; las soluciones se cambiaron semanalmente. Todas las soluciones preparadas se esterilizaron usando un filtro de jeringa de 0,2 μm y se mantuvieron hasta su uso a 4 °C. Al final de cada período de tiempo evaluado, se retiraron las muestras de la solución, se lavaron con agua destilada y se secaron en tambor vacío a temperatura ambiente hasta peso constante. Para evaluar la degradación se comparó el peso inicial seco (w_0) de las muestras con el peso final seco (w_d) usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{(w_0 - w_d)}{w_0} \times 100 \quad \text{Ecuación III.3}$$

III.2.3.6 Pruebas mecánicas

Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de las películas, se realizaron pruebas de tracción sobre PFVH-CHI y PFVH-CHI-B. Las propiedades de tracción se determinaron con una máquina de ensayo universal (DigimesstC500), utilizando una celda de carga de fuerza ('Interface' de Arizona, EE.UU.), capacidad de SM-50 N bajo condiciones de humedad controlada a temperatura ambiente. Las muestras fueron

cortadas con forma de “hueso de perro” (50 x 18 mm²) y se ensayaron a una velocidad de 5 mm/min hasta el punto de rotura. La máxima resistencia tensil, el módulo elástico (Módulo de Young) y la elongación al quiebre se calcularon sobre la base de las curvas de tensión vs. deformación generadas con el equipo.

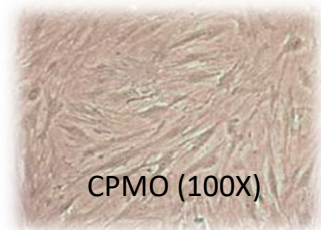
III.2.4 Ensayos *in Vitro*

Todos los procedimientos utilizados en este trabajo, que implican animales de experimentación, están de acuerdo con la guía de Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio [National Research Council, 2010], bajo las condiciones establecidas en las normas bioéticas nacionales - Disposición ANMAT 5330/97 - e internacionales - Código de Nüremberg, Declaración de Helsinki y sus modificaciones. Además fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata (CICUAL Protocolo Número 001-05-15).

III.2.4.1 Cultivos celulares

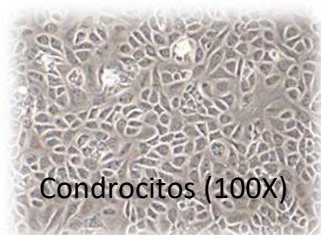
III.2.4.1.1 Células progenitoras de médula ósea (CPMO)

Se emplearon células CPMO obtenidas de ratas Sprague-Dawley (machos - 3 meses de edad), los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical bajo anestesia. Se disecaron los fémures y luego de un lavado con alcohol 70° se cortaron las epífisis en condiciones de esterilidad a fin de exponer el canal medular por el cual se hizo fluir medio de cultivo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/l) y estreptomycin (100 mg/l) (medio basal). La suspensión obtenida se recogió en tubos estériles y se plaqueó en frascos de cultivo celular de 25 cm² manteniéndose en estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37 °C, en una atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂. Luego de 24 horas, las células no adheridas fueron removidas aspirando el medio de cultivo, el cual se renovó dos veces por semana hasta que las células llegaron a confluencia (aproximadamente 10 días). A continuación la monocapa celular fue despegada usando 0,025% p/v de tripsina en PBS / EDTA (1 mM) y las células transferidas a frascos para cultivo celular de 75 cm², o a platos de cultivo multipocillos para realizar los diferentes experimentos manteniendo las mismas condiciones de cultivo [Molinuevo et al., 2010].



III.2.4.1.2 Condrocitos

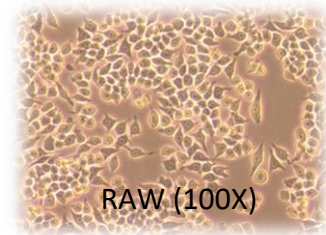
Se empleó un cultivo primario de condrocitos, aislados a partir de cartílago hialino del esternón de ratas Sprague-Dawley jóvenes. Para ello, se disecó la apófisis xifoides del esternón, se retiró el pericondrio y el cartílago se cortó en pequeñas porciones con bisturí bajo condiciones de esterilidad; se lavó tres veces con PBS y se trató con tripsina 0,025% p/v con agitación durante 15 minutos, adaptando la metodología descrita por Qiu y colaboradores [Qiu et al., 2000]. Luego el



cartílago se suspendió en medio basal, se depositó en frascos de cultivo celular de 25 cm², manteniéndolo en un incubador para cultivo celular a 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂ (condiciones basales). Cada tres días se renovó la mitad del medio de cultivo hasta la formación de una monocapa celular, aproximadamente 15 días. Luego se despegó usando tripsina 0,025% p/v en PBS / EDTA (1 mM), transfiriendo las células a frascos para cultivo celular de 75 cm² o a platos de cultivo multipocillos para realizar los diferentes ensayos, cultivando bajo las mismas condiciones basales.

III.2.4.1.3 Células RAW264.7 (ATCC TIB-71)

Las células RAW264.7 son una línea celular establecida, derivada de macrófagos murinos (*Mus musculus*) obtenidos a partir de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon; su morfología es monocítica y crecen adheriéndose a las superficies de cultivo estándares [Raschke et al., 1978]. Esta línea celular expresa distintos marcadores de citotoxicidad,



como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) y poseen capacidad de diferenciarse hacia macrófagos con alta capacidad fagocítica [Denlinger et al., 1996]; por este motivo constituyen un excelente modelo biológico *in vitro* para estudios de citotoxicidad y degradación de distintas sustancias y han sido ampliamente empleadas para tal fin en nuestro laboratorio y por otros colegas. Las células RAW264.7 se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, en DMEM suplementado con 5% de SFB, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Para realizar los subcultivos, las células se despegan del frasco en el cual crecen, usando PBS / EDTA (1 mM) y se resuspenden en DMEM con 5% SFB.

III.2.4.2 Viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad sobre las películas obtenidas se realizaron ensayos de adhesión y proliferación con las células CPMO y los condrocitos. La viabilidad celular a diferentes tiempos se evaluó mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). El MTT, compuesto amarillo soluble en agua, en células viables se reduce metabólicamente, por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, a un formazán insoluble azul-violeta. La actividad mitocondrial de las células tratadas, se correlaciona con la intensidad de color determinada por mediciones espectrofotométricas después de disolver el formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) y es directamente proporcional al número de células viables [Grillo et al., 2010]. Para este ensayo se prepararon las películas poliméricas por el método de *solvent casting* directamente sobre platos de 96 pocillos y se esterilizaron con UV como se explicó previamente. Se cultivaron $2,7 \times 10^3$ células por pocillo en una placa de 96 con o sin membrana (condición control) a 37 °C en 5% de CO₂ en atmósfera húmeda con medio basal más fungizona (0,25 µg/ml) durante 1 h (adhesión), 1, 3, y 7 días (proliferación). Al final de cada tiempo se retiró el medio y se reemplazó por 100 µl de medio conteniendo MTT (0,1 mg/ml) incubando las células durante 2 h adicionales, se descartó el sobrenadante y después se adicionaron 100 µl de DMSO a cada pocillo para la lisis celular y la disolución del formazán agitando durante 10 min. A continuación, el extracto

se transfirió otra placa limpia y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector automático de placa de ELISA (Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland). Los datos para este ensayo son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie control luego de transcurrida 1 hora desde que se inició el ensayo.

Para evaluar la interacción celular con las membranas de PFVFH-CHI-B, las células CPMO se cultivaron sobre las membranas durante 1 h y 24 h. Luego, las membranas se lavaron con PBS, se fijaron con p-formaldehído 10% durante 10 min, se deshidrataron con metanol durante 5 min, se secaron e inmediatamente después se metalizaron con oro para su observación por SEM en un equipo Phillips 505 (The Netherlands).

III.2.4.3 Evaluación de la capacidad osteogénica

III.2.4.3.1 Diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico

Para estos estudios las células CPMO fueron plaqueadas en platos de 24 pocillos con y sin membrana (condición control) estériles con una densidad de 5×10^4 células por pocillo en medio basal suplementado con fungizona (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e incubadas a 37 °C en 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Una vez que alcanzaron un 70-80% de confluencia para inducir la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico el medio basal se suplementó con 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerofosfato de sodio (medio osteogénico), cambiando el medio 3 veces por semana. El β -glicerofosfato actúa como sustrato de la fosfatasa alcalina para producir los depósitos de mineral, y funciona de forma sinérgica con el ácido ascórbico, un cofactor necesario para la síntesis de colágeno, para promover la expresión del fenotipo osteoblástico [Quarles et al., 1992].

La capacidad osteogénica de las células CPMO creciendo sobre la película PFVH-CHI-B se evaluó a través de la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), la producción de colágeno tipo I y la producción de nódulos de mineralización mediante métodos colorimétricos. Todos los datos fueron expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal las células que crecieron sobre el control. Para estos ensayos, además del control de las células creciendo sobre la placa de cultivo celular, se realizaron controles sobre la película PFVH-CHI-B sin células (blanco de membrana). De manera complementaria, se determinó la expresión de marcadores moleculares de diferenciación osteoblástica (Runx2, colágeno tipo 1, FAL) mediante la técnica semicuantitativa de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las metodologías empleadas se detallan a continuación.

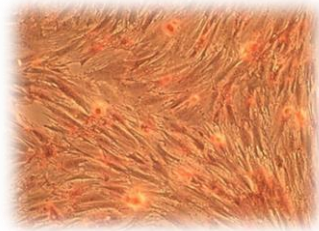
III.2.4.3.2 Actividad de fosfatasa alcalina

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL), un marcador del fenotipo osteoblástico, se evaluó sobre extractos de las células CPMO diferenciadas sobre las películas durante 15 días en medio osteogénico. Al final de este período de incubación se descartó el medio de cultivo, se lavó con PBS y se lisaron las células con 250 μl Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Arg.) 0,1% v/v en agua destilada. Una alícuota del extracto celular obtenido fue utilizada para evaluar la actividad de la FAL por el método colorimétrico cinético utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Arg.). El producto de hidrólisis, p-nitrofenol, se determinó por

absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en buffer glicina (glicina 55 mM, MgCl₂ 0,55 mM, pH=10,5) durante un período de tiempo predeterminado [Fernández et al., 2014]. Por otro lado, otra alícuota del extracto se utilizó para determinar la concentración de proteínas celulares totales por el método colorimétrico de Bradford, determinando la absorbancia a 595 nm (PG Instruments T60 UV/VIS Spectrophotometer). [Bradford, 1976].

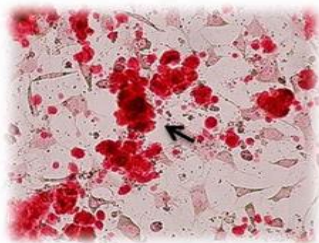
III.2.4.3.3 Determinación de la producción de colágeno tipo I

La producción de colágeno tipo 1 (Col 1) se determinó utilizando un ensayo colorimétrico mediante la técnica de Sirius Red [Tullberg-Reinert & Jundt, 1999]. Luego de 15 días de diferenciación osteoblástica, las células se fijaron con solución fijadora de Bouin (ácido pícrico saturado / formaldehído 35% / ácido acético glacial, 15:5:1) durante 1 h. Luego se lavó con ácido clorhídrico 0,1 N y se tiñó con una solución del colorante Sirius Red (Sigma-Aldrich Buenos Aires, Arg.) (0,1% p/v en ácido pícrico saturado) por 1 h. En la imagen ilustrativa se muestra la monocapa celular de CPMO diferenciadas 15 días, con su colágeno asociado teñido con este colorante, empleando un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 adicionado con una cámara Nikon Coolpix 4500. Trascorrido este tiempo se retiró el exceso del colorante, se extrajo con NaOH 0,1 N y se midió la absorbancia a 550 nm. En paralelo se realizó una curva de calibración utilizando colágeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU).



III.2.4.3.4 Determinación de la producción de nódulos de mineralización

Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo de las células CPMO en un medio de diferenciación osteogénico utilizando la coloración con rojo de alizarina S [Ueno et al., 2001]. La monocapa de células se fijó con p-formaldehído al 10% en PBS durante 10 minutos, se lavó con agua destilada y se coloreó con una solución de rojo de alizarina S 2% p/v en agua destilada (pH 4,2) durante 10 min. El exceso de colorante se retiró con agua destilada, se solubilizó el colorante con 0,1 N de NaOH y se midió la absorbancia a 548 nm. En la imagen se observa una fotografía representativa, previo a la etapa de extracción del colorante, la flecha señala los nódulos de mineral producidos.



III.2.4.3.5 Expresión de marcadores moleculares osteogénicos

Para los estudios de RT-PCR se aisló el ARN total de las células CPMO cultivadas sobre placas de 6 pocillos con y sin membrana en medio de diferenciación osteogénico durante 15 días mediante el método del reactivo TRIZOL (Invitrogen, Argentina), según lo sugerido por el fabricante. Se analizó la expresión de los marcadores osteogénicos (Runx2, fosfatasa alcalina (FAL) y colágeno tipo I (Col I)) mediante la técnica semicuantitativa RT-PCR utilizando MMLV-RT (PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina), oligo dT (Biodinamics) y ADN polimerasa termoestable (Taq pegasus; PB-L Productos Bio-Lógicos, Argentina). El oligo dT funciona como cebador de la reacción para

retrotranscribir ARN mensajero (ARNm) y así obtener ADN codificante. Para esta técnica se prosiguió según el protocolo indicado por el fabricante. Los *primers* específicos para los marcadores se diseñaron a partir de datos de secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el software CLC Genomics Workbench (QIAGEN) (tabla III.1). La temperatura de alineamiento (T_a) para cada par de *primers* se calculó usando el software disponible en www.appliedbiosystems.com. Luego los productos de la RT-PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% p/v en buffer TAE (0,5% p/v Tris (Sigma-Aldrich, Bs. As., Arg.), 0,1% v/v ácido acético glacial y 0,001 M de EDTA, pH = 8) con bromuro de etidio (BrEt) como colorante de visualización; cuantificando la intensidad de las bandas utilizando la herramienta de análisis de geles del programa MBF ImageJ (www.macbiophotonics.ca/imagej). Los resultados se expresan como intensidad relativa y representan el cociente entre la intensidad de señal de la banda específica de cada marcador evaluado y la intensidad de señal de β -actina como proteína constitutiva (*housekeeping*).

Tabla III.1 *Primers* marcadores osteogénicos

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	T_a (°C)
β -actina	NM_031144.3	345	fw CCTTCAACACCCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56,1
Runx2	XM_006244554.2	598	fw GCCGGAATGATGAGAACTA rv TGAGAGAGGAAGGCCAGA	55,1
FAL	J03572.1	737	fw GACAGCAAGCCCAAGAGA rv CAGTTCAGTGCGGTTCCA	55,1
Col I	NM_053304.1	651	fw GCATACACAATGGCCTAA rv CTGTTCCAGGCAATCCAC	51,8

III.2.4.4 Evaluación de la capacidad condrogénica

Para evaluar la capacidad condrogénica de las películas PFVH-CHI-B se utilizaron los condrocitos primarios aislados como se indicó previamente. Los condrocitos fueron crecidos sobre placas de 24 pocillos con y sin la película polimérica, esterilizadas como se indicó previamente en el punto 3.1.2., se dejaron crecer hasta confluencia y se mantuvieron en medio basal suplementado con fungizona (0,25 $\mu\text{g/ml}$) durante 14 días a 37 °C en 5% de CO_2 y atmósfera húmeda para estudiar la producción de glicosaminoglicanos sulfatados y la expresión de marcadores condrogénicos moleculares mediante RT-PCR, detalladas a continuación.

III.2.4.4.1 Determinación de glicosaminoglicanos sulfatados

Luego de 14 días se determinó la producción de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) [Bahmanpuret & Paulsen, 2006], como una medida de maduración de los condrocitos. Las células se fijaron con p-formaldehído 10% durante 10 min, se tiñeron durante toda la noche con 0.001% p/v de Azul Alcían/ ácido acético al 3% v/v (pH = 2,5); se lavaron con HCl 0.1 N seguido de un lavado con agua destilada y se extrajo el colorante con DMSO durante toda la noche para solubilizar



agua destilada y se extrajo el colorante con DMSO durante toda la noche para solubilizar

el colorante asociado a los GAGs de la matriz, determinando la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 600 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal las células que crecieron sobre la condición control.

III.2.4.4.2 Expresión de marcadores moleculares condrogénicos

Para el análisis de los marcadores moleculares condrogénicos, mediante la técnica de RT-PCR, se aisló el ARNm de los condrocitos cultivados durante 14 días con medio basal, y se trató de igual modo que para la evaluación de los marcadores osteogénicos detallada previamente. Se analizó la expresión de los marcadores condrogénicos (colágeno tipo II (Col 2), *agrecán* y *Sox9*) que fueron normalizados utilizando β -actina como *housekeeping*. Los *primers* específicos para los marcadores condrogénicos se diseñaron a partir de datos de secuencia del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (tabla III.2).

Tabla III.2 *Primers* marcadores condrogénicos

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	Ta (°C)
β -actina	NM_031144.3	345	fw CCTTCAACACCCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56,1
Col 2	NM_012929.1	295	fw GGGGCAGAAAGGAGAACCT rv TTGCATGACTCCCATCTGG	57,2
<i>Agrecán</i>	NM_022190.1	525	fw CCATCCCCTGCTACTTCATC rv CACCATAGCAACCTTCCC	54,5
<i>Sox9</i>	NM_080403.1	503	fw TCTCCTGGACCCCTTCAT rv GGTGGTCTTTCTTGCT	52,3

III.2.4.5 Evaluación de la citotoxicidad

La eventual citotoxicidad de las películas PFVH-CHI-B se evaluó empleando macrófagos RAW264.7, los que fueron crecidos en platos de 48 pocillos con y sin membrana (control) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂, en medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con 5% de SFB, penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y fungizona (0,25 µg/ml). El medio condicionado fue retirado a diferentes tiempos para analizar la producción de óxido nítrico (NO), interleuquina-1 β (IL1 β), factor de necrosis tumoral (TNF α); por otro lado se estudió por RT-PCR los marcadores de citotoxicidad: IL1 β y TNF α . Las técnicas empleadas se describen a continuación.

III.2.4.5.1 Producción de NO

El óxido nítrico (NO) es un efector de la respuesta inmune innata, producido por la enzima NO sintasa inducible (iNOS) de los macrófagos en respuesta a la presencia de diversos patógenos [Lowenstein & Padalko, 2004]. Para medir la liberación de NO hacia el medio de cultivo por los macrófagos RAW264.7, se empleó el método de Griess [Fernández et al., 2014]. Para ello, se incubaron dichas células en medio de cultivo DMEN sin rojo de fenol durante 1, 2 y 3 días. El método utiliza como agente de diazotación ácido sulfanílico (1% p/v en ácido Fosfórico al 5%, Reactivo A) y como agente de acoplamiento el N-1-naftilendiamina (0,1 % p /v en agua destilada, Reactivo B). La

reacción se lleva a cabo mezclando volúmenes iguales de reactivo A y reactivo B; luego esta mezcla se adiciona en relación 1:1 al medio condicionado y se mide la absorbancia a 548 nm. Se realizó en paralelo una curva de calibración para los reactivos de Griess utilizando como patrón nitrito de sodio (NaNO₂, Biopack, Bs. As., Argentina).

III.2.4.5.2 Producción de citoquinas

La liberación del factor de necrosis tumoral α (TNF α) y la interleuquina 1 β (IL1 β) hacia al medio de cultivo por las células RAW264.7 se evaluó mediante la técnica de ELISA. Para la medida de estas citoquinas se utilizaron kit comerciales: Mouse IL-1 β ELISA kit para IL1 β (BD Biosciences OptEIA™) y el kit Mouse TNF α ELISA para TNF α (BD Biosciences OptEIA™), utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (kits TMB substrate Reagent Set, BD Biosciences OptEIA™) como sustrato cromógeno de la reacción de ELISA. La liberación de citoquinas se midió en los medios de cultivo luego de 2, 7 y 13 días de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se midieron empleando un lector de placas de ELISA automático (Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland).

III.2.4.5.3 Expresión de marcadores moleculares de citotoxicidad

Se aisló ARN total mediante el método del reactivo TRIZOL, mencionado anteriormente, a partir de los macrófagos RAW264.7 cultivados durante 3 días en las condiciones descriptas previamente. La expresión del ARNm de los marcadores de citotoxicidad (IL1 β y TNF α) se estudió utilizando la técnica semicuantitativa RT-PCR del mismo modo que para los marcadores osteo- y condrogénicos, descriptos previamente. La secuencia de los *primers* específicos para los marcadores de citotoxicidad diseñados se muestran en la tabla III.3.

Tabla III.3 *Primers* marcadores de citotóxicidad

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	Ta (°C)
β -actina	NM_007393.4	345	fw CCTTCAACACCCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56,1
IL1 β	NM_008361.3	264	fw AAGCTCTCCACCTCAATG rv CAGACTCAAACCTCCACTTT	48,4
TNF α	NM_013693.3	298	fw CACGCTCTTGTGTACTG rv CTTGAAGAGAACCTGGGA	49,3

III.2.5 Análisis estadístico

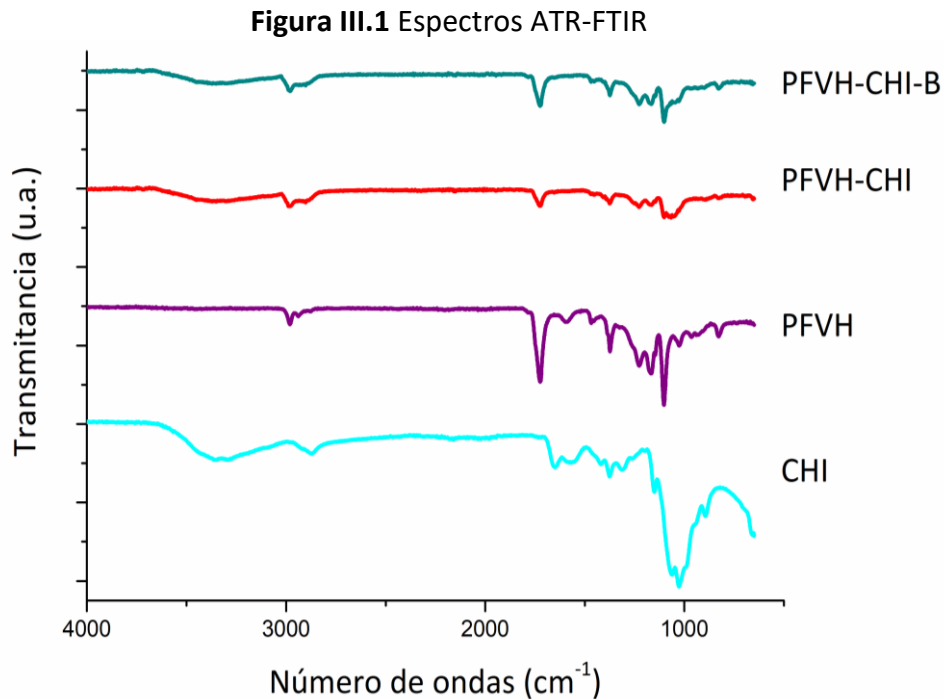
Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y, a menos que se indique lo contrario, se obtuvieron a partir de al menos dos experimentos separados realizados por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey post hoc. Para datos con distribución no normal se utilizó el test no paramétrico Kruskal Wallis empleando el test de Dunn post-hoc, usando el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos.

III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.3.1 Estudio de las películas

III.3.1.1 Espectroscopia ATR-FTIR

Se estudiaron las mezclas poliméricas obtenidas por análisis espectroscópico ATR-FTIR. Los espectros de las mezclas, PFVH-CHI y PFVH-CHI-B, junto con el espectro para el PFVH y el CHI se muestran en la figura III.1.



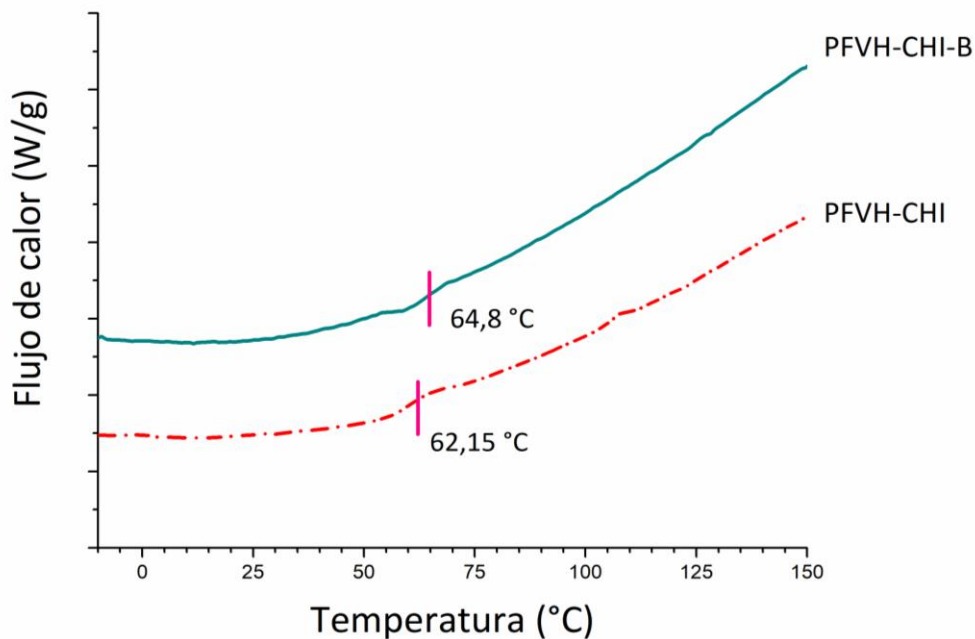
Los espectros de las mezclas poliméricas contienen algunos picos característicos tanto del CHI como del PFVH. Por ejemplo, una banda ancha entre 3300-3500 cm⁻¹ que se corresponde con la presencia del grupo N-H del CHI. De manera similar, las bandas a 2979, 2931, 2877 cm⁻¹ correspondientes al estiramiento C-H alifáticos y una banda cercana al 1725 cm⁻¹ correspondiente con el estiramiento C=O, son característica del copolímero PFVH. A partir del análisis cualitativo de los espectros, no se encontró diferencias apreciables entre la mezcla con y sin bórax; lo cual indicaría que no existen evidencias de interacciones fuertes debida a la presencia de bórax o al entrecruzamiento apreciables por este método. Esto coincide con lo observado por otros autores para un sistema de PVA/CHI entrecruzado con bórax [Liang et al., 2009]. Tampoco se logra diferenciar las bandas propias de los enlaces boro-oxígeno, que suelen encontrarse a 985, 1060 y 1350 cm⁻¹ [Waclawska, 1995].

III.3.1.2 Análisis térmico

De igual manera que para los polímeros sintetizados, PFV Y PFVH, para las mezclas PFVH-CHI y PFVH-CHI-B se estudió la temperatura de transición vítrea (T_g) por DSC y los perfiles de descomposición por TGA, ambos en atmósfera inerte.

En la figura III.2 está representada la curva obtenida del flujo de calor frente al aumento de la temperatura (termograma) del segundo calentamiento, obtenida por DSC, para las películas de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B. Las medidas por DSC para PFVH-CHI con y sin bórax mostraron una T_g de 64,8 °C y 62,15 °C, respectivamente. A su vez, estos valores de T_g son mayores que los encontrados previamente para el PFVH ($T_g = 60,5$ °C, figura II.6), como es esperado debido a una interacción fisicoquímica con otro polímero como el CHI. El aumento de la T_g en la mezcla realizada en presencia de bórax sugiere, que se produce el entrecruzamiento entre los polímeros PFVH y CHI, que restringe los movimientos catenarios, como ha sido anteriormente reportado para otros sistemas entrecruzados [Shi et al., 2008; Uslu et al., 2008].

Figura III.2 Termograma observado por DSC para PFVH-CHI y PFVH-CHI-B



Los termogramas obtenidos para analizar la estabilidad térmica de las películas PFVH-CHI y PFVH-CHI-B mediante TGA bajo atmósfera de nitrógeno se presentan en la figura III.3, mientras que en la tabla III.4 se muestra el análisis de los resultados obtenidos. En la figura III.3 A se representan las curvas de pérdida de masa y en la figura III.3 B las correspondientes derivadas de dichas curvas (DTG). Se puede observar que las películas parecen descomponerse térmicamente en tres etapas (figura III.3 B) y muestran alta temperatura de descomposición inicial (TDI) (figura III.3 A); ambas mayores a la del PFVH (figura II.7). Por debajo de la TDI los dos termogramas (figura III.3 A) muestran una pérdida de peso gradual debido a la pérdida de humedad asociada con los grupos polares de los polímeros constituyentes; ambas muestras sufren una pérdida de peso de alrededor del 8% en ese rango de temperatura. Sin embargo, en el intervalo comprendido entre la TDI hasta 600 °C, el comportamiento de degradación térmica de las dos películas poliméricas muestra sus diferencias (tabla III.4).

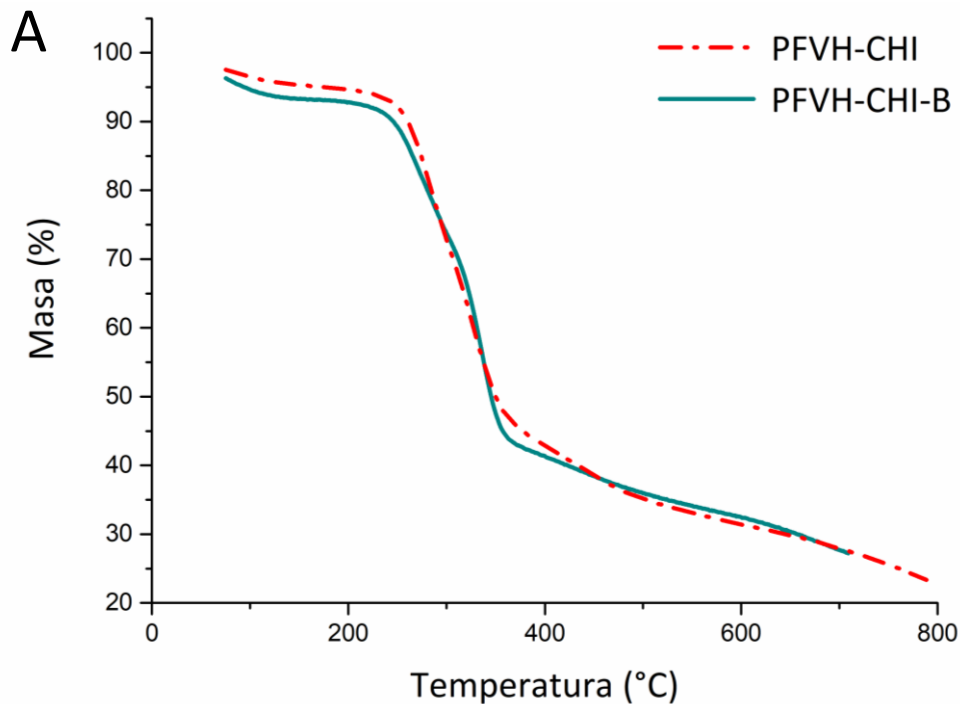
Los dos primeros eventos de descomposición (T_1 y T_2), observados en la figura III.3 B, se pueden atribuir a la degradación de los polímeros, dado que son valores comparables con los que se observó anteriormente tanto para los copolímeros fumáricos [Oberti et al., 2012] como para el CHI [Cardenas & Miranda, 2004]. El último

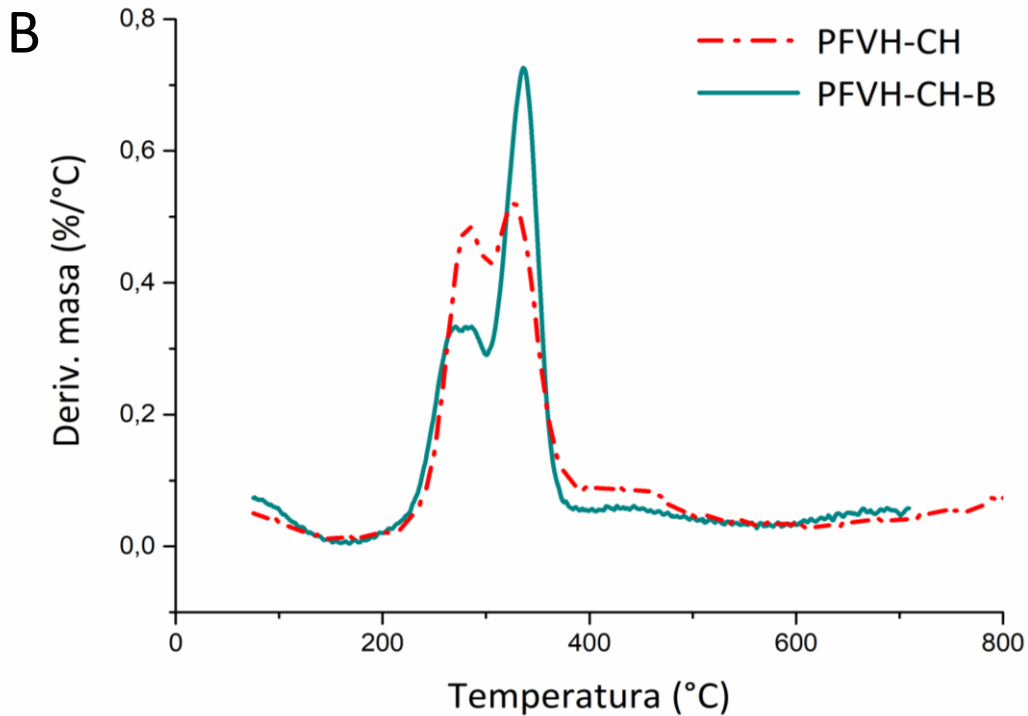
evento térmico (T_3) muestra la degradación completa de la estructura macromolecular. Por último, como puede observarse en la tabla III.4, la mezcla PFVH-CHI-B presentó una mayor T_3 con menor pérdida de masa total en comparación con la mezcla sin bórax, PFVH-CHI. Estos resultados demuestran una estabilidad térmica superior para PFVH-CHI-B, que puede ser atribuible al entrecruzamiento entre los dos polímeros constitutivos, que contribuye a una pérdida de peso relativamente menor en comparación con la película sin bórax. Resultados similares se observaron para otros sistemas basado en polisacáridos entrecruzados con bórax [Sreedhar et al., 2005; Bajpai et al., 2016]. Finalmente, más allá de 600 °C, las muestras PFVH-CHI y PFVH-CHI-B presentan casi el mismo porcentaje de pérdida de peso, que puede atribuirse al proceso de carbonización que se produce para ambas.

Tabla III.4 Análisis por TGA para PFVH-CHI-B y PFVH-CHI

T (°C)	PFVH-CHI	Pérdida de masa (%)	PFVH-CHI-B	Pérdida de masa (%)
TDI	263	-	242	-
T₁	280	25.3	270	16.5
T₂	323	54.1	336	43.6
T₃	457	68.8	541	59.6

Figura III.3 Perfiles de descomposición por TGA para PFV-CHI y PFVH-CHI-B, A) pérdida de masa y B) DTG





En conjunto los resultados del comportamiento térmico de la película PFVH-CHI-B nos da indicios de que el agregado de bórax a la mezcla polimérica da lugar al entrecruzamiento, visto por un aumento en la Tg y en la mayor estabilidad térmica.

III.3.1.3 Apariencia y morfología

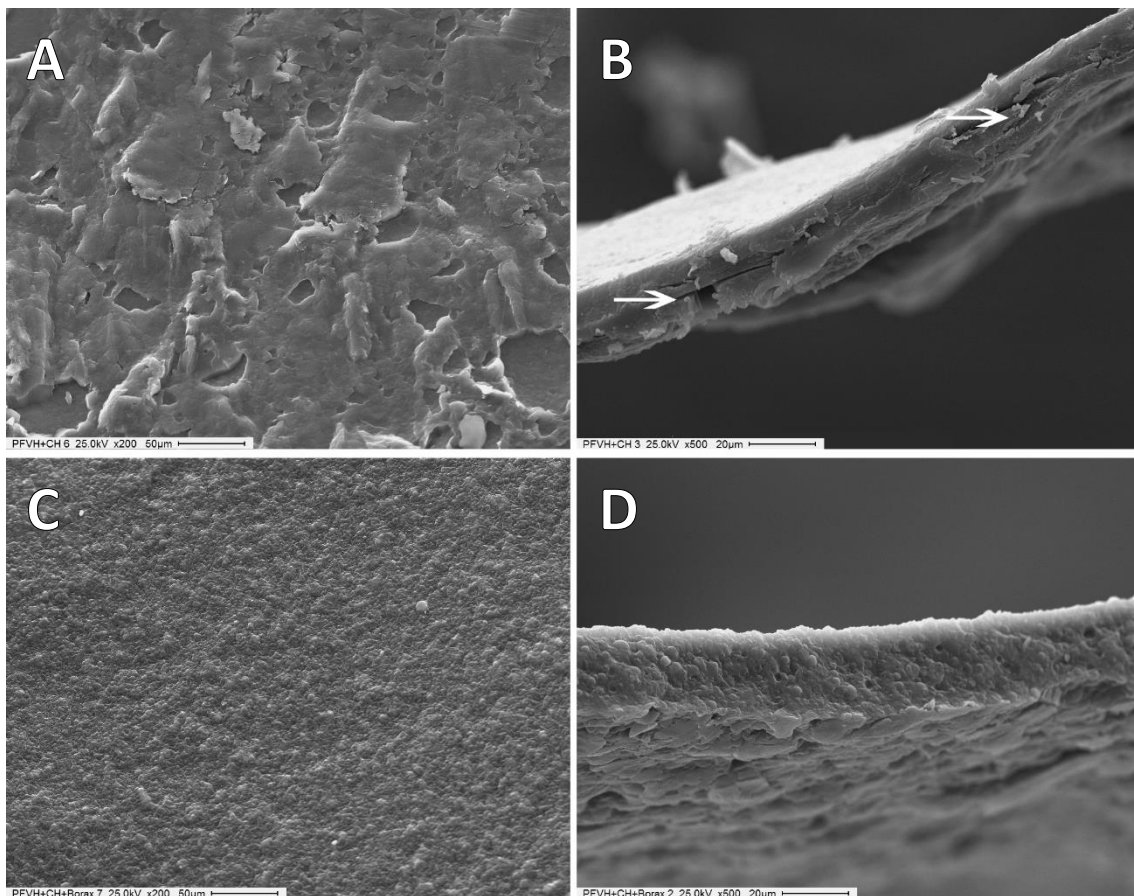
Si bien el procedimiento de formación de películas por *solvent casting* es un método simple y reproducible, que no requiere de aparatos sofisticados, presenta limitaciones respecto a la homogeneidad en el espesor de las películas que se obtienen y se cuestiona la homogeneidad y la interconexión de los poros, así como la presencia de solvente residual [Mano et al., 2007]. Las películas de PFVH-CHI-B obtenidas por este procedimiento arrojaron un espesor promedio de $0,064 \pm 0,004$ mm, el cual se obtuvo de medidas por triplicado a partir de 8 películas. Este resultado demuestra una gran reproducibilidad en la formación de películas por el método de *solvent casting* para este sistema. Además, como puede apreciarse de la evaluación macroscópica (imagen III.1) las películas no presentan heterogeneidad aparente y son considerablemente transparentes.

Imagen III.1 Película de PFVH-CHI-B



Adicionalmente, para evaluar la compatibilidad física de los polímeros, se estudió la superficie y el corte transversal de la película obtenida por SEM comparando la mezcla de con y sin la adición de bórax, PFVH-CHI-B y PFVH-CHI, respectivamente (imagen III.2). Se encontró que la película de PFVH-CHI tiene una superficie escamosa (imagen III.2 A) con signos evidentes de separación de fases en el borde de la fractura (imagen III.2 B, flecha). Por otra parte, la película PFVH-CHI-B presentó una superficie homogénea rugosa (imagen III.2 C) y el mismo tipo de estructura parece observarse en la imagen de la fractura de la película (imagen III.2 D), indicando que el agregado de bórax favorece la compatibilización física de los polímeros.

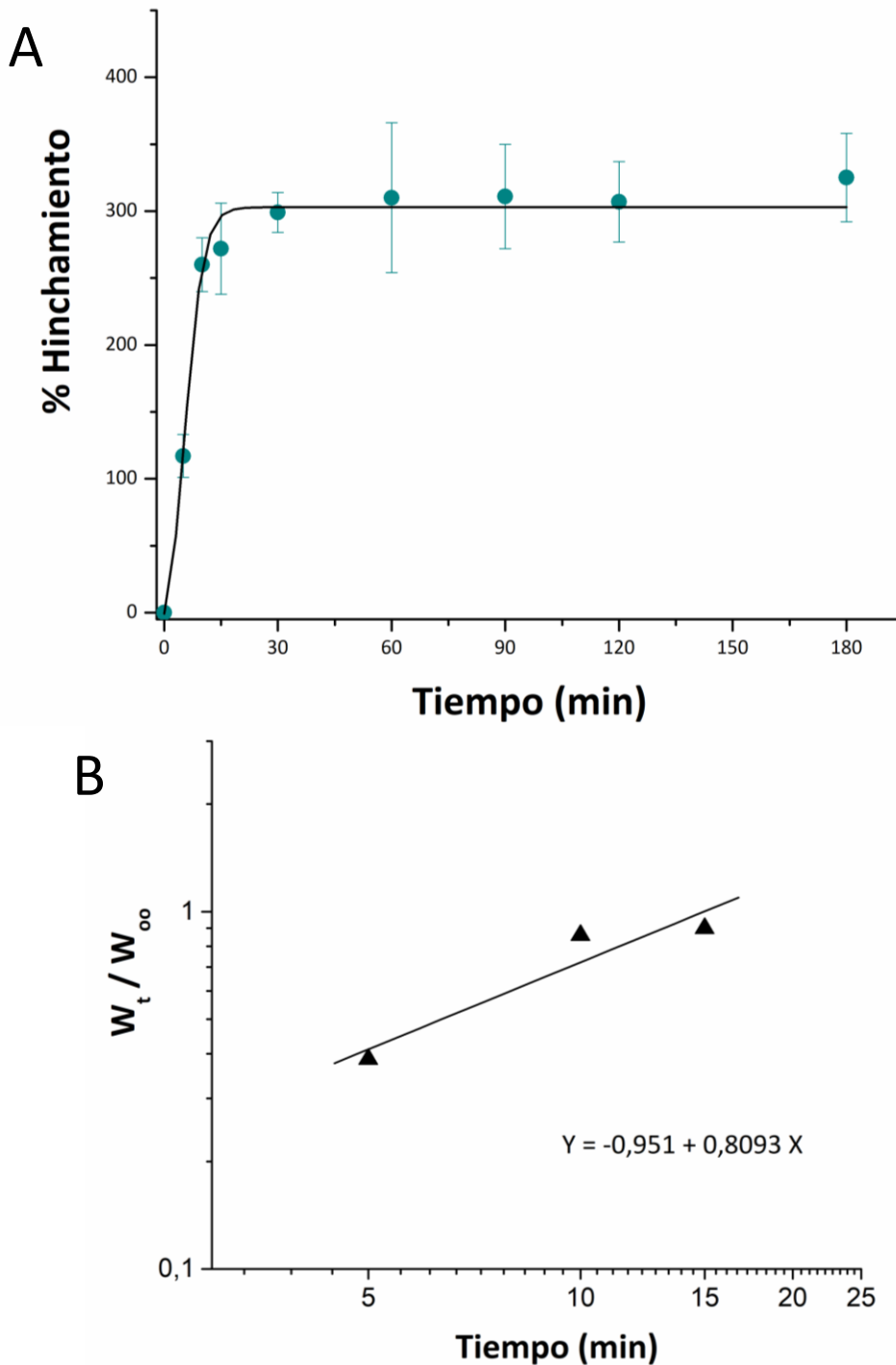
Imagen III.2 Micrografías obtenidas por SEM de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B. Vista superficie y corte transversal de las membranas A, B) PFVH-CHI o C, D) PFVH-CHI-B.



III.3.1.4 Estudio de hinchamiento

El estudio de la cinética de hinchamiento para la película PFVH-CHI-B en buffer fosfato a 37 °C mostró un rápido incremento durante los primeros 10 minutos, para luego alcanzar el equilibrio a los 30 minutos con un porcentaje máximo de hinchamiento de $303 \pm 13\%$ (figura III.4 A); este valor se encuentra dentro de los valores típicos reportados para hidrogeles [Costa-Júnior et al., 2009; Doulabi et al., 2013]. De la gráfica puede advertirse además, que el *plateau* se mantuvo alrededor del valor mencionado hasta el tiempo final analizado (180 min), sin mostrar decrecimiento u otro tipo de comportamiento.

Figura III.4 Hinchamiento de la película PFVH-CHI-B A) Cinética de hinchamiento y B) Gráfica log-log correspondiente a la ecuación III.2



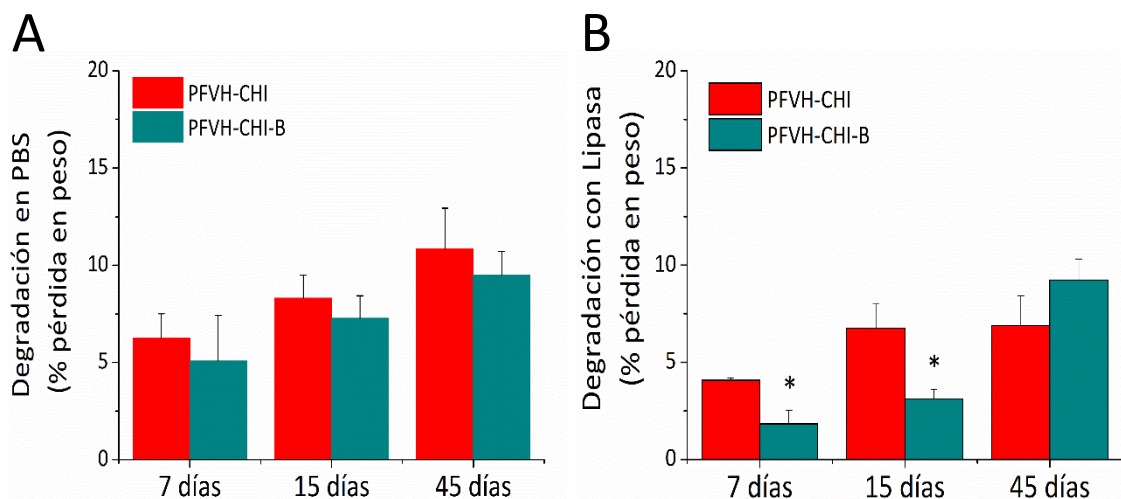
Durante el proceso de hinchamiento la molécula de agua difunde en la matriz polimérica actuando como plastificantes y promoviendo la relajación de las cadenas macromoleculares [Ganji et al., 2010]. Como se mencionó anteriormente, el mecanismo que gobierna el proceso de difusión puede analizarse a través del modelo de Fick para determinar el exponente n. Para ello, se graficó la fracción de agua absorbida a tiempos cortos sobre el porcentaje de absorción en el equilibrio (W_t/W_{∞}), en escala logarítmica en función del tiempo (figura III.4 B). A partir de la pendiente inicial de la gráfica,

siguiendo la ecuación III.2, se obtuvo un valor de n igual a 0,809 para la película PFVH-CHI-B; el cual sugiere que el mecanismo de transporte de agua dentro del *scaffold* se produjo por un proceso de difusión no fickiano, probablemente con una rápida difusión de agua en comparación con la relajación de la cadena macromolecular.

III.3.1.5 Estudio de degradación

Se estudió la estabilidad y posible degradación de las películas en buffer fosfato pH 7,4 a 37 °C (figura III.5 A), encontrándose un aumento lineal en la pérdida de peso tanto para PFVH-CHI como PFVH-CHI-B con un máximo de aproximadamente 10% de pérdida de peso después de 45 días de incubación, sin diferencias significativas entre ambas películas. Por otro lado, cuando se estudió la degradación de las películas en presencia de lipasa la tasa de degradación de PFVH-CHI-B fue significativamente menor que la tasa de PFVH-CHI durante los tiempos cortos (7 y 15 días), pero alcanzó niveles similares a los 45 días (figura III.5 B); no obstante, el porcentaje máximo de pérdida de peso fue similar al obtenido para el estudio en PBS (figura III.5 A).

Figura III.5 Estudio de degradación de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B en A) buffer PBS pH 7,4 y en B) solución de lipasa. * $p < 0,05$ vs PFVH-CHI



Resultados previos indicaron que el poli(diisopropil fumarato) (PFIP) incubado en PBS a 37 °C durante 21 días no muestra degradación en condiciones hidrolíticas [Cortizo et al., 2008]. El CHI, por su parte, es un polisacárido que presenta un proceso de degradación ampliamente estudiado en diversas condiciones [Zhang & Neau, 2001; Kim et al., 2008; Croisier & Jérôme, 2013; Levengood & Zhang, 2014;], se degrada *in vivo* por varias enzimas a oligosacáridos de longitud variable no tóxicos, siendo la principal responsable de su degradación la lisozima, que actúa sobre los residuos acetilados del CHI. Su tasa de degradación se relaciona principalmente con el grado de acetilación (DA) pero también con la distribución de los residuos de N-acetilglucosamina y el peso molecular del CHI [Croisier & Jérôme, 2013]. Para explicar la relación entre la degradación del quitosano y su DA, es importante recordar que el quitosano es un polímero semicristalino; de hecho presenta una cristalinidad máxima para un DA igual a 100% (quitina) o a 0% (CHI totalmente desacetilado), mientras que disminuye para grados de acetilación intermedios [Levengood & Zhang, 2014]. Su cristalinidad está

inversamente relacionada con la cinética de degradación, de tal modo que cuando el grado de acetilación aumenta (cerca del 40%) su cristalinidad disminuye dando como resultado una tasa de degradación mayor que las muestras de menor grado de acetilación [Kim et al., 2008]. Teniendo en cuenta esto, se puede atribuir la baja tasa de degradación para la película PFVH-CHI-B al CHI empleado (DA = 24%), que es el único polímero de la mezcla que puede sufrir un proceso degradativo enzimático. Esta hipótesis también podría explicar el comportamiento similar de las películas con y sin bórax en condiciones de degradación hidrolítica, pero también nos permite sugerir que el agregado del bórax está afectando la tasa de degradación del CHI. Se ha demostrado previamente en películas constituidas por CHI y un polímero sintético, poli(ϵ -caprolactona) (PCL), que la degradación de las películas puede atribuirse directamente a la degradación del CHI [Sarasam et al., 2006].

Las propiedades mecánicas también están estrechamente relacionadas con la degradación del *scaffold*, donde idealmente, la tasa de degradación debe ser a una velocidad controlada de modo que mientras el tejido se regenera, las cargas que se producen sobre el tejido puedan ser soportadas por el *scaffold* y a su vez este se pueda ir reemplazando por tejido nuevo [Levengood & Zhang, 2014]. La tasa de degradación "ideal" para un *scaffold* varía en función de la zona donde se quiere aplicar el mismo; por ejemplo, para defectos óseo en la región espinal debe ser de 9 meses o más; mientras que para aplicaciones cráneo-maxilofaciales de 3 a 6 meses [Bose et al., 2012]. Sin embargo, existen otros factores de morbilidad asociada que pueden requerir tiempos de degradación más prolongados, entre ellos la edad y condición fisiopatológica previa del paciente. En este caso, el *scaffold* PFVH-CHI-B diseñado presenta una lenta degradación, compatible con el desarrollo del tejido óseo en pacientes donde la tasa de formación ósea esté disminuida y por ende se requiera que el material sustituto esté presente por períodos más prolongados; tal es el caso de los pacientes añosos.

III.3.1.6 Pruebas mecánicas

El comportamiento mecánico de las películas PFVH-CHI-B y PFVH-CHI se analizó mediante el ensayo de tracción teniendo en cuenta la curva tensión vs. deformación generadas con el equipo. En la figura III.6 se presenta una curva de tensión vs. deformación típica hallada para las películas en esta prueba de tracción, a partir de las cuales se determinó: la máxima resistencia tensil, el porcentaje de elongación al quiebre y el módulo elástico (ME). La máxima resistencia tensil se definió como la tensión máxima soportada por la muestra durante la prueba de tracción (máximo de la curva, figura III.6). La elongación al quiebre se calculó como el porcentaje máximo de desplazamiento alcanzado antes del quiebre por la muestra durante esta prueba. Mientras que, el módulo elástico (ME) se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal inicial (región elástica) de la curva. Los datos en base a los cálculos realizados para los *scaffolds* PFVH-CHI y PFVH-CHI-B son presentados en la tabla III.5, como la media \pm SEM considerando los valores medios de muestras independientes (n = 18).

Figura III.6 Curva tensión vs. deformación

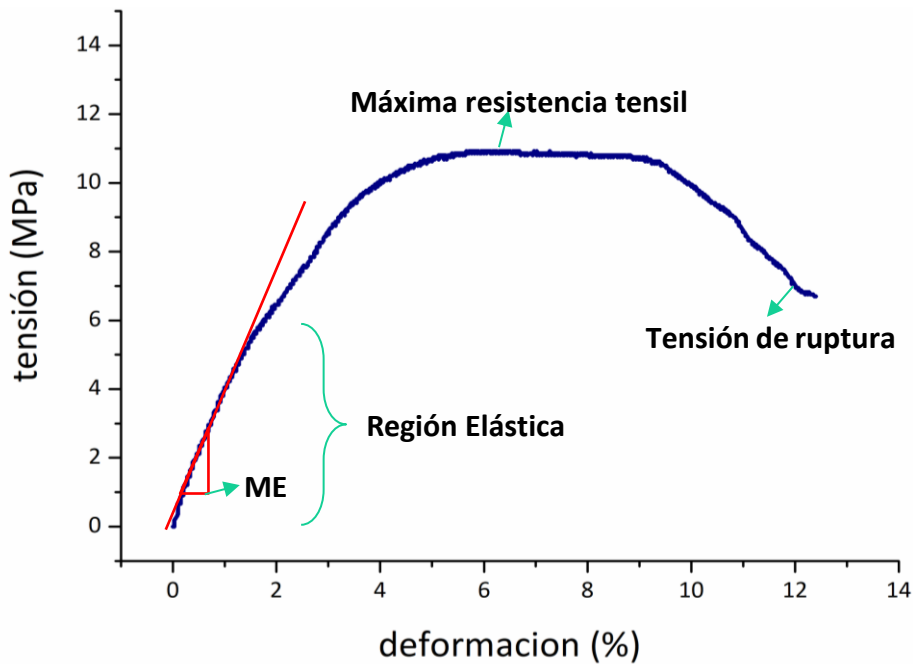


Tabla III.5 Propiedades mecánicas para PFVH-CHI-B y PFVH-CHI

	Módulo elástico (MPa)	Máxima resistencia tensil (MPa)	Elongación al quiebre (%)
PFVH-CHI	407 ± 30	11 ± 2	5,6 ± 0,7
PFVH-CHI-B	344 ± 38	10 ± 2	6,0 ± 1,0

Se encontró que no hubo diferencias significativas en estos parámetros estudiados entre los *scaffolds* con y sin bórax, lo que podría explicarse por una baja tasa de entrecruzamiento de las redes debido a la baja proporción de bórax utilizada para formar estas películas. Estos resultados son consistentes con los datos mostrados previamente en los estudios de DSC donde se encontraron solo pequeñas diferencias entre las películas PFVH-CHI y PFVH-CHI-B. Por otra parte, el valor del módulo elástico obtenido está en el orden con el previamente publicado para mezclas de PVA/CHI con y sin agentes entrecruzantes [Liang et al., 2009]. En particular para el cartílago articular, el módulo elástico es esencialmente una medida de la matriz sólida de colágeno y varía tanto por la profundidad como por la orientación de las fibras de colágeno en el tejido [Roth & Mow, 1980]. Estos valores varían entre 5 a 25 MPa en el cartílago articular sano dependiendo de la ubicación en la articulación y la profundidad en el tejido; en general, la zona superficial del cartílago (donde las fibras de colágeno II se distribuyen paralelas a la superficie) es más rígida en tensión que las zonas medias o profundas [Athanasίου et al., 2009]. Por otro lado, las propiedades mecánicas del hueso varían ampliamente entre el hueso trabecular y el hueso cortical; encontrando valores en el módulo de elástico que van desde 100 a 500 MPa para el hueso trabecular y entre 12000 y 18000

MPa para el hueso cortical [Rezwan et al., 2006]. Esta alta resistencia a la tracción y la resistencia a la fractura del hueso se atribuyen a las fibras de colágeno resistentes y flexibles reforzadas por los cristales de hidroxiapatita. Entonces, los valores del módulo elástico hallados para PFVH-CHI y PFVH-CHI-B (tabla III.5) están en el orden del valor reportado para el hueso trabecular, pero por encima del reportado para el cartílago.

La gran variación en las propiedades mecánicas entre en hueso y el cartílago articular hace que sea difícil diseñar un *scaffold* “ideal” para la zona osteocondral.

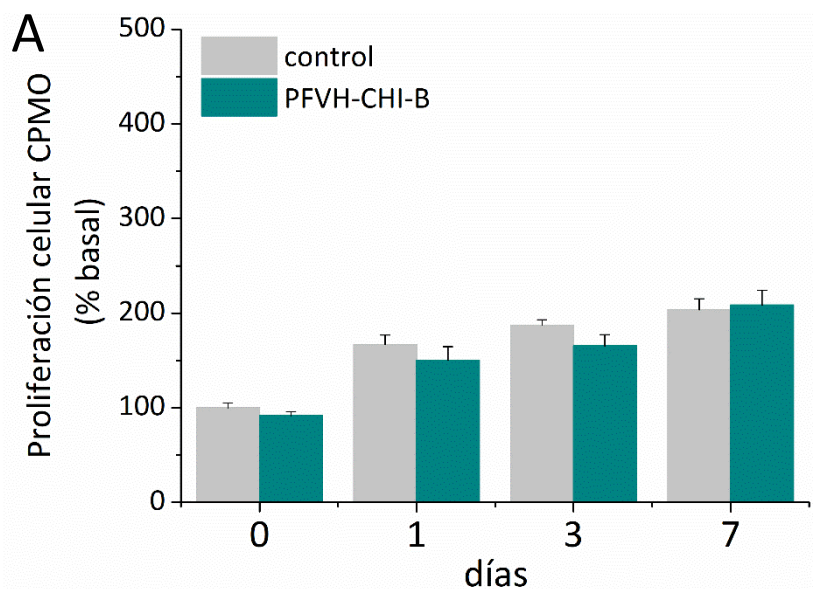
III.3.2 Ensayos In Vitro

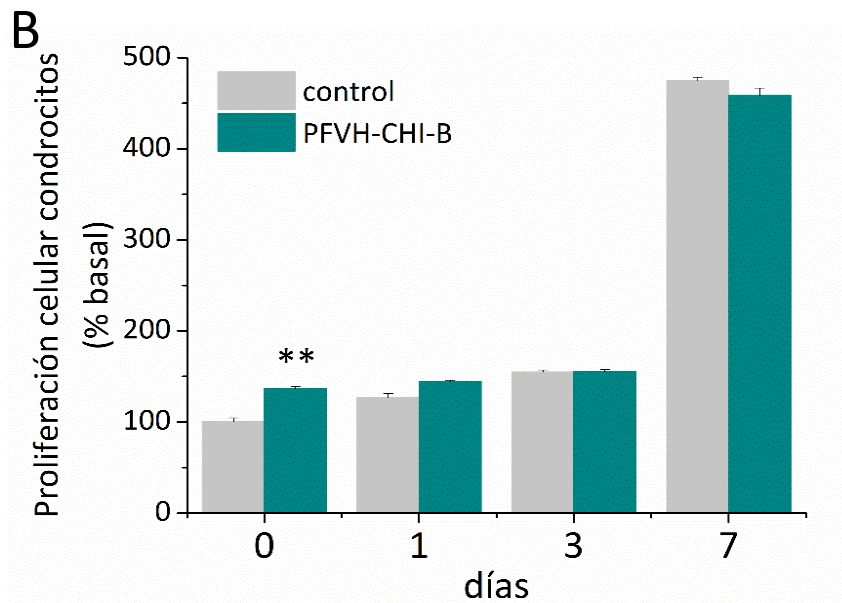
La respuesta biológica, evaluada mediante cultivos celulares *in vitro*, permite la observación y el análisis de las interacciones e influencia de los materiales en el comportamiento celular respecto a su biocompatibilidad y citotoxicidad. El empleo de células en cultivo, representa un entorno relativamente sencillo y controlado, que permite rediseñar el material para adecuarlo a los requerimientos tisulares; siendo una de las propiedades más importantes, porque de ésta depende en gran medida el éxito del implante *in vivo*.

III.3.2.1 Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular sobre el *scaffold* PFVH-CHI-B se estudió la cinética de crecimiento de las células CPMO y condrocitos primarios sembrados sobre estas películas (figura III.7 A y B).

Figura III.7 Proliferación celular por MTT A) CPMO y B) Condrocitos primarios, **p < 0,01 vs control

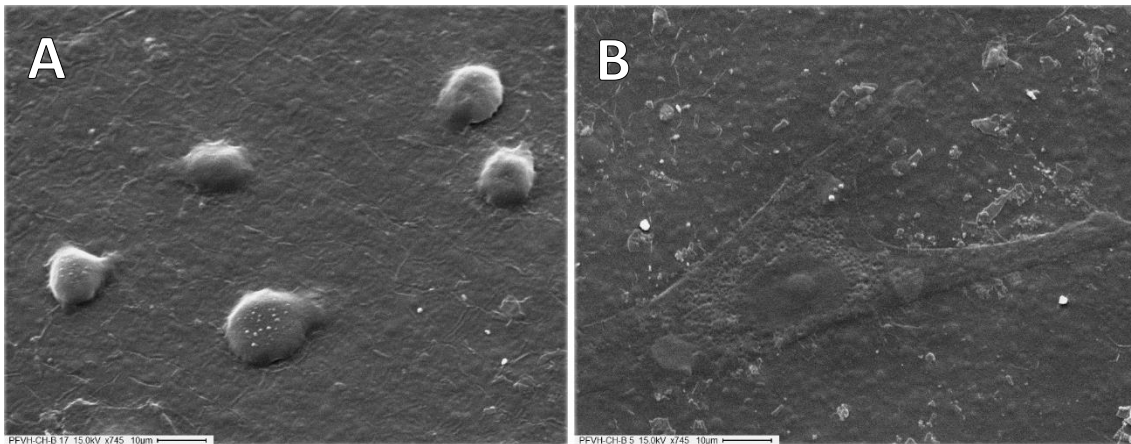




Como se observa en la figura III.7 A, las células CPMO mostraron un crecimiento dependiente del tiempo, donde tanto la cantidad de células adheridas (0 día de proliferación) como las que proliferaron (día 1, 3 y 7) sobre la película PFVH-CHI-B eran comparables con la condición control. Por su parte, el cultivo de condrocitos primarios presentó un tiempo de retardo en el crecimiento (fase de latencia) que se continuó en un aumento exponencial en el número de células (figura III.7 B). Se encontró sobre PFVH-CHI-B un mayor número de células adheridas (0 día de proliferación, $p < 0,01$); aunque la cinética de proliferación sobre la película mostro una fase de latencia mayor respecto al control. En otros estudios, se ha demostrado que la adhesión celular depende del tiempo de secreción de la matriz extracelular (MEC) y de la interacción de esta con las proteínas de adhesión, pudiendo modular la tasa de proliferación celular [Kawano et al., 2001]. En este caso, esta secreción de MEC puede haber sido mayor sobre nuestra película o bien la formación de los complejos de adhesión fue más estable, lo que podría explicar el comportamiento observado en la adhesión y proliferación de los condrocitos.

Adicionalmente, se realizó una observación por SEM de las células CPMO sembradas sobre las películas de PFVH-CHI-B, luego de incubar durante 1 h y 24 h (imagen III.3). De las imágenes de SEM puede observarse que las células fueron capaces de adherirse luego de una hora mostrando una forma redondeada (imagen III.3 A). Al cabo de 24 h (imagen III.3 B) las células mostraron una morfología poliédrica, con el núcleo excéntrico con un nucléolo central y desarrollan extensiones citoplasmáticas sobre la superficie de la película PFVH-CHI-B. Varios estudios *in vitro* demostraron que la morfología, independiente de los factores en el medio, tiene una gran influencia sobre la diferenciación de las células madres mesenquimales. Más aún se encontró que cuando se disponían en forma alargada y/o estrellada se diferenciaban mejor hacia el linaje osteoblástico que al disponerse de formas redondeadas [McBeath et al., 2004; Kilian et al., 2010].

Imagen III.3 Micrografías obtenidas por SEM de las CPMO crecidas sobre PFVH-CHI-B.
A) 1 h y B) 24 h

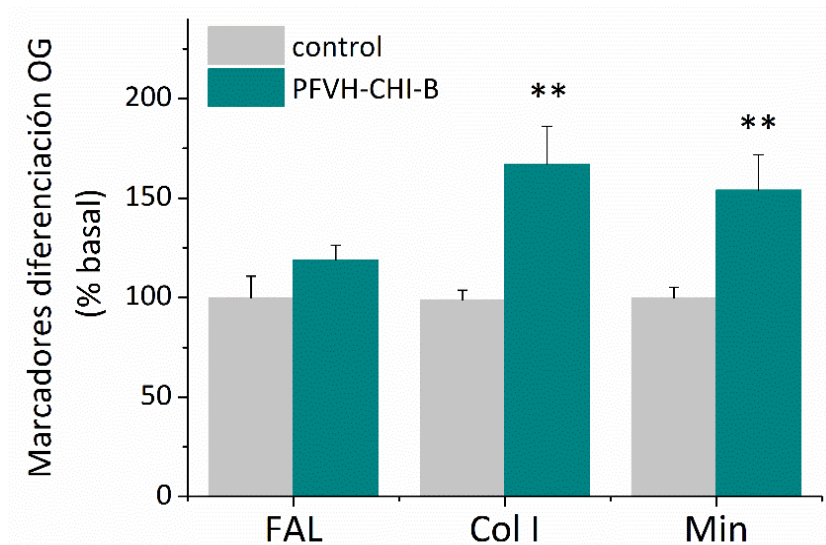


Estos resultados obtenidos muestran que el *scaffold* genera un ambiente adecuado para el crecimiento celular presentando una buena biocompatibilidad.

III.3.2.2 Evaluación de la capacidad osteogénica

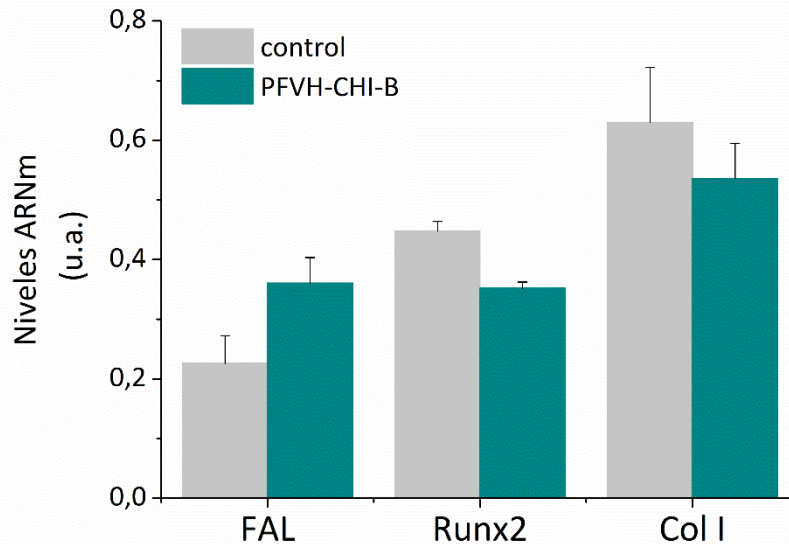
Se evaluó la capacidad de las células CPMO crecidas sobre las películas de PFVH-CHI-B para diferenciarse hacia fenotipo osteoblástico. Para este estudio se midió la actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) y la producción de colágeno tipo I (Col I) luego de incubar las células CPMO 15 días en medio específico; y en las mismas condiciones pero luego de 21 días se midió la producción de nódulos de mineral (Min). Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.8, donde se observa que las células CPMO crecidas y diferenciadas sobre las películas producen cantidades significativamente mayores ($p < 0,01$) de colágeno tipo I y nódulos mineral después de 15 y 21 días, respectivamente, en comparación con la condición control; mientras que la medida la actividad de FAL fue equivalente para ambas condiciones.

Figura III.8 Evaluación de marcadores osteogénicos (OG), ** $p < 0,01$ vs control



También se evaluó la expresión de ARNm para los marcadores moleculares osteogénicos Runx2, fosfatasa alcalina (FAL) y Col I por RT-PCR. El análisis de las bandas mostró que las células CPMO crecidas y diferenciadas durante 21 días sobre la condición control y sobre la película PFVH-CHI-B expresaron niveles similares de todos los marcadores estudiados (figura III.9).

Figura III.9 Expresión de marcadores moleculares osteogénicos



Estos ensayos de diferenciación permitieron evaluar la funcionalidad y progresión hacia el fenotipo osteoblástico específico, no sólo por el estudio de la producción de matriz sobre las películas sino además por la medida en los niveles de marcadores óseos en el ARNm celular. Permitiendo argumentar que el material promueve el depósito de la matriz de colágeno tipo I y su mineralización, sin afectar los niveles de ARNm. Estos estudios de crecimiento y diferenciación celular osteogénica permiten evaluar la osteoconducción del biomaterial y tener una idea general acerca de su aplicabilidad para ingeniería de tejido óseo.

III.3.2.3 Evaluación de la capacidad condrogénica

Teniendo en cuenta nuestro objetivo de desarrollar un *scaffold* para regeneración ósteo-cartilaginosa seguimos con la evaluación de la capacidad condrogénica de las películas de PFVH-CHI-B. Para ello se evaluó la producción de matriz de proteoglicano en un cultivo de condrocitos primarios crecidos sobre la película. En la figura III.10, se observa que los condrocitos crecidos sobre la película PFH-CHI-B produjeron mayores cantidades de glicosaminoglicanos (GAG) que el control ($p < 0,05$).

Por otro lado, se evaluó el ARNm para los marcadores moleculares condrogénicos colágeno tipo II (Col 2), agregacán y el factor de transcripción SOX9 mediante RT-PCR. Los resultados mostraron que los niveles de Col 2 y SOX9 eran similares para los condrocitos que crecían tanto sobre la condición control como sobre PFVH-CHI-B. Contrariamente, las células que crecen en los *scaffolds* PFVH-CHI-B expresan niveles significativamente mayores de agregacán que las células que lo hacen sobre la superficie control (figura III.11, $p < 0,05$). Por lo tanto, la película modula los

marcadores moleculares condrogénicos de manera diferente. Estos datos en conjunto con la evaluación de los niveles de GAG encontrados para los condrocitos que crecen sobre la película PFVH-CHI-B indicarían que el *scaffold* es un buen soporte también para la diferenciación condrogénica. Porque no sólo permite la adhesión y proliferación de estas células sino además promueve un buen desarrollo de la matriz propia del tejido cartilaginoso.

Figura III.10 Evaluación marcador condrogénico, * $p < 0,05$ vs control

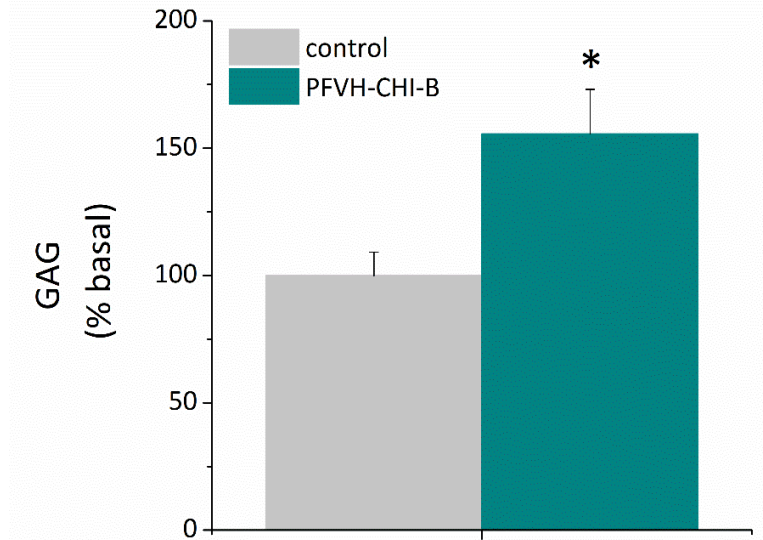
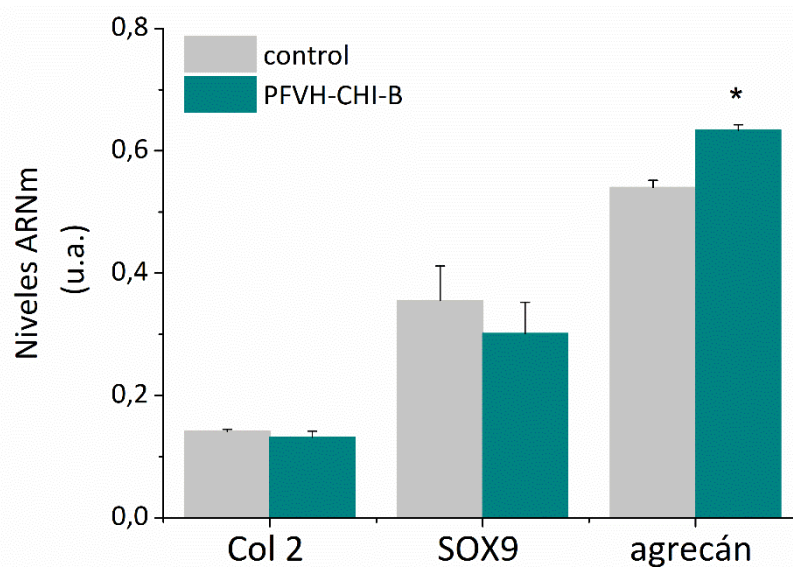


Figura III.11 Expresión de marcadores moleculares condrogénicos, * $p < 0,05$ vs control



Es importante destacar, que en conjunto nuestros resultados sugieren que este biomaterial presenta suficiente versatilidad para ser utilizado en la regeneración osteocondral. Estudios anteriores sobre películas conteniendo quitosano también mostraron una buena biocompatibilidad de los *scaffolds*, permitiendo la condro- u osteoblastogénesis [Elder et al., 2013; Ferrand et al., 2014, Müller et al., 2016]. Además, se ha informado que las mezclas de quitosano con polímeros sintéticos o cerámicas resultan más adecuados para este fin. Sin embargo, hay pocos informes sobre películas que soporten el desarrollo de ambos tejidos [Ghosh et al., 2014; Mellor et al., 2015]. En

este sentido, nuestra película PFVH-CHI-B representa una mejora en los biomateriales basados en quitosano, ya que permite *in vitro* el crecimiento y la maduración tanto osteo- como condrocítica.

III.3.2.4 Evaluación de la citotoxicidad

Finalmente, se estudió si las películas podrían generar cualquier efecto citotóxico empleando un modelo de macrófagos murino RAW264.7 en cultivo. Los macrófagos tienen la capacidad de reaccionar frente a cuerpos extraños produciendo y liberando al medio mediadores de inflamación tales como interleuquina-1 β (IL1 β), factor de necrosis tumoral (TNF α) y óxido nítrico (NO), y por ello representan un buen modelo para investigar la citotoxicidad de los biomateriales. En el presente trabajo se evaluó en primer lugar los niveles de NO liberados al medio por los macrófagos luego de 1, 2 y 3 días de cultivo (tabla III.6), no encontrando diferencias significativas en la producción de NO entre los macrófagos crecidos sobre las películas y la condición de control. Se obtuvieron resultados similares para los niveles de las citoquinas IL1 β y TNF α liberadas al medio a los 2, 7 y 13 días de cultivo mediante la técnica de ELISA (tabla III.7). De modo que con este estudio los niveles liberados al medio para los distintos marcadores estudiados (IL1 β , TNF α y NO) no presentaron diferencias significativas cuando los macrófagos crecen sobre la película PFVH-CHI-B comparando con los crecidos sobre la placa de cultivo estándar a los diferentes tiempos estudiados.

Tabla III.6 Producción de NO

	NO [nmol / ml]		
	1 día	2 días	3 días
control	0,017 \pm 0,014	0,262 \pm 0,074	0,096 \pm 0,041
PFVH-CHI-B	0,034 \pm 0,015	0,389 \pm 0,148	0,035 \pm 0,023

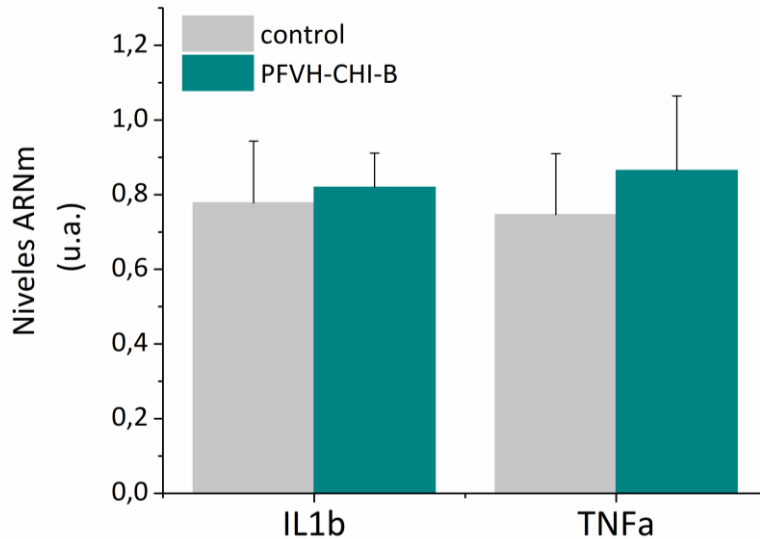
Tabla III.7 Producción de citoquinas IL1 β y TNF α

días	IL1 β [pg / ml]		TNF α [pg / ml]	
	control	PFVH-CHI-B	control	PFVH-CHI-B
2	15,0 \pm 5,6	8,9 \pm 2,5	32 \pm 6	20 \pm 5
7	11,6 \pm 2,1	10,9 \pm 1,7	30 \pm 7	14 \pm 2
13	8,1 \pm 2,0	9,8 \pm 2,6	64 \pm 12	56 \pm 1

Por último se estudió la expresión a nivel del ARNm para las citoquinas IL1 β y TNF α en los macrófagos RAW264.7 crecidos durante 3 días sobre la película PFVH-CHI-B mediante RT-PCR. Los datos son presentados en la figura III.12 como intensidad relativa usando como *housekeeping* la β -actina de estas células. Estos resultados indican que los niveles de expresión encontrados para ambas citoquinas a nivel del ARNm eran

comparables para ambas condiciones de cultivo. Con estos resultados se obtiene otra prueba de la no evidencia de efectos citotóxicos del *scaffold* PFVH-CHI-B desarrollado en este trabajo.

Figura III.12 Expresión de marcadores moleculares de citotoxicidad



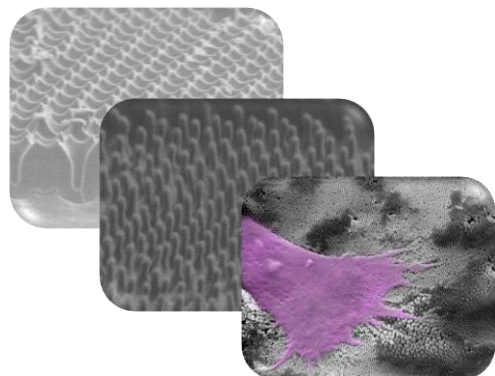
Como se ha comentado, una de las razones del interés en los biomateriales basados en quitosano es la baja citotoxicidad del quitosano [Croisier & Jérôme, 2013]. Pero la combinación con materiales sintéticos, en la búsqueda de mejoras sobretodo de sus propiedades fisicoquímicas, puede generar efectos citotóxicos indeseados en los materiales. Por ello es importante la evaluación de estas propiedades a la hora de desarrollar un nuevo material para aplicaciones biomédicas. Se ha demostrado en trabajos anteriores la buena biocompatibilidad *in vitro* y baja toxicidad de membranas basadas en polifumaratos [Cortizo et al., 2008; Fernández et al., 2010; Fernández et al., 2011a; Fernández et al., 2014], lo que nos llevó a la elección de un polímero sintético de este tipo. Por otro lado, el entrecruzamiento puede modificar las propiedades de los biomateriales; es más, muchos de los agentes entrecruzantes provocan cambios indeseables en la funcionalidad de los biopolímeros o generan como resultado citotoxicidad [Maitra & Shukla, 2014]. En este trabajo se utilizó el bórax, que se considera un agente entrecruzante de citotoxicidad baja y se demostró que la combinación de estos dos materiales utilizando bórax para obtener el nuevo material entrecruzado no generó efectos citotóxicos.

III.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este trabajo se logró combinar el polímero natural quitosano (CHI) con un copolímero sintético de fumarato de diisopropilo y acetato de vinilo hidrolizado (PFVH), los cuales fueron compatibilizados físicamente mediante entrecruzamiento con bórax logrando obtener películas por el método de *solvent casting* con una muy buena reproducibilidad. Se analizaron las películas por ATR-FTIR, DSC, TGA y SEM, demostrando su integración, estabilidad térmica y una superficie homogénea, respectivamente, sin separación de fases. Los estudios llevados a cabo en base a la cinética de degradación de las películas con y sin bórax mediante el proceso hidrolítico y el enzimático demostraron una baja tasa de degradación en ambos casos, que podría atribuirse a la degradación del quitosano. El biomaterial entrecruzado PFVH-CHI-B presenta un comportamiento de hinchamiento comparable con un hidrogel y propiedades mecánicas con valores que están en el orden del valor hallado para el hueso trabecular.

Por su parte, los estudios realizados *in vitro* mostraron una buena biocompatibilidad de la película PFVH-CHI-B, encontrando que las células progenitoras de médula ósea (CPMO) eran capaces de crecer sobre la superficie del *scaffold* alcanzando valores normales y presentando una morfología poliédrica. Los resultados demostraron la versatilidad de este material ya que permite el desarrollo osteogénico de las células CPMO, el crecimiento de los condrocitos primarios y favorece el depósito de la matriz extracelular cartilaginosa. Por último, se ha confirmado, mediante los experimentos con un modelo de macrófagos en cultivo, que este *scaffold* no muestra evidencia de efectos citotóxicos. Estos estudios *in vitro* aportan información valiosa sobre el tipo de respuesta que se podría esperar al utilizar esta matriz en ensayos *in vivo*.

CAPÍTULO IV: **Nanoestructuración del** ***scaffold*, caracterización y** **propiedades**



IV.1 INTRODUCCIÓN

En el campo de la ingeniería de tejidos, se ha resaltado la importancia tanto de la naturaleza química como de la microestructuración o nanoestructuración de la superficie del *scaffold* para mejorar la adhesión, proliferación y/o diferenciación celular [Ahn et al., 2013; Ross & Lahann, 2015]. En este sentido, en nuestro grupo se han estudiado películas nanoestructuradas de colágeno, polifumaratos compatibilizados y de un copolímero tautomérico, habiendo demostrado en todos los casos que la nanoestructuración del biomaterial modifica sustancialmente los mencionados procesos celulares [Fernández et al., 2011b; Lastra et al., 2015]. Por otro lado algunos autores, han propuesto que se logra una mejor integración y reparación del tejido cuando más similar es un *scaffold* a la matriz extracelular (MEC) específica del tejido [Carrow & Gaharwar, 2015]. Entonces, la idea de nanoestructurar polímeros con el fin de ser aplicados en la regeneración tisular, surge del conocimiento de que la MEC generadas por las células, y con las cuales ellas interactúan, son de dimensiones nanométricas. Desde esta perspectiva, la nanoestructuración de matrices, con el fin de imitar más efectivamente las matrices naturales que rodean las células, resulta una estrategia interesante en el campo de la regeneración tisular que podría mejorar la respuesta de las células al material y de esta manera acelerar la reparación del tejido [Zhang & Webster, 2009; Deng et al., 2012]. Como se ha descrito, la matriz extracelular orgánica tanto ósea como cartilaginosa está compuesta principalmente por nanofibras de colágeno, las cuales poseen un diámetro entre 50 y 300 nm [Ross & Pawlina, 2013]. Estas nanofibras actúan como un soporte natural sobre el cual se produce el crecimiento y maduración de las células. De modo que siguiendo la idea anterior, el diseño de *scaffolds* de dimensiones similares a estas fibras podría promover el desarrollo de tejido óseo y cartilaginoso.

La nanotecnología se ha convertido en una poderosa herramienta en la ciencia de los materiales para aplicaciones biomédicas. En general, los métodos para fabricación de nanoestructuras unidimensionales se dividen en dos categorías principales: técnicas de “top-down” (nanolitografías) y técnicas de “bottom-up” (estructuras orgánicas autoensambladas, crecimientos basados en procesos catalíticos, etc) [Biswas et al., 2012]. La metodología “top-down” implica grabar un material eliminando capas y las técnicas de “bottom-up” se basan en el crecimiento sobre una superficie. Con cualquiera de las técnicas, es posible producir nanoestructuras de diferentes materiales y geometrías (forma, diámetro, altura) en matrices con diferente densidad (número de nanoestructuras por área) y regularidad (matrices ordenadas o al azar).

Para la obtención de materiales poliméricos nanoestructurados unidimensionales las técnicas que describen la literatura están basados en su mayoría en el nanomoldeo de polímeros preformados. Entre ellos se pueden mencionar los métodos físicos, que emplean plantillas, *electrospinning*, litografía o combinación de estos [Mijangos et al., 2016]; y por otro lado, los denominados métodos químicos suaves que involucran reacciones de polimerización para la obtención de nanofibras poliméricas [Wan, 2008]. En particular, los métodos basados en plantillas facilitan la fabricación de nanoestructuras con una alta relación de aspecto muy bien definida y muy buena reproducibilidad [Mijangos et al., 2016]. Las plantillas de óxido de aluminio

anodizado (AAO) son muy utilizadas porque proporcionan una gran versatilidad con respecto al diámetro y la longitud de sus poros, tienen un costo relativamente bajo y una disposición ordenada de poros homogéneos de largo alcance.

El método de humectación de película para la infiltración de mezclas poliméricas empleando las plantillas AAO es simple y versátil para la preparación de estructuras tubulares con diámetros que van desde algunas decenas de nanómetros a micrómetros. Este método de infiltración, basado en el fenómeno de mojado, se caracteriza principalmente por ser espontáneo y consiste básicamente en poner en contacto la plantilla AAO con un fluido polimérico en condiciones adecuadas, en las que se produce la infiltración. Mediante este método es posible infiltrar tanto fundidos poliméricos como disoluciones. En general, la infiltración de disoluciones no requiere una temperatura concreta y se puede llevar a cabo a temperatura ambiente. Por el contrario, la infiltración de polímeros fundidos se lleva a cabo a altas temperaturas, incluso a temperaturas en las que el polímero puede sufrir degradación termooxidativa. De modo que una condición importante para el uso de este método de infiltración es que el material polimérico debe infiltrarse por encima de su T_g y necesita ser térmicamente estable. Por lo tanto, es importante conocer el comportamiento térmico del material a emplear. Luego de la infiltración y tras un proceso de solidificación del material polimérico en el interior de los nanoporos (evaporación del disolvente, cristalización, etc.) se obtiene la nanoestructura unidimensional sólida. Por último, si es necesario, se procede a la extracción de la nanoestructura del poro mediante procesos mecánicos o ataque químico de la plantilla. Por este método se ha logrado infiltrar una gran variedad de sistemas poliméricos, por ejemplo derivados de poliestireno, poli(metilmelacrilato), poli(vinil alcohol), poli (ϵ -caprolactona), entre otros [Martín et al., 2012; Suzuki et al., 2013].

En este capítulo se describe como se llevó a cabo la nanoestructuración de la película polimérica PFVH-CHI-B, sintetizada y caracterizada previamente, empleando el método de humectación de película por moldeo en plantillas AAO. Se describe la fabricación de las plantillas AAO, el procedimiento de infiltración para obtener las nanofibras poliméricas unidimensionales y la caracterización de las películas nanoestructuradas. Además se realizaron estudios *in vitro* para evaluar su potencial uso como *scaffold* nanoestructurado para ingeniería de tejido óseo y cartilaginosa. La nanoestructuración y parte de la caracterización de estas la películas se realizó en el grupo NanoPoly&Gel dirigido por la Dr. Carmen Mijangos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros de Madrid, España, gracias a una estancia de investigación desarrollada durante el año 2015.

IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.2.1 Reactivos y drogas

- Placas de aluminio de muy alta pureza (99.999%, Advent Research Materials Ltd., Inglaterra) de 12 cm² de superficie.
- Solventes: etanol absoluto (99,8%, Aldrich), acetona (99,8%, Anedra), ácido perclórico (70%, Scharlau) cloroformo (99.8%, Scharlau), metanol (99.9%, Aldrich), ácido acético glacial (Scharlau), ácido clorhídrico (HCl 37%, Anedra), ácido fosfórico (H₂PO₄, 98%, Aldrich).
- Hidróxido de sodio (NaOH 99,2%, Anedra).
- Ácido oxálico anhidro (H₂C₂O₄, 99%, Scharlau).
- Trióxido de cromo (CrO₃, 99,99% Aldrich).
- cloruro de cobre (II) (CuCl₂) (Aldrich)

IV.2.2 Fabricación de las plantillas de óxido de aluminio anodizado

La fabricación de las plantillas AAO consiste en la oxidación electroquímica (anodizado) de aluminio metálico (Al). Tras una serie de procesos se obtiene una capa porosa de alúmina amorfa y no estequiométrica cuyos poros se distribuyen según una red hexagonal compacta. Para esta tesis se prepararon tres tipos de plantillas AAO con diferentes dimensiones de poro, a través del procedimiento conocido como “anodización en dos pasos” desarrollado por Masuda y Fukuda [Masuda & Fukuda, 1995]. El proceso de “anodización en dos pasos” consta de 4 etapas principales: (a) el electropulido del Al, (b) la 1ª anodización, (c) la disolución de la 1ª capa anódica y (d) la 2ª anodización, tal y como se representa en el esquema IV.1 A.

Para la elaboración de las plantillas AAO se siguió una metodología previamente descrita por Martín y colaboradores [Martín et al., 2009] detallada a continuación:

a) **Electropulido:** Para ello en primer lugar se limpia el Al mediante sucesivos lavados ultrasónicos en acetona, agua y etanol. Luego se procede con el electropulido cuyo objetivo es partir de una superficie plana al momento de llevar a cabo la primera anodización, debido a que la uniformidad en el proceso de anodización en la superficie beneficia el ordenamiento poroso. Para el mismo se utiliza una celda electroquímica (como se muestra en el esquema IV.1 B), similar a la empleada en los procesos de anodización posteriores, en los que la lámina de aluminio, que actúa como ánodo, está en contacto con una solución electrolítica de ácido perclórico (HClO₄) y etanol (C₂H₅OH) en proporción volumétrica de 1:3, respectivamente. Se empleó una rejilla de Pt como cátodo y agitación magnética proporcionada por una platina calefactora. Los parámetros óptimos de electropulido en el montaje empleado son: voltaje de 20 Volt, corriente de aproximadamente 0,1 A/cm², placa calefactora a 50 °C y electrolito a temperatura ambiente durante 3 o 4 min.

El mecanismo del electropulido puede explicarse de la siguiente manera: cuando se aplica una diferencia de potencial entre la lámina de Al y la rejilla de Pt, la rugosidad superficial de la lámina de Al de partida provoca que la distribución de líneas de campo eléctrico sobre ella no sea homogénea. Las líneas de campo tienden a confluir en las

crestas presentes en la superficie y por lo tanto, el campo eléctrico en estos puntos es mayor que en las demás regiones, con lo que la reacción de formación de óxido es mayor. Dicho óxido es altamente soluble en el electrolito empleado, por lo que desaparece prácticamente tras su formación. Así, este proceso de formación y posterior disolución del óxido en las zonas más elevadas tiende a eliminar la rugosidad del Al.

b) 1ª Anodización: En esta etapa se produce la primera capa anódica con una distribución no ordenada de poros. La misma se lleva a cabo en una celda electroquímica (esquema IV.1 C) donde la lámina de Al electropulida actúa como ánodo en contacto con una base de cobre conectada al polo positivo de la fuente de alimentación y una rejilla de Pt situada paralelamente a la lámina actúa como cátodo. La diferencia de potencial aplicada es la variable que determina el parámetro de la red hexagonal y el espesor de la capa barrera y ha de mantenerse constante durante la anodización. La temperatura de anodización repercute en el diámetro y longitud de los poros obtenidos y es controlada mediante un baño refrigerante. La medición de la temperatura de reacción se lleva a cabo con una termocupla. Finalmente, un amperímetro externo a la fuente y colocado en serie es el encargado de medir la corriente de paso. La distancia entre poros es aproximadamente lineal con el voltaje aplicado. Así, el diámetro de los poros sí puede ser modificado mediante disolución controlada de las paredes, pudiendo oscilar entre 20 nm y 400 nm. Las condiciones empleadas en esta etapa fueron: voltaje constante igual a 195 Volt y como electrolito se empleó ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) 1% p/p a 1 °C durante 15 min.

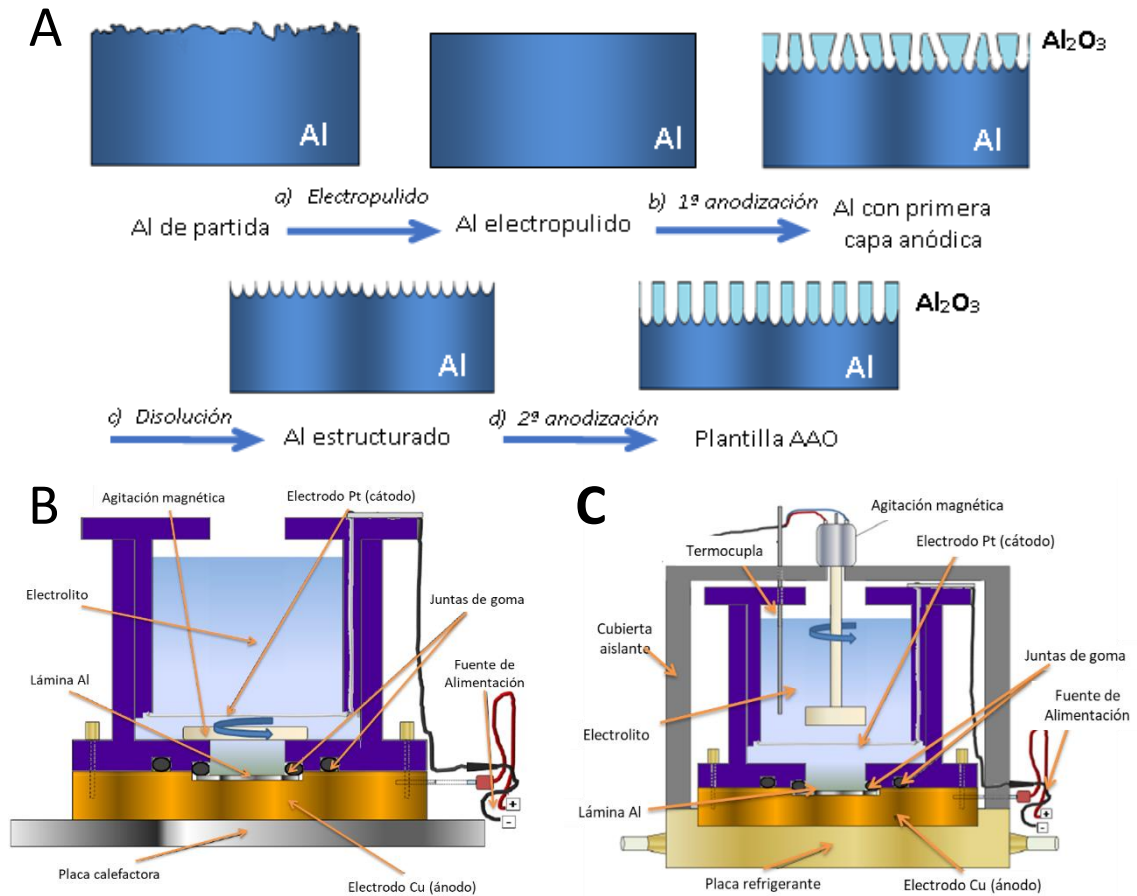
En estas condiciones la velocidad de crecimiento es 5 $\mu\text{m}/\text{h}$, el parámetro de red de 480 nm y el diámetro de poro entre 170-180 nm.

c) Disolución de la 1ª capa anódica: En esta etapa se elimina el óxido formado en los primeros instantes de la anodización, dado que esta muestra una distribución no ordenada de poros además de una ancha dispersión de diámetros. Sin embargo, los poros se van ordenando a medida que se va formando la capa anódica, de modo que, el óxido formado en las últimas etapas de la primera anodización, sí presenta orden en la distribución de sus poros. Por otro lado, el óxido poroso, en su crecimiento, esculpe formas cóncavas en el Al bajo los extremos de los poros, que además, tienden a ordenarse a medida que se ordenan los poros sobre ellas. Las cavidades semiesféricas del Al servirán como puntos de nucleación de los poros de una segunda capa anódica crecida en una anodización posterior. Para ello, se elimina selectivamente la primera capa de óxido en una disolución acuosa de trióxido de cromo (CrO_3) y ácido fosfórico (H_3PO_4). La capa de óxido desaparece completamente al cabo de 12 horas a temperatura ambiente.

d) 2ª anodización: Las condiciones de reacción para esta etapa (temperatura, voltaje, concentración de electrolito, etc.) son idénticas a las de la primera anodización. En esta segunda anodización crece una nueva capa anódica cuyos poros se sitúan en los centros de las cavidades semiesféricas presentes en el aluminio. Por lo tanto, la nueva capa anódica adquiere el orden de largo alcance que presentaba el aluminio del que ha crecido, formando un arreglo hexagonal de nanoporos, donde la simetría se mantiene a lo largo de dominios que comprenden entre 10 y 20 parámetros de red. La longitud de los poros puede ser controlada mediante el tiempo de la segunda anodización, pudiendo oscilar entre unos 100 nm y unos 300 μm . En este trabajo, la

reacción se realizó a 1 °C durante 15 min o 6 hs para obtener plantillas de diferente longitud de poro.

Esquema IV.1 Fabricación de las plantillas AAO: A) esquema del proceso “anodización en dos pasos” B) celda para electropulido C) celda para anodizaciones



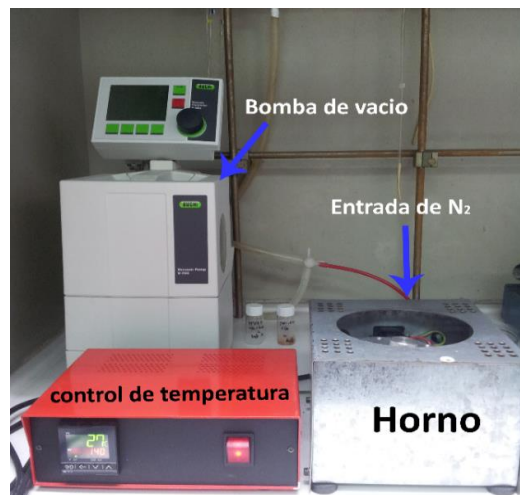
Además se fabricó una tercer plantilla AAO donde los poros fueron ensanchados. Para ello se partió de una plantilla obtenida en las condiciones previamente descritas, con un tiempo de la segunda anodización igual a 15 minutos. Posteriormente la plantilla se somete a una disolución parcial controlada de la alúmina en H₃PO₄ 10 % p/p a 35 °C durante 60 min.

Una vez sintetizadas, las plantillas AAO son sometidas a un pequeño tratamiento con el objetivo concreto de eliminar los posibles restos de la anodización o de los tratamientos de ensanchamiento, etc. que puedan quedar sobre la superficie de las plantillas AAO cubriendo las paredes de los poros y facilitar así el proceso de infiltración de los polímeros. Para ello, las plantillas AAO son sometidas a ciclos de limpieza con acetona, agua y etanol en un baño de ultrasonido (Fisherbrand™, Fisher Scientific, S.L.) durante 4 min en cada disolvente. A continuación, se introducen en un horno a 175 °C en vacío, durante 1 h como mínimo. Este tratamiento permite eliminar los restos orgánicos que pueden encontrarse adsorbidos a las paredes de la plantilla AAO, que pueden disminuir su energía superficial.

IV.2.3 Infiltración de PFVH-CHI-B en las plantillas AAO

Los *scaffolds* nanoestructurados (SN) se prepararon por infiltración de PFVH-CHI-B en las nanocavidades AAO por el método de humectación de película precursora [Martín & Mijangos, 2008]. Para este método, se utilizó un horno de reducidas dimensiones que permite un notable control de la temperatura y llevar a cabo las infiltraciones en atmosfera de nitrógeno o en vacío (imagen IV.1). Para el procedimiento de infiltración, la película de PFVH-CHI-B se colocó sobre la superficie de la plantilla previamente obtenida y luego se introdujo en un horno a 140 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 6 h. Durante este proceso, el polímero se presionó sobre la plantilla cada 15 min para promover la infiltración. Para la tercera plantilla obtenida, donde transcurrió mayor tiempo de segunda anodización, las condiciones de infiltración utilizadas fueron iguales a las anteriores pero se dejó durante 18 h en el horno, dado que tiene mayor longitud de poro. Al final del proceso de infiltración, el exceso de copolímero se eliminó de la superficie superior de la plantilla AAO con un bisturí.

Imagen IV.1 Horno empleado para la infiltración de la película



Adicionalmente, a modo de controlar que las condiciones empleadas para la infiltración no generen cambios indeseables en la estructura del polímero, una película de PFVH-CHI-B se sometió a un ciclo de calentamiento de 140 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 12 h y se estudió por DSC, del mismo modo que se indicó en el capítulo anterior.

IV.2.4 Estudio de la nanoestructura

IV.2.4.1 Espectroscopía Raman Confocal

Con el objetivo de analizar el efecto de la infiltración en la distribución del polímero dentro de los poros de la plantilla AAO, se realizaron mediciones por espectroscopía Raman confocal usando un equipo Renishaw In Via Reflex Raman system con un microscopio óptico acoplado al sistema. La dispersión Raman se excita usando un láser de diodo a una longitud de onda de 785 nm. El haz del láser se centra en la muestra con un objetivo de microscopio de 0,85 x 100. La potencia del láser en la muestra, el tiempo de exposición y el número de acumulaciones para las mediciones Raman corresponden a 320 mW, 10 segundos y 10 barridos, respectivamente. En este caso, el estudio fue llevado a cabo a

temperatura ambiente sobre PFVH-CHI-B infiltrado en el interior de la plantilla AAO de mayor longitud de poro. Los perfiles de profundidad se obtuvieron enfocando el microscopio paso a paso, a intervalos de 5 μm , a través de la plantilla AAO. De igual modo, se estudiaron por esta técnica los compuestos de partida el PFVH, CHI, PFVH-CHI-B. Todas las muestras fueron medidas en el intervalo espectral de 3500 a 300 cm^{-1} .

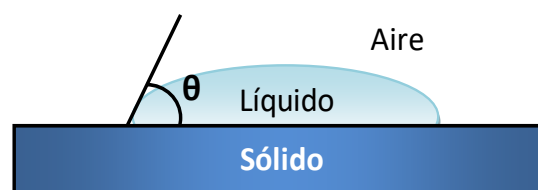
IV.2.4.2 Microscopía SEM

Tanto las plantillas porosas de alúmina anódica como las nanofibras obtenidas mediante la infiltración de la mezcla polimérica se analizaron morfológicamente mediante microscopía SEM. Para el análisis de las nanoestructuras, primeramente se colocó un soporte de poli(metil metacrilato) (PMMA) sobre la plantilla infiltrada, para soportar las nanoestructuras libres, lo que se ha visto no interfiere con futuras determinaciones [Giussi et al., 2013; Lastra et al., 2015]. Luego con el fin de realizar el análisis de las nanofibras de copolímero libre, el sustrato de aluminio se eliminó. Para ello se trató con una solución acuosa de CuCl_2 al 1,7% p/v y HCl 50% v/v hasta completa disolución del aluminio y luego para disolver la alúmina con una solución acuosa al 10% de H_3PO_4 durante toda la noche a temperatura ambiente. Las imágenes de SEM de esta parte fueron tomadas en el ICTP (CSIC, Madrid) empleando un microscopio FE-SEM Hitachi modelo SU8000. Adicionalmente la apariencia de las películas se evaluó macroscópicamente.

IV.2.4.3 Medidas de ángulo de contacto

Con el fin de conocer la hidrofobicidad de las películas poliméricas con distintas estructuras, se realizaron pruebas de tensión superficial sobre las matrices, a partir de mediciones del ángulo de contacto con el agua usando un goniómetro KSV Theta a temperatura ambiente. Se midieron los ángulos de contacto de las películas nanoestructuradas obtenidas con las diferentes plantillas y de la película polimérica sin nanoestructurar. Todas las pruebas fueron realizadas en la interfaz sólido-aire. Para ello, se colocó agua bidestilada sobre las superficies enfrentadas al aire de las muestras y se usó una cámara de dispositivo de acoplamiento de carga para capturar las imágenes de las gotas de agua; y así determinar los ángulos de contacto. Se realizaron al menos seis mediciones en diferentes posiciones sobre la superficie de cada muestra para calcular el ángulo de contacto estático medio. En el esquema IV.2 se representa una gota de agua sobre un material sólido. Se observa la descomposición de fuerzas entre las distintas interfaces teniendo como resultante el ángulo θ conocido como ángulo de contacto.

Esquema IV.2 Determinación del ángulo de contacto



IV.2.5 Estudios *in vitro* en los SN

Para estos ensayos se emplearon los mismos cultivos celulares que se describieron para el *scaffold* sin nanoestructurar (CPMO, condrocitos y RAW264.7). Los SN se cortaron

con sacabocado de igual diámetro de pocillo de la placa a emplear y, previo a la incubación con células, se esterilizaron por exposición al UV durante 30 min. Para todos los ensayos *in vitro* se utiliza como control las células creciendo sobre la placas de cultivo estándar sin membrana a iguales condiciones.

IV.2.5.1 Viabilidad celular

Para el estudio de viabilidad celular sobre los SN se utilizaron células CPMO que se mantuvieron en medio basal a 37 °C. La adhesión celular y la proliferación se evaluaron mediante el ensayo MTT, detallado en el apartado III.2.4.2. Para ello las células se cultivaron sobre las películas nanoestructuradas en placas de cultivo de 96 pocillos durante 1 h (adhesión), 1 y 3 días (proliferación). Después de estos períodos de cultivo, las células se incubaron durante dos horas adicionales con una solución de 0,1 mg/ml de MTT. Después las membranas se pasaron a un pocillo limpio, el precipitado de formazán se disolvió con DMSO y la absorbancia se leyó a 570 nm. Los datos son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie control luego de transcurrida 1 hora desde que se inició el ensayo. Adicionalmente se dejaron crecer las células CPMO durante 24 h para estudiar su interacción con el SN mediante microscopía SEM empleando un equipo Phillips 505. Para ello las células se fijaron con p-formaldehído 10% durante 10 min, se secaron e inmediatamente después se metalizaron con oro para su observación.

También se evaluó el efecto de los productos de degradación de los SN luego de 14 días sobre la viabilidad celular. Para este estudio los *scaffolds* se incubaron en DMEM, suplementado con penicilina (100 UI/l) y estreptomocina (100 mg/l), a 37 °C durante 14 días. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes (medio condicionado) se expusieron a una monocapa de células CPMO creciendo sobre una placa de cultivo estándar (96 pocillos), suplementando este medio condicionado con SFB al 10% e incubando a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂, durante 1 y 3 días. Transcurrido este tiempo la viabilidad celular se evaluó con el ensayo de MTT, tal como se describió anteriormente. Para este ensayo en particular, los resultados se compararon con células CPMO creciendo con medio basal fresco en las mismas condiciones (condición control) y son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal las células crecidas luego de 1 día de cultivo en esta condición.

IV.2.5.2 Evaluación de la capacidad osteo- y condrogénica

La capacidad osteogénica se evaluó incubando las células CPMO sobre los SN en medio osteogénico de igual modo que se detalló para las películas sin nanoestructurar (apartado III.2.4.3). Los marcadores osteogénicos evaluados para las células crecidas y diferenciadas sobre los SN después de 15 días fueron: la producción de colágeno tipo I, mediante el ensayo colorimétrico Sirius red, y la actividad de FAL, mediante la conversión de p-nitrofenilfosfato de sodio en p-nitrofenol. Mientras que después de 21 días en las mismas condiciones se analizó la producción de nódulos de mineralización con el ensayo colorimétrico de rojo de Alisarina S.

Alternativamente, para estudiar la capacidad de desarrollo condrogénico de estas membranas se dejaron crecer los condrocitos sobre los SN durante 14 días en medio basal

suplementado con fungizona (0,25 µg/ml) a 37 °C y 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Luego de ese tiempo se midió la producción de glicosaminoglicanos por parte de los condrocitos crecidos sobre las membranas empleando el método colorimétrico azul alcian detallado previamente (apartado III.2.4.4.1). Brevemente, las células se fijaron con p-formaldehído 10% durante 10 min y se tiñeron durante la noche con azul alcian. Después se lavó, se extrajo el colorante con DMSO y la absorbancia se midió a 600 nm de longitud de onda.

Para estos estudios los resultados son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal las células que crecieron sobre la superficie control.

IV.2.5.3 Evaluación de la citotoxicidad

Para determinar la eventual citotoxicidad de los SN se evaluó la producción de óxido nítrico (NO), interleucina-1β (IL1β) y la expresión en el ARNm de los marcadores de citotoxicidad utilizando los macrófagos RAW264.7, de modo similar que para el *scaffold* sin nanoestructurar (apartado III.2.4.5). Brevemente, los macrófagos se hicieron crecer sobre los SN o pocillos sin membrana (condición control) con DMEM sin rojo de fenol y SFB al 5% en placas de 48 pocillos. Donde después de 1, 2 y 3 días se recogieron los sobrenadantes y se evaluó la producción de NO mediante el ensayo de Griess. La producción de IL1β, por su parte, se determinó mediante el kits de ELISA (Mouse IL-1β ELISA kit, BD Biosciences OptEIA™) en los medios de cultivo luego de 1, 2 y 3 días de incubación. Finalmente, para los estudios de PCR se aisló ARN total a partir de RAW264.7 cultivadas 3 días sobre los SN y se evaluó la expresión de IL1β, factor de necrosis tumoral α (TNFα) y óxido nítrico sintasa (iNOS) en los niveles de ARNm utilizando la técnica semicuantitativa RT-PCR como se describió en el capítulo anterior. Los *primers* específicos para los marcadores de citotoxicidad empleados se muestran en la tabla IV.1 y fueron normalizados utilizando β-actina.

Tabla IV.1 *Primers* marcadores de citotóxicidad

Marcador	Código Genbank	Tamaño del producto (pb)	Secuencia	Ta (°C)
β-actina	NM_007393.4	345	fw CCTTCAACACCCCAGCCAT rv CATAGCTCTTCTCCAGGGA	56,1
IL1β	NM_008361.3	264	fw AAGCTCTCCACCTCAATG rv CAGACTCAAACCTCACTTT	48,4
TNFα	NM_013693.3	298	fw CACGCTCTTGTGTACTG rv CTTGAAGAGAACCTGGGA	49,3
iNOS	NM_010927.3	499	fw ACCAGAGGACCCAGAGACAA rv CGATGCACAACCTGGGTGA	56,7

IV.2.6 Análisis estadístico

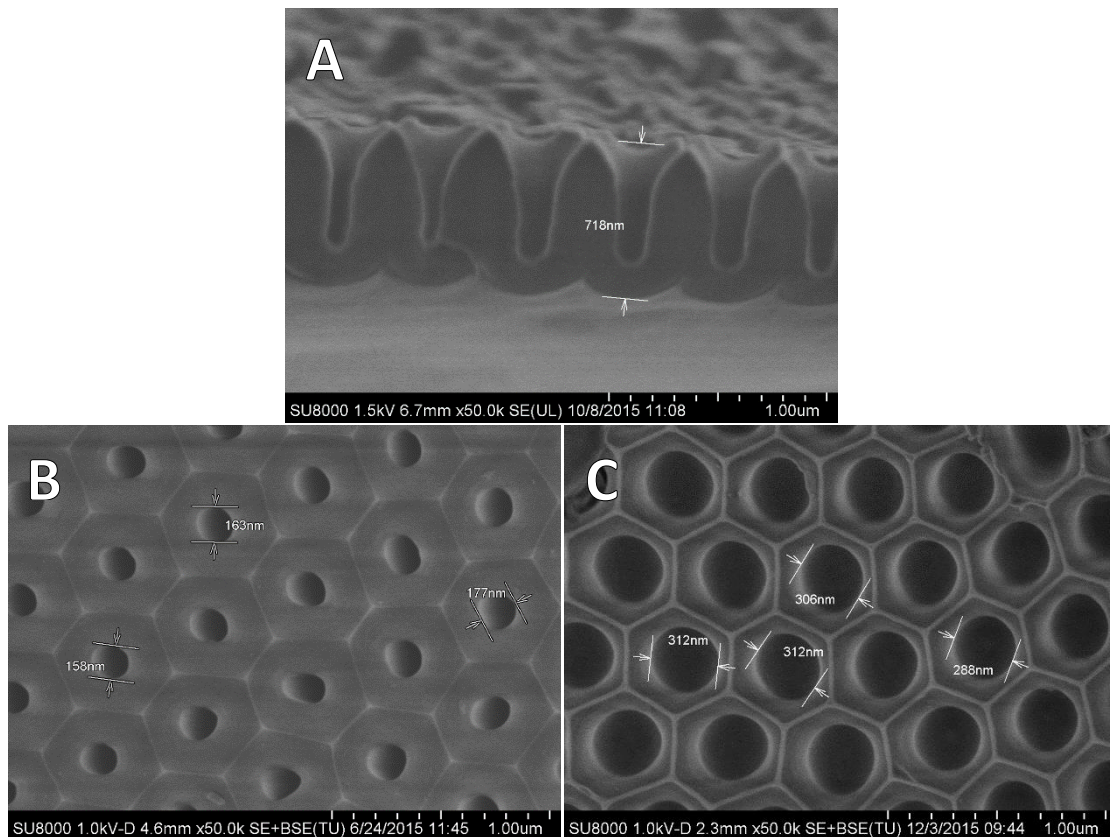
Para los ensayos *in vitro* todos los resultados son expresaron como la media ± SEM y se obtuvieron a partir de dos experimentos separados realizados al menos por triplicado. Las diferencias entre grupos se establecieron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey, con el programa GraphPad InStat versión 3.05. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p < 0,05 para todos los análisis estadísticos.

IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1 Fabricación de las plantillas de óxido de aluminio anodizado

Las plantillas de óxido de aluminio anodizado (AAO) se sintetizaron mediante un proceso de anodización electroquímica en dos etapas para producir nanocavidades porosas bien definidas. La imagen IV.2 presenta las imágenes de SEM de las plantillas obtenidas, AAO170 y AAO300, donde se puede observar una arquitectura ordenada de largo alcance con poros uniformes y de simetría hexagonal.

Imagen IV.2 Micrografías SEM de las plantillas AAO. A) Vista lateral de AAO170 y vista superior de B) AAO170 y C) AAO300



Se denominó AAO170 a las plantillas que se obtuvieron siguiendo los pasos descritos en la parte experimental con una segunda etapa de anodización de 15 minutos; mientras que AAO300 se designa a las obtenidas con las mismas condiciones más un paso adicional para el ensanchamiento de las nanocavidades. Además de las plantillas AAO170 y AAO300 se obtuvo una plantilla de mayor longitud denominada AAO30L, modificando el tiempo de la segunda etapa de anodización a 6 h. Las dimensiones características de las plantillas sintetizadas fueron determinadas por microscopía SEM y se presentan en la tabla IV.2 como la media \pm SEM, tomando los valores de diámetro y longitud para al menos tres plantillas por cada condición de síntesis. Con estos resultados se puede ver la buena reproducibilidad y relación de aspecto bien definida que existe para este método de síntesis, como ha sido indicado anteriormente [Mijangos et al., 2016].

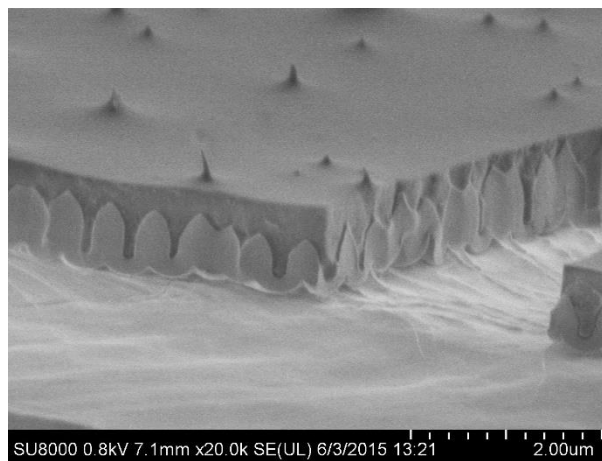
Tabla IV.2 Dimensiones de las plantillas AAO

	Diámetro	Longitud
AAO170	169 ± 7 nm	766 ± 25 nm
AAO300	327 ± 4 nm	760 ± 55 nm
AAO30L	172 ± 8 nm	31 ± 2 μm

IV.3.2 Infiltración de la película

La nanoestructuración de la película PFVH-CHI-B en las plantillas AAO se llevó a cabo, como se describe en la sección experimental, por el método de humectación de película precursora [Martín & Mijangos, 2008]. Para la etapa de infiltración se sometió la muestra a un calentamiento térmico de 140 °C en atmósfera de nitrógeno. Esta temperatura se seleccionó teniendo en cuenta que está por encima de la T_g (64,8 °C) y muy por debajo de la temperatura de descomposición inicial (TDI = 242 °C) para la película PFVH-CHI-B empleada, como fue demostrado en el capítulo anterior. Luego de este proceso y antes de eliminar la plantilla AAO las muestras se estudiaron mediante microscopía SEM para confirmar la infiltración. En la imagen IV.3 se presenta una microfotografía de SEM después de una infiltración de PFVH-CHI-B en una plantilla AAO170. Con esta imagen se puede observar que el polímero logra infiltrarse en el molde AAO rellenando las nanocavidades.

Imagen IV.3 Vista lateral de una película PFVH-CHI-B infiltrada



Adicionalmente, se evaluó por DSC una muestra sometida a las mismas condiciones de infiltración pero durante 12 h. Los resultados indicaron una T_g igual a 64,5 °C, no presentando diferencias significativas respecto a la T_g de la muestra sin tratar (T_g = 64,8 °C). De modo, que por este estudio se indica que aún luego de 12 h de someter la muestra a las condiciones de infiltración seleccionadas el PFVH-CHI-B no sufre modificaciones apreciables en su T_g.

IV.3.3 Estudio de la nanoestructura

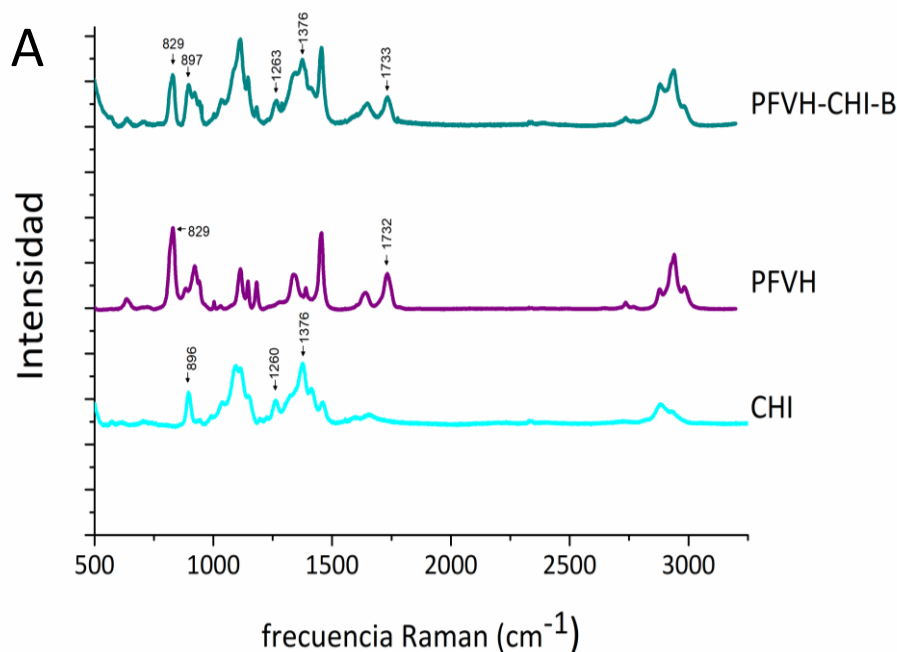
Los sistemas nanoestructurados obtenidos han sido estudiados mediante diferentes técnicas a fin de conocer la nanoestructura y su posible empleo en el campo de la ingeniería de tejidos.

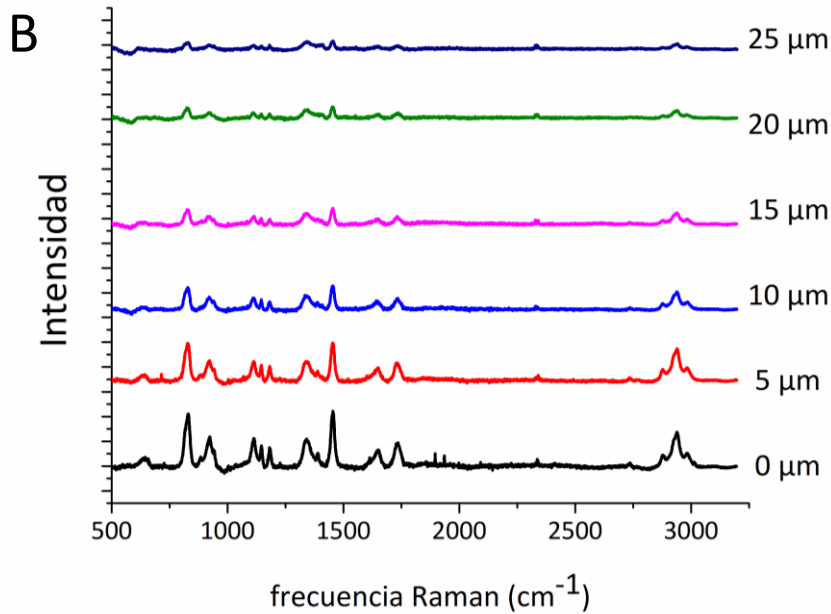
IV.3.3.1 Espectroscopia Raman Confocal

Se evaluó la presencia del material a lo largo de la longitud de la nanocavidad por espectroscopia Raman confocal, para una plantilla AAO30L infiltrada con PFVH-CHI-B. En primer lugar, se evaluaron los espectros Raman de CHI, PFVH y PFVH-CHI-B (figura IV.1 A). El quitosano mostró bandas a 2880 cm^{-1} que corresponden a la vibración de estiramiento $\nu(\text{C-H})$ del anillo piranoide, y otras a 1376 , 1260 y 896 cm^{-1} que podrían ser asignadas a vibraciones de flexión $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2)$, $\nu(\text{C-O})$ de estiramiento y vibración y $\nu(\text{C-C})$ de estiramiento-vibración del anillo de piranoide, respectivamente [Zajac et al., 2015]. PFVH presentó bandas características en 1732 y 829 cm^{-1} que corresponde a la vibración de estiramiento $\nu(\text{C=O})$ y $\nu(\text{C-CH}_3)$, respectivamente. Para el espectro Raman del PFVH-CHI-B se identificaron las bandas características de ambos componentes.

La figura IV.1 B muestra los espectros Raman de PFVH-CHI-B tomado a diferentes intervalos de profundidad. A pesar del ruido debido a la fluorescencia de la alúmina, se pudieron observar todas las bandas características para la muestra PFVH-CHI-B en los espectros Raman en profundidad hasta $25\text{ }\mu\text{m}$. La disminución de la intensidad de las bandas con la profundidad de la cavidad que se observa puede atribuirse a la disminución de la transparencia de la muestra con la profundidad, como ya se ha observado para otros sistemas similares [Gallardo et al., 2007]. Esto demuestra que con el método de infiltración empleado no se producen cambios en la composición química por degradación u algún otro proceso químico o físico.

Figura IV.1 Espectroscopia Raman confocal, A) de CHI, PFVH y PFVH-CHI-B y B) AAO30L infiltrada con PFVH-CHI-B



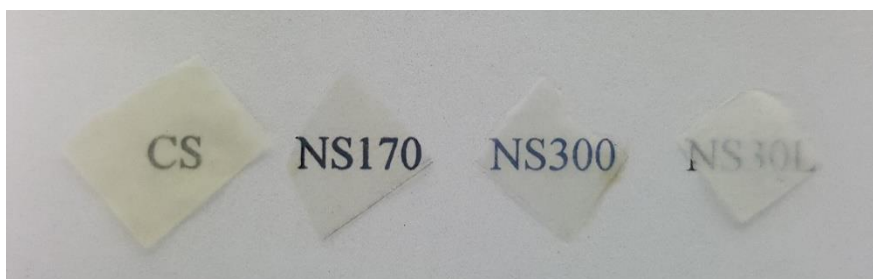


IV.3.3.2 Apariencia y morfología

Para obtener los *scaffolds* nanoestructurados (SN) de PFVH-CHI-B, una vez infiltrada la película en las plantillas se le colocó un soporte de PMMA y se eliminó el molde de AAO, tal como se describe en la sección experimental. Siguiendo esta metodología, se obtuvieron tres *scaffolds* nanoestructurados: SN170, SN300 y SN30L usando plantillas AAO170, AAO300 o AAO30L, respectivamente. Los SN se cortaron en pequeñas porciones para realizar estudios morfológicos macroscópicos y microscópicos.

En la imagen IV.4 se presenta el aspecto macroscópico de las membranas, se puede observar que los *scaffolds* nanoestructurados SN170 y SN300 son más transparentes que las películas del SN30L y del sin nanoestructurar, obtenido por *solvent casting*. Esta diferencia probablemente sea causada por la masa más alta presentada en el *scaffold* obtenido por *solvent casting* y el SN30L.

Imagen IV.4 Imagen macroscópica de los *scaffolds*: nanoestructurados (NS) y por *solvent casting* (CS)

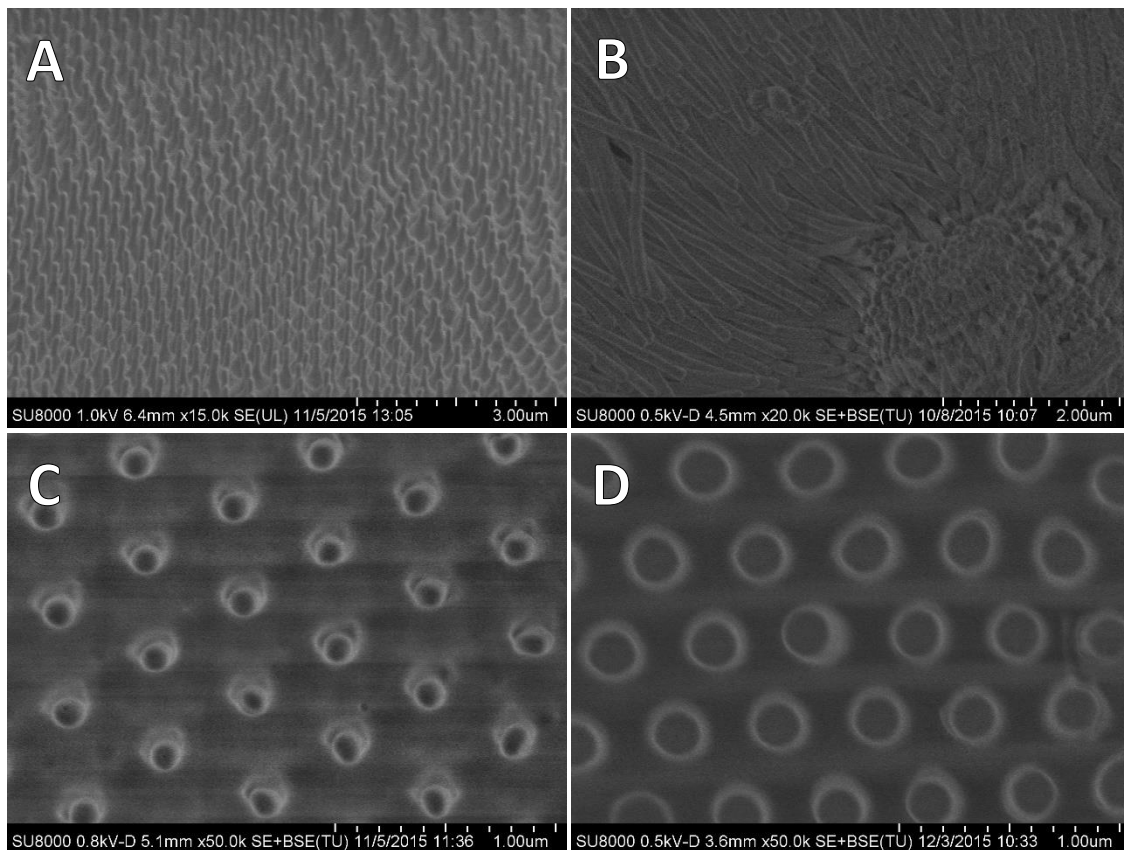


Por otro lado, los estudios morfológicos a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) permitieron examinar las nanofibras de PFVH-CHI-B obtenidas para evaluar su longitud, diámetro y distribución (imagen IV.5). La imagen IV.5 A es una vista transversal del SN170 que permite estudiar la longitud de las fibras, encontrando con

esta que las nanofibras cortas presentaban una distribución homogénea en longitud y en los espacios entre ellas. El mismo patrón se encontró para el SN300. Mientras que, como se puede observar en la imagen IV.5 B, las nanofibras largas (SN30L) dan lugar a una membrana desordenada donde la estructura fibrosa está colapsada y los nanopilares muestran una estructura condensada tipo racimo. Por su parte, en las imágenes IV.5 C y D se muestra la vista desde arriba de las nanofibras de PFVH-CHI-B obtenidas a partir de plantillas AAO170 y AAO300, respectivamente.

A partir de estas imágenes puede observarse que los diámetros de las nanofibras son muy homogéneos y coincidentes con los de la plantilla, mostrando que el copolímero llenaba completamente las nanocavidades.

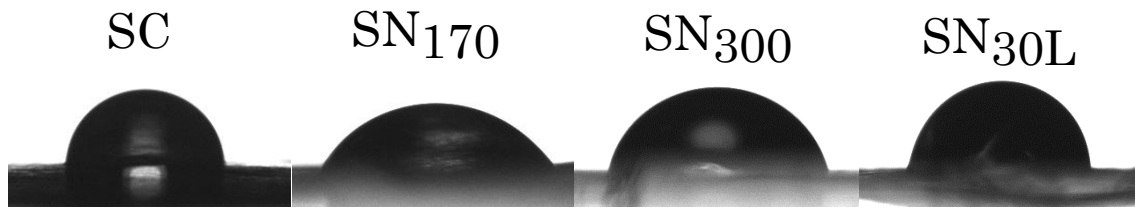
Imagen IV.5 SEM de las películas nanoestructuradas, vista transversal de A) SN170 y B) SN30L; vista superior A) SN170 y B) SN300



IV.3.3.3 Medidas de ángulo de contacto

Se realizaron pruebas de tensión superficial sobre las matrices de PFVH-CHI-B a partir de mediciones del ángulo de contacto, las cuales se pueden relacionar directamente con la polaridad del material. En la imagen IV.6 se muestran fotografías de la gota de agua sobre las películas con distinta estructura: *scaffold* obtenido por *solvent casting* (SC) y *scaffolds* nanoestructurados SN170, SN300 y SN30L.

Imagen IV.6 imágenes gota de agua sobre las películas



La medida del ángulo de contacto mostró que las películas PFVH-CHI-B nanoestructuradas cortas (SN170 y SN300) presentan valores significativamente más bajos que los observados para el SC ($p < 0.001$, tabla IV.3), lo que sugiere un aumento en la hidrofiliidad para los *scaffolds* nanoestructurados SN170 y SN300. Los valores encontrados para SN30L no presentaron diferencias significativas respecto al SC, esto puede deberse al colapso de la nanoestructura observado por SEM para el SN30L, lo que conlleva a una matriz más desordenada en comparación de las nanoestructuras cortas. De modo que el aumento en la hidrofiliidad puede deberse al ordenamiento de la estructura del *scaffolds* por la nanoestructuración vistos para SN170 Y SN300. Además, encontramos un menor valor de ángulo de contacto para el *scaffold* con fibras de diámetro más pequeño (SN170).

Tabla IV.3 Ángulo de contacto de los *scaffolds*

	Ángulo de contacto	D* (nm)
SC	$103^\circ \pm 1$	-
SN170	$61^\circ \pm 3$	270
SN300	$81^\circ \pm 2$	125
SN30L	$100^\circ \pm 4$	-

*D: distancia entre las fibras, evaluada por SEM

Basándose en la medición del ángulo de contacto, se ha explicado el comportamiento de la humectación de sólidos con arquitectura porosa o texturizada por diferentes modelos [Wenzel, 1936; Cassie & Baxter, 1944]. Estos modelos consideran el efecto del factor de rugosidad (r) y la fracción de área de la superficie sólida (ϕ_s) en contacto con la gota de agua. Se ha demostrado que el ángulo de contacto aumentará con el aumento de la rugosidad de una superficie hidrófoba, mientras que el ángulo de contacto disminuirá con el aumento de la rugosidad de una superficie hidrófila. Los resultados de nuestras películas mostraron un comportamiento más cercano a la superficie hidrófila, aunque el ángulo de contacto de SC es 103° mayor a 90° . Las superficies de ambos SN ordenados mostraron valores más bajos de ángulo de contacto que 90° . Por otra parte, el valor más bajo medido para SN170 en comparación con SN300 podría correlacionarse con el aumento de la distancia entre las nanofibras (tabla IV.3) que promueve una superficie más húmeda y por lo tanto una disminución del ángulo de contacto aparente, según el modelo de Wenzel. Un comportamiento similar causado por nanoestructuración de superficies ha sido reportado previamente [Rasilainen et al., 2009].

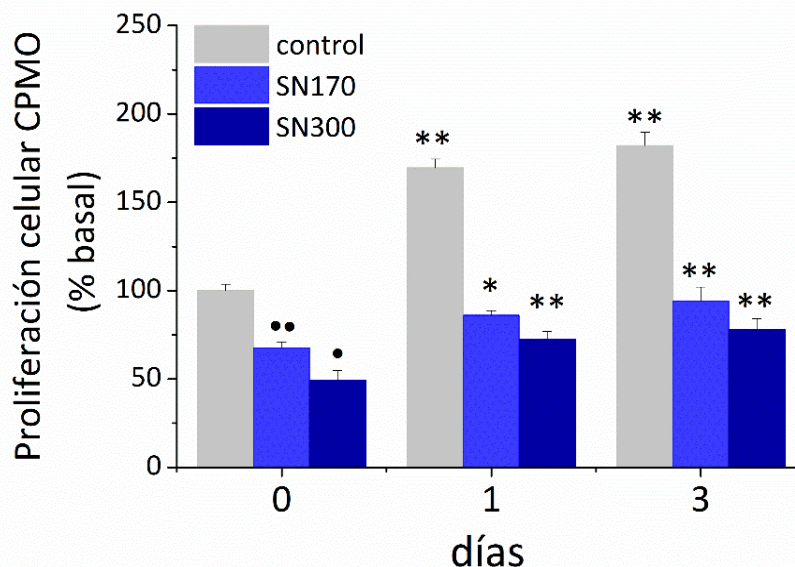
IV.3.4 Estudios *in vitro* en los SN

Para los estudios *in vitro*, se seleccionaron las películas nanoestructuradas SN170 y SN300 con el fin de evaluar posibles diferencias en la respuesta biológica causada por el ordenamiento de la superficie y la diferencia en el diámetro de las nanofibras. La selección de estas películas se basó en experimentos previos que demostraron que las películas con estructuras ordenadas promueven la diferenciación osteoblástica mejor que con estructuras desordenadas, como es el caso de SN30L [Fernández et al., 2011b; Cortizo et al., 2012; Cortizo et al., 2016].

IV.3.4.1 Viabilidad celular

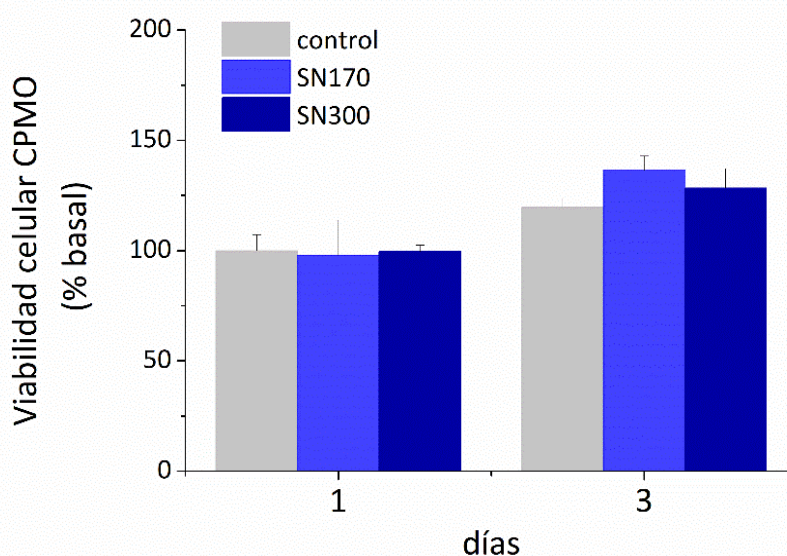
Se evaluó la adhesión y proliferación de las células progenitoras de la médula ósea (CPMO) en las películas nanoestructuradas por el ensayo MTT (figura IV.2). Se encontró que las células CPMO se adherían mejor a la superficie control que a la superficie de las películas nanoestructuradas (día 0, $p < 0.001$). Sin embargo, la tasa de crecimiento encontrada fue equivalente entre la superficie control y las nanoestructuradas (Figura IV.2, 1 y 3 días). En el capítulo anterior se demostró que la adhesión de las células CPMO era comparable en los platos de cultivo celular respecto a las crecidas sobre la película de PFVH-CHI-B obtenida por *solvent casting* (figura III.7 A), lo que sugiere que las diferencias en adhesión pueden estar influenciadas por características de superficie y no por la naturaleza química de la película. Estos datos coinciden con un trabajo previo donde se reportó una disminución en la adhesión de células óseas debido a nanofibras de similares dimensiones [Biggs et al., 2009]. En concordancia con estos resultados, varios grupos han demostrado que la topografía del material puede influir en la adhesión y la proliferación celular empleando cultivo de células madres [Oh et al., 2009; Tsimbouri et al., 2014; Park & Im, 2015]; también en nuestro laboratorio se ha demostrado el efecto de la superficie del *scaffold* sobre la adhesión y proliferación de células osteoblásticas [Fernández et al., 2011b; Cortizo et al., 2012; Lastra et al., 2015].

Figura IV.2 Proliferación celular por MTT de CPMO sobre los SN, •• $p < 0,001$ vs control, • $p < 0,05$ vs SN170 día 0, * $p < 0,05$ vs día 0, ** $p < 0,001$ vs día 0



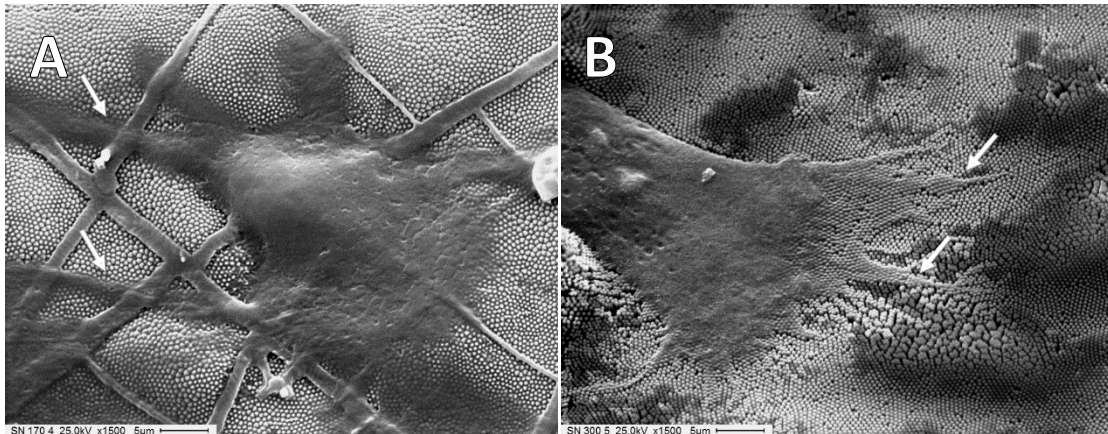
Adicionalmente, se estudiaron los efectos de los productos de degradación de los SN sobre la viabilidad celular. Este es un ensayo indirecto que permite conocer si las diferencias apreciadas en la figura IV.2 se asocian o no a posibles productos de degradación de los SN. Para esto, los SN se incubaron en medio de cultivo DMEM durante 14 días; el sobrenadante se expuso a una monocapa de células CPMO en cultivo, creciendo sobre una superficie de cultivo estándar durante 1 y 3 días. Los resultados encontrados se muestran en la figura IV.3., como puede verse el ensayo mostró que las células crecían sobre la superficie de manera comparable a las células expuestas a medios de cultivo estándar (condición control) incluso después de 3 días de exposición. Demostrando que las diferencias encontradas para las células CPMO que crecen sobre los SN en comparación con la condición control pueden ser atribuidos al cambio en la topografía de la superficie.

Figura IV.3 Ensayo indirecto por MTT



La topografías superficiales de los *scaffolds* también influyen en la diseminación de las células y el reordenamiento del citoesqueleto, que a su vez podría influir en el potencial de diferenciación de las células madres [Biggs et al., 2009; Oh et al., 2009; Tsimbouri et al., 2014]. Para estudiar la morfología de las células creciendo sobre las superficies nanoestructuradas, se observaron las células CPMO por microscopía SEM luego de 24 h de cultivo (imagen IV.7). En las imágenes se puede observar que las células CPMO fueron capaces de adherirse y extenderse sobre las superficies nanoestructuradas. El análisis de las imágenes SEM también demostró que las células desarrollaban lamelipodios que interactúan estrechamente con las nanofibras (imagen IV.7, flechas blancas). En este sentido, estudios realizados por otros investigadores han asociado el desarrollo correcto del citoesqueleto con adecuadas interacciones células-matriz, que a su vez lleva a la activación de las vías intracelulares necesarias para el crecimiento de las células y su diferenciación [Biggs et al., 2009; Tsimbouri et al., 2014; Kim et al., 2013]. Además, como se mencionó en el capítulo anterior, la disposición alargada o estrellada de las células conlleva a una mejor diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico que la morfología redonda, causada por la alteración de los complejos de adhesión celular [McBeath et al., 2004; Kilian et al., 2010; Biggs et al., 2009].

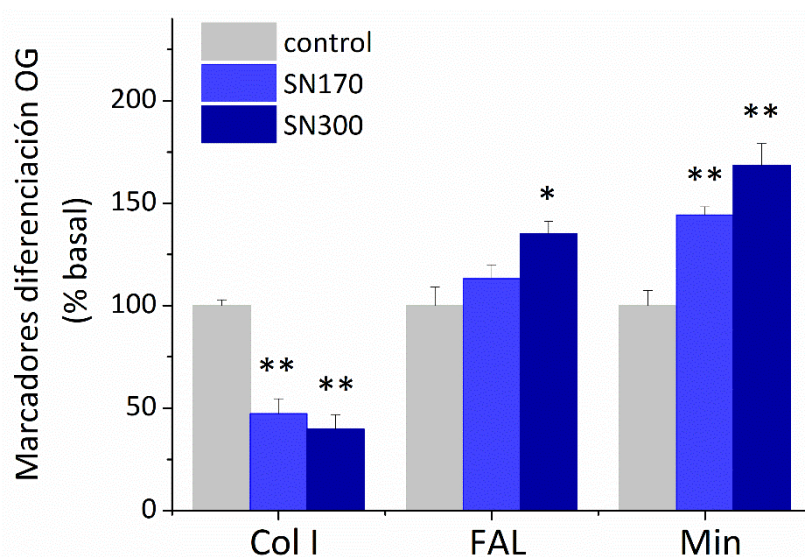
Imagen IV.7 Micrografías obtenidas por SEM de las CPMO crecidas sobre A) SN170 y B) SN300



IV.3.4.2 Evaluación de la capacidad osteo- y condrogénica

Se evaluaron en las células CPMO crecidas sobre las películas nanoestructuradas, de PFVH-CHI-B de igual modo que para las películas sin nanoestructurar, los marcadores de diferenciación osteoblástica: actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de nódulos de mineral (Min) y de colágeno tipo I (Col I). En la película SN300, se encontró un aumento significativo en la actividad de la fosfatasa alcalina ($p < 0,01$) y en la deposición de nódulos de mineral ($p < 0,001$) en comparación con la superficie control (figura IV.4). Mientras que para SN170 sólo la producción de depósitos de mineral fue significativamente mayor que el control ($p < 0,001$). En comparación con las células CPMO crecidas y diferenciadas sobre las SC, estos resultados muestran niveles comparables para la producción de nódulos de mineral, mayor actividad de FAL y una disminución en la producción de colágeno tipo I.

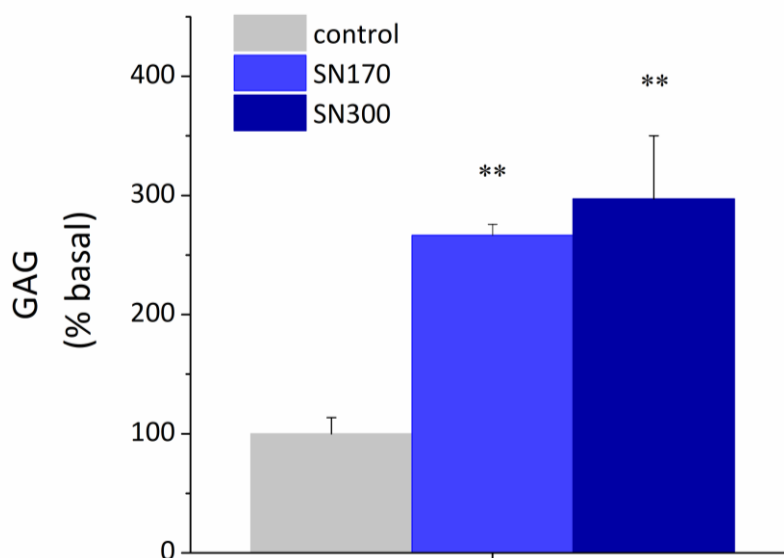
Figura IV.4 Evaluación de marcadores osteogénicos (OG), * $p < 0,01$ vs control, ** $p < 0,001$ vs control



A diferencia de lo encontrado para los otros marcadores óseos, el estudio de la producción de colágeno tipo I en todos los SN de PFVH-CHI-B fue significativamente menor que en el control ($p < 0,001$). Este resultado podría explicarse por el hecho de que la nanoestructuración de la superficie también influye en la deposición de la matriz extracelular. En este sentido, se ha demostrado previamente que la deposición de colágeno tipo I fue disminuida cuando células osteoblásticas se cultivan en superficies fibrosas-nanoestructuradas [Smith et al., 2009; Lastra et al., 2015]. La baja en la producción de colágeno tipo I se cree que podría deberse a la maduración acelerada de la MEC en el material nanofibroso en comparación con el control, o la capacidad de las células para interactuar con las nanofibras de manera similar que lo hacen con el colágeno tipo I, por lo que requieren menos secreción de colágeno tipo I [Smith et al., 2009].

Por otro lado, se evaluó la producción de la matriz extracelular de glicosaminoglicanos (GAG) con cultivo de condrocitos primarios crecidos sobre los SN, para estudiar la capacidad condrogénica de las películas. Con este fin, los condrocitos se cultivaron sobre los SN durante 15 días y se tiñeron con azul alcian. Se encontró un aumento significativo en la producción de GAG con los condrocitos que crecieron sobre las superficies nanoestructuradas en comparación con la superficie control ($p < 0,001$), aunque no se encontraron diferencias entre las distintas nanoestructuras (figura IV.5). Estos valores son superiores a los encontrados para la película sin nanoestructurar (figura III.10), demostrando un efecto pro-condrogénico de la nanoestructuración del *scaffold*.

Figura IV.5 Evaluación de marcador condrogénico, ** $p < 0,001$ vs control



Nuevamente los resultados sobre el *scaffold* indican una gran versatilidad de este biomaterial, permitiendo tanto el desarrollo condro- como osteogénico, sin observar diferencias debidas al diámetro de las nanofibras estudiadas.

IV.3.4.3 Evaluación de la citotoxicidad

Por último, se estudió la influencia de la nanoestructuración de las películas de PFVH-CHI-B en la respuesta inflamatoria de células macrofágicas RAW264.7, que como ya se mencionó representan un buen modelo para investigar la citotoxicidad de los biomateriales. Para ello, se evaluó la producción y liberación al medio de cultivo de óxido nítrico (NO) e interleuquina-1 β (IL1 β) por parte de los macrófagos crecidos sobre los SN y sobre la condición control en función del tiempo de cultivo (1, 2 y 3 días). Se encontró que los macrófagos que crecen en las películas nanoestructuradas aumentaron significativamente la producción de NO frente al control ($p < 0,01$) después de 1 y 2 días de cultivo, mientras que no hubo diferencias significativas en la producción de NO a los 3 días (tabla IV.4). Por otro lado, se muestran en la tabla IV.5 los niveles de producción y liberación al medio de la citoquina IL1 β , en los mismos períodos de tiempo para los macrófagos crecidos sobre los SN. En este caso, no se encontró diferencias significativas en los niveles de IL1 β respecto a la condición control (tabla IV.5).

Tabla IV.4 Producción de NO, * $p < 0,01$ vs control

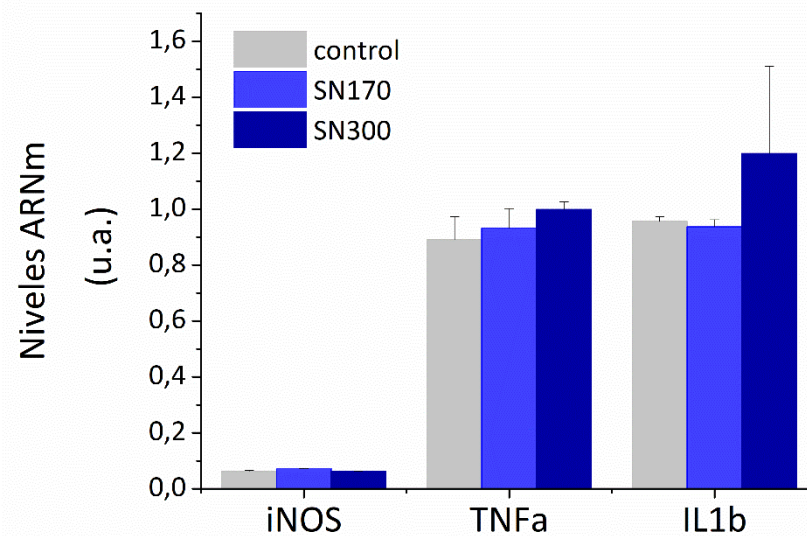
NO [nmol / ml]			
	1 día	2 días	3 días
control	0,016 \pm 0,014	0,311 \pm 0,063	0,143 \pm 0,035
SN170	0,157 \pm 0,054*	1,055 \pm 0,188*	0,368 \pm 0,069
SN300	0,165 \pm 0,030*	0,764 \pm 0,060*	0,350 \pm 0,040

Tabla IV.5 Producción de IL1 β

IL1 β [pg / ml]			
	1 días	2 días	3 días
control	9,5 \pm 2,1	15,0 \pm 5,6	11,1 \pm 3,0
SN170	7,8 \pm 1,3	13,3 \pm 5,0	10,5 \pm 2,2
SN300	8,4 \pm 1,0	8,74 \pm 1,2	8,0 \pm 0,6

En último lugar, se estudió la expresión a nivel del ARNm para IL1 β , factor de necrosis tumoral α (TNF α) y óxido nítrico sintasa (iNOS) a partir de RAW264.7 cultivadas 3 días sobre los SN de PFVH-CHI-B. Estos estudios se realizaron mediante la técnica semicuantitativa RT-PCR (figura IV.6). Encontrando que el ARNm para los diferentes marcadores moleculares de inflamación no presentó diferencias significativas respecto al control.

Figura IV.6 Expresión de marcadores moleculares de citotoxicidad



En conjunto, los resultados obtenidos mediante los estudios *in vitro*, demostraron que la nanoestructuración del biomaterial no provoca efectos citotóxicos apreciables. Estos resultados son interesantes en el campo de la ingeniería de tejidos, ya que existen diferentes respuestas inflamatorias hacia los biomateriales que podrían causar el reclutamiento de células proinflamatorias o la encapsulación y posterior rechazo del implante [Padmanabhan & Kyriakides, 2015]. Por otra parte, también se ha propuesto que niveles bajos de secreción de citoquinas podrían favorecer la angiogénesis en los *scaffolds* [Dagtekin et al., 2003]. De modo que para promover la integración del tejido debe haber un equilibrio estrecho en la producción de citoquinas; mientras que los niveles bajos promueven la angiogénesis, los niveles altos provocan respuestas inflamatorias e inmunogénicas.

IV.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se lograron sintetizar, mediante un proceso de anodización electroquímica en dos etapas, diferentes plantillas de óxido de aluminio anodizado (AAO) para producir nanocavidades porosas con buena reproducibilidad y de dimensiones bien definidas. Empleando estas plantillas AAO se logró infiltrar exitosamente la mezcla polimérica PFVH-CHI-B, empleando el método de humectación de película en condiciones bien controladas, como pudo corroborarse por microscopía SEM. El método de infiltración empleado no generó modificaciones en la composición química de la mezcla polimérica apreciables por DSC ni espectroscopía Raman. Los *scaffolds* nanoestructurados PFVH-CHI-B obtenidos presentaron una morfología de nanofibras de diferentes diámetro y longitud, consiguiendo así obtener diferentes topografías de superficie. Se realizaron medidas del ángulo de contacto a las matrices de PFVH-CHI-B encontrando mayor hidrofiliidad aparente en los *scaffolds* que presentaban una superficie más ordenada.

Por otro lado, se realizaron estudios *in vitro* sobre las películas nanoestructuradas, demostrando que este biomaterial permitió la adhesión y proliferación de las células progenitoras de médula ósea. Además, estas películas nanoestructuradas promovieron la diferenciación osteo- y condrogénica evaluada por diferentes marcadores de fenotipo específicos y no presentaron respuesta inflamatoria *in vitro*. No se observó gran influencia del diámetro de las nanofibras seleccionadas sobre la proliferación celular, la diferenciación o la citotoxicidad.

CAPITULO V: Estudios *in vivo*



V.1 INTRODUCCIÓN

Además de los estudios *in vitro*, para evaluar los biomateriales que se desarrollan como sustitutos para la reparación de tejidos, es esencial establecer modelos de pruebas clínicamente relevantes. Los resultados *in vitro* sin duda contribuye significativamente a la evaluación de la respuesta celular directa al biomaterial empleado como *scaffold*, pero las pruebas *in vivo* constituyen un paso intermedio entre las pruebas *in vitro* y los ensayos clínicos en humanos. Los modelos animales para estudios *in vivo* desempeñan un papel indispensable en el estudio de biomateriales como sustitutivos óseos para comprender su osteoconductividad, biocompatibilidad, propiedades mecánicas, degradación e interacción con los tejidos del huésped.

En la actualidad para el estudio de sustitutos óseos se emplean principalmente como modelos animales de prueba: roedores, conejos, ovejas, cabras y cerdos, para simular el entorno humano *in vivo*; y entre los sitios de defectos ortopédicos experimentales más comunes encontramos: la bóveda craneal, el fémur y el cúbito [Li et al., 2015]. Para seleccionar el modelo de prueba *in vivo* a emplear se deben considerar varios factores. En primer lugar, el modelo animal elegido debe demostrar claramente tanto las analogías fisiológicas como fisiopatológicas en comparación con los humanos. En segundo lugar, debe ser manejable para operar y observar una multiplicidad de parámetros de estudio después de la cirugía en un período relativamente corto de tiempo [Lieschner, 2004]. Otros criterios de selección incluyen la disponibilidad de animales, los costos de adquisición, cuidado y mantenimiento, tolerancia al cautiverio, facilidad de alojamiento y aceptabilidad para la sociedad [Pearce et al., 2007]. De acuerdo con la norma internacional, también se debe considerar el tamaño de las muestras de implantes, el número de implantes por animal, la duración prevista de la prueba y las posibles diferencias de las especies con respecto a las respuestas biológicas [Upman, 2006].

Uno de los modelos de primera elección para la prueba *in vivo* para la regeneración del tejido óseo son los roedores dado que son animales pequeños, de bajos costos y fáciles de manipular. Sin embargo, este modelo presenta ciertas desventajas en comparación con otros animales más grandes, como conejos o cerdos, dado que poseen huesos largos de pequeño tamaño y cortezas delgadas y frágiles. Además, los modelos de roedores no muestran remodelación tipo Havers en la corteza, mientras que los animales más grandes sí lo hacen [Li et al., 2015]. A pesar de ello, es un modelo considerado útil en los primeros estadios en estudios preclínicos para estudiar biomateriales como sustitutos óseos [Gomes & Fernandes, 2011]. Particularmente los defectos en la calota (craneotomía) de ratas han sido empleados ampliamente en estudios sobre *scaffold* para ingeniería de tejido óseo [Gomes & Fernandes, 2011; Li et al., 2011; Li et al., 2015; Pigossi et al., 2015]. El modelo de calota es muy adecuado y popular entre los investigadores, por los siguientes motivos: la estructura ósea de la calota (hueso cortical) permite el establecimiento de un defecto uniforme, reproducible y estandarizado que se evalúa fácilmente mediante análisis radiográfico e histológico; la ubicación anatómica refleja un tamaño adecuado para acceso quirúrgico y manejo intraoperatorio; la duramadre y la piel superpuesta establecen un soporte adecuado para los materiales implantados, sin la necesidad de fijación interna o externa; y el

modelo ha sido ampliamente utilizado y estudiado, lo que permite la comparación entre biomateriales relacionados [An & Freidman, 1998; Gomes & Fernandes, 2011].

La caracterización del tejido óseo regenerado se realiza comúnmente por evaluación histológica con microscopía óptica, siguiendo una tinción estándar para la muestra, como es la tinción hematoxilina-eosina. La histomorfometría y la histología descriptiva son las principales evaluaciones histológicas que se emplean. La histomorfometría permite el análisis cuantitativo de los datos histológicos; es decir, la longitud y la distancia, el área y el número de los componentes de interés. La histología descriptiva se usa para proporcionar una evaluación general del tejido de interés, proporcionando datos con respecto a la morfología celular, estructura y disposición dentro de la interfaz con la matriz extracelular o con el material implantado [Gomes & Fernandes, 2011].

También se debe hacer una correcta elección del *scaffold* a emplear para los estudios *in vivo*. En los capítulos anteriores se demostró que la arquitectura del *scaffold* es otro determinante de las funciones celulares, como la adhesión, la proliferación y el depósito de la MEC, pero puede afectar también significativamente la vascularización *in vivo* de la construcción [Rouwkema et al., 2008; Boccaccini et al., 2012]. Por su parte, los hidrogeles se han usado ampliamente en ingeniería de tejido óseo, pero su éxito puede verse afectado por una baja porosidad, lo que posteriormente da como resultado una perfusión limitada y una reducida capacidad migratoria celular dentro del material [Sheehy et al., 2014]. Se ha demostrado que una matriz porosa permite una mejor vascularización del tejido que rodea al implante que una matriz rígida; más aún, un *scaffold* debe tener un gran volumen de poros interconectados para permitir una correcta vascularización y colonización celular del mismo, así como el flujo correcto de nutrientes y la apropiada eliminación de desechos [Sanzana et al., 2014]. Se utilizan varias técnicas para el desarrollo de *scaffolds* porosos en ingeniería de tejido óseo como el electrospinning, liofilizado, formación de espumas o lixiviación de partículas [Rezwan et al., 2006; Rouwkema et al., 2008; Sanzana et al., 2014]. En base a estas diferentes técnicas se han obtenido *scaffolds* con diferentes arquitecturas de poros, tamaños y microestructuras.

En este capítulo se estudió un *scaffold* de PFVH-CHI-B obtenido por liofilización empleando un modelo de lesión de calota en roedores.

V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

V.2.1 Animales

Para este ensayo se emplearon dos ratas macho de la cepa WKAH/Hok de tres meses de edad y se aclimataron durante 15 días antes de su uso en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Las mismas se mantuvieron antes y después de la cirugía alimentadas con una dieta estándar y agua ad libitum, con control de temperatura y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, en una jaula ubicada en una sala aislada en el bioterio. Todos los procedimientos detallados anteriormente se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicados por los Institutos Nacionales de Salud, y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la esta Facultad (Protocolo Número 001-05-15, CICUAL, Fac. Cs. Exactas, UNLP).

V.2.2 Obtención de las películas liofilizadas

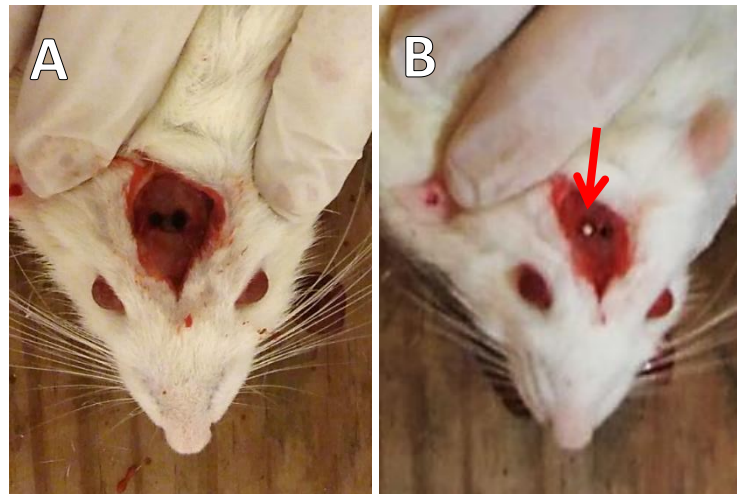
Para el desarrollo del *scaffold* de PFVH-CHI-B se preparó la mezcla de los polímeros del mismo modo que para las películas previamente estudiadas (metodología descrita en el apartado III.2.2). La misma se volcó en un molde de Teflón y se dejó en el freezer a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente se sumergió en nitrógeno líquido durante 20 minutos para lograr congelar la solución PFVH-CHI-B en ácido acético diluido y se llevó al liofilizador. Este paso se repitió durante 7 días, para alcanzar la completa evaporación de solvente. Para la obtención de las membranas se empleó un equipo liofilizador de laboratorio modelo Scientz 10N provisto por Hinotek, China. Antes de realizar el implante en los animales, las membranas se cortaron con un sacabocado a un tamaño adecuado para cubrir el defecto de la craneotomía a realizar y se esterilizaron por exposición al U.V. 30 min. Previamente, las películas así obtenidas se evaluaron macroscópicamente a través de una observación visual.

V.2.3 Craneotomía

A los animales se les practicó un defecto de craneotomía en cada hueso parietal [Molinuevo et al., 2010]. Para ello en primer lugar, se indujo anestesia general mediante inyección intraperitoneal de 0,1 ml cada 100 g de peso corporal de hidrocloreuro de ketamina (50 mg/ml) y otra intramuscular 0,2 ml cada 100 g de peso corporal de clorhidrato de xilazina (20 mg/ml) (Laboratorios Richmond, Buenos Aires, Argentina). La cirugía se realizó utilizando técnicas asépticas estándar. Después del afeitado y la preparación de la región frontoparietal, se realizó una incisión de 15 mm de largo sobre la sutura interparietal para luego exponer el hueso, dividieron en su totalidad los tejidos por encima de este. El periostio se eliminó por completo de la superficie del cráneo raspando mientras que la duramadre subyacente se mantuvo intacta. A cada uno de los animales se le realizaron dos defectos de craneotomía circular de 2 mm de diámetro, uno en cada parietal, usando un torno manual de baja velocidad manteniendo húmeda la zona mediante goteo con solución fisiológica estéril. Se procuró durante la creación del defecto mantener la integridad de la duramadre y el cerebro. Para cada animal en uno de los defectos realizados se colocó la película de PFVH-CHI-B a estudiar y en el otro se dejó vacío como control (imagen V.1, la

flecha roja señala el *scaffold*). Por último, el tejido blando se reposicionó y se realizó una sutura con un hilo de nylon monofilamento (3/0, Keeper).

Imagen V.1 Craneotomía A) antes y B) después de agregar la película de PFVH-CHI-B



V.2.4 Postoperatorio

Los animales se sacrificaron treinta días después de la cirugía, bajo anestesia con xilazina y ketamina, por dislocación cervical. Las muestras de las calotas de cada animal fueron recolectadas para los posteriores estudios histomorfométricos.

V.2.5 Estudio histomorfométrico

V.2.5.1 Obtención de cortes histológicos

Los huesos parietales se fijaron en buffer de formalina neutra (NBF) durante 72 horas y luego se descalcificaron con una solución al 10% de EDTA (Biopack, Buenos Aires, Argentina) durante 60 días a temperatura ambiente. A continuación, los huesos se deshidrataron utilizando solventes orgánicos con distinto grado de polaridad. El proceso se inició con dos pasajes sucesivos de 1 h en soluciones de alcohol con decreciente grado de hidratación (70 °, 96 ° y 100 °), xileno y finalmente en parafina I y parafina II fundidas a 56 °C para su inclusión. Los huesos incrustados en parafina se cortaron en secciones semi-seriadas de 6 µm en dirección anteroposterior con un micrótopo SM 2000R Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), los cortes se recogieron en un baño termostático de flotación y se secaron durante toda la noche a 56°C en estufa (SanJor, Buenos Aires, Argentina). Los cortes se procesaron para su análisis histológico y morfométrico.

V.2.5.2 Coloración histológica

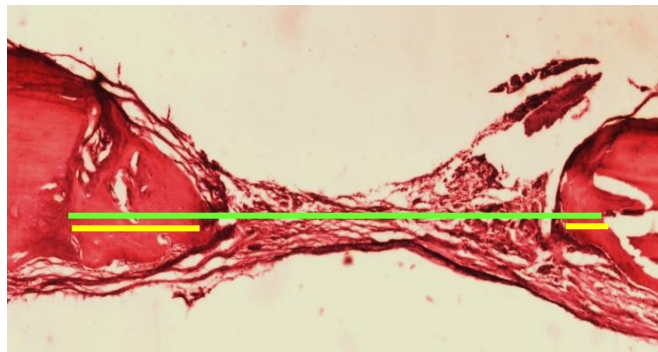
Los cortes histológicos se sumergieron en xileno para eliminar la parafina, luego se re-hidrataron usando el tren de hidratación (alcoholes con grado creciente de hidratación: 100°, 96° y 70°), y a continuación se realizó la coloración de Hematoxilina – Eosina (H & E), ambos colorantes adquiridos de Biopur, Rosario, Argentina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe las estructuras ácidas (basófilas) en tono violáceo, como por ejemplo los núcleos celulares. Por su parte la eosina, colorante con naturaleza ácida, tiñe

componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, como la mayoría de las proteínas al pH de la tinción. Para la coloración, los cortes hidratados, se tiñeron 3 minutos con Hematoxilina, se lavaron con agua corriente y se sumergieron 1 minuto en eosina. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada, se deshidrataron utilizando un tren de hidratación (alcohol 70°, 96°, 100°, xileno) y se montaron con bálsamo sintético (Biopur, Argentina).

V.2.5.3 Histomorfometría ósea

Las fotografías de los cortes para este estudio se tomaron con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 en un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japón). Las mismas se analizaron con el programa Image J (www.macbiophotonics.ca/imagej) ajustando con un plugin de escala de microscopio. Las medidas se realizaron sobre los cortes a partir de las fotografías, midiendo el espesor de hueso nuevo tomando desde el borde de la herida hacia el centro de la misma, considerando la sumatoria del hueso nuevo hacia ambos lados, y se tomó como el espesor del defecto óseo al diámetro de la herida (Imagen V.2, línea amarilla y verde).

Imagen V.2 Micrografía del corte del defecto sin rellenar



amarillo: espesor hueso regenerado, verde: espesor del defecto

La reosificación del hueso después de 30 días poscirugía se calculó como:

$$\text{reosificación (\%)} = \frac{\text{espesor de hueso reosificado (mm)}}{\text{espesor del defecto óseo (mm)}} \times 100 \quad \text{Ecuación V.1}$$

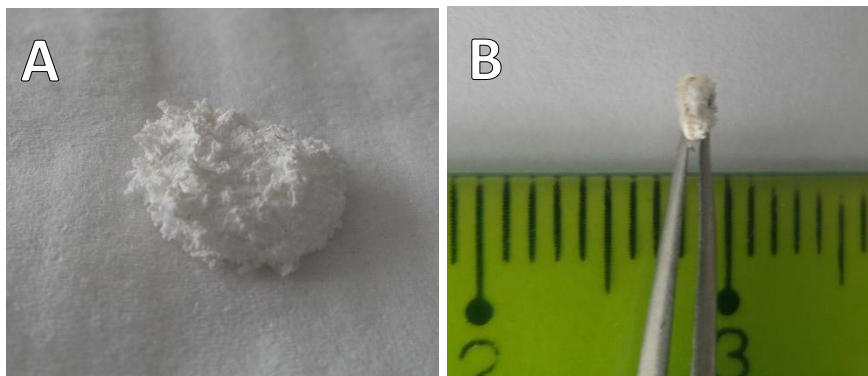
Estos resultados se tomaron para los defectos con y sin membrana (condición control), y se expresaron como la media \pm SEM y se obtuvieron a partir de 8 cortes en la región media de la lesión para cada condición. Las diferencias entre grupos se establecieron empleando el test de Tukey, usando el programa estadístico GraphPad InStat.

V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.3.1 Estudio de las películas

Para los estudios *in vivo* se desarrolló una película de PFVH-CHI-B por el método de liofilizado. La idea de diseñar este *scaffold* surgió del estudio previo presentado en los capítulos anteriores, donde se mostró que este biomaterial era muy versátil para su estructuración y presentaba *in vitro* resultados muy prometedores para su empleo en ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso. En particular, el hueso está altamente vascularizado y por lo tanto, la eficiencia de un *scaffold* óseo va a depender entre otras cosas de su capacidad para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Se sabe que *en condiciones in vivo*, el suministro de oxígeno y nutrientes es esencial para la supervivencia de las células y los tejidos en crecimiento dentro del *scaffold* [Bose et al., 2012]. La arquitectura y el diseño del *scaffold* tienen un profundo efecto en la tasa de vascularización después de la implantación [Rouwkema et al., 2008]. En la imagen V.3 se muestra el *scaffold* obtenido, de aproximadamente un 1 mm de espesor, donde se puede ver una estructura menos compacta que la obtenida por *solvent casting* (imagen III.1), esta estructura tipo esponja sugiere que dicho material podría presentar una mejor vascularización. Por otro lado, el espesor del *scaffold* desarrollado por este método es más adecuado para cubrir el defecto generado por craneotomía que el de la película obtenida por *solvent casting* (0,064 mm), dado que el espesor del hueso parietal es aproximadamente un orden de magnitud mayor. Además, el diámetro del mismo se ajustó cortando con un sacabocado teniendo en cuenta el diámetro de la lesión a evaluar.

Imagen V.3 Película de PFVH-CHI-B liofilizada. Vista A) transversal y B) lateral



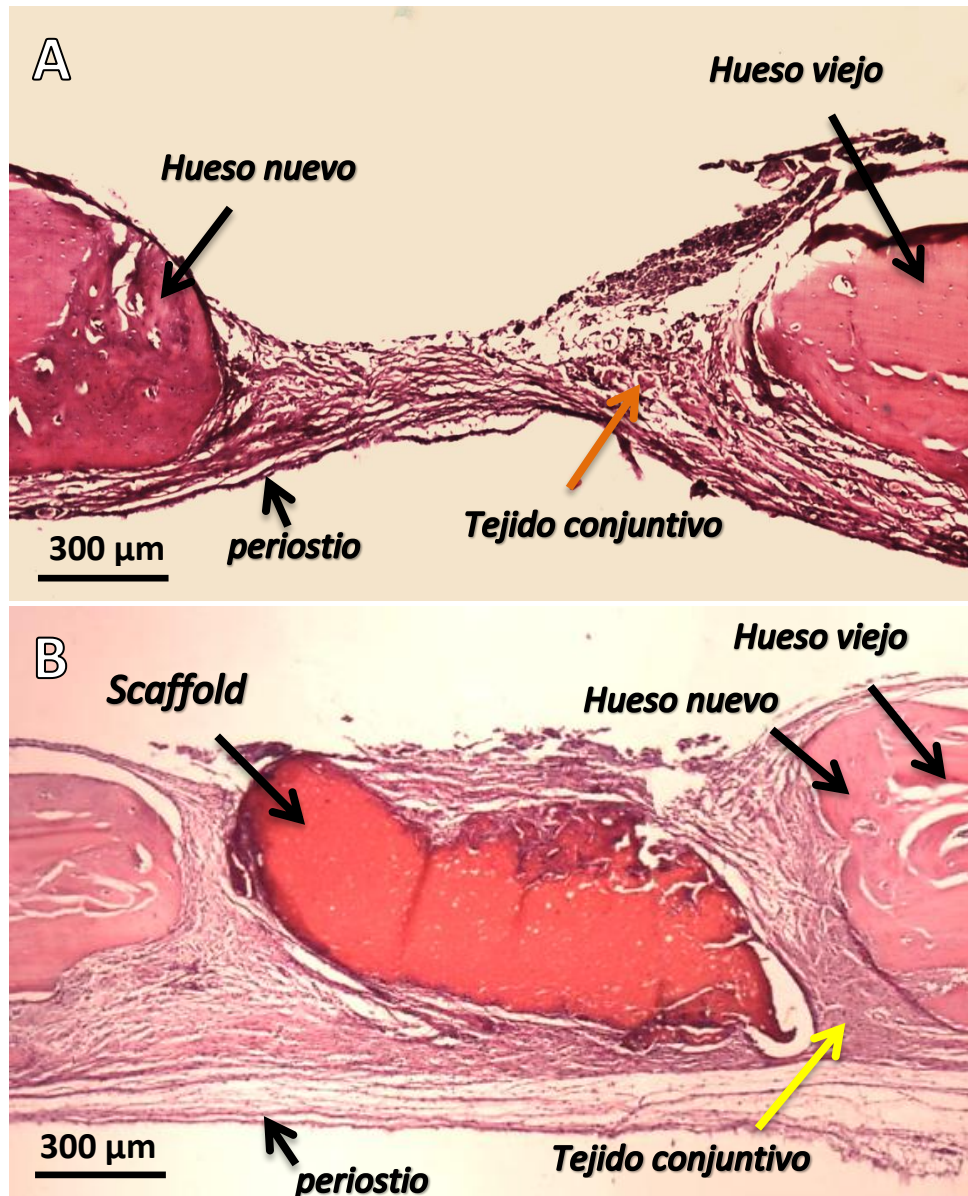
V.3.2 Estudio *in vivo*

Pasado los 30 días de la cirugía se realizó el sacrificio de los animales y la recolección de las calotas para el estudio histológico e histomorfométrico como se indicó en el apartado materiales y métodos.

En la imagen V.4 se muestran un corte representativo del defecto en el control y en presencia del *scaffold* PFVH-CHI-B al final del experimento (imagen V.4, A y B, respectivamente). En la condición control se observa una herida menos consolidada, en donde el periostio invade el defecto, presentado un tejido conjuntivo escaso y constituido por fibras delgadas hacia el centro (imagen V.4 A, flecha naranja); por el

contrario para el defecto conteniendo el *scaffold* el periostio se encuentra conservado, mientras que entre los bordes de la herida y el *scaffold* se encuentra gran cantidad de tejido conjuntivo denso fibroso (imagen V.4 B, flecha amarilla). En ambos casos el hueso nuevo regenerado se encuentra en los márgenes del defecto (imagen V.4 A y B), identificándose por su apariencia menos organizada en comparación con la calota nativa (hueso viejo) [Ren et al., 2016].

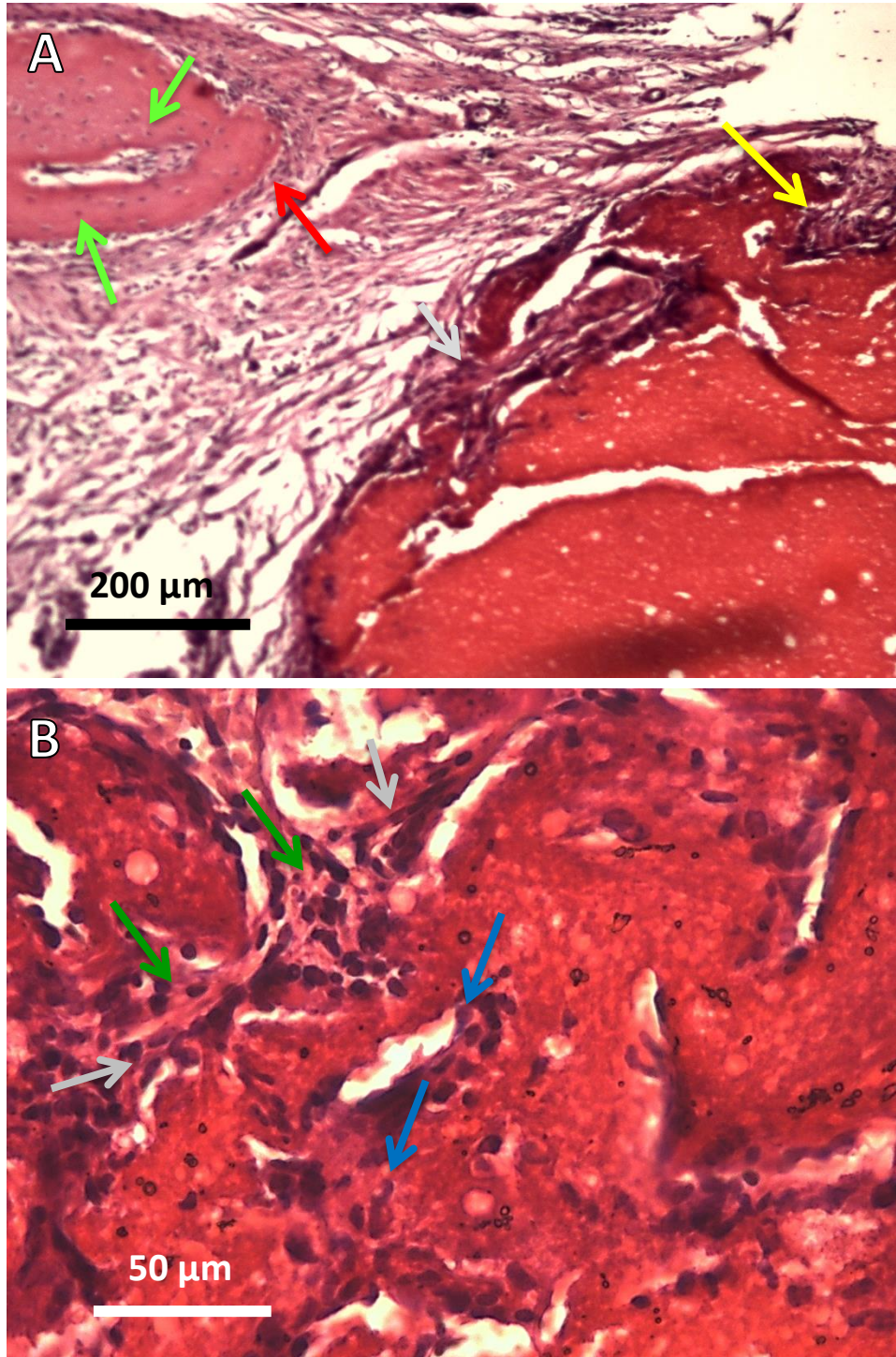
Imagen V.4 Micrografías 4X del corte del defecto A) control y B) cubierto con el *scaffold* PFVH-CHI-B



A mayor aumento se observan en la región de hueso nuevo osteocitos rodeados por osteoide y osteoblastos sobre la superficie en regeneración reconocidos por su morfología cuboidal (imagen V.5 A, flechas verde y roja, respectivamente). Además, en esta imagen se visualiza la integración del *scaffold* con el tejido que lo rodea (imagen V.5 A, flecha amarilla). Más aún podemos observar como las células han penetrado la estructura porosa del *scaffold* colonizando su interior y formando un tejido conectivo

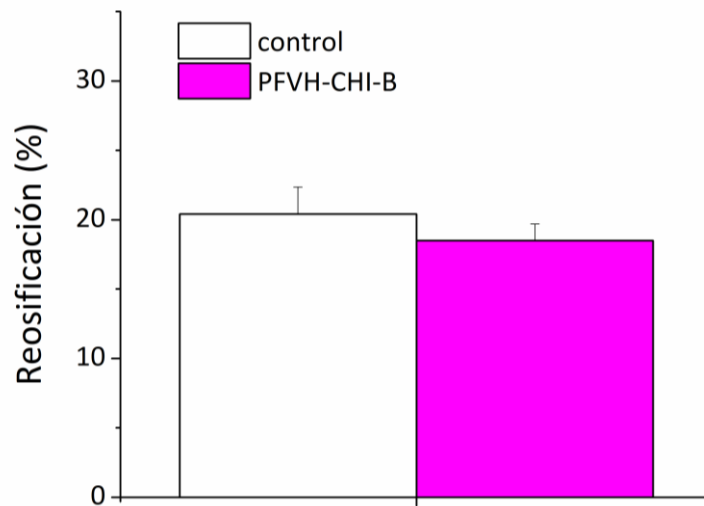
denso (imagen V.5 B, flechas verdes); además, se puede observar en la zona donde se encuentra el *scaffold* una gran cantidad de células estromales, que han invadido a la región y están bien integradas, con depósito de MEC alrededor del polímero (imagen V.5 B, flechas grises). También se encuentra una escasa presencia de células inflamatorias (imagen V.5 B, azules), sin señales de encapsulamientos ni otro comportamiento que demuestre incompatibilidad del material.

Imagen V.5 Micrografías del corte del defecto cubierto con el *scaffold* A) 10X y B) 40X



Los datos de la reosificación del hueso en presencia y ausencia del *scaffold* se obtuvieron como se indicó en la sección experimental (ecuación V.1) y se muestran en la figura V.1. Los resultados obtenidos por este análisis histomorfométrico no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el defecto cubierto con la membrana y la condición control.

Figura V.1 Reosificación del defecto óseo



En la regeneración normal de este tipo de lesiones se sabe que en los primeros estadios se genera un tejido conjuntivo fibroso, debido a la migración de los fibroblastos al sitio de la herida; seguido del reemplazo por hueso inmaduro, que finalmente se remodela dando lugar a hueso maduro [Gomes & Fernandes, 2011]. Varios investigadores han encontrado que este proceso ocurre de manera más eficaz en presencia de ciertos sustitutos médicos para relleno de heridas, logrando tiempos de generación más cortos y eficaces [Gomes & Fernandes, 2011; Li et al., 2011; Pigossi et al., 2015]. En el presente trabajo el análisis de los resultados histomorfométrico no mostró diferencias en presencia y ausencia del *scaffold*, para una lesión con un tamaño subcrítico, luego de 30 días de la cirugía. Sin embargo, en el análisis histológico sí muestra mejores resultados para la lesión tratada con el *scaffold*, debido a una mejor estabilización de la herida y un tejido conjuntivo más denso. Además encontramos células inflamatorias y éstas tienen un rol importante en la regeneración de heridas, se ha encontrado que niveles bajos de algunas citoquinas pueden favorecer la angiogénesis en los *scaffolds* [Dagtekin et al., 2003]. Por otra parte, investigaciones recientes establecen que la regeneración exitosa de las fracturas óseas se basa en la comunicación cruzada coordinada entre células inflamatorias y las células formadoras de hueso; particularmente, los macrófagos durante la regeneración ósea parecen desempeñar un papel importante en el reclutamiento y la regulación de la diferenciación de las células madre mesenquimales [Pajarinen et al., 2018].

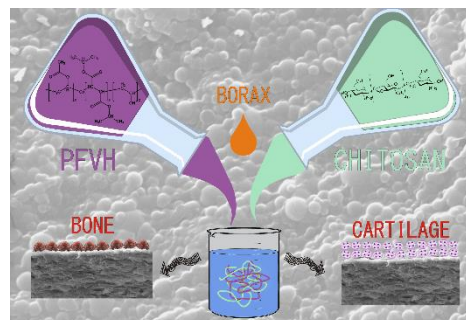
Nuestras observaciones en la regeneración ósea, sobre el defecto en la calota de ratas, son prometedores en cuando a la posibilidad de emplear el *scaffold* de PFVH-CHI-B para ingeniería de tejido óseo; dado que este material mostró una buena biocompatibilidad, osteoconducción y osteointegración.

V.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Los modelos *in vivo* desempeñan un papel indispensable en la prueba de biomateriales como sustitutivos óseos para comprender su osteoconductividad, biocompatibilidad, propiedades mecánicas, degradación e interacción con los tejidos del huésped. En este capítulo logramos evaluar *in vivo*, con un modelo de lesión en calota sobre ratas, un *scaffold* de PFVH-CHI-B obtenido por liofilización.

El estudio del tejido óseo regenerado se realizó con evaluación por microscopía óptica. La histomorfometría permitió un análisis cuantitativo del porcentaje de regeneración ósea hallando valores comparables estadísticamente entre la lesión regenerada en ausencia y presencia del *scaffold*. En el estudio histológico encontramos un comportamiento esperable para la regeneración de este tipo de lesión, con hueso nuevo en las regiones laterales y tejido fibroso en mayor proporción hacia el centro de la lesión. Aunque la regeneración de la herida en presencia del *scaffold* mostró resultados mejores, encontrando un mayor porcentaje de tejido fibroso y de mejor calidad, además de una mejor estabilización de la herida. Por otro lado, encontramos una buena integración de las células con el biomaterial, sin evidencias de rechazo; demostrando la biocompatibilidad, osteoconductividad y osteointegración del *scaffold* desarrollado. Estos resultados son muy alentadores para seguir con el estudio de este material para su aplicación en ingeniería de tejido óseo.

CAPITULO VI: Conclusiones generales



VI. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo, hemos desarrollado un biomaterial a partir de una mezcla de quitosano y un copolímero sintético fumárico entrecruzados con bórax para la regeneración ósteo-cartilaginosa. El copolímero fumárico es un poli(fumarato de diisopropilo-co-acetato de vinilo) hidrolizado (PFVH), fue sintetizado mediante copolimerización radicalaria empleando energía de microondas y sometido posteriormente a hidrólisis. El mismo fue caracterizado correctamente por SEC, FTIR y ^1H -RMN, DSC y TGA; lo que dio a conocer su alto peso molecular y buena estabilidad térmica.

El biomaterial obtenido a partir de la mezcla entrecruzada del PFVH con quitosano (CHI) fue estudiado por ATR-FTIR, DSC y TGA. Además, se realizaron pruebas mecánicas, de hinchamiento y de degradación; encontrándose propiedades mecánicas del orden de las propias del hueso trabecular, una tasa de degradación lenta y un comportamiento de hinchamiento comparable con un hidrogel. Por otro lado, el material mostró una buena capacidad para la estructuración logrando obtener *scaffolds* tanto por *solvent casting* o liofilización como por nanoestructuración mediante la infiltración en plantilla de AAO de distintas dimensiones. Los *scaffolds* nanoestructurados presentaron una morfología de nanofibras homogénea dado por un relleno uniforme de las nanocavidades de las plantillas AAO como se demostró mediante espectroscopía SEM y Raman.

Por su parte, los estudios *in vitro* mostraron que tanto el material obtenido por *solvent casting* (SC) como el nanoestructurado (SN) presentaron una muy buena biocompatibilidad. Además, se demostró la versatilidad de este material ya que permite la adhesión, proliferación y el desarrollo osteogénico de células progenitoras de médula ósea (CPMO), y permite el crecimiento de condrocitos primarios y la deposición de la matriz extracelular (MEC) cartilaginosa. Más aún, se encontró que este biomaterial promovía la diferenciación osteo- y condrogénica evaluada por diferentes marcadores de fenotipo específicos. Se observaron ciertas diferencias debido al cambio en la topografía de la superficie del *scaffolds* sobre estos parámetros evaluados *in vitro*. Por ejemplo, se observó una mejor adhesión de las células CPMO sobre SC que sobre la superficie nanoestructurada. Los valores encontrados para los marcadores osteogénicos dieron resultados más variables respecto a la influencia de la topografía: por su parte la producción de nódulos de mineral fue comparable en ambas superficies, mientras que la actividad de fosfatasa alcalina fue mayor y la producción de colágeno tipo I menor cuando las células que crecen sobre el SN. Por otro lado, se encontró que la producción de matriz cartilaginosa era mayor cuando los condrocitos crecían sobre la superficie del SN. Con estos resultados se evidenció

una clara influencia de la topografía de la superficie sobre el crecimiento y la diferenciación celular. Además, se evaluó la respuesta inflamatoria con un modelo de macrófagos en cultivo encontrando que ni el material ni su nanoestructuración presentaba evidencias de efectos citotóxicos.

Por último se empleó un modelo *in vivo* para evaluar este biomaterial como sustituto óseos. Se seleccionó un modelo de lesión en calota en roedores ampliamente utilizado por otros investigadores, en el defecto creado en este modelo se implantó el biomaterial (PFVH-CHI-B), estructurando el *scaffold* por liofilización. Sobre cortes histológicos de este ensayo teñidos con Hematoxilina-Eosina se realizó una evaluación histológica y se encontró una buena regeneración del tejido y buena integración de las células con el *scaffold* sin signos que evidencien el rechazo de dicho material.

En conjunto estos resultados son muy prometedores sobre el biomaterial desarrollado PFVH-CHI-B para su uso potencial como *scaffold* en la regeneración ósteo-cartilaginosa.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

A

Abdel-Sayed, P., & Pioletti, D. P. (2015). Strategies for improving the repair of focal cartilage defects. *Nanomedicine*, 10(18), 2893-2905.

Acuicultura, S. D. P. Y. (2007). *Pesquería de calamar y langostino situación actual*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la República Argentina, Buenos Aires.

Ahn, C. B., Kim, Y., Park, S. J., Hwang, Y., & Lee, J. W. (2017). Development of arginine-glycine-aspartate-immobilized 3D printed poly (propylene fumarate) scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 1-15.

Ahn, J., Son, S. J., & Min, J. (2013). The control of cell adhesion on a PMMA polymer surface consisting of nanopillar arrays. *Journal of biotechnology*, 164(4), 543-548.

Al-Arbash, A. H., Elsaygher, F. A., Ali, A. A. M., & Elsabee, M. Z. (1999). Glass-transition temperature of polydialkyl fumarate copolymers. *Journal of Polymer Science Part A Polymer Chemistry*, 37, 1839-1846.

An, Y. H., & Freidman, R. J. (Eds.). (1998). *Animal models in orthopaedic research*. CRC Press.

Armarego WLF, Perrin DD. (1997). *Purification Of Laboratory Chemicals*. 4th ed., Butterworth Heinemann: Oxford, Reino Unido, p. 105.

Arthur, A., Zannettino, A., & Gronthos, S. (2009). The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *Journal of cellular physiology*, 218(2), 237-245.

Atala, A. (2007). Engineering tissues, organs and cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(2), 83-96.

Athanasίου, K. A., Darling, E. M., & Hu, J. C. (2009). Articular cartilage tissue engineering. *Synthesis Lectures on Tissue Engineering*, 1(1), 1-182.

B

Babensee, J. E., McIntire, L. V., & Mikos, A. G. (2000). Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharmaceutical research*, 17(5), 497-504.

Bahmanpour, S., & Paulsen, D. F. (2006). Inhibition of chondrogenic differentiation in chick limb-bud mesenchyme microcultures treated with cyclosporine. *Indian journal of pharmacology*, 38(1), 43-48.

Bajpai, S. K., Daheriya, P., Ahuja, S., & Gupta, K. (2016). Water absorption and antimicrobial behavior of physically cross linked poly (vinyl alcohol)/carrageenan films loaded with minocycline. *Designed Monomers and Polymers*, 19(7), 630-642.

Baruah, S. D., Sarmah, D., & Laskar, N. C. (2011). Copolymers of bulky fumarate: synthesis and their properties. *Journal of polymer research*, 18(2), 225-233.

Bellido, T. (2014). Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified tissue international*, 94(1), 25-34.

Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for

biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 19-34.

Berghoff, C. F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas Quitosano/Polímero sintético para regeneración de tejido óseo (Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP).

Biggs, M. J., Richards, R. G., Gadegaard, N., Wilkinson, C. D., Oreffo, R. O., & Dalby, M. J. (2009). The use of nanoscale topography to modulate the dynamics of adhesion formation in primary osteoblasts and ERK/MAPK signalling in STRO-1+ enriched skeletal stem cells. *Biomaterials*, 30(28), 5094-5103.

Bispo, V. M., Mansur, A. A., Barbosa-Stancioli, E. F., & Mansur, H. S. (2010). Biocompatibility of nanostructured chitosan/poly (vinyl alcohol) blends chemically crosslinked with genipin for biomedical applications. *Journal of biomedical nanotechnology*, 6(2), 166-175.

Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in colloid and interface science*, 170(1), 2-27.

Bobick, B. E., & Kulyk, W. M. (2008). Regulation of cartilage formation and maturation by mitogen-activated protein kinase signaling. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(2), 131-154.

Boccaccini, A. R., Kneser, U., & Arkudas, A. (2012). Scaffolds for vascularized bone regeneration: advances and challenges. *Expert review of medical devices*, 9(5), 457-460.

Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food hydrocolloids*, 51, 281-294.

Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.

Burr, D. B. (2004). Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 12, 20-30.

C

Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., & Quarto, R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 22(1), 81-91.

Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in sports medicine*, 36(3), 413-425.

Cardenas, G., & Miranda, S. P. (2004). FTIR and TGA studies of chitosan composite films. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49(4), 291-295.

Carrow, J. K., & Gaharwar, A. K. (2015). Bioinspired polymeric nanocomposites for regenerative medicine. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 216(3), 248-264.

Cassie, A. B. D., & Baxter, S. (1944). Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday society*, 40, 546-551.

Chen, C. H., Wang, F. Y., Mao, C. F., Liao, W. T., & Hsieh, C. D. (2008). Studies of chitosan: II. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(1), 37-42.

Chen, F. H., Rousche, K. T., & Tuan, R. S. (2006). Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature Reviews. Rheumatology*, 2(7), 373.

Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.

Cortizo, A. M., Ruderman, G., Correa, G., Mogilner, I. G., & Tolosa, E. J. (2012). Effect of surface topography of collagen scaffolds on cytotoxicity and osteoblast differentiation. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2(2), 125-132.

Cortizo, A. M., Ruderman, G., Mazzini, F. N., Molinuevo, M. S., & Mogilner, I. G. (2016). Novel vanadium-loaded ordered collagen scaffold promotes osteochondral differentiation of bone marrow progenitor cells. *International journal of biomaterials*, 2016.

Cortizo, M. S., Andreetta, H. A., & Figini, R. V. (1989). Molecular characterization of poly (diisopropyl fumarate) by the absolute calibration method in molecular exclusion chromatography (GPC). *Journal of High Resolution Chromatography*, 12(6), 372-374.

Cortizo, M. S. (2007). Polymerization of diisopropyl fumarate under microwave irradiation. *Journal of applied polymer science*, 103(6), 3785-3791.

Cortizo, M. S., Laurella, S., & Alessandrini, J. L. (2007). Microwave-assisted radical polymerization of dialkyl fumarates. *Radiation Physics and Chemistry*, 76(7), 1140-1146.

Cortizo, M. S., Molinuevo, M. S., & Cortizo, A. M. (2008). Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(1), 33-42.

Cortizo, M. S., & Belluzo, M. S. (2017). Biodegradable Polymers for Bone Tissue Engineering. In *Industrial Applications of Renewable Biomass Products* (pp. 47-74). Springer, Cham.

Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472-481.

Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 331-347.

Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.

D

Dagtekin, G., Schiffer, R., Klein, B., Jahnen-Dechent, W., & Zwadlo-Klarwasser, G. (2003). Modulation of angiogenic functions in human macrophages by biomaterials. *Biomaterials*, 24(20), 3395-3401.

Dalle Carbonare, L., Innamorati, G., & Valenti, M. T. (2012). Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 891-897.

Dawber, J. G., & Green, S. I. (1986). An ¹¹B nuclear magnetic resonance study of the reaction of the tetrahydroxyborate ion with polyhydroxy compounds. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*, 82(11), 3407-3413.

Debuigne, A., Caille, J. R., Willet, N., & Jérôme, R. (2005). Synthesis of poly (vinyl acetate) and poly (vinyl alcohol) containing block copolymers by combination of cobalt-mediated radical polymerization and ATRP. *Macromolecules*, 38(23), 9488-9496.

Demoor, M., Ollitrault, D., Gomez-Leduc, T., Bouyoucef, M., Hervieu, M., Fabre, H., Mallein-Gerin, F., Legendre, F., & Galera, P. (2014). Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(8), 2414-2440.

Deng, M., James, R., Laurencin, C. T., & Kumbar, S. G. (2012). Nanostructured polymeric scaffolds for orthopaedic regenerative engineering. *IEEE transactions on nanobioscience*, 11(1), 3-14.

Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Garis, K. A., Kwon, G., Vazquez-Torres, A., Simon, A. D., Nguyen B., Proctor R.A., Bertics P.J, & Corbett, J. A. (1996). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 337-342.

Deschaseaux, F., Sensébé, L., & Heymann, D. (2009). Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends in molecular medicine*, 15(9), 417-429.

Díaz-Ortiz, A., de la Hoz, A., Alcázar, J., R Carrillo, J., A Herrero, M., Fontana, A., de Mata Muñoz, J., Prieto, P., & de Cózar, A. (2011). Influence of polarity on the scalability and reproducibility of solvent-free microwave-assisted reactions. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14(2), 109-116.

Díez-Pascual, A. M., & Díez-Vicente, A. L. (2016). Poly (propylene fumarate)/polyethylene glycol-modified graphene oxide nanocomposites for tissue engineering. *ACS applied materials & interfaces*, 8(28), 17902-17914.

Doulabi, A. H., Mirzadeh, H., Imani, M., & Samadi, N. (2013). Chitosan/polyethylene glycol fumarate blend film: Physical and antibacterial properties. *Carbohydrate polymers*, 92(1), 48-56.

Dunstan, C. R., Blair, J. M., Zhou, H., & Seibel, M. J. (2007). 6.21 Bone, Mineral, Connective Tissue Metabolism. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 6: 495-520.

Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., & Heymann, D. (2007). Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. *Stem cells*, 25(3), 544-552.

E

Elder, S., Gottipati, A., Zelenka, H., & Bumgardner, J. (2013). Attachment, proliferation, and chondroinduction of mesenchymal stem cells on porous chitosan-calcium phosphate scaffolds. *The open orthopaedics journal*, 7, 275.

Estrada, C., Paz, A. C., & López, L. E. (2006). Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Revista EIA*, (5), 93-100.

Eyre, D. R., Wu, J. J., Fernandes, R. J., Pietka, T. A., & Weis, M. A. (2002). Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network.

F

Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., McCarthy, A. D., & Cortizo, M. S. (2010). Characterization of Poly (ϵ -caprolactone)/Polyfumarate Blends as Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(10), 1297-1312.

Fernández, J. M., Molinuevo, M. S., Cortizo, M. S., & Cortizo, A. M. (2011a). Development of an osteoconductive PCL–PDIPF–hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(6), 126-135.

Fernández, J. M., Cortizo, M. S., Cortizo, A. M., & Abraham, G. A. (2011b). Osteoblast behavior on novel porous polymeric scaffolds. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 1(1), 86-92.

Fernández, J. M., Cortizo, M. S., & Cortizo, A. M. (2014). Fumarate/ceramic composite based scaffolds for tissue engineering: evaluation of hydrophylicity, degradability, toxicity and biocompatibility. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 4(3), 227-234.

Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, M. A., Canto Pingarrón, M. D., & Blanco Jerez, L. (2006). Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)*, 11(1), 47-51.

Ferrand, A., Eap, S., Richert, L., Lemoine, S., Kalaskar, D., Demoustier-Champagne, S., Atmani, H., Mely, Y., Fioretti, F., Schlatter, G., Kuhn, L., Ladam, G., & Benkirane-Jessel N. (2014). Osteogenetic Properties of Electrospun Nanofibrous PCL Scaffolds Equipped With Chitosan-Based Nanoreservoirs of Growth Factors. *Macromolecular bioscience*, 14(1), 45-55.

Flannery, C. R., Hughes, C. E., Schumacher, B. L., Tudor, D., Aydelotte, M. B., Kuettner, K. E., & Caterson, B. (1999). Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 254(3), 535-541.

Frenkel, S. R., & Di Cesare, P. E. (2004). Scaffolds for articular cartilage repair. *Annals of biomedical engineering*, 32(1), 26-34.

Fuchs, J. R., Nasser, B. A., & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of thoracic surgery*, 72(2), 577-591.

G

Gallardo, A., Spells, S., Navarro, R., & Reinecke, H. (2007). Confocal Raman microscopy: how to correct depth profiles considering diffraction and refraction effects. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(7), 880-884.

Ganji, F., Vasheghani-Farahani, S., & Vasheghani-Farahani, E. (2010). Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iran Polym J*, 19(5), 375-398.

García Cruz, D. M., Escobar Ivirico, J. L., Gomes, M. M., Gómez Ribelles, J. L., Sánchez, M. S., Reis, R. L., & Mano, J. F. (2008). Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(6), 378-380.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2002). Texto atlas de histología. McGraw-Hill Interamericana. "Capítulo 7: Cartílago y hueso". 2da edición, 127-151.

Geneser F. (2006). Histología sobre bases moleculares. Buenos Aires, Médica Panamericana. 3ra. Edición.

Ghosh, P., Rameshbabu, A. P., & Dhara, S. (2014). Citrate cross-linked gels with strain reversibility and viscoelastic behavior accelerate healing of osteochondral defects in a rabbit model. *Langmuir*, 30(28), 8442-8451.

Giussi, J. M., Blaszczyk-Lezak, I., Cortizo, M. S., & Mijangos, C. (2013). In-situ polymerization of styrene in AAO nanocavities. *Polymer*, 54(26), 6886-6893.

Golub, E. E. (2009). Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(12), 1592-1598.

Gomes, M. E., Azevedo, H. S., Moreira, A. R., Ellä, V., Kellomäki, M., & Reis, R. L. (2008). Starch–poly (ϵ -caprolactone) and starch–poly (lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: structure, mechanical properties and degradation behaviour. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(5), 243-252.

Gomes, P. S., & Fernandes, M. H. (2011). Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals*, 45(1), 14-24.

Gomoll, A. H., Madry, H., Knutsen, G., van Dijk, N., Seil, R., Brittberg, M., & Kon, E. (2010). The subchondral bone in articular cartilage repair: current problems in the surgical management. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 18(4), 434-447.

Grillo, C. A., Reigosa, M. A. & Fernandez Lorenzo M. A. (2010). Does over-exposure to copper ions released from metallic copper induce cytotoxic and genotoxic effects on mammalian cells?. *Contraception*, 81(4), 343-349.

Gründer, T., Gaissmaier, C., Fritz, J., Stoop, R., Hortschansky, P., Mollenhauer, J., & Aicher, W. K. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and cartilage*, 12(7), 559-567.

Guo, X., Wang, C., Duan, C., Descamps, M., Zhao, Q., Dong, L., Lü, S., Anselme, K., Lu, J., & Song, Y. Q. (2004). Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue engineering*, 10(11-12), 1830-1840.

H

Hall, B. K., & Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22(2), 138-147.

He, S., Timmer, M. D., Yaszemski, M. J., Yasko, A. W., Engel, P. S., & Mikos, A. G. (2001). Synthesis of biodegradable poly (propylene fumarate) networks with poly (propylene fumarate)–diacrylate macromers as crosslinking agents and characterization of their degradation products. *Polymer*, 42(3), 1251-1260.

Heath, D. E., & Cooper, S. L. (2013). CHAPTER I. 2.2 POLYMERS: BASIC PRINCIPLES. *Biomaterials Science*, 3rd ed.; B. D. Ratner, B.D.; Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J. E., Eds.; Academic Press, 64-79.

Hunziker, E. B., Lippuner, K., Keel, M. J. B., & Shintani, N. (2015). An educational review of cartilage repair: precepts & practice—myths & misconceptions—progress & prospects. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(3), 334-350.

Hutchison, C., Pilote, M., & Roy, S. (2007). The axolotl limb: a model for bone development, regeneration and fracture healing. *Bone*, 40(1), 45-56.

K

Karsenty, G., & Wagner, E. F. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental cell*, 2(4), 389-406.

Karsenty, G., Kronenberg, H. M., & Settembre, C. (2009). Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, 629-648.

Kawano, K., Kantak, S. S., Murai, M., Yao, C. C., & Kramer, R. H. (2001). Integrin $\alpha 3 \beta 1$ engagement disrupts intercellular adhesion. *Experimental cell research*, 262(2), 180-196.

Kenawy, E. R., Bowlin, G. L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D. G., Sanders, E. H., & Wnek, G. E. (2002). Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly (ethylene-co-vinylacetate), poly (lactic acid), and a blend. *Journal of controlled release*, 81(1), 57-64.

Khan, T. A., Peh, K. K., & Ch'ng, H. S. (2000). Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing. *J Pharm Pharm Sci*, 3(3), 303-311.

Khan, Y., Yaszemski, M. J., Mikos, A. G., & Laurencin, C. T. (2008). Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *JBJS*, 90(Supplement 1), 36-42.

Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T., & Mrksich, M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 4872-4877.

Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*, 26(1), 1-21.

Kim, H. N., Jiao, A., Hwang, N. S., Kim, M. S., Kim, D. H., & Suh, K. Y. (2013). Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 65(4), 536-558.

Koinuma, Y., Murata, Y., Otsu, T., Goto, K., Fujiwara, H., & Takita, Y. (1997). Thermal and mechanical properties of poly (diisopropyl fumarate) blends with various polymers. *Japanese Journal of polymer science and technology*, 54, 301-308.

Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203.

L

Langer, R., & Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260, 920-926.

Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Giussi, J. M., Allegretti, P. E., Blaszczyk-Lezak, I., Mijangos, C., & Cortizo, M. S. (2015). Tautomerizable β -ketonitrile copolymers for bone tissue engineering: Studies of biocompatibility and cytotoxicity. *Materials Science and Engineering: C*, 51, 256-262.

Lee, S. H., & Shin, H. (2007). Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4), 339-359.

Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.

Li, J., Hong, J., Zheng, Q., Guo, X., Lan, S., Cui, F., ... & Chen, C. (2011). Repair of rat cranial bone defects with nHAC/PLLA and BMP-2-related peptide or rhBMP-2. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(11), 1745-1752.

Li, X., Jin, L., Balian, G., Laurencin, C. T., & Anderson, D. G. (2006). Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2426-2433.

Li, Y., Chen, S. K., Li, L., Qin, L., Wang, X. L., & Lai, Y. X. (2015). Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation*, 3(3), 95-104.

Liang, S., Liu, L., Huang, Q., & Yam, K. L. (2009). Preparation of single or double-network chitosan/poly (vinyl alcohol) gel films through selectively cross-linking method. *Carbohydrate Polymers*, 77(4), 718-724.

Liebschner, M. A. (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25(9), 1697-1714.

Liu, R., Schindeler, A., & Little, D. G. (2010). The potential role of muscle in bone repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 10(1), 71-6.

LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., & Selvamurugan, N. (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate polymers*, 151, 172-188.

Lorentzon, M., & Cummings, S. R. (2015). Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. *Journal of internal medicine*, 277(6), 650-661.

Loupy, A. (2004). Solvent-free microwave organic synthesis as an efficient procedure for green chemistry. *Comptes Rendus Chimie*, 7(2), 103-112.

Lowenstein, C. J., & Padalko, E. (2004). iNOS (NOS2) at a glance. *Journal of cell science*, 117(14), 2865-2867.

M

Madhally, S. V., & Matthew, H. W. (1999). Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20(12), 1133-1142.

Madry, H., van Dijk, C. N., & Mueller-Gerbl, M. (2010). The basic science of the subchondral bone. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*, 18(4), 419-433.

Maitra, J., & Shukla, V. K. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25-31.

Mano, J. F., & Reis, R. L. (2007). Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4), 261-273.

Mano, J. F., Silva, G. A., Azevedo, H. S., Malafaya, P. B., Sousa, R. A., Silva, S. S., Boesel, L.F., Oliveira, J.M, Santos, T.C, Marques, A.P, & Neves, N. M. (2007). Natural origin

biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface*, 4(17), 999-1030.

Martin, I., Schaefer, D., & Dozin, B. (2013). Repair of osteochondral lesions. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6458/>

Martín, J., & Mijangos, C. (2008). Tailored polymer-based nanofibers and nanotubes by means of different infiltration methods into alumina nanopores. *Langmuir*, 25(2), 1181-1187.

Martín, J., Vázquez, M., Hernández-Vélez, M., & Mijangos, C. (2009). Ordered arrays of magnetic polymer-based nanorods by template synthesis. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 9(10), 5898-5902.

Martín, J., Maiz, J., Sacristan, J., & Mijangos, C. (2012). Tailored polymer-based nanorods and nanotubes by "template synthesis": From preparation to applications. *Polymer*, 53(6), 1149-1166.

Martini, F.H., Timmons, M.J., Tallitsch, R.B. (2009). *The skeletal System: Osseous Tissue and Skeletal Structure. Human Anatomy. 6° Ed.* Pearson Education, Benjamin Cummings Publishing Company, 5: 912.

Masuda, H., & Fukuda, K. (1995). Ordered metal nanohole arrays made by a two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *science*, 268(5216), 1466.

McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell*, 6(4), 483-495.

Mellor, L. F., Mohiti-Asli, M., Williams, J., Kannan, A., Dent, M. R., Guilak, F., & Lobo, E. G. (2015). Extracellular calcium modulates chondrogenic and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: a novel approach for osteochondral tissue engineering using a single stem cell source. *Tissue Engineering Part A*, 21(17-18), 2323-2333.

Mijangos, C., Hernandez, R., & Martin, J. (2016). A review on the progress of polymer nanostructures with modulated morphologies and properties, using nanoporous AAO templates. *Progress in Polymer Science*, 54, 148-182.

Miljkovic ND, Cooper GM, Marra KG (2008) Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 16(10):1121–1130.

Moisio, K., Eckstein, F., Chmiel, J. S., Guermazi, A., Prasad, P., Almagor, O., Song, J., Dunlop, D., Hudelmaier, M., Kothari, A., & Sharma, L. (2009). Denuded subchondral bone and knee pain in persons with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 60(12), 3703-3710.

Molinuevo, M. S., Schurman, L., McCarthy, A. D., Cortizo, A. M., Tolosa, M. J., Gangoiti, M., Arnol, V., & Sedlinsky, C. (2010). Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(2), 211-221.

Morihara, T., Harwood, F., Goomer, R., Hirasawa, Y., & Amiel, D. (2002). Tissue-engineered repair of osteochondral defects: effects of the age of donor cells and host tissue. *Tissue engineering*, 8(6), 921-929.

Mountziaris, P. M., & Mikos, A. G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 14(2), 179-186.

Müller, W. E. G., Neufurth, M., Wang, S., Tolba, E., Schröder, H. C., & Wang, X. H. (2016). Morphogenetically active scaffold for osteochondral repair (polyphosphate/alginate/N, O-carboxymethyl chitosan). *Eur. Cells Mater. Journal [eCM]*, 31, 174-190.

Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Leonardi, R., Trovato, F. M., Szychlinska, M. A., Di Giunta, A., Loreto, C., & Castorina, S. (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *World journal of orthopedics*, 5(2), 80.

N

National Research Council. (2010). *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academies Press.

Niedźwiedzki, T., & Filipowska, J. (2015). Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of molecular endocrinology*, 55(2), R23-R36.

Nukavarapu, S. P., & Dorcemus, D. L. (2013). Osteochondral tissue engineering: current strategies and challenges. *Biotechnology advances*, 31(5), 706-721.

O

Oberti, T. G., Cortizo, M. S., & Alessandrini, J. L. (2010). Novel copolymer of diisopropyl fumarate and benzyl acrylate synthesized under microwave energy and quasielastic light scattering measurements. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47(7), 725-731.

Oberti, T. G., Alessandrini, J. L., & Cortizo, M. S. (2012). Thermal characterization of novel p-nitrobenzylacrylate–diisopropyl fumarate copolymer synthesized under microwave energy. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, 109(3), 1525-1531.

Odian, G. (2004). *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons.

Oh, S., Brammer, K. S., Li, Y. J., Teng, D., Engler, A. J., Chien, S., & Jin, S. (2009). Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2130-2135.

Otsu, T., Minai, H., Toyoda, N., & Yasuhara, T. (1985). Radical high polymerization of dialkyl fumarates with bulky substituents leading to less-flexible rod-like polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 12(S19851), 133-142.

Otsu, T., Matsumoto, A., Shiraishi, K., Amaya, N., & Koinuma, Y. (1992). Effect of the substituents on radical copolymerization of dialkyl fumarates with some vinyl monomers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 30(8), 1559-1565.

P

Padmanabhan, J., & Kyriakides, T. R. (2015). *Nanomaterials, inflammation, and tissue engineering*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 7(3), 355-370.

Pajarinen, J., Lin, T., Gibon, E., Kohno, Y., Maruyama, M., Nathan, K., L. Lu, Z. Yao & Goodman, S. B. (2018). *Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing*. *Biomaterials*

Panseri, S., Russo, A., Cunha, C., Bondi, A., Di Martino, A., Patella, S., & Kon, E. (2012). Osteochondral tissue engineering approaches for articular cartilage and subchondral bone regeneration. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 20(6), 1182-1191.

Park, J., & Lakes, R. S. (2007). *Biomaterials: an introduction*. Springer Science & Business Media.

Park, S., & Im, G. I. (2015). Stem cell responses to nanotopography. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 1238-1245.

Pasqualone, M., Oberti, T. G., Andretta, H. A., & Cortizo, M. S. (2013). Fumarate copolymers-based membranes overlooking future transdermal delivery devices: synthesis and properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(7), 1683-1692.

Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E., & Pearce, S. G. (2007). Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*, 13(1), 1-10.

Pigossi, S. C., de Oliveira, G. J., Finoti, L. S., Nepomuceno, R., Spolidorio, L. C., Rossa, C., Ribeiro, S. J., Saska S., & Scarel-Caminaga, R. M. (2015). Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. *Journal of biomedical materials research Part A*, 103(10), 3397-3406.

Potier, E., Noailly, J., & Ito, K. (2010). Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics. *Journal of biomechanics*, 43(5), 807-817.

Q

Qiu, W., Murray, M. M., Shortkroff, S., Lee, C. R., Martin, S. D., & Spector, M. (2000). Outgrowth of chondrocytes from human articular cartilage explants and expression of α -smooth muscle actin. *Wound Repair and Regeneration*, 8(5), 383-391.

Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692.

R

Radhakrishnan, A., Jose, G. M., & Kurup, M. (2015). PEG-penetrated chitosan-alginate co-polysaccharide-based partially and fully cross-linked hydrogels as ECM mimic for tissue engineering applications. *Progress in biomaterials*, 4(2-4), 101-112.

Rai, V., Dilisio, M. F., Dietz, N. E., & Agrawal, D. K. (2017). Recent strategies in cartilage repair: a systemic review of the scaffold development and tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(8), 2343-2354.

Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., & Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261-267.

Rasilainen, T., Suvanto, M., & Pakkanen, T. A. (2009). Anisotropically microstructured and micro/nanostructured polypropylene surfaces. *Surface Science*, 603(14), 2240-2247.

Ravichandran, R., Sundarajan, S., Venugopal, J. R., Mukherjee, S., & Ramakrishna, S. (2012). Advances in polymeric systems for tissue engineering and biomedical applications. *Macromolecular bioscience*, 12(3), 286-311.

Ren, X., Tu, V., Bischoff, D., Weisgerber, D. W., Lewis, M. S., Yamaguchi, D. T., ... & Lee, J. C. (2016). Nanoparticulate mineralized collagen scaffolds induce in vivo bone

regeneration independent of progenitor cell loading or exogenous growth factor stimulation. *Biomaterials*, 89, 67-78.

Rezwan, K., Chen, Q. Z., Blaker, J. J., & Boccaccini, A. R. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413-3431.

Rinaudo, M., Milas, M., & Le Dung, P. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15(5), 281-285.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.

Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of controlled release*, 5(1), 23-36.

Ross, A. M., & Lahann, J. (2015). Current trends and challenges in biointerfaces science and engineering. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 6, 161-186.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2013). *Histología. Texto y Atlas*. 6ta. Edición. Ed. Médica Panamericana.

Roth, V., & Mow, V. C. (1980). The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 62(7), 1102-1117.

Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in biotechnology*, 26(8), 434-441.

S

Sanzana, E. S., Navarro, M., Ginebra, M. P., Planell, J. A., Ojeda, A. C., & Montecinos, H. A. (2014). Role of porosity and pore architecture in the in vivo bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(6), 1767-1773.

Sarasam, A. R., Krishnaswamy, R. K., & Madhally, S. V. (2006). Blending chitosan with polycaprolactone: effects on physicochemical and antibacterial properties. *Biomacromolecules*, 7(4), 1131-1138.

Sekiya, I., Colter, D. C., & Prockop, D. J. (2001). BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(2), 411-418.

Seo, S. J., Mahapatra, C., Singh, R. K., Knowles, J. C., & Kim, H. W. (2014). Strategies for osteochondral repair: focus on scaffolds. *Journal of tissue engineering*, 5, 2041731414541850.

Sgaglione, N. A., Miniaci, A., Gillogly, S. D., & Carter, T. R. (2002). Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 18(2), 9-32.

Shalak, R.; Fox C.P. (1988). "Preface" *Tissue Engineering*. Shalak, R.; Fox, C.P. (eds). New York: Alan R. Liss, 26-29.

Sheehy, E. J., Vinardell, T., Toner, M. E., Buckley, C. T., & Kelly, D. J. (2014). Altering the architecture of tissue engineered hypertrophic cartilaginous grafts facilitates vascularisation and accelerates mineralisation. *PloS one*, 9(3), e90716.

Shi, R., Bi, J., Zhang, Z., Zhu, A., Chen, D., Zhou, X., Zhang, L., & Tian, W. (2008). The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature. *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 763-770.

Smith, I. O., Liu, X. H., Smith, L. A., & Ma, P. X. (2009). Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(2), 226-236.

Spencer, N. D., Gimble, J. M., & Lopez, M. J. (2011). Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Veterinary Surgery*, 40(2), 129-139.

Sreedhar, B., Sairam, M., Chattopadhyay, D. K., Rathnam, P. A., & Rao, D. V. (2005). Thermal, mechanical, and surface characterization of starch-poly (vinyl alcohol) blends and borax-crosslinked films. *Journal of Applied Polymer Science*, 96(4), 1313-1322.

Stevens, B., Yang, Y., Mohandas, A., Stucker, B., & Nguyen, K. T. (2008). A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues. *Journal of biomedical materials research Part B: applied biomaterials*, 85(2), 573-582.

Suzuki, Y., Duran, H., Akram, W., Steinhart, M., Floudas, G., & Butt, H. J. (2013). Multiple nucleation events and local dynamics of poly (ϵ -caprolactone)(PCL) confined to nanoporous alumina. *Soft Matter*, 9(38), 9189-9198.

T

Tan, H. S., & Pfister, W. R. (1999). Pressure-sensitive adhesives for transdermal drug delivery systems. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(2), 60-69.

Thompson, E. M., Matsiko, A., Farrell, E., Kelly, D. J., & O'Brien, F. J. (2015). Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 9(8), 889-902.

Timmer, M. D., Shin, H., Horch, R. A., Ambrose, C. G., & Mikos, A. G. (2003). In vitro cytotoxicity of injectable and biodegradable poly (propylene fumarate)-based networks: unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules*, 4(4), 1026-1033.

Tsimbouri, P., Gadegaard, N., Burgess, K., White, K., Reynolds, P., Herzyk, P., Oreffo, R., & Dalby, M. J. (2014). Nanotopographical effects on mesenchymal stem cell morphology and phenotype. *Journal of cellular biochemistry*, 115(2), 380-390.

Tuan, R. S., Boland, G., & Tuli, R. (2002). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5(1), 32.

Tullberg-Reinert, H., & Jundt, G. (1999). In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochemistry and cell biology*, 112(4), 271-276.

Tuzlakoglu, K., Alves, C. M., Mano, J. F., & Reis, R. L. (2004). Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 811-819.

U

Ueno, A., Kitase, Y., Moriyama, K., & Inoue, H. (2001). MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells. *Matrix Biology*, 20(5), 347-355.

Upman, P. J. (2006). ISO 10993-6: Test for local effects after implantation. *BONEZone*, 5(1), 50-52.

Uslu, İ., Çelikkan, H., Atakol, O., & Aksu, M. L. (2008). Preparation of PVA/Chitosan Doped with Boron Composite Fibers and Their Characterization. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 117-122.

V

Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., & Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in biotechnology*, 27(5), 307-314.

W

Waclawska, I. (1995). Thermal decomposition of borax. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 43(1), 261-269.

Wan, M. (2008). A template-free method towards conducting polymer nanostructures. *Advanced Materials*, 20(15), 2926-2932.

Wenzel, R. N. (1936). Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry*, 28(8), 988-994.

Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941-2953.

Woolf, A. D., & Pflieger, B. (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*, 81(9), 646-656.

Wu, H., Wan, Y., Cao, X., & Wu, Q. (2008). Interlocked chitosan/poly (dl-lactide) blends. *Materials Letters*, 62(2), 330-334.

Z

Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M., & Dymińska, L. (2015). Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 134, 114-120.

Zhang, H., & Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658

Zhang, L., & Webster, T. J. (2009). Nanotechnology and nanomaterials: promises for improved tissue regeneration. *Nano today*, 4(1), 66-80.

Zhou, S., Li, Y. B., Morsi, Y. S., Wang, Y. Y., Chen, C., & Zhang, L. (2014). Effects of Ethylene-Vinyl Acetate Copolymer on the Morphology and Mechanical Properties of Hydroxyapatite/Polyamide 66 Composites for Bone Tissue Engineering. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 53(3), 290-297.

**ÍNDICE DE ESQUEMAS,
FIGURAS, IMÁGENES Y
TABLAS**

ESQUEMAS

Esquema I.1 Células del tejido óseo	10
Esquema I.2 Estructura del tejido óseo	12
Esquema I.3 Estructura del cartílago articular	17
Esquema I.4 Lesión osteocondral	20
Esquema I.5 Representación de la A) Microfractura, B) Mosaicoplastia y C) implantes de condrocitos autólogos	21
Esquema I.6 Representación de un implante en ingeniería de tejido cartilaginoso	23
Esquema I.7 Células progenitoras de médula ósea A) Potenciales linajes celulares de diferenciación. B) principales cascadas de señales involucradas en la osteogénesis y la condrogénesis	24
Esquema II.1 Estructura del AcV	37
Esquema II.2 Estructura del CHI	39
Esquema II.3. Síntesis del copolímero PFV	40
Esquema II.4. Hidrólisis del copolímero PFV	40
Esquema IV.1 Fabricación de las plantillas AAO: A) Esquema del proceso “anodización en dos pasos” B) celda para electropulido C) celda para anodizaciones	84
Esquema IV.2 Determinación del ángulo de contacto	86

FIGURAS

Figura II.1 Espectro ^1H -RMN del FIP	38
Figura II.2 Espectro FTIR del PFV	42
Figura II.3 Espectro FTIR del PFVH	42
Figura II.4 Espectro ^1H -RMN del PFV	43
Figura II.5 Espectro ^1H -RMN del FPVH	45
Figura II.6 Termograma observado por DSC para PFV y PFVH	46
Figura II.7 Perfiles de descomposición por TGA para PFV y PFVH, A) pérdida de masa y B) DTG	46
Figura III.1 Espectros ATR-FTIR	62
Figura III.2 Termogramas observado por DSC para PFVH-CHI y PFVH-CHI-B	63
Figura III.3 Perfiles de descomposición por TGA para PFV-CHI y PFVH-CHI-B, A) pérdida de masa y B) DTG	64
Figura III.4 Hinchamiento de la película PFVH-CHI-B A) Cinética de hinchamiento y B) Gráfica log-log correspondiente a la ecuación III.2	67
Figura III.5 Estudio de degradación de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B en A) buffer PBS pH 7,4 y en B) solución de lipasa	68
Figura III.6 Curva tensión vs. deformación	70
Figura III.7 Proliferación celular por MTT A) CPMO y B) Condrocitos primarios	72
Figura III.8 Evaluación de marcadores osteogénicos	73
Figura III.9 Expresión de marcadores moleculares osteogénicos	74
Figura III.10 Evaluación de marcador condrogénico	75
Figura III.11 Expresión de marcadores moleculares condrogénicos	75

Figura III.12 Expresión de marcadores moleculares de citotoxicidad	77
Figura IV.1 Espectroscopia Raman confocal, A) de CHI, PFVH y PFVH-CHI-B y B) AAO30L infiltrada con PFVH-CHI-B	91
Figura IV.2 Proliferación celular por MTT de CPMO sobre los SN	95
Figura IV.3 Ensayo indirecto por MTT	96
Figura IV.4 Evaluación de marcadores osteogénicos	97
Figura IV.5 Evaluación de marcador condrogénico	98
Figura IV.6 Expresión de marcadores moleculares de citotoxicidad	100
Figura V.1 Reosificación del defecto óseo	111

IMÁGENES

Imagen III.1 Película de PFVH-CHI-B	65
Imagen III.2 Micrografías obtenidas por SEM de PFVH-CHI y PFVH-CHI-B. Vista superficie y corte transversal de las membranas A, B) PFVH-CHI o C, D) PFVH-CHI-B	66
Imagen III.3 Micrografías obtenidas por SEM de las CPMO crecidas sobre PFVH-CHI-B. A) 1 h y B) 24 h	73
Imagen IV.1 Horno empleado para la infiltración de la película	85
Imagen IV.2 Micrografías SEM de las plantillas AAO, A) Vista lateral de AAO170 y vista superior de B) AAO170 y C) AAO300	89
Imagen IV.3 Vista lateral de una película PFVH-CHI-B infiltrada	90
Imagen IV.4 Imagen macroscópica de los <i>scaffolds</i>	92
Imagen IV.5 SEM películas nanoestructuradas, vista transversal de A) SN170 y B) SN30L; vista superior A) SN170 y B) SN300	93
Imagen IV.6 imágenes gota de agua sobre las películas	94
Imagen IV.7 Micrografías obtenidas por SEM de las CPMO crecidas sobre A) SN170 y B) SN300	97
Imagen V.1 Craneotomía A) antes y B) después de agregar la película de PFVH-CHI-B	106
Imagen V.2 Micrografía del corte del defecto sin rellenar	107
Imagen V.3 Película de PFVH-CHI-B liofilizada. Vista A) transversal y B) lateral	108
Imagen V.4 Micrografías 4X del corte del defecto A) control y el B) cubierto con el <i>scaffold</i> PFVH-CHI-B	109
Imagen V.5 Micrografías del corte del defecto cubierto con el <i>scaffold</i> A) 10X y B) 40X	110

TABLAS

Tabla I.1 Factores involucrados en el desarrollo y mantenimiento del tejido cartilaginoso	19
Tabla II.1 Asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del FIP	38
Tabla II.2 Asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del PFV	43
Tabla II.3 Asignación de señales del espectro $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3) del PFVH	44
Tabla III.1 <i>Primers</i> marcadores osteogénicos	59
Tabla III.2 <i>Primers</i> marcadores condrogénicos	60
Tabla III.3 <i>Primers</i> marcadores de citotoxicidad	61
Tabla III.4 Análisis por TGA para PFVH-CHI-B y PFVH-CHI	64
Tabla III.5 Propiedades mecánicas para PFVH-CHI-B y PFVH-CHI	70
Tabla III.6 Producción de NO	76
Tabla III.7 Producción de citoquinas IL1 β y TNF α	76
Tabla IV.1 <i>Primers</i> marcadores de citotoxicidad	88
Tabla IV.2 Dimensiones de las plantillas AAO	90
Tabla IV.3 Ángulo de contacto de los <i>scaffolds</i>	94
Tabla IV.4 Producción de NO	99
Tabla IV.5 Producción de IL1 β	99

ABREVIATURAS

AAO: plantillas de óxido de aluminio anodizado

AcV: acetato de vinilo

CHI: quitosano

CPMO: células progenitoras de médula ósea

FIP: fumarato de diisopropilo

GAGs: glicosaminoglicanos sulfatados

MEC: matriz extracelular

MSCs: células madres mesenquimales

PB: peróxido de benzoilo

PFV: poli(fumarato de diisopropilo -co- acetato de vinilo)

PFVH: poli(fumarato de diisopropilo -co- acetato de vinilo) hidrolizado

PFVH-CHI: mezcla poli(fumarato de diisopropilo -co- acetato de vinilo) hidrolizado y quitosano

PFVH-CHI-B: mezcla poli(fumarato de diisopropilo -co- acetato de vinilo) hidrolizado y quitosano con incorporación de bórax.

SC: *scaffold* obtenido por *solvent casting*

SN: *scaffold* nanoestructurado

PUBLICACIONES

Los resultados incluidos en el presente trabajo de tesis han dado origen a las siguientes publicaciones:

- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., & Cortizo, M. S. (2015). Biocompatibilidad de matrices basadas en polifumaratos para regeneración del tejido óseo-cartilaginoso. *Investigación Joven*, 1(2).

- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., & Cortizo, M. S. (2017). Fumarate Copolymer–Chitosan Cross-Linked Scaffold Directed to Osteochondrogenic Tissue Engineering. *Macromolecular bioscience*, 17(5).

- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Blaszczyk-Lezak, I., Mijangos, C., & Cortizo, M. S. (2018). Nanostructured fumarate copolymer-chitosan crosslinked scaffold: An in vitro osteochondrogenesis regeneration study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 570-579.



Facultad de Ciencias
EXACTAS



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**