



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE LOS MATERIALES

**Materiales-híbridos fibrilares en base a
polímeros biodegradables**

Sartuqui Javier

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2017

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Materiales, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Química del Sur (INQUISUR) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2013 y el 09 de Junio de 2017, bajo la dirección de Dr. Paula Verónica Messina, Profesora Adjunta de la Universidad del Sur e Investigadora Independiente de CONICET.

Sartuqui Javier



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

La participación directa o indirecta de muchas personas a nivel personal y académico me permitió alcanzar este nuevo logro y, por ello, deseo expresar un profundo agradecimiento.

En primer lugar deseo agradecer a la Universidad Nacional del Sur, al Departamento de Química de la citada Universidad y al Instituto de Química del Sur – INQUISUR – CONICET por proveer del lugar físico y marco académico donde se desarrolló el trabajo de investigación; y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el soporte económico, mediante una beca interna de formación doctoral, a lo largo de estos años.

Por otro lado, a Paula Messina, quien me aceptó en su grupo de investigación y fue la guía y fuente de consejos, conocimiento e ideas fundamentales para todo este proceso.

A Noelia y Noel, compañeras y amigas, por estar siempre, por los momentos compartidos, por las interminables charlas y discusiones constructivas y hacer ameno el día a día en todo este tiempo. También a Nancy y a Luciano, por las charlas y la ayuda proporcionada.

Quiero agradecer también a los colaboradores que en algún momento tuvieron participación: las Dras. Barbara Zavan, Chiara Gardin, Letizia Ferroni y Aitziber López Cortajarena; el Dr. Juan M. Ruso; Mag. Daniel Ercoli; y a Daniel Sánchez de Alcázar por su compromiso, buena predisposición y profesionalismo que determinó una importante contribución en este trabajo.

Quiero agradecer y también dedicar este trabajo a mi familia, a Lucía y a mis amigos, por estar siempre y brindar un apoyo constante e incondicional.

Resumen

El hueso, para su estudio, se puede considerar tanto un tejido como una estructura, ya que desempeña dos funciones básicas: (i) control del metabolismo mineral de Ca, P y Mg (función fisiológica) y, (ii) sostén y protección de órganos (función mecánica). Como el material estructural primario del cuerpo, el mismo debe soportar una variedad de condiciones de carga estáticas y dinámicas; lo cual le es posible debido a la alta complejidad de su estructura altamente organizada.

El tejido óseo es un compuesto de fibras de colágeno resistentes, aunque flexibles, reforzadas con nanocristales de fosfato cálcico. Esta estructura compuesta le da una rigidez mucho mayor que el resto de los tejidos mientras que le proporciona una tenacidad a la fractura y resistencia al daño sorprendentemente altas. La complejidad mecánica del tejido óseo, compuesto de hueso cortical y hueso trabecular, ambos con comportamientos mecánicos distintos, supera la de la mayoría de los materiales utilizados en ingeniería y por tal motivo su reemplazo por un material funcional es prácticamente imposible.

Las dificultades clínicas que radican en la incapacidad de restaurar, frente a una pérdida de masa, la funcionalidad del tejido óseo mediante la sustitución sumado al deterioro de la micro-arquitectura ósea o pérdidas cualitativas de tejido asociadas a ciertas patologías, motivan la necesidad de investigar el modo de regenerar tejido nativo. El objetivo es guiar la formación de hueso sano necesario y suficiente para cubrir los defectos óseos, así como también brindar un soporte adecuado para alojar las prótesis. La ingeniería de tejido en las últimas décadas se ha convertido en un área de la ciencia que nos despliega una opción para la regeneración ósea en lugar de la sustitución mediante el uso de estructuras tridimensionales (3D) o matrices enriquecidas que pueden proveer de manera autóloga el sistema de reparación y regeneración de hueso a grandes volúmenes: biorreactores óseos.

Estos sistemas se han convertido día a día en la opción más considerada y consisten en el acoplamiento y organización de células, andamios y complementos fisiológicos que simulen el ambiente tisular. Con la combinación adecuada de estos factores es posible obtener la respuesta celular adecuada hacia la regeneración funcional de tejido, siendo el andamio la estructura de sostén mecánico de todo el sistema.

Considerando lo mencionado, durante el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos específicos con el objetivo general de crear una estructura con potencial aplicación como biorreactor óseo: (1) estudiar la respuesta potencial de regeneración celular ósea ante la presencia de nanorodillos de hidroxapatita (HA) sintética; componente fundamental de la

estructura u andamio a preparar. (2) Determinar las propiedades e interacciones de los nanorodillos de HA con una proteína derivada de la hidrólisis de colágeno (gelatina); la organización de este sistema compuesto será la base estructural del andamio. (3) Construir y caracterizar un andamio basado en los componentes mencionados en la búsqueda del desarrollo de un biorreactor óseo.

Para cumplir con los objetivos planteados, en primer lugar, se estudió la viabilidad, proliferación, adhesión y diferenciación en linaje osteogénico de células madre derivadas de tejido adiposo humano cultivadas en presencia de recubrimientos de dos tipos de nanorodillos de hidroxiapatita. Estos aspectos fueron analizados mediante técnicas de cuantificación de la actividad metabólica celular, actividad de la fosfatasa alcalina, cuantificación de la expresión génica, determinación de depósitos de fosfato de calcio y observación de las células adheridas.

En segunda instancia, mediante el análisis de la viscosidad y densidad de soluciones con diferentes concentraciones de gelatina y cantidades de nanorodillos de hidroxiapatita mantenidas a distintas temperaturas se estudió la organización hidrodinámica de nuestro sistema. Esta sección fue complementada con estudios de espectroscopía y microscopía óptica.

Como tercer paso se seleccionó una de las soluciones estudiadas, a la cual se le añadió un agente entrecruzante para obtener andamios a partir de un proceso de liofilizado. Estos andamios fueron luego caracterizados estructuralmente utilizando técnicas como microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja, espectroscopía fotoelectrónica de rayos X y calorimetría diferencial de barrido. Por otro lado se hicieron estudios en soluciones fisiológicas simuladas de degradación y bioactividad. En la parte final de nuestro trabajo, se realizaron estudios acerca de la porosidad, almacenamiento de solventes y propiedades mecánicas de los andamios construidos.

Como resultado de este estudio, se obtuvieron andamios conformados a partir de una hidroxiapatita sintética similar a la apatita ósea, capaz de inducir proliferación y diferenciación celular, combinada con gelatina y un agente entrecruzante que presentan propiedades mecánicas comparables con las encontradas en tejidos óseos y características estructurales apropiadas para su consideración como biorreactor. Además, los estudios de bioactividad y degradación de los andamios también arrojaron resultados prometedores para su aplicación en ingeniería de tejidos óseos.

Abstract

The bone, for its study, could be considered both a tissue and a structure, since it performs two basic functions: (i) control of Ca, P and Mg mineral metabolism (physiological function) and, (ii) support and protection of organs (mechanical function). As the primary structural material of the body, it must withstand a variety of static and dynamic loading conditions; which is possible due to the high complexity of its highly organized structure.

Bone tissue is a composite of tough but flexible collagen fibers reinforced with calcium phosphate nanocrystals. This composite structure gives it a much greater rigidity than the rest of tissues while providing surprisingly high fracture toughness and damage resistance. The mechanical complexity of the bone tissue, which is composed of cortical bone and trabecular bone, each with different mechanical behaviors, surpasses that of most materials used in engineering and for that reason its replacement by a functional material is practically impossible.

The clinical difficulties that arise from the inability to restore, in a loss of mass, the functionality of the bone tissue through the substitution, added to the deterioration of the bone micro architecture or qualitative losses of tissue associated with certain pathologies, motivate the need to investigate the way to regenerate native tissue. The goal is to guide the formation of necessary and sufficient healthy bone to cover the defects, as well as to provide adequate support to accommodate the prostheses. In the last decades, tissue engineering has become an area of science that offers us an option for bone regeneration, instead of replacement, through the use of three-dimensional structures (3D) or enriched matrices that can provide an autologous system of repair and regeneration of bone to large volumes: bone bioreactors.

Currently these systems have become a more considered option and consist in the coupling and organization of cells, scaffolds and physiological supplements that simulate the tissue environment. With the adequate combination of these factors it is possible to obtain the adequate cellular response towards the functional regeneration of tissue, a scaffold being the mechanical support structure of the whole system.

Considering the above, the following specific objectives of the present work were set out with the general aim of creating a structure with potential application as a bone bioreactor: (1) to study the potential response of bone cell regeneration to the presence of synthetic hydroxyapatite nanorods (HA); a fundamental component of the scaffold to be prepared (2) to determine the properties and interactions of HA nanorods with a protein

derived from the hydrolysis of collagen (gelatin); the organization of this system will be the structural basis of the scaffold (3) to construct and characterize a scaffold based on the components mentioned in the search for the development of a bone bioreactor.

First, the viability, proliferation, adhesion and differentiation in osteogenic lineage of stem cells derived from human adipose tissue cultured in the presence of coatings of two types of hydroxyapatite nanorods were studied. These aspects were analyzed by quantification techniques of cellular metabolic activity, alkaline phosphatase activity, quantification of gene expression, determination of calcium phosphate deposits and observation of adhered cells.

In the second instance, the hydrodynamic organization of our system was studied by analyzing the viscosity and density of solutions with different concentrations of gelatin and amounts of hydroxyapatite nanorods maintained at different temperatures. This section was supplemented with spectroscopy and optical microscopy studies.

As a third step, a crosslinking agent was added to a selected solution, in order to obtain scaffolds from a freeze-drying process. These scaffolds were then structurally characterized using techniques such as scanning electron microscopy, high resolution transmission electron microscopy, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and differential scanning calorimetry. On the other hand degradation and bioactivity studies were carried out in simulated physiological solutions. In the final part of our work, porosity, solvent storage and mechanical properties of constructed the scaffolds were studied.

As a result of this study, scaffolds were obtained from a synthetic hydroxyapatite, similar to the bone apatite and capable of inducing cell proliferation and differentiation, combined with gelatin and a crosslinking agent. These structures presented mechanical properties comparable to those found in bone tissues and structural properties suitable for consideration as a bioreactor. In addition, studies of bioactivity and scaffold degradation also yielded promising results for application in bone tissue engineering.

Índice de contenidos

Prefacio.....	I
Agradecimientos.....	II
Resumen.....	III
Abstract.....	V
Índice de contenidos.....	VII
Lista de abreviaturas y símbolos.....	XII
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1 Composición ósea.....	1
1.1.1 Matriz orgánica ósea.....	3
1.1.2 Porción mineral ósea.....	4
1.1.3 Mineralización del colágeno.....	5
1.1.4 Renovación ósea.....	7
1.1.5 Propiedades mecánicas.....	7
1.2 Ingeniería de tejidos.....	10
1.2.1 Biomateriales.....	11
1.2.2 Cerámicos.....	11
1.2.3 Polímeros sintéticos.....	11
1.2.4 Materiales biológicos.....	11
1.2.5 Combinaciones de materiales.....	12
1.3 Colágeno/gelatina-cerámico: combinación natural en la síntesis del scaffold definitivo.....	12
1.3.1 Gelatina.....	12
1.3.2 Hidroxiapatita (HA).....	14
1.4 Biorreactores.....	15
Referencias bibliográficas.....	16
Capítulo 2: Objetivos.....	27
Capítulo 3: Influencia de nanorodillos de HA en la viabilidad y diferenciación de células madre mesenquimales adiposas humanas (hADSCs)	28
3.1 Hidroxiapatita sintética nanoestructurada.....	28
3.2 Células madre derivadas de tejido adiposo.....	30

VIII

3.3 Materiales y métodos – Nanorodillos de HA.....	32
3.3.1 Reactivos.....	32
3.3.2 Síntesis de nanorodillos.....	33
3.3.3 Dispersión de HA nanoestructurada y formación del recubrimiento....	34
3.3.4 Recubrimientos nanoestructurados de HA.....	34
3.4 Materiales y métodos – Ensayos de biología celular.....	34
3.4.1 Aislamiento y cultivo celular.....	34
3.4.2 Cultivo de hADSCs sobre recubrimientos nanoestructurados de HA....	35
3.4.3 Actividad metabólica mitocondrial y ensayos de viabilidad.....	35
3.4.4 Análisis del crecimiento y morfología de hADSCs: proliferación, localización y adhesión.....	35
3.4.5 Estudio de la actividad de Fosfatasa Alcalina	36
3.4.6 Coloración con Rojo de Alizarina S.....	36
3.4.7 Microscopía electrónica de Barrido – Estudio de la micromorfología de las hADSCs.....	37
3.4.8 Aislamiento total de RNA y Real Time PCR.....	37
3.4.9 Análisis estadístico.....	37
3.5 Nanorodillos de HA y el destino de las hADSCs.....	39
3.5.1 Adhesión, supervivencia y distribución de las hADSCs sobre los recubrimientos de HA nanoestructurada.....	39
3.5.2 Influencia de los nanorodillos de HA en la diferenciación de hADSCs.	40
3.5.3 Perfiles progresivos de expresión genética.....	48
3.6 Expresión de mRNA relacionados con la osteogénesis.....	50
3.7 Conclusiones.....	53
Referencias bibliográficas.....	54
Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA.....	63
4.1 Soluciones de gelatina.....	63
4.2 Materiales y métodos.....	64
4.2.1 Reactivos.....	64
4.2.2 Preparación de las soluciones gelatina-HA.....	65
4.2.3 Medidas de viscosidad y densidad.....	65
4.2.4 Espectroscopía de fluorescencia y UV-Vis.....	68

4.2.5 Estudio de la capacidad de moldeado de las soluciones por microscopía óptica.....	69
4.3 Análisis Hidrodinámico.....	69
4.3.1 Análisis de la viscosidad intrínseca.....	69
4.3.2 Rol de los nanorodillos de HA en los parámetros $[\eta]$, K_H y K_m	71
4.3.3 Asociación de los sistemas de gelatina y gelatina-HA.....	74
4.3.4 Influencia de los nanorodillos de HA en la hidratación y rigidez de las cadenas de gelatina.....	76
4.3.5 Estudios de quimioluminiscencia.....	79
4.3.6 Actividad de moldeado de las soluciones gelatina-HA.....	82
4.4 Conclusiones.....	83
Referencias bibliográficas.....	84
Capítulo 5: Caracterización estructural de andamios de gelatina-nanorodillos de HA (GEL-HA).....	88
5.1 Entrecruzamiento de materiales.....	88
5.1.1 Ácido tánico como entrecruzante.....	89
5.2 Materiales y métodos.....	90
5.2.1 Reactivos.....	90
5.2.2 Ensamble.....	90
5.2.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	91
5.2.4 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (H-TEM)...	92
5.2.5 Difracción de rayos X.....	92
5.2.6 Espectroscopía FT-IR.....	92
5.2.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X.....	92
5.2.8 Caracterización térmica.....	93
5.2.9 Degradación hidrolítica y enzimática in vitro.....	93
5.2.10 Incubación de los scaffolds entrecruzados de gelatina-HA en fluido fisiológico simulado (SBF).....	94
5.3. Andamios mineralizados y entrecruzados sintetizados a partir de gelatina-HA	94
5.3.1 Caracterización micro-estructural, morfológica y topológica.....	94
5.3.2 XPS.....	98
5.3.3 Propiedades térmicas.....	99
5.3.4 Mineralización biomimética.....	102

5.3.5 Estudio de osteointegración potencial y biodegradabilidad in vitro.....	110
5.4 Conclusiones.....	114
Referencias bibliográficas.....	115
Capítulo 6: Propiedades mecánicas, porosidad y almacenamiento de agua de los andamios GEL-HA.....	121
6.1 La deformación de los materiales.....	121
6.2 Porosidad.....	124
6.3 Hinchamiento y capacidad de absorción de solvente.....	124
6.4 Materiales y métodos.....	125
6.4.1 Porosidad efectiva.....	126
6.4.2 Cinética de hinchamiento y capacidad de almacenamiento de solvente	126
6.4.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo.....	127
6.4.4 Compresión – ensayos preliminares.....	127
6.4.5 Compresión – ensayos definitivos y ensayos de tracción.....	128
6.4.6 Análisis estadístico.....	129
6.5 Características y propiedades mecánicas de los andamios.....	130
6.5.1 Porosidad efectiva y almacenamiento de solvente.....	130
6.5.2 Ensayos mecánicos preliminares.....	132
6.5.3 Comportamiento ante compresión.....	134
6.5.3.1 Respuesta ósea y de andamios a 0 % de humedad ante esfuerzos mecánicos.....	134
6.5.3.2 Comparación hueso – andamios.....	136
6.5.3.3 Andamios secos y andamios al 50 % de humedad.....	137
6.5.3.4 Ensayos de tracción.....	140
6.6 Conclusiones.....	143
Referencias bibliográficas.....	144
Capítulo 7: Conclusiones generales y perspectivas a futuro.....	150
Capítulo 8: Producción científica.....	154

Lista de abreviaturas y símbolos

ΔC_p	Capacidad calorífica diferencial
β -Gly	β -glicerofosfato
ΔH_m	Entalpía de fusión
$\Delta H_{\text{relajación}}$	Entalpía de relajación durante envejecimiento físico
ΔS_m	Entropía de fusión
\bar{v}	Volumen específico parcial
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
$\langle [\eta] \rangle$	Viscosidad intrínseca promedio
3D	Tridimensional
AA	Ácido ascórbico
ACP	Fases amorfas de fosfatos cálcicos
ALP	Fosfatasa alcalina
ALPL	Fosfatasa alcalina hígado/hueso/riñón
ARS	Rojo de Alizarina
BM-MSCs	Células madre mesenquimales de médula ósea
BMP2	Proteína morfogenética del hueso 2
C+	Control
cDMEM	Medio de Eagle Completo Modificado por Dulbecco
cDNA	ADN complementario
Col	Colágeno
COL1A1	Colágeno tipo 1 alfa 1
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
Dex	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
E_a	Energía de activación del cambio de estado (fusión)
ESB	Sociedad Europea de Biomateriales
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bobino
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2

FT-IR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
GEL	Gelatina
GEL-Ca ²⁺	Gelatina-iones calcio
GEL-HA	Gelatina-nanorodillos de hidroxiapatita
GEL-HA-TA	Andamio conformado por gelatina, hidroxiapatita y ácido tánico
GEL-HA-TA1	Andamio conformado por gelatina, hidroxiapatita y ácido tánico en baja concentración
GEL-HA-TA2	Andamio conformado por gelatina, hidroxiapatita y ácido tánico en alta concentración
GEL-TA1	Andamio conformado por gelatina y ácido tánico en baja concentración
GEL-TA2	Andamio conformado por gelatina y ácido tánico en alta concentración
HA	Hidroxiapatita
HA1	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ polipropilenglicol 400
HA2	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ polietilenglicol
HA3	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ copolímero polietilenglicol – polipropilenglicol – polietilenglicol
HA4	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ octilfenoxipolietoxietanol
hADSCs	Células madre derivadas de tejido adiposo humano
H-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
IGEPAL®	Octilfenoxipolietoxietanol
CA 630	
IprOH	Alcohol isopropílico
K_H	Coefficiente de Huggins
K_m	Constante de auto-asociación
MEC	Matriz extra-celular
MMA	Actividad metabólica mitocondrial
mRNA	ARN mensajero
MSCs	Células madre mesenquimales
MTT	Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio
OC	Osteocalcina

XIII

ODM	Medio de diferenciación osteogénico
ON	Osteonectina
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
p2	Pasaje 2
PBS	Solución salina fosfatada
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PEG 400	Polietilenglicol 400
PEG-PPG- PEG	Polietilenglicol-bloque- polipropilenglicol-bloque-polietilenglicol
PFA	Paraformaldehído
Phe	Fenilalanina
p-NPP	p-nitrofenil fosfato
PPG	Polipropilenglicol
R	Viscosidad aportada por clusters / viscosidad aportada por cadenas aisladas
RANKL	Ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa \beta$
Rku	Coefficiente de escarpadura
Rsw	Coefficiente de asimetría
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado con runt
SBF	Suero fisiológico simulado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SOST	Esclerostina
SPP1	Fosfoproteína secretada 1
TA	Ácido tánico
TFRC	Receptor de transferrina
Tg	Temperatura de transición vítrea
Tm	Temperatura de fusión
T _{sub-g}	Temperatura de relajación Sub-T _g
Tyr	Tirosina
V1	Velocidad menor de ensayos mecánicos
V2	Velocidad intermedia de ensayos mecánicos
V3	Velocidad mayor de ensayos mecánicos

W/S	Tasa peso-hinchamiento
Wu	Capacidad de absorción de agua
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos
XRD	Difracción de rayos X
α	Fracción en peso de clusters
η_r	Viscosidad relativa
η_{sp}	Viscosidad específica

Capítulo 1

Introducción general

Se estima que el número anual de procedimientos de implantes óseos a lo largo del mundo asciende a 2.2 millones [1]. Actualmente el trasplante autólogo de implantes (autoimplantes) es lo máximo a lo que se puede aspirar en el campo. No obstante, algunos de los problemas que usualmente se presentan son la morbilidad del sitio donante y la poca disponibilidad de fuentes de tejido [2]. Además de los autoimplantes, hoy en día es factible el uso de aloimplantes, caso en el que los riesgos son de otra índole: se pueden transmitir enfermedades a través del implante, o éste puede ser rechazado por el sistema inmunológico [2]. En consecuencia, gracias a las preocupaciones y limitaciones que poseen los mencionados mecanismos, ha sido muy desarrollado el campo de los sustitutos óseos sintéticos, siendo el grupo de los cerámicos de fosfatos cálcicos uno de los más estudiados [3]. Entre las principales razones por las cuales estos compuestos son tan utilizados se encuentran la biodegradabilidad, bioactividad y osteoconductividad, propiedades en las que se comportan de manera similar al hueso [4]. Por otro lado, el estudio de biomateriales a base de colágeno aplicables a la reparación, aumento o sustitución de tejidos calcificados ha tenido un crecimiento constante en las últimas décadas [5], [6]. En esta breve introducción se definirán aquellos conceptos básicos relacionados con el tejido óseo, así como con los mecanismos de regeneración asociados. Mediante la misma se pretende imbuir al lector en el argumento del presente trabajo.

1.1 Composición ósea

El hueso es un tejido conectivo especializado caracterizado por su composición en parte orgánica y en parte inorgánica, la cual es resultado de un proceso de biomineralización en el que los cristales minerales se depositan de manera ordenada en la matriz extracelular [7]. El esqueleto humano, además de ser una fuente de reservas de iones para la homeostasis del calcio, cumple un rol fundamental en funciones de soporte y protección del cuerpo. Para poder lograrlo es necesario que posea determinadas propiedades mecánicas, debe ser suficientemente fuerte como para sostener el peso y, al mismo tiempo, duro para evitar fracturas. Las propiedades óseas, partiendo de niveles macroscópicos hasta microscópicos, son objeto de estudios frecuentes [9], [10]. En líneas generales, los huesos pueden adquirir diferentes formas, de acuerdo con su función. Un ejemplo de esto es la estabilidad en las

extremidades inferiores que proporcionan huesos largos como el fémur o la tibia, Figura 1.1; o las vértebras, que soportan esfuerzos de compresión y poseen una estructura caracterizada por un interior altamente poroso llamado hueso trabecular.

En particular, el colágeno tipo I es el constituyente de la matriz ósea y de otros tejidos del cuerpo como los tendones. En referencia al aspecto microscópico, existen diferentes niveles jerárquicos en su organización, siendo las trabéculas u osteonas características en el rango de 100 μm en hueso trabecular o cortical respectivamente, Figura 1b y c; estructuras de tipo lamelar en la escala del micrómetro, Figura 1d; fibrillas de colágeno de entre aproximadamente 50 y 200 nm de diámetro (principal unidad constitutiva del hueso, Figura 1e y f) y en el nivel más pequeño, de unos pocos nanómetros, moléculas de colágeno junto con partículas minerales [11].

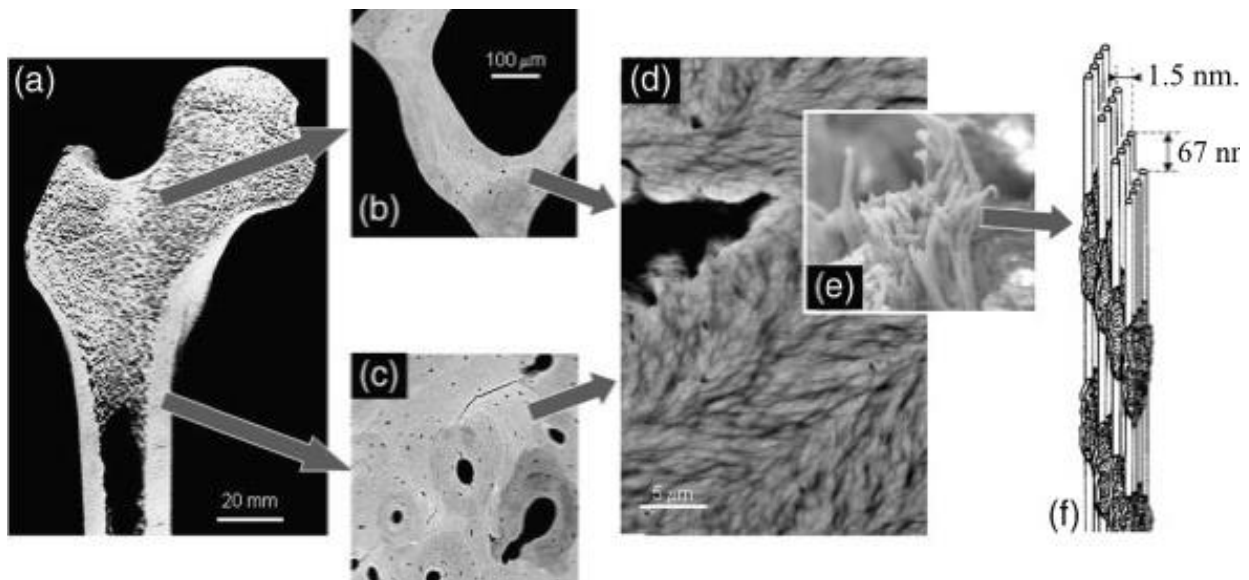


Figura 1.1 Estructura jerárquica de fémur humano. La cabeza femoral está formada por hueso trabecular (a), con sus respectivas trabéculas individuales (b). La cubierta cortical del hueso contiene osteonas (c) en las que el canal de Havers se ve claramente rodeado de lamelas concéntricas. El hueso lamelar (d) consiste en finas capas de fibras de colágeno con disposición similar al material conocido como multilaminado. Las fibrillas de colágeno se encuentran reforzadas con las partículas minerales (e), figura tomada de Fratzl y col, 2009 [11].

1.1.1 Matriz orgánica ósea

La matriz orgánica ósea se encuentra formada por un 90% de fibrillas de colágeno tipo I, mientras que el 10% restante corresponde a otro tipo de proteínas, proteoglicanos y fosfolípidos [12]. Las fibrillas de colágeno son ensambladas dentro de las células, consisten en moléculas filamentosas que se arreglan por sí mismas adquiriendo una configuración de triple hélice que tiene una longitud aproximada de 300 nm. Culminado dicho proceso, son secretadas al exterior celular donde son clivadas [13], [14] y donde, por último, se autoensamblan paralelamente con otras triple-hélices. Los huecos existentes en y entre las mismas fibrillas de colágeno se rellenan y cubren con cristales minerales [15], [16] con forma de platos planos [17] que se disponen paralelamente entre sí, y también paralelamente al eje longitudinal de cada fibrilla [18]; aunque existen reportes que indican que esto no se da en la totalidad de las oportunidades [15].

Estas triple-hélices pueden presentar variabilidad debido a que cada una de las cadenas que la conforman pueden tener diferencias en sus secuencias aminoacídicas. Las fibrillas de colágeno tipo I son producto de la combinación de dos cadenas $\alpha 1$ (I) y una $\alpha 1$ (II), además de ser relativamente gruesas (aproximadamente 78 nm de diámetro). Debido al modo en que se ensamblan presentan una repetitividad periódica cada aproximadamente 66.8 nm, Figura 1.2 [19]–[21]. Estas estructuras moleculares son estabilizadas por entrecruzamientos intra e intermoleculares que también poseen influencia en la mineralización posterior y la fuerza de la estructura ósea final [22]. Hasta aquí hemos hecho referencia a la estructura en sólo dos dimensiones ya que, aunque hay publicaciones que lo discuten [19], [21], [23], no existe precisión en los conocimientos acerca de la estructura tridimensional.

En cuanto a los componentes orgánicos no colagénicos, además de los mencionados anteriormente, podemos encontrar fosfoproteínas, factores de crecimiento [24] y enzimas como la fosfatasa alcalina [25] o metaloproteinasas [27], [28]; siendo estos algunos ejemplos que pueden ser encontrados en bibliografía [29], [31]. En cuanto a la distribución de estos elementos, se sabe que varían dependiendo del tipo de hueso que se estudie; como por ejemplo la fosfoproteína secretada 1 (SPP1), que puede ser encontrada tanto en hueso lamelar como en trabéculas; u osteocalcina, localizada en las lamelas [32], [33].

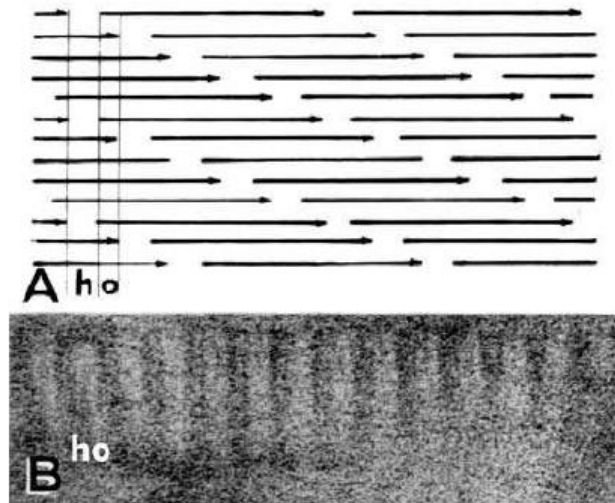


Figura 1.2. Esquema del arreglo de las moléculas de colágeno según el modelo de Hodge & Petruska; se puede estimar la presencia de zonas de huecos (h) y de solapamientos (o) (A). Micrografías de secciones ultrafinas en las que se pueden observar las bandas generadas por las dos diferentes zonas mencionadas (B); esquema tomado de An & Draughn, 2000 [34].

1.1.2 Porción Mineral ósea

Los cristales que se depositan/embeben en y entre las fibrillas de colágeno son pequeños arreglos inorgánicos de 25-50 nm con forma de rodillo [8], [35], [36]. Estos cristales forman parte del orden estructural del más bajo nivel del tejido óseo siendo además, el origen de las conocidas propiedades del mismo, Figura 1.3.

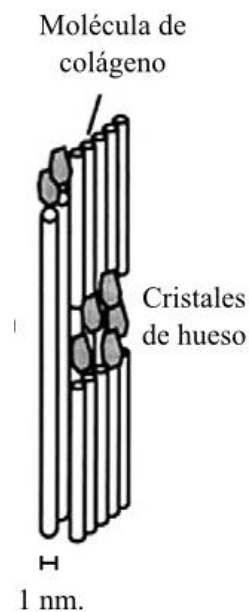
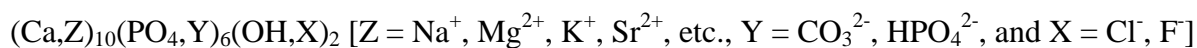


Figura 1.3. En la nanoescala, las unidades estructurales son fibras compuestas de colágeno mineralizado. Esquema de Rogel y col, 2008 [37].

Aunque la identificación del mineral del hueso como apatita fue bien establecida en su momento, el mencionarla como hidroxiapatita estequiométrica $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HA) ya no se considera adecuado. La principal razón para ello es la presencia de iones carbonatos, por lo que podría ser mejor definido como apatita carbonatada ya que se desvía de la HA estequiométrica [38]. La composición de las apatitas biológicas es compleja, debido a las múltiples sustituciones catiónicas y aniónicas y a la capacidad de la apatita de albergar gran cantidad de vacancias [38], [39]. Descartando trazas menores, las sustituciones más relevantes que conciernen las apatitas es el reemplazo de aniones PO_4^{3-} de la estructura de la hidroxiapatita por especies de iones bivalentes como CO_3^{2-} y HPO_4^{2-} , los cuales han sido detectados en grandes y variables cantidades en el tejido óseo [40].

Su forma deficiente en calcio y parcialmente carbonatada puede ser representada por la siguiente fórmula:



En el hueso, aporta propiedades mecánicas a las elásticas pero débiles fibras de colágeno complementándose para conformar una estructura sinérgica capaz de soportar grandes esfuerzos[41].

Los estudios realizados con microscopía electrónica indican que pueden ser descriptos como tabletas [42], rodillos o agujas [43]. La evidencia ultraestructural señala que los pequeños cristales se ubican en los huecos [12] que forman las moléculas de colágeno al autoensamblarse de modo de no perturbar la estructura proteica. Los centros de nucleación, dominios proteicos localizados en los huecos que unen la matriz orgánica a la porción mineral, son los encargados de guiar la formación de cristales [44]. Luego de ese primer paso, los cristales crecen pero se mantienen delgados [15], [17], [45] para, más tarde, crecer en grosor [46], [47]. Entre los tejidos óseos de diferentes especies animales, los rangos en los que varía el grosor de los cristales van desde 1.5 a 4.5 nm [9], [15], [47]–[49].

1.1.3 Mineralización del colágeno

La matriz extracelular (MEC) actúa como plantilla para la deposición mineral, define donde comienza la mineralización y las dimensiones de los cristales. Son muchos los estudios que han intentado dilucidar el proceso de mineralización completo, pero hasta el día de la fecha no se ha logrado en su totalidad [7], [50]. Fisiológicamente, la mineralización del colágeno es un proceso en etapas que involucra el auto-ensamblado de las fibras de colágeno y la deposición controlada de la fase mineral. En líneas generales, se considera que la regulación de la deposición de las fases minerales de fosfato de calcio durante la

biomineralización exhibe dos fases: (i) secuestro de los iones Ca^{2+} y PO_3^{-3} , (ii) nucleación y crecimiento de los minerales [51].

Las actuales teorías señalan a las proteínas no colagénicas como protagonistas de la mineralización. De acuerdo con ellas, la nucleación de minerales inorgánicos se da en soluciones supersaturadas de iones cuando un cristal de un determinado tamaño actúa como precursor inicial [52], [53]. Son diversos los mecanismos que se piensa actualmente que están involucrados de manera cooperativa y redundante:

- Vesículas de la matriz que surgen de la membrana plasmática y acumulan iones calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) extracelulares para posteriormente asociarse con la MEC de colágeno [54].
- Proteínas no colagénicas asociadas a los huecos en las fibrillas de colágeno, que median la nucleación y promueven la propagación de la mineralización en y a lo largo de éstas fibrillas [55]. Direccionan la nucleación de los cristales, contienen dominios poli-aniónicos compuestos básicamente por grupos funcionales $-\text{COO}^-$ y $-\text{PO}_4^{-2}$ que se unen al colágeno en sitios específicos [51].
- Fosfatos cálcicos amorfos e iones calcio almacenados en las mitocondrias son transportados por vesículas al exterior celular antes de convertirse en apatita cristalina y propagarse a partir de centros densos de nucleación [56].

Este intrincado proceso biológico ha inspirado a los científicos a desarrollar nuevas estrategias biomiméticas a fin de reproducir este mecanismo y crear materiales de colágeno mineralizado con propiedades superiores a los obtenidos hasta ahora a fin de emplearlos en la ingeniería de tejidos. Se han conseguido ciertos avances que no han sido concluyentes; Pederson y colaboradores [57] emplearon sistemas auto-agregados formados por liposomas en un método de mineralización directo. Beniash y Deshpande, 2008 [58] propusieron una síntesis donde la nucleación de los cristales de HA sobre las fibras de colágeno fue dirigida por la presencia de ácido poli-aspártico, esta técnica involucró la autoagregación simultánea del colágeno y la precipitación del fosfato de calcio.

1.1.4 Renovación ósea

El hueso es un tejido dinámico que se renueva a un porcentaje cercano al 10% anual a partir de la adultez en un ciclo coordinado de resorción y formación. La remodelación ósea consiste, básicamente, en la resorción de la porción mineral vieja y la formación de nueva. Este proceso se desarrolla sin resultar en cambios de forma o densidad ósea, a través de una secuencia que comienza con una (i) activación osteoclástica, (ii) resorción ósea, (iii) activación osteoblástica y (iv) formación de hueso nuevo en el sitio de resorción [59]. Gracias a este proceso, pequeños defectos son constantemente reparados pero, en defectos a partir de un determinado tamaño, es necesaria la intervención humana. Los biocerámicos de calcio y fosfato, en comparación con otros biomateriales, tienen la ventaja de inducir respuestas biológicas durante este proceso gracias a su composición [60].

1.1.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas son producto de la íntima interacción entre la porción dura inorgánica y los componentes orgánicos. Esta interacción resulta en un tejido que posee, en algunas porciones, valores mecánicos de magnitudes comparables con el aluminio o el acero templado pero en una estructura mucho más liviana. Por ejemplo, muestras óseas han evidenciado capacidades de soportar esfuerzos de tracción de 700 a 1400 kg/cm² (68 a 137 MPa) y esfuerzos de compresión de 1400 a 2100 kg/cm² (137 a 205 MPa). Aún a pesar de su rigidez, el hueso muestra un grado considerable de elasticidad, que es un factor importante que le otorga la capacidad de soportar impactos. Los módulos estimados de elasticidad de las muestras óseas se encuentran en el orden de los 420 a 700 kg/cm² (41 a 68 MPa), valores que indican una mayor elasticidad que, por ejemplo, el acero [60].

Con el fin de caracterizar su *microestructura* se describieron diferentes parámetros que hacen referencia a la cantidad de estructura ósea respecto del volumen que ésta realmente ocupa [61]. Estos parámetros pueden ser estudiados mediante imágenes y un software que permite medir las estructuras [62]. Es conocido que la estructura ósea es *anisotrópica* y por lo tanto las direcciones normalmente ensayadas pueden ser: SI (superior-inferior), AP (antero-posterior) o ML (medio-lateral) [63].

Se pueden mencionar diferentes factores que son capaces de afectar a las propiedades mecánicas: 1) factores *in vivo* como edad, sexo, especie, función y 2) factores *in vitro* como fijación, autoclavado, congelamiento, esterilización y el equipo con el que se desarrolla el ensayo [64].

El efecto que tiene la edad y el paso del tiempo en las propiedades de los huesos se ve, principalmente, en los humanos debido a su longevidad respecto de otros animales. Por esta razón se cuestiona el uso de animales para modelos en los que se estudia el efecto del paso del tiempo en las características óseas [65], [66]. En general, se sabe que con el envejecimiento se incrementa el contenido mineral de los huesos, lo que aumenta la fuerza y dureza al momento de la madurez (aproximadamente 35 años en humanos). Sin embargo, de ese punto en adelante, las propiedades del tejido óseo comienzan a deteriorarse en hombres y mujeres [71] - [73] .

En pocas palabras, las propiedades óseas ya ampliamente estudiadas son consecuencia de la organización jerárquica del tejido (Tabla 1.1). A su vez, esta organización característica y, por lo tanto, sus propiedades, dependen de la porción mineral, la porción proteica, y el producto de la interacción entre ambas [71], [72].

Las propiedades mecánicas del hueso cortical son influidas por diferentes factores. En primer lugar, la *densidad*; existe una positiva correlación entre esta propiedad y las capacidades mecánicas óseas [63]. En segundo lugar, podemos mencionar la *porosidad*; propiedad ampliamente estudiada; cuya relación es inversa, cuanto más poroso es el hueso, menor es su fuerza mecánica. Una de sus definiciones la considera como la relación del volumen vacío respecto del volumen total de la muestra y ha sido medida mediante diferentes técnicas [73]–[75]. Otro factor a considerar es la *anisotropía* (estrechamente relacionado con el concepto de heterogeneidad); contrario al concepto de isotropía, esta propiedad determina la desigualdad en cuanto al comportamiento, es decir, las propiedades mecánicas de las muestras dependen del sentido en el cual son aplicadas las cargas [63]. Ascenzi y col [76], [77] se basaron en la dirección de las fibras de dos lamelas sucesivas para clasificar 3 tipos de osteonas: 1) transversales (T), los cúmulos de fibras en forma de espiral se disponen transversalmente en lamelas sucesivas; 2) alternadas (A), las lamelas sucesivas conforman ángulos de 90° y 3) longitudinales (L), que se disponen longitudinalmente las lamelas sucesivas, Figura 1.4.

Tabla 1.1. Organización jerárquica y propiedades mecánicas; basado en los estudios de Rho y col; y Hoffler y col [71], [72].

<i>Nivel</i>	<i>Elementos</i>	<i>Principales factores determinantes de la fuerza</i>
<i>Macroestructura</i>	Fémur, húmero, falange, vértebras.	Forma tubular, área transversal, porosidad de los huesos largos.
<i>Arquitectura</i> (nivel tisular)	Hueso compacto o trabecular.	Densidad, porosidad, orientación de osteonas, fibras o trabéculas.
<i>Microestructura</i> (nivel osteonal o trabecular)	Osteonas, trabéculas	Dirección de carga, con la fuerza máxima a lo largo del eje longitudinal.
<i>Submicroestructura</i> (nivel lamelar)	Lamelas, fibras largas de colágeno.	Las fibrillas de colágeno-HA se unen en fibras o lamelas con direcciones determinadas que determinan su fuerza.
<i>Ultraestructura</i> (nanoestructura)	Fibrillas de colágeno y moléculas, componentes minerales.	Los cristales se embeben entre moléculas de colágeno contiguas, este material final tiene mejores propiedades que cada uno de los dos por separado; más dúctil que HA, permite la absorción de energía y mayores cargas.

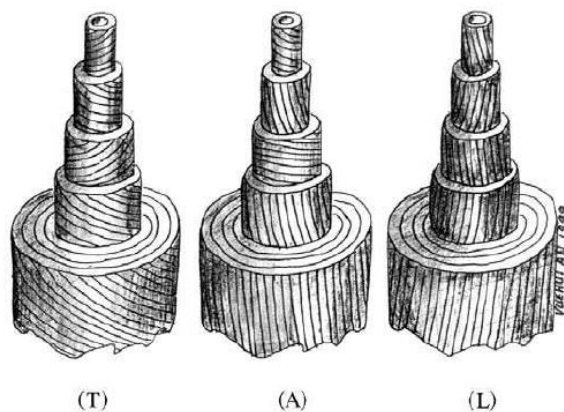


Figura 1.4. Clasificación de osteonas propuesta por Ascenzi y col.1968 [76].

En líneas generales, se encontró que el tipo A de osteonas es el más resistentes al estrés de flexión, el tipo L son fuertes en ensayos de tracción, mientras que las A son las más débiles en este último tipo de ensayo. En cuanto a compresión, el tipo T resultó ser el más fuerte. Este tipo de variaciones se pueden considerar adaptaciones individuales que permiten a los huesos soportar tipos particulares de estrés en diversas situaciones. Usualmente, para realizar los ensayos mecánicos, los huesos corticales son utilizados completos o cortados en probetas. La mayor densidad de los huesos corticales en comparación con los trabeculares los hace ser más fuertes y duros y las propiedades mecánicas dependen del tipo de test que se realice [63].

La naturaleza estructural del hueso trabecular consiste en columnas óseas con poros que pueden ser rellenos con médula u otros elementos [78], [79]. Las propiedades mecánicas del hueso trabecular se ven afectadas por varios factores como densidad, conectividad trabecular, ubicación y función [63]; por otro lado son comúnmente medidas a través de ensayos de compresión, tracción o flexión. El comportamiento en cuanto a resistencia de esfuerzos es mejor en test de compresión que en el test de tensión, propiedades entre las cuales se conocen relaciones como las reportadas por Kaplan y col [80] y Keaveny y col [81], [82]. Existe una fuerte correlación entre la fuerza y dureza del hueso trabecular y su *densidad* [63]. En la comparación con el hueso cortical, las propiedades mecánicas del trabecular suelen resultar menores [73], [83].

1.2 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos se puede definir como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería a las ciencias de la vida en busca del desarrollo de sistemas capaces de reemplazar funcional y estructuralmente los diferentes tipos de tejidos. En la actualidad, se encuentra orientada en hallar soluciones que logren reducir las complicaciones presentadas por los diferentes tratamientos existentes [84]. Este concepto de ingeniería involucra principalmente tres estrategias diferentes: (i) el uso de células aisladas o substitutos celulares para reemplazar determinadas funciones del tejido; (ii) el uso de sustancias inductoras de tejido como los factores de crecimiento; y (iii) andamios para dirigir el desarrollo del tejido. En el caso del tejido óseo, un andamio adecuado actuaría como un sustrato temporal permitiendo el natural desarrollo celular y, por ende, del tejido, imitando tanto en estructura como en función a la matriz extracelular [85].

1.2.1 Biomateriales

Actualmente, según la definición aceptada por la Sociedad Europea de Biomateriales (ESB), un biomaterial es un “material planeado para interactuar con sistemas biológicos con el objetivo de evaluar, tratar, aumentar, o reemplazar algún tejido, órgano o función del organismo”. Este concepto es diferente del primero que se consensuó en 1976 demostrando la evolución que se ha logrado en el campo. Considerando específicamente los andamios, son tres los grandes grupos de materiales de los que podemos hablar a la hora de su fabricación: cerámicos, polímeros sintéticos o polímeros naturales cada uno de los cuales posee ventajas y desventajas por lo que poco a poco se comienzan a desarrollar biomateriales compuestos por combinaciones [86].

1.2.2 Cerámicos

Compuestos cerámicos como HA y fosfato tricálcico, son usualmente utilizados en investigaciones acerca de implantes de tejidos duros ya que poseen características como alta resistencia mecánica, poca elasticidad y una superficie dura [86]. Estos cerámicos son estructuralmente similares a las fases minerales del hueso, hecho que influye mejorando la performance de proliferación y diferenciación de células osteogénicas [87], [88]. A pesar de todo, su aplicación clínica se encuentra limitada debido a factores como la fragilidad y dificultad de dar una forma adecuada para el implante [89]. Además el control de la tasa de degradación es otra de las cuestiones problemáticas actuales a solucionar para su uso [90], [91].

1.2.3 Polímeros sintéticos

Otro camino considerado es la utilización de diferentes polímeros sintéticos, sobre los cuales se controla su arquitectura, degradación y demás propiedades [92]–[94]. En este caso los contratiempos que se han presentado se relacionan con la posibilidad de rechazo del implante por parte del sistema inmune debido a la baja bioactividad, sumado a los productos de degradación de dichos polímeros que pueden resultar perjudiciales para el organismo [95], etc.

1.2.4 Materiales biológicos

Los compuestos naturales son la tercera opción a la hora de considerar las materias primas para los andamios. Ejemplos de estos materiales son el colágeno, algunos proteoglicanos, alginatos o el quitosano; que, a diferencia de los compuestos sintéticos, promueven un alto grado de adhesión y crecimiento. Otra ventaja es que son biodegradables,

por lo que permiten que a lo largo del tiempo, las propias células produzcan la matriz extracelular (MEC) que finalmente los reemplaza. Por otra parte, son materiales que representan un desafío debido a su difícil manejo y reproducibilidad; y suelen tener pobres propiedades mecánicas, lo que limita su uso en aplicaciones que requieran resistencia a los esfuerzos [86].

1.2.5 Combinaciones de materiales

Debido a las complicaciones presentadas por cada uno de las tres opciones, las investigaciones se comenzaron a direccionar hacia combinaciones de materiales. Se han reportado intentos de introducir cerámicos en andamios basados en polímeros [96]–[99], y también combinaciones de polímeros sintéticos con naturales [99], [100] con el objetivo de mejorar su funcionalidad biológica. Aunque estas combinaciones resultan prometedoras, es necesario recordar que al menos una de las dos fases es un producto extraño para el organismo, lo que puede derivar en los ya conocidos problemas como biocompatibilidad, biodegradación o ambos [86].

1.3 Colágeno/gelatina-cerámico: combinación natural en la síntesis del andamio definitivo

En el campo de la ingeniería de tejidos, más específicamente en el desarrollo de andamios estructurales para reparación de lesiones óseas, es de particular interés la combinación del cerámico HA, , con colágeno (Col), una elección natural para un implante óseo ya que en los vertebrados, como mencionamos, las fibrillas de colágeno mineralizado son responsables de la organización jerárquica del hueso y dan cuenta de su fortaleza y resistencia [101]. El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo humano y tiene grandes ventajas: es biodegradable, biocompatible, económicamente accesible y muy versátil. Sin embargo, ya que se trata de una proteína, los cambios conformacionales que sufre en los diferentes procesos y protocolos hacen necesario, ahora más que nunca, el diseño de nuevas rutas viables y perfectamente reproducibles con el fin de que los materiales que se obtengan sean económicamente factibles.

1.3.1 Gelatina

La gelatina es una proteína que se obtiene a partir de la hidrólisis parcial del colágeno. Se la puede obtener, principalmente, a partir de piel, huesos, cartílagos y tejido conectivo blando. Según el tipo de procedimiento que se seleccione para el proceso de hidrólisis se puede obtener gelatina tipo A (ácido) o tipo B (alcalino). Los procesos de manufactura son exhaustivamente controlados logrando las características comunes de gelificación, pudiendo

llegar a obtener, mediante tratamiento enzimático, un compuesto que resulta de muy bajo peso molecular, que puede solubilizarse en agua fría y que no forma geles. Dependiendo del procedimiento, el resultado puede ser un material casi incoloro con propiedades organolépticas neutras o un material crudo pobremente purificado que se utiliza como pegamento animal [102]. Las diferentes propiedades de la gelatina la hacen una proteína muy útil: transición reversible gel-a-sol en solución acuosa, formación de films, permeabilidad al agua, habilidad de actuar como coloide de protección, insoluble en agua fría pero completamente soluble en agua caliente. Además de las mencionadas propiedades es una proteína nutritiva, por lo que se ha abierto camino en la industria de la comida, amén de la farmacéutica y la fotográfica [102].

La gelatina está constituida por moléculas polipeptídicas con pesos moleculares que varían en un amplio rango de aproximadamente 20000-250000 Da (con un promedio aproximado de ≈ 95000 Da) y una similar composición aminoacídica que su predecesor, el colágeno, Figura 1.5. En general tiene un gran contenido de glicina, el menos abundante es la tirosina y el aminoácido esencial, el triptófano, no está presente.

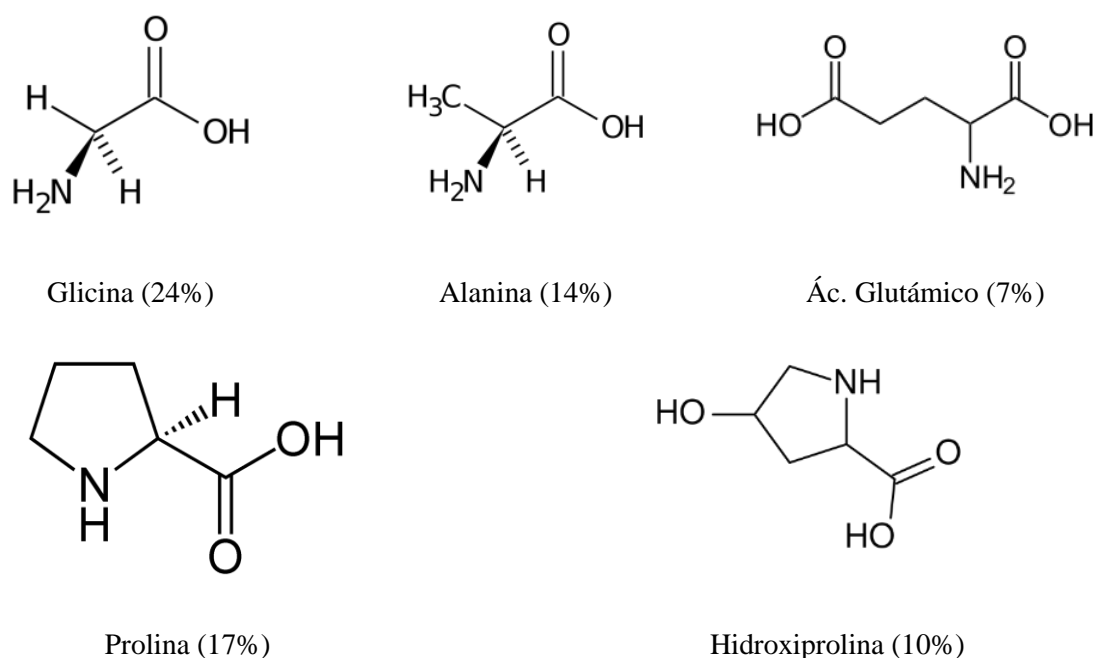


Figura 1.5. Aminoácidos presentes en mayor proporción en la gelatina.

Además de los cinco aminoácidos que mayor presencia tienen, en la gelatina se pueden encontrar, en proporción decreciente, ácido aspártico, lisina, serina, arginina, leucina, valina, fenilalanina, treonina, isoleucina, hidroxilisina, histidina, metionina y tirosina [103], [104].

Al igual que en el colágeno, los aminoácidos se disponen en cadenas de diferente longitud conformando una triple hélice. Dos de esas cadenas poseen una región helicoidal idéntica y son llamadas $\alpha 1$, mientras que la tercera cadena de la triple-hélice tiene diferencias y es llamada $\alpha 2$ [105]. Estas cadenas pueden estar asociadas mediante uniones químicas o fuerzas electrostáticas.

El colágeno es la única proteína natural que contiene el aminoácido hidroxiprolina, en consecuencia, también está presente en la gelatina. Las regiones α del colágeno tienen una secuencia altamente ordenada que colocan a la glicina en cada tercera posición a lo largo de la cadena peptídica [106]. Las cadenas α de la gelatina tienen un comportamiento aleatorio en solución, mientras que en su forma gelificada tienen hasta un 70% de conformación helicoidal [107], que se cree posee interacciones inter e intramoleculares en los propios segmentos de cadena [102].

La gelatina, en comparación con su precursor, tiene menor costo, baja antigenicidad y retiene las señales específicas de información, como el tripéptido ácido arginil glicil aspártico que puede mejorar parcialmente la actividad de adhesión celular [108], [109]. Recientemente, biomateriales basados en gelatina han sido aplicados a pieles artificiales [110], injertos de hueso [111] y andamios para ingeniería de tejidos [112], [113].

1.3.2 Hidroxiapatita (HA)

La HA es uno de los biocerámicos más importantes y, por tanto, más ampliamente utilizado, ya que es químicamente similar al componente de la porción mineral ósea de tejidos duros en mamíferos. De composición $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, los esfuerzos de investigación están siendo dirigidos hacia su uso como sustituto o reemplazo en prácticas biomédicas [114], [115]. Tiene una estructura cristalográfica hexagonal y es uno de los pocos materiales que se encuentran clasificados como bioactivos, lo que significa que puede funcionar como soporte para el crecimiento de tejido óseo al ser utilizado como soporte en aplicaciones ortopédicas y dentales [116].

Es una forma hidroxilada de la apatita, el mineral con fósforo de mayor presencia del planeta que se puede encontrar en diferentes tipos de rocas [117]. Actualmente son exitosos los trabajos de síntesis de fosfatos cálcicos con el objetivo de obtener materiales para regeneración de tejido [118].

1.4 Biorreactores

En el campo de la ingeniería de tejidos, el acoplamiento y organización de células, andamios y complementos fisiológicos que simulen el ambiente tisular se ha convertido en una opción cada vez más considerada. Con una combinación adecuada de factores fisiológicos el crecimiento celular se logra siendo el andamio la estructura de sostén de todo el sistema. Cabe destacar que los andamios son estructuras tridimensionales que pueden presentar dificultades en aspectos como biocompatibilidad, estabilidad mecánica, biodegradación y el proceso conocido como transporte de masas [119].

Los biorreactores, sistemas en los cuales se mantiene un ambiente biológicamente activo, se comenzaron a estudiar con el objetivo de alcanzar el desarrollo de un cultivo celular en tres dimensiones. Sikavitsas y col [120], Figura 1.6, lograron cultivar osteoblastos en matraces de agitación y biorreactores de paredes rotatorias mostrando evidencias de mayor crecimiento celular y procesos de mineralización en comparación con cultivos estáticos. Por otra parte, en los tejidos nativos, las células no se encuentran a una distancia mayor que 10 nm de los capilares sanguíneos [121]; hecho que obliga a considerar la necesidad del transporte de masas cuando se trata con biorreactores. En el campo de cultivo de tejidos, la máxima distancia que puede ser atravesada para lograr el suministro de oxígeno sólo por difusión es de 100-200 nm [122]; lo que deriva en un desafío para los andamios, ya que éstos usualmente no cumplen con este requisito en cultivos *in vitro* [119], [123].

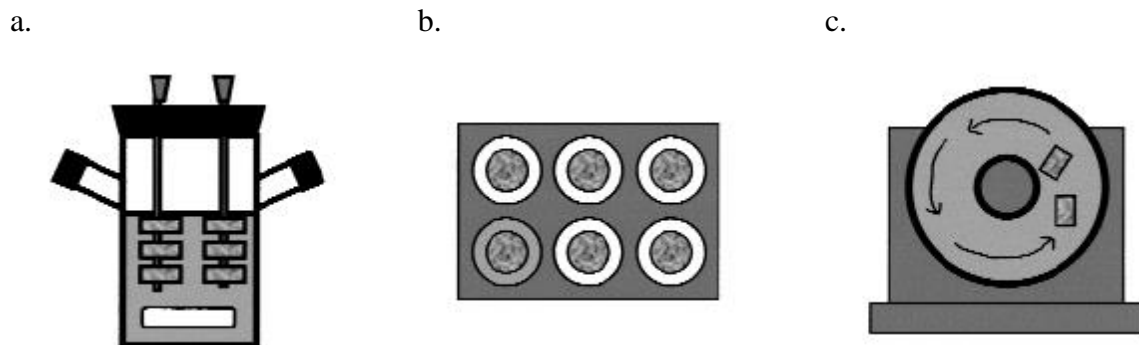


Figura 1.6. Cultivo en matraz giratorio (a), cultivo estático (b) y cultivo en recipiente de paredes giratorias. Figura tomada de Sikavitsas y col. [120].

Recientemente, la ingeniería ósea *in vivo* ha reportado combinaciones de materiales porosos exitosas o soportes de matriz ósea demineralizados con células mesenquimales o proteínas morfogenéticas [124]–[126]. De particular interés para nuestra investigación es el trabajo realizado por Stevens y col [127] en el cual lograron el desarrollo de un biorreactor *in vivo*. En este estudio, crearon biorreactores en la tibia de ratones blancos de Nueva Zelanda

gracias a la generación de un “espacio” entre la superficie de un hueso largo y la membrana llamada periostio, estructura rica en células pluripotentes. Este ambiente fue creado mediante la inyección de un gel de calcio-alginato entrecruzado *in situ*; y debido a su presencia, se generó una respuesta por parte del organismo en la cual la población celular y las señales biomoleculares necesarias para la formación de hueso fueron reclutadas hacia el sitio de la inyección. Este proceso fue luego seguido con el tiempo observándose, luego de 12 semanas, la reconstitución del biorreactor por tejido vivo funcional [127].

Referencias bibliográficas

- [1] P. V Giannoudis, H. Dinopoulos, & E. Tsiridis, “Bone substitutes: an update.,” *Injury*, vol. 36, pp. S20–S27, 2005.
- [2] W. G. De Long, T. A. Einhorn, K. Koval, M. McKee, W. Smith, R. Sanders, & T. Watson, “Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis.,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 89, pp. 649–658, 2007.
- [3] R. Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, & J. P. LeGeros, “Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications.,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 14, pp. 201–209, 2003.
- [4] G. Hannink & J. J. C. Arts, “Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?,” *Injury*, vol. 42, pp. S22–S25, 2011.
- [5] W. J. Landis, F. H. Silver, & J. W. Freeman, “Collagen as a scaffold for biomimetic mineralization of vertebrate tissues,” *J. Mater. Chem.*, vol. 16, pp. 1495–1503, 2006.
- [6] S. J. Lee, G. J. Lim, J.-W. Lee, A. Atala, & J. J. Yoo, “In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration.,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3466–3472, 2006.
- [7] A. L. Boskey, “Biomineralization: conflicts, challenges, y opportunities.,” *J. Cell. Biochem. Suppl.*, vol. 30–31, pp. 83–91, 1998.
- [8] S. Weiner & H. D. Wagner, “THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations,” *Annu. Rev. Mater. Sci.*, vol. 28, pp. 271–298, 1998.
- [9] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, & P. Roschger, “Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone,” *J. Mater. Chem.*, vol. 14, pp. 2115–2123, 2004.
- [10] P. Fratzl & R. Weinkamer, “Nature’s hierarchical materials,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 52, pp. 1263–1334, 2007.

- [11] P. Fratzl, H. S. Gupta, P. Roschger, & K. Klaushofer, “Bone Nanostructure and its Relevance for Mechanical Performance, Disease, and Treatment,” *Nanotechnology*, vol. 5, pp. 345–360, 2009.
- [12] M. . Glimcher, “Composition, structure, and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification,” en *Handbook of Physiology: Endocrinology*, R. O. Greep & E. B. Astwood, Eds. Washington, D.C: American P, 1976, p. 25-116.
- [13] E. G. Canty & K. E. Kadler, “Collagen fibril biosynthesis in tendon: A review and recent insights,” *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 133, pp. 979–985, 2002.
- [14] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, & J. A. Chapman, “Collagen fibril formation,” *J. Biochem.*, vol. 316, pp. 1–11, 1996.
- [15] M. A. Rubin, J. Rubin, & I. Jasiuk, “SEM and TEM study of the hierarchical structure of C57BL/6J and C3H/HeJ mice trabecular bone,” *Bone*, vol. 35, pp. 11–20, 2004.
- [16] G. E. Fantner, T. Hassenkam, J. H. Kindt, J. C. Weaver, H. Birkedal, L. Pechenik, J. a Cutroni, G. a G. Cidade, G. D. Stucky, D. E. Morse, & P. K. Hansma, “Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture.,” *Nat. Mater.*, vol. 4, pp. 612–616, 2005.
- [17] W. J. Landis, “Mineral characterization in calcifying tissues: Atomic, molecular and macromolecular perspectives,” *Connect Tissue Res*, vol. 34, p. 239–246, 1996.
- [18] S. Weiner & W. Traub, “Bone structure: from angstroms to microns.,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 6, pp. 879–885, 1992.
- [19] J. A. Chapman & D. J. Hulmes, “Electron microscopy of the collagen fibril,” en *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*, A. Ruggeri & P. M. Motta, Eds. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984.
- [20] M. van der Rest, “The collagens of bone,” en *Bone, Vol. 3: Bone Matrix and Bone Specific Products*, CRC Press., B. K. Hall, Ed. Boca Raton, FL, 1991.
- [21] A. Veis & B. Sabsay, “The collagen of mineralized matrices,” en *Bone and Mineral Research*, W. A. Peck, Ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987.
- [22] M. Yamauchi, G. S. Chandler, & E. P. Katz, “Collagen cross-linking and mineralization,” en *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, H. Slavkin & P. Price, Eds. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1992.
- [23] J. A. Chapman, “Molecular organization in the collagen fibril,” en *Connective Tissue Matrix*, D. W. C. Hukins, Ed. London: Macmillan, 1984.

- [24] S. M. Seyedin & D. M. Rosen, "Unique bone-derived cytokines," en *Cytokines and Bone Metabolism*, M. Gowen, Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.
- [25] E. Bonucci, G. Silvestrini, & P. Bianco, "Extracellular alkaline phosphatase activity in mineralizing matrices of cartilage and bone: ultrastructural localization using a cerium-based method," *Histochemistry*, vol. 12, pp. 323–327, 1992.
- [26] B. DeBernard, B. Paolo, E. Bonucci, M. Costantini, G. C. Lunazzi, N. Stagni, & F. Vittur, "Biochemical and Immunohistochemical Evidence That in Cartilage an Alkaline Phosphatase Is a Ca²⁺ -binding Glycoprotein Immunofluorescence Microscopy Immunogold Electron Microscopy," *J. Cell Biol.*, vol. 103, pp. 1615–1623, 1986.
- [27] Y. Eeckhout & J. M. Delaisse, "The role of collagenase in bone resorption. An overview.," *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 36, pp. 1139–1146, 1988.
- [28] R. L. Jilka, "Procollagenase associated with the noncalcified matrix of bone and its regulation by parathyroid hormone.," *Bone*, vol. 10, pp. 353–358, 1989.
- [29] A. L. Boskey, "Noncollagenous matrix proteins and their role in mineralization.," *Bone Miner.*, vol. 6, pp. 111–123, 1989.
- [30] W. T. Butler, "Matrix Macromolecules of Bone and Dentin," *Coll. Relat. Res.*, vol. 4, pp. 297–307, 1984.
- [31] S. M. Seyedin & D. M. Rosen, "Matrix proteins of the skeleton," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 74, pp. 914–919, 1990.
- [32] E. Bonucci & G. Silvestrini, "Ultrastructure of the organic matrix of embryonic avian bone after en bloc reaction with various electron-dense 'stains'.," *Acta Anat. (Basel)*, vol. 156, pp. 22–33, 1996.
- [33] J. P. Gorski, "Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms.," *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 9, pp. 201–223, 1998.
- [34] Y. H. An & R. A. Draughn, *Mechanical testing of bone and the bone implant interface*. Y. H. An & R. A. Draughn, Eds, Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [35] G. E. Poinern, R. K. Brundavanam, N. Mondinos, & Z. Jiang, "Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 16, pp. 469–474, 2009.
- [36] C. Hellmich & F. Ulm, "Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracollagenous ultrastructure of mineralized tissues: evidence at the 1 – 10- 1 m

- scale,” *Biomechan. Model Mechanobiol.* 2, vol. 2, pp. 21–36, 2003.
- [37] M. R. Rogel, H. Qiu, & G. A. Ameer, “The role of nanocomposites in bone regeneration,” *J. Mater. Chem.*, vol. 18, pp. 4233–4241, 2008.
- [38] B. Wopenka & J. D. Pasteris, “A mineralogical perspective on the apatite in bone,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 25, pp. 131–143, 2005.
- [39] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, & D. Grossin, *Bioactive Ceramics: Physical Chemistry*. Elsevier Ltd., 2011.
- [40] C. Rey & C. Combes, “Physical chemistry of biological apatites,” en *Biom mineralisation and biomaterials*, C. Aparicio & M.P. Ginebra, Eds, Amsterdam: Elsevier Ltd., 2016.
- [41] V. Uskokovi, “The Role of Hydroxyl Channel in Defining Selected Physicochemical Peculiarities Exhibited by Hydroxyapatite,” *RSC Adv.*, vol 5, pp. 36614–36633, 2015.
- [42] R. A. Robinson, “An electron-microscopic study of the crystalline inorganic component of bone and its relationship to the organic matrix.,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 34–A, pp. 389–435, 1952.
- [43] A. Ascenzi, E. Bonucci, & D. S. Bocciarelli, “An Electron Microscope Study Of Osteon Calcification,” *J. Ultrastruct. Res.*, vol. 12, pp. 287–303, 1965.
- [44] J. Sodek, B. Ganss, & M. D. McKee, “Osteopontin,” *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, vol. 11, pp. 279–303, 2000.
- [45] W. J. Landis, K. J. Hodgens, M. J. Song, J. Arena, S. Kiyonaga, M. Marko, C. Owen, & B. F. McEwen, “Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging.,” *J. Struct. Biol.*, vol. 117, pp. 24–35, 1996.
- [46] P. Roschger, B. M. Grabner, S. Rinnerthaler, W. Tesch, M. Kneissel, A. Berzlanovich, K. Klaushofer, & P. Fratzl, “Structural Development of the Mineralized Tissue in the Human L4 Vertebral Body,” *J. Struct. Biol.*, vol. 136, pp. 126–136, 2001.
- [47] P. Fratzl, N. Fratzl-Zelman, K. Klaushofer, G. Vogl, & K. Koller, “Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle X-ray scattering,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 48, pp. 407–413, 1991.
- [48] A. S. Posner, “The mineral of bone.,” *Clinical orthopaedics and related research*, vol. 200. pp. 87–99, 1985.
- [49] P. Fratzl, M. Groschner, G. Vogl, H. Plenk, J. Eschberger, N. Fratzl-Zelman, K. Koller, & K. Klaushofer, “Mineral crystals in calcified tissues: A comparative study by SAXS,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 7, pp. 329–334, 1992.

- [50] E. Beniash, “Biomaterials — hierarchical nanocomposites: the example of bone,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 3, pp. 47-69, 2011.
- [51] Y. Liu, N. Li, Y. P. Qi, L. Dai, T. E. Bryan, J. Mao, D. H. Pashley, & F. R. Tay, “Intrafibrillar collagen mineralization produced by biomimetic hierarchical nanoapatite assembly,” *Adv. Mater.*, vol. 23, pp. 975–980, 2011.
- [52] D. Gebauer, “Stable Prenucleation Calcium Carbonate Clusters,” *Science*, vol. 120, pp. 1819–1823, 2008.
- [53] E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. A. C. M. Goos, P. M. Frederik, G. De With, & N. A. J. M. Sommerdijk, “The initial stages of template-controlled CaCO₃ formation revealed by cryo-TEM,” *Science*, vol. 323, pp. 1455–1458, 2009.
- [54] H. C. Anderson, “Molecular biology of matrix vesicles.,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 314, pp. 266–280, 1995.
- [55] M. J. Glimcher & H. Muir, “Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds,” *Philos. Trans. R. Soc. B*, vol. 304, pp. 479–508, 1984.
- [56] S. Boonrungsiman, E. Gentleman, R. Carzaniga, N. D. Evans, & D. W. Mccomb, “The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, pp. 14170–14175, 2012.
- [57] A. W. Pederson, J. W. Ruberti, & P. B. Messersmith, “Thermal assembly of a biomimetic mineral/collagen composite,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4881–4890, 2003.
- [58] A. S. Deshpande & E. Beniash, “Bio-inspired Synthesis of Mineralized Collagen Fibrils,” *Cryst. Growth Des.*, vol. 8, pp. 3084–3090, 2008.
- [59] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, & R. Recker, “Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function.,” *Instr. Course Lect.*, vol. 45, pp. 387–399, 1996.
- [60] F. Barrère & C. A. Van Blitterswijk, “Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, pp. 317–332, 2006.
- [61] M. A. Parfitt, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, & R. R. Recker, “Bone Histomorphometry: Standardization,” *J Bone Miner Res.* vol. 2, pp. 595-610, 1987.
- [62] Q. Kang, Y. H. An, H. F. 3rd Butchhorn, & R. J. Friedman, “Morphological and mechanical study on the effects of experimentally induced inflammatory knee arthritis in rabbit long bones.,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 9, pp. 463–473, 1998.

- [63] Y. H. An, “Mechanical Properties of Bone,” in *Mechanical testing of bone and the bone implant interface*, Y. H. An & R. A. Draughn, Eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [64] P. Zioupos & C. W. Smith, “Factors Affecting Mechanical Properties of Bone,” in *Mechanical testing of bone and the bone implant interface*, Y. H. An & R. A. Draughn, Eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [65] T. D. Crenshaw, E. R. Peo, A. J. Lewis, & B. D. Moser, “Influence of Age , Sex and Calcium and Phosphorus Levels on the Mechanical Properties of Various Bones in Swine,” *J. Anim. Sci.*, pp. 1319–1329, 2010.
- [66] L. A. Lawrence, E. A. Ott, G. J. Miller, P. W. Poulos, G. Piotrowski, & R. L. Asquith, “The mechanical properties of equine third metacarpals as affected by age.,” *J. Anim. Sci.*, vol. 72, pp. 2617–2623, 1994.
- [67] O. Lindahl & A. G. H. Lindgren, “Cortical Bone in Man 1. Variation of the Amount and Density with Age and Sex,” *Acta Orthop. Scand.*, vol. 38, pp. 133–140, 1967.
- [68] A. H. Burstein, D. T. Reilly, & M. Martens, “Aging of bone tissue: mechanical properties.,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 58, pp. 82–86, 1976.
- [69] J. C. Wall, S. K. Chatterji, & J. W. Jeffery, “Age-related changes in the density and tensile strength of human femoral cortical bone.,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 27, pp. 105–108, 1979.
- [70] R. W. McCalden, J. A. McGeough, M. B. Barker, & C. M. Court-Brown, “Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure.,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 75, pp. 1193–1205, 1993.
- [71] J. Y. Rho, R. B. Ashman, & C. H. Turner, “Young’s modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements.,” *J. Biomech.*, vol. 26, pp. 111–119, 1993.
- [72] C. E. Hoffler, R. McCreddie, E. A. Smith, & S. A. Goldstein, “A Hierarchical Approach to Exploring Bone Mechanical Properties,” in *Mechanical testing of bone and the bone implant interface*, Y. H. An & R. A. Draughn, Eds. Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [73] J. D. Currey, “The effect of porosity and mineral content on the Young’s modulus of elasticity of compact bone,” *J. Biomech.*, vol. 21, pp. 131–139, 1988.
- [74] M. B. Schaffler & D. B. Burr, “Stiffness of compact bone: effects of porosity and density.,” *J. Biomech.*, vol. 21, pp. 13–16, 1988.

- [75] R. Lazenby, “Porosity-geometry interaction in the conservation of bone strength.,” *J. Biomech.*, vol. 19, pp. 257–258, 1986.
- [76] A. Ascenzi & E. Bonucci, “The compressive properties of single osteons,” *Anat. Rec.*, vol. 161, pp. 377–391, 1968.
- [77] A. Ascenzi, P. Baschieri, & A. Benvenuti, “The Bending Properties of Single Osteons,” *J Biomech*, vol. 23, pp. 763–771, 1990.
- [78] D. R. Carter & W. C. Hayes, “Bone compressive strength: the influence of density and strain rate.,” *Science*, vol. 194, pp. 1174–1176, 1976.
- [79] D. R. Carter & W. C. Hayes, “The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure.,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 59, pp. 954–962, 1977.
- [80] S. J. Kaplan, W. C. Hayes, J. L. Stone, & G. S. Beaupre, “Tensile strength of bovine trabecular bone.,” *J. Biomech.*, vol. 18, pp. 723–727, 1985.
- [81] T. M. Keaveny, X. E. Guo, E. F. Wachtel, T. A. McMahon, & W. C. Hayes, “Trabecular bone exhibits fully linear elastic behavior and yields at low strains.,” *J. Biomech.*, vol. 27, pp. 1127–1136, 1994.
- [82] T. M. Keaveny, E. F. Wachtel, C. M. Ford, & W. C. Hayes, “Differences between the tensile and compressive strengths of bovine tibial trabecular bone depend on modulus.,” *J. Biomech.*, vol. 27, pp. 1137–1146, 1994.
- [83] S. A. Goldstein, “The mechanical properties of trabecular bone: Dependence on anatomic location and function,” *J. Biomech.*, vol. 20, pp. 1055–1061, 1987.
- [84] R. Langer & J. P. Vacanti, “Tissue Engineering,” *Science*, vol. 260, pp. 920-926, 1993.
- [85] H. Zhou & J. Lee, “Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [86] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 14, pp. 88–95, 2011.
- [87] L. L. Hench, “Bioceramics,” *J. Am. Ceram. Soc*, vol. 28, pp. 1705-1728, 1998.
- [88] A. M. Ambrosio, J. S. Sahota, Y. Khan, & C. T. Laurencin, “A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 58, pp. 295–301, 2001.
- [89] M. Wang, “Developing bioactive composite materials for tissue replacement,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 2133–2151, 2003.
- [90] P. Van Landuyt, F. Li, J. P. Keustermans, J. M. Streydio, & F. Delannay, “The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxylapatite,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 6, pp. 8–13, 1995.

- [91] D. C. Tancred, B. A. O. McCormack, & A. J. Carr, "A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone," *Biomaterials*, vol. 19, pp. 2303–2311, 1998.
- [92] L. Lu, S. J. Peter, M. D. Lyman, H. Lai, S. M. Leite, J. A. Tamada, S. Uyama, J. P. Vacanti, R. Langer, & A. G. Mikos, "In vitro and in vivo degradation of porous poly (DL -lactic- co -glycolic acid) foams," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1837–1845, 2000.
- [93] S. H. Oh, S. G. Kang, E. S. Kim, S. H. Cho, & J. H. Lee, "Fabrication and characterization of hydrophilic poly (lactic- co - glycolic acid)/ poly (vinyl alcohol) blend cell scaffolds by melt-molding particulate-leaching method," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4011–4021, 2003.
- [94] A. S. Rowlands, S. A. Lim, & D. Martin, "Polyurethane / poly (lactic- co -glycolic) acid composite scaffolds fabricated by thermally induced phase separation," *Biomaterials*, vol. 28, pp. 2109–2121, 2007.
- [95] H. Liu & T. J. Webster, "Less harmful acidic degradation of poly (lactic- co-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition," *Int. J. Nanomedicine*, pp. 541–545, 2006.
- [96] S. Kim, M. Sun, O. Jeon, C. Yong, & B. Kim, "Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 1399–1409, 2006.
- [97] Y. X. Huang, J. Ren, C. Chen, T. B. Ren, & X. Y. Zhou, "Preparation and Properties of Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/ Nano-Hydroxyapatite (NHA) Scaffolds by Thermally Induced Phase Separation and Rabbit MSCs Culture on Scaffolds," *J. Biomater. Apply*, vol. 22, pp. 409–432, 2008.
- [98] B. Damadzadeh, H. Jabari, M. Skrifvars, K. Airola, N. Moritz, & P. K. Vallittu, "Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly- L - lactic acid and poly- L -lactic-co-glycolic acid composites for medical applications," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 21, pp. 2523–2531, 2010.
- [99] W. Friess & M. Schlapp, "Sterilization of gentamicin containing collagen / PLGA microparticle composites," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 63, pp. 176–187, 2006.
- [100] W. Wu, X. Feng, T. Mao, X. Feng, & H. Ouyang, "Engineering of human tracheal tissue with collagen-enforced poly-lactic-glycolic acid non-woven mesh: A preliminary," *Br J Oral Maxillofac Surg*, vol. 45, pp. 272–278, 2007.
- [101] H. S. Gupta, J. Seto, W. Wagermaier, P. Zaslansky, P. Boesecke, & P. Fratzl, "Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale," *Proc.*

- Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, pp. 17741–17746, 2006.
- [102] T.R. Keenan, “Gelatin,” *Polym. Sci. A Compr. Ref.*, vol 10, pp. 237–247, 2012.
- [103] P. Johns, “The Chemical Examination of Gelatins,” in *The science and technology of gelatin*, A. G. Ward & A. Courts, Eds. London; New York: Academic Press, 1977.
- [104] J. E. Eastoe, “The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin,” *Biochem. J.*, vol. 61, pp. 589–600, 1955.
- [105] H. Kang, B. Faris, & C. Franzblau, “Intramolecular cross-link of chick skin collagen,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 36, pp. 345–349, 1969.
- [106] J. Josse & W. F. Harrington, “Role of Pyrrolidine Residues in the Structure and Stabilization of Collagen” *J. Mol. Biol.*, vol. 9, p. 269-287, 1964.
- [107] G. Stainsby, “Relationship Between Collagen and Gelatin,” in *The Science and Technology of Gelatine*, A. G. Ward and A. Courts, Eds. London, New York: Academic Press, 1977.
- [108] S. M. Lien, L. Y. Ko, & T. J. Huang, “Effect of crosslinking temperature on compression strength of gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, pp. 631–635, 2010.
- [109] F. Zhang, C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo, & J. Wang, “Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 48, pp. 474–481, 2011.
- [110] M. B. Dainiak, I. U. Allan, I. N. Savina, L. Cornelio, E. S. James, S. L. James, S. V. Mikhailovsky, H. Jungvid, & I. Y. Galaev, “Gelatin-fibrinogen cryogel dermal matrices for wound repair: Preparation, optimisation and in vitro study,” *Biomaterials*, vol. 31, pp. 67–76, 2010.
- [111] S. J. Ding, M. Y. Shie, & C. K. Wei, “In vitro physicochemical properties, osteogenic activity, and immunocompatibility of calcium silicate-gelatin bone grafts for load-bearing applications,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 3, pp. 4142–4153, 2011.
- [112] A. Ovsianikov, A. Deiwick, S. Van Vlierberghe, P. Dubrue, L. Möller, G. Drager, & B. Chichkov, “Laser fabrication of three-dimensional CAD scaffolds from photosensitive gelatin for applications in tissue engineering,” *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 851–858, 2011.
- [113] C. N. Grover, R. E. Cameron, & S. M. Best, “Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 10, pp. 62–74, 2012.

- [114] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. Xu, F. Lam, K. C. Tan, & T. C. Lim, “State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective,” *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 1, pp. 245–260, 2007.
- [115] W. J. E. M. Habraken, J. G. C. Wolke, & J. A. Jansen, “Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, pp. 234–248, 2007.
- [116] X. Lu, H. Zhang, Y. Guo, Y. Wang, X. Ge, Y. Leng, & F. Watari, “Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO₂ nanotubes under urea,” *CrystEngComm*, pp. 3741–3749, 2011.
- [117] N. H. De Leeuw, J. R. Bowe, & J. A. L. Rabone, “A computational investigation of stoichiometric and calcium-deficient oxy- and hydroxy-apatites,” *Faraday Discuss*, vol. 134, pp. 195–214, 2007.
- [118] N. L. D’Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, pp. 5014–5026, 2013.
- [119] A. G. Mikos, L. Lu, J. S. Temenoff, & J. K. Tessmar, “Synthetic Bioresorbable Polymer Scaffolds,” in *Biomaterials Science 2nded*, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, Eds. Elsevier, 2004.
- [120] V. I. Sikavitsas, G. N. Bancroft, & A. G. Mikos, “Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, pp. 136–148, 2002.
- [121] L. Sherwood, *Human Physiology: From Cells to Systems, 7thed*. Brooks Cole, 2008.
- [122] D. Fassnacht & R. Pörtner, “Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed-bed reactors,” *J. Biotechnol.*, vol. 72, pp. 169–84, 1999.
- [123] I. Martin, D. Wendt, & M. Heberer, “The role of bioreactors in tissue engineering,” *Trends Biotechnol.*, vol. 22, pp. 80–86, 2004.
- [124] W. Paul & C. P. Sharma, “Ceramic Drug Delivery: A Perspective,” *J. Biomater. Appl.*, vol. 17, pp. 252–264, 2003.
- [125] P. Warnke, I. Springer, P. J. Wiltfang, P. Y. Acil, P. H. Eufinger, M. Wehmöller, P. Russo, H. Bolte, E. Sherry, E. Behrens, & P. H. Terheyden, “Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man,” *Lancet*, vol. 364, pp. 766–770, 2004.

- [126] C. A. Simmons, E. Alsberg, S. Hsiong, W. J. Kim, & D. J. Mooney, “Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells,” *Bone*, vol. 35, pp. 562–569, 2004.
- [127] M. M. Stevens, R. P. Marini, D. Schaefer, J. Aronson, R. Langer, & V. P. Shastri, “In vivo engineering of organs: the bone bioreactor.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, pp. 11450–11455, 2005.

Capítulo 2

Objetivo General

La presente propuesta estudiará nuevas estrategias biomiméticas de síntesis de materiales híbridos (inorgánico-orgánico) en base al auto-ensamblado molecular de gelatina, proteína derivada por hidrólisis del colágeno, e hidroxiapatita cristalina, un fosfato cálcico similar a la apatita presente en el tejido óseo, en vistas a sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Se busca estudiarlos a partir de un nuevo acercamiento al proceso básico de formación de tejidos mineralizados y llevar al desarrollo de un nuevo material nanoestructurado para reparación y regeneración de tejidos duros.

Objetivos Específicos

1. Estudiar la biocompatibilidad de los nanorodillos de HA sintetizados en el laboratorio mediante diferentes ensayos:
 - a. Proliferación celular.
 - b. Diferenciación celular.
 - c. Morfología celular.
 - d. Expresión de mRNA indicador de linaje osteoblástico.
2. Estudiar la interacción y evolución hidrodinámica de soluciones confeccionadas a partir de diferentes concentraciones de gelatina y distintas cantidades de HA controlando funcionalidad, densidad, orden molecular y composición, además de su respuesta a perturbaciones externas (pH, Temperatura).
3. A partir de los resultados de los estudios correspondientes a los incisivos anteriores, realizar la síntesis definitiva de estructuras a modo de andamios y su adecuada caracterización.
4. Estudiar la bioactividad de los andamios en suero fisiológico simulado.
5. Caracterizar mecánicamente los andamios preparados y comprobar su compatibilidad con el tejido óseo, con este fin se realizarán:
 - a. Ensayos de compresión a diferentes velocidades.
 - b. Ensayos de tracción a diferentes velocidades.
6. Evaluar la posibilidad de aplicación de los andamios preparados para actuar como biorreactores óseos.

Capítulo 3

Influencia de nanorodillos de HA en la viabilidad y diferenciación de células madre mesenquimales adiposas humanas (hADSCs)

La ingeniería de tejido en las últimas décadas se ha convertido en un área de la ciencia que nos despliega una opción para la regeneración ósea en lugar de la sustitución mediante el uso de estructuras tridimensionales (3D) o matrices enriquecidas que pueden proveer de manera autóloga el sistema de reparación y regeneración de hueso a grandes volúmenes. Estas matrices 3D deben contar con dos elementos básicos: I) células autólogas con propiedades osteoinductivas, tales como las células mesenquimales y, II) una matriz con capacidad osteoconductiva y osteoinductiva. A lo largo de este capítulo, como punto de partida de nuestras investigaciones y paso previo a la formación de un andamio con potencial para la regeneración tisular, se estudió la influencia de los nanorodillos de hidroxiapatita (HA), esencial componente del mismo, en la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo (del inglés Human Adipose Derived Stem Cells, hADSCs). Durante este estudio se comprobó que la matriz nanoestructurada de HA ofrece, simultáneamente, un soporte físico y un ambiente biológicamente activo para la adhesión, supervivencia y diferenciación osteogénica de las hADSCs induciendo progresivamente la formación de una nueva matriz mineral.

3.1 Hidroxiapatita sintética nanoestructurada

La HA sintética presenta una serie de ventajas respecto de otros cristales como buena biocompatibilidad, lenta degradación *in situ* y buena capacidad osteoconductiva / osteoinductiva que, junto con su conocida similitud al componente inorgánico óseo y su fuerte afinidad con los tejidos de los hospedadores, la hacen un candidato ideal para la construcción de implantes dentales y ortopédicos [1], [2]. Sin embargo, posee pobres propiedades mecánicas en cuanto al soporte de cargas, sobre todo en ambientes húmedos, lo que limita su uso en aplicaciones relacionadas con esfuerzos [3]. Al conferirles una nanoestructura la HA adquiere sinterabilidad y densificación mejorada debido a su gran

superficie lo que deriva en el incremento de sus propiedades mecánicas como resistencia a la fractura [4].

Como producto del trabajo del grupo de investigación de Materiales Nanoestructurados, se desarrolló una síntesis de HA que ha permitido obtener cuatro materiales organizados jerárquicamente, bioactivos, biocompatibles y con forma de rodillo de 25-50 nm de longitud [5]. A continuación se resumen sus características de mayor relevancia, las cuales son naturalmente deseables de reproducir en materiales pensados para ingeniería de tejidos con el fin de imitar la estructura y funciones biológicas de la matriz extra celular (MEC).

Los cuatro materiales preparados difieren en el polímero empleado en su síntesis; polipropilenglicol (PPG), polietilenglicol 400 (PEG 400), polietilenglicol-bloque-polipropilenglicol-bloque-polietilenglicol (PEG-PPG-PEG) y Octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL® CA 630) fueron utilizados dando origen a HA1, HA2, HA3 y HA4 respectivamente.

El análisis morfológico de los mismos mostró que presentan un aspecto reticular formado mediante el autoensamblado de nanopartículas con forma de rodillos y de similares relación de aspecto (largo/diámetro). Todos los materiales resultaron cristalinos, pudiendo ser indexados en la HA hexagonal con caras cargadas positiva y negativamente. Por otro lado, presentan relaciones Ca/P de 1,92; 1,97; 1,62 y 2,04 para HA1, HA2, HA3 y HA4 respectivamente. De ellos, HA3 es el único que presentó un valor comparable a la HA estequiométrica, mientras que el exceso de calcio en los restantes fue adjudicado a $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Si bien a simple vista los materiales parecen similares, un análisis más profundo demostró que la organización de los nanorodillos es diferente lo cual da lugar a distintas propiedades topográficas. En líneas generales, la topografía de los materiales está caracterizada por diferentes sucesiones de picos y valles. Puntualmente, los parámetros analizados [5] evidenciaron perfiles con la presencia de valles rellenos y picos altos. La relación entre el número de picos y valles de los materiales HA1, HA2 y HA3 indicó relativamente pocos picos y valles poco profundos, mientras que el HA4 está caracterizado por muchos picos y valles poco profundos. Las superficies de HA3 y HA4 son más suaves que las de HA1 y HA2, que mostraron una superficie más irregular [5]. Esta diferencia topográfica influencia el contacto posterior entre el implante y el hueso conocido como bioactividad. Para la evaluación de este aspecto, de acuerdo a Kokubo y col [6], [7], se sumergen los materiales en suero fisiológico simulado (del inglés Simulated Body Fluid, SBF); proceso en el cual se debe formar un recubrimiento de fosfatos cálcicos sobre los materiales.

Capítulo 3: Influencia de nanorodillos de HA en la viabilidad y diferenciación de células madre mesenquimales adiposas humanas (hADSCs)

Específicamente, la cubierta desarrollada sobre HA1 presentó forma esferulítica con núcleos de aproximadamente 3-5 μm de diámetro compuestos a partir de clusters de cristales con forma de plato y 150 nm de largo. Además, HA1 y su recubrimiento superficial exhibieron una relación Ca/P cercana a la encontrada en el hueso trabecular [8] y una morfología, según Kokubo y col [9], esencial para una buena bioactividad. Mientras que HA3 y HA4 mostraron la formación de una fase con estructura de red y una relación Ca/P cercana a uno, HA2 evidenció una relación también cercana a la del hueso trabecular y recubrimientos con formas esféricas.

Asimismo, los materiales HA1 y HA2 demostraron poseer una superficie hidrofílica precisa y una tasa de degradación óptima en condiciones ácidas mediadas por células; características que permitieron un normal crecimiento y diferenciación de células óseas in vitro [10], junto con una coagulación acelerada de plasma empobrecido en plaquetas de una manera dependiente de la dosis [10].

3.2 Células madre derivadas de tejido adiposo (hADSCs)

Los esfuerzos de varias disciplinas se combinan para lograr los mejores resultados en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos. La reparación de diferentes tejidos es un aspecto de sumo interés cuando los materiales biomiméticos de soporte son correctamente construidos [11]. Considerando la estrategia de medicina regenerativa que combina la terapia basada en células con el uso de biomateriales, la atención se ha centrado en células madre adultas [12], como pueden ser las células madre mesenquimales de médula ósea (del inglés bone marrow–mesenchymal stem cells BM-MSCs) con las que se han obtenido resultados promisorios en ensayos clínicos [13]–[15].

Otro tipo celular reconocido son las hADSCs, que cuentan con algunas ventajas terapéuticas sobre las BM-MSC [16]. Es conocida la capacidad del tejido adiposo de realizar considerables cambios a lo largo de la vida, como lo es la generación de nuevos adipocitos [17], [18]. Este proceso es factible debido a la presencia de una población de células madre y progenitoras con una alta capacidad proliferativa y el alto potencial de diferenciación [19], [20] lo que lo ha convertido en un tejido de interés [21]–[23]. A partir de diversos estudios se conoce que estas células madre poseen propiedades similares a las de las células madre mesenquimales (del inglés mesenchymal stem cells MSCs) [24]–[29].

Las ADSCs aisladas a partir del estroma poseen gran similitud con las BM-MSCs, ya que expresan los mismos marcadores de superficie, poseen similares perfiles de expresión genética y potenciales de diferenciación. El tejido adiposo se caracteriza por ser abundante y

accesible, proporcionando mucha mayor cantidad de células por gramo que la médula ósea (5.000 vs. 100-1.000 células g⁻¹) con menor riesgo durante el proceso de obtención [30].

Rodbell, 1964 describió por primera vez el aislamiento de una población celular de tejido adiposo en roedores [31], mientras que estudios de diferenciación celular fueron realizados con éxito a partir de células de tejido adiposo de ratas adultas [32]. La lipoaspiración es un procedimiento que ha facilitado la obtención de tejido adiposo [33] y, debido a una modificación en los métodos de aislamiento a partir de materiales de deshecho, el tejido adiposo humano pudo ser procesado para la obtención de poblaciones celulares de fibroblastos en un proceso llamado lipoaspirado. Estas células obtenidas a partir del lipoaspirado se pudieron mantener *in vitro*, con baja senescencia y, mediante diferentes técnicas, fue confirmado su origen mesodérmico o mesenquimal [25]. Las ADSCs representan una fuente confiable para el aislamiento de células madre potencialmente útiles. Las células madre obtenidas a partir del lipoaspirado presentan pre-adipocitos capaces de diferenciar *in vitro* en diferentes linajes mesenquimales dando muestras de una gran plasticidad al mismo tiempo que de autorenovación [34]. Con el agregado de los correspondientes factores de crecimiento, las células de tejido adiposo tienen el mismo potencial de crecimiento y diferenciación en diversos linajes que las células madre mesenquimales totipotentes de médula [35].

Gracias a la recurrencia de la práctica de la liposucción en nuestros días, la obtención de grandes cantidades de tejido adiposo con bajo riesgo es relativamente sencilla, además de la prescindibilidad del tejido removido de los pacientes [36]. Por otro lado, luego de digerido el tejido adiposo con colagenasa es posible obtener, proporcionalmente, un mejor rendimiento con las ADSCs que con las MSCs. Estudios han demostrado que para alcanzar la confluencia en 5-7 días se requiere una menor cantidad de ADSCs que de MSCs por centímetro cuadrado [37], [38] [39], [40]. Cabe destacar que la biología de ambos tipos celulares es similar; los dos linajes expresan marcadores de superficie similares como CD105, SH3 o CD90 [24], [27], [28], [39], [40].

En cuanto a la osteogénesis, las ADSCs pueden diferenciar *in vitro* en osteoblastos capaces de depositar una matriz extracelular de la misma manera que las MSCs. En determinadas condiciones de cultivo, a 14 y 21 días, se observó que las ADSCs expresan múltiples marcadores osteogénicos como fosfatasa alcalina, osteopontina y colágeno tipo I [26], [41]. Lu y col., 2006 demostraron que la combinación de tejido adiposo y andamios de colágeno tipo I es útil en el reemplazo de tejidos dañados [42]. En otro estudio, Zhang y col., 2007 lograron adhesión, crecimiento y proliferación de ADSCs en andamios de colágeno tipo

Capítulo 3: Influencia de nanorodillos de HA en la viabilidad y diferenciación de células madre mesenquimales adiposas humanas (hADSCs)

I debido a su gran compatibilidad celular [43]. Además de la compatibilidad, la composición química, estabilidad mecánica y arquitectura 3D del andamio son aspectos fundamentales para la ingeniería de tejidos con ADSCs de modo de poder garantizar penetración, proliferación y diferenciación celular en la estructura [44]. Dragoo y col., 2003 determinaron que la transducción con la información de la proteína morfogenética del hueso 2 (BMP2) resultó en la producción de hueso ectópico [45]. Lendeckel y col., 2004 utilizaron para un tratamiento regenerativo de defectos de calvaria una combinación de hueso esponjoso ilíaco autólogo, ADSCs, pegamento de fibrina y un andamio biodegradable [46]; el estudio realizado luego del implante evidenció formación de hueso. En un estudio de pacientes con la enfermedad de Crohn, pudieron ser cerradas aperturas en fístulas utilizando ADSCs autólogas [47].

Considerando lo expuesto se puede decir que las ADSCs se han convertido en una opción promisoriosa para terapias que utilizan células para el tratamiento de diferentes dolencias. Por estas razones, es esperable que las ADSCs se conviertan en una muy buena alternativa para aplicaciones clínicas futuras y reconstrucción de tejidos [30].

Los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería de tejido óseo inspiradas en mecanismos de reparación endógenos. Los reportes existentes y pruebas clínicas señalan que las ADSCs en andamios 3D podrían ser una alternativa potencial en reparación de heridas [48], implantes cardiovasculares [49], [50], reparación de tejido ortopédico [51], ingeniería oral y maxilofacial [52] y reconstrucción plástica post-cirugía [53].

3.3 Materiales y métodos – Nanorodillos de HA

3.3.1. Reactivos

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, PM = 364,48 g / mol, 99% Sigma-Aldrich); poli(etilen-glicol) 400 (PEG 400, Sigma-Aldrich, PM = 380–420 g / mol, δ = 1,126 g / mL a 25 °C); poli(propilen-glicol) (PPG, Sigma-Aldrich, PM = 425 g / mol, δ = 1,004 g / mL a 25 °C); fosfato de sodio (Na_3PO_4 , PM = 148 g / mol, 96% Sigma-Aldrich); cloruro de calcio (CaCl_2 , PM = 91 g / mol, 99% Sigma-Aldrich); nitrito de sodio (NaNO_2 , PM = 69 g / mol, 97% Sigma-Aldrich); dimetilsulfóxido (DMSO, PM = 78,13 g / mol, δ = 1,1 g / mL a 25°C, 99% Sigma-Aldrich); alcohol isopropílico (IprOH, PM = 60,10 g / mol, δ = 0,78 g / mL a 25°C, 99.5% Sigma-Aldrich); etanol (EtOH, PM = 46,07 g / mol, δ = 0,78 g / mL a 25°C, 96% Sigma-Aldrich); paraformaldehído (PFA, PM = 30,03 g / mol (como monómero), Sigma-Aldrich) fueron utilizados sin purificaciones. Bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2

5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma-Aldrich, 5mg / mL); solución salina fosfatada (del inglés phosphate buffered saline, PBS sin Ca/Mg, EuroClone, Milan, Italy); solución Tripsina-EDTA (tripsina-EDTA, EuroClone, Milan, Italy); solución de Rojo de Alizarina S (ARS, Sigma-Aldrich). Medio de Eagle Completo Modificado por Dulbecco (del inglés Dulbecco's modified Eagle's medium, cDMEM) compuesto por Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Lonza S.r.l., Milano, Italy) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (del inglés Fetal Bovine Serum FBS, Bidachem S.p.A., Milano, Italy) y 1% Penicilina/Estreptomicina (P/S, EuroClone). Medio de diferenciación osteogénico (del inglés Osteogenic differentiation medium ODM) fue compuesto de cDMEM suplementado con 10 ng / mL Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (del inglés Fibroblast Growth Factor, FGF-2, ProSpec, East Brunswick, NJ, USA), β -glicerofosfato 10 mM (Sigma-Aldrich), y dexametasona 10 nM (Sigma-Aldrich). Solución de fijación para SEM: glutaraldehído 2,5% (GA) en buffer cacodilato (CAC) 0,1 M (2,5% GA -0,1M CAC, Poly Scientific R E D Corp., USA). Kit de ensayo para actividad de fosfatasa alcalina (del inglés Alkaline Phosphatase Assay activity kit, ALP kit, Abcam, ab83369). Para el recuento de RNA total (tRNA) se utilizaron procedimientos de aislamiento de ADN complementario (cDNA) y PCR en tiempo real mediante el kit de purificación Total de ARN (del inglés Total RNA Purification Plus Kit, tRNA - ppKit, Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada); kit de síntesis de cDNA (sFASTTM - cDNAsKit, Bioline, London, UK) y SensiFASTTM SYBR No-ROX Kit (sFASTTM - sNorKit, Bioline, London, UK). Para la preparación de las soluciones, fue utilizada solo agua Milli-Q[®] estéril. Para todos los experimentos fue utilizado el pasaje dos (P2) celular.

3.3.2. Síntesis de nanorodillos

En el contexto de nuestro estudio, para la síntesis de nanopartículas de hidroxipatita (nanorodillos de 8 ± 1 nm de diámetro y 25-50 nm de longitud) se utilizaron únicamente PPG y PEG debido a los resultados obtenidos por D'Elía y col siguiendo el protocolo correspondiente [5]. Como primer paso, 350 mL de una solución acuosa de CTAB fue mezclada con 20 mL de PPG o PEG y agitada a 500 rpm durante 10 minutos. En segundo lugar, 200 mL de una solución acuosa 2M de nitrito de sodio fue incorporada. Secuencialmente se agregaron 2,2 g de cloruro de calcio. Finalmente 200 mL de una solución acuosa 0,14M de NaPO₄ fueron agregados gota a gota a temperatura ambiente y bajo agitación a 500 rpm. Luego de la integración de todos los reactivos, la solución final fue agitada magnéticamente por una hora. Los geles resultantes fueron tratados en autoclave a

100°C por 24 horas. Finalmente, los materiales obtenidos fueron filtrados y lavados con agua tridestilada para remover impurezas. Como último paso el surfactante fue removido por la técnica de extracción con disolvente ácido [54], [55].

3.3.3 Dispersión de HA nanoestructuradas y formación de recubrimiento

Los recubrimientos nanoestructurados se obtuvieron por el autoensamblaje de nanorodillos de HA de 8 ± 1 nm de diámetro y 28 ± 3 nm de longitud. Dos materiales diferentes, para los que se usaron como molde redes estructuradas de CTAB-PPG y CTAB-PEG-400 y llamados HA1 y HA2 respectivamente fueron evaluados. La interacción sinérgica de cada sistema resulta en estructuras organizadas jerárquicamente que exhiben diferentes características en cuanto a su micro-rugosidad [5], [10]. Previo a su uso, los dos tipos de materiales fueron esterilizados en autoclave a 120°C por 30 minutos. Luego, se preparó una dispersión de (71,42 $\mu\text{g} / \text{mL}$) colocando los materiales en un agitador rotatorio junto con agua Milli-Q estéril por 5 minutos.

3.3.4 Recubrimientos nanoestructurados de HA

Cada pocillo utilizado de una placa multiwell de 24 ($2 \text{ cm}^2 / \text{ pocillo}$), con fondo plano, fue cubierto con la cantidad adecuada de la dispersión de material en agua Milli-Q® para alcanzar el nivel de cubierta final citocompatible de $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nano-HA [10]. Las cubiertas de material se dejaron secar por la noche en agitación en una cabina de seguridad biológica para obtener una distribución final homogénea en el fondo del pocillo. Para microscopía electrónica de barrido (del inglés, Scanning Electron Microscopy, SEM) y coloración con Rojo de Alizarina S (del inglés Alizarin Red S, ARS), las cubiertas se realizaron en cubreobjetos circulares de 1,2 cm de diámetro que luego se colocaron en cada pocillo. La distribución homogénea y adhesión de los nanomateriales sobre la superficie se comprobó mediante microscopía óptica (Leica DM IRB).

3.4. Materiales y métodos – Ensayos de Biología celular

3.4.1. Aislamiento y cultivo celular

Las hADSCs fueron aisladas a partir de tejido adiposo de pacientes sanos (edad: 21-36; Índice de Masa Corporal: 30-38) sometidos a cirugía estética de acuerdo a la reglamentación de cirugía plástica de la Universidad de Padova, Italia. De acuerdo con la Declaración de Helsinki, fue obtenido el consentimiento de todos los pacientes por escrito previa inclusión en este estudio. El tejido adiposo fue digerido y las células cultivadas de acuerdo con el procedimiento descrito en Pozzuoli y col. [56]. Cuando las hADSCs pasaje 2 (p2)

estuvieron en confluencia, fueron tomadas mediante tratamiento con tripsina (tripsina/EDTA, EuroClone, Milan, Italia), y cultivadas.

3.4.2. Cultivo de hADSCs sobre recubrimientos nanoestructurados de HA

Lotes simultáneos de hADSCs fueron cultivados con una densidad de 3×10^4 células / cm^2 por pocillo, con fondo plano, ya sea en ODM o cDMEM sobre los recubrimientos de HA y fueron analizados luego de transcurridos 7 y 21 días [57], [58]. El medio de cultivo correspondiente fue cambiado dos veces por semana. Los experimentos fueron desarrollados por triplicado.

3.4.3. Actividad metabólica mitocondrial y ensayos de viabilidad

La viabilidad de las hADSCs cultivadas sobre recubrimientos de HA1 y HA2 fue evaluada luego de 7 y 21 días ya sea en ODM o cDMEM mediante el ensayo de toxicidad basado en MTT, como se describió en Denizot y Lang [59]. Las hADSCs con un metabolismo activo, tienen la capacidad de reducir el MTT en un producto de coloración azul-violácea que puede ser solubilizado y cuantificado por medios espectrofotométricos. Cuando las células mueren, esta capacidad se pierde, por lo que esta técnica es un marcador de células metabólicamente activas [60], [61]. Este ensayo se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la actividad metabólica mitocondrial (del inglés mitochondrial metabolic activity, MMA) de las hADSCs e, indirectamente, su viabilidad cuando son cultivadas en presencia de los materiales preparados [61]. Luego del período de cultivo, (7 o 21 días), las células fueron incubadas con 1 mL de una solución 0,5 mg / mL de MTT-PBS por 3 horas a 37°C en ambiente controlado (5% CO_2). Luego de ello, la solución fue removida y cada una de las muestras se extrajo con 0,5 mL de una solución DMSO 10% en IprOH por 30 minutos a 37°C. Para cada muestra, alícuotas de 200 μL , por duplicado, fueron usadas para medidas de densidad óptica (DO) obtenidas a 570 nm mediante un Lector de Multiplaca Multidetectores (Victor 3, Perkin Elmer, Milano, Italy). La absorbancia de los pocillos recubiertos fue utilizada como blanco.

3.4.4. Análisis del crecimiento y morfología de hADSCs: proliferación, localización y adhesión

La distribución homogénea y adhesión de los nanomateriales de HA en el fondo de los pocillos luego del sembrado de las células fue comprobado a través de microscopía óptica (Leica DM IRB). Células sembradas en pocillos sin recubrimiento fueron utilizadas como control (C).

3.4.5. Estudio de la actividad de fosfatasa alcalina

La actividad intracelular de la fosfatasa alcalina (del inglés Alkaline Phosphatase, ALP) de las ADSCs cultivadas en contacto con los recubrimientos de los diferentes nanorodillos por 7 y 21 días en ODM o cDMEM, fue estudiada utilizando el kit de ensayo colorimétrico Fosfatasa Alcalina (Abcam). De acuerdo al protocolo del fabricante, las células sobre el material fueron lavadas con PBS, homogeneizadas con buffer de ensayo ALP (300 μ L en total para cada grupo), luego centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos para remover el material insoluble. Posteriormente, diferentes volúmenes de las muestras fueron colocados en placas de 96 pocillos llevando, con buffer de ensayo, a un volumen final de 80 μ L, a cada una de las muestras. A continuación, fueron añadidos 50 μ L de p-nitrofenil fosfato (pNPP) 5 mM a cada uno de los pocillos e incubados por 60 minutos a 25°C y en oscuridad. Una curva de calibrado de 0, 4, 6, 12, 16 y 20 nmol / pocillo fue generada a partir de una solución estándar 1 mM de pNPP llevando a un volumen final de 120 μ L con buffer de ensayo. Luego de la detención de todas las reacciones con 20 μ L de solución Stop los valores de DO fueron tomados a $\lambda_{\max} = 405$ nm en un lector de placas (Victor 3, Perkin Elmer, Milano, Italy). Los resultados fueron normalizados sustrayendo el valor obtenido de los estándares a todos los valores. La curva estándar pNPP fue confeccionada para identificar la concentración de pNPP en cada muestra. La actividad ALP de las muestras fue calculada de la siguiente manera:

$$FAL_{actividad} \left(\frac{U}{mL} \right) = \frac{A/V}{T}$$

donde A es la cantidad de pNPP generado por las muestras (en μ mol), V es la cantidad de muestra añadida en el pocillo (en mL), y T es el tiempo de reacción (en minutos).

3.4.6. Coloración con Rojo de Alizarina S

Los depósitos minerales intracelulares fueron detectados con la coloración Rojo de Alizarina S. Las hADSCs cultivadas en contacto con la cubierta de los diferentes nanorodillos por 7 y 21 días en ODM o cDMEM se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS y temperatura ambiente durante 10 minutos. Las células fueron coloreadas con 40 mM de solución fresca de ARS (Sigma-Aldrich), pH 4,2, por diez minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Finalmente, fueron lavadas con agua Milli-Q[®] estéril y luego observadas con un microscopio óptico Leica DM4000 M anexo a una computadora.

3.4.7. Microscopía Electrónica de Barrido - Estudio de la micro-morfología de las hADSCs

Para el análisis de la micromorfología de hADSCs luego de la interacción con los nanomateriales y la obtención de las imágenes SEM; las hADSCs cultivadas en contacto con la cubierta de los diferentes nanorodillos por 7 y 21 días en ODM o cDMEM fueron fijadas en glutaraldeído 2,5% en una solución reguladora cacodilato 0,1M por una hora, para luego ser deshidratadas progresivamente en etanol de acuerdo con el protocolo SEM para muestras biológicas [62]. Las muestras se inmovilizaron con cinta de carbón de doble cara, recubrieron con oro (Edwards S150A, sputter coating unit, Edwards, Crawley, UK) y observaron con SEM (JEOL JSM-6490LV, JEOL, Tokio, Japan). El microanálisis de fluorescencia de rayos X proveyó información cualitativa sobre la composición elemental de la superficie.

3.4.8. Aislamiento total de RNA y Real Time PCR

Con el objetivo de confirmar la inducción osteogénica, el RNA total fue aislado con un Kit de Purificación Total de RNA (Norgen Biotek Corp., Thorold, ON, Canada) a partir de hADSCs cultivadas con HA1 (PPG) y HA2 (PEG) por 7 y 21 días en ODM y cDMEM. Para evaluar calidad y concentración de las muestras de RNA fue utilizado un NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

El DNA complementario (cDNA) fue obtenido a partir de 500 ng del total de RNA usando el Kit de Síntesis SensiFAST™ (Bioline, Londres, RU) siguiendo el protocolo del fabricante. Las Real Time PCR se desarrollaron en un Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia) utilizando 400 nM de los cebadores diseñados y el Kit SensiFAST™ SYBR No-ROX (Bioline). Los valores fueron normalizados respecto de la expresión del gen constitutivo del receptor de transferrina (TFRC) y las diferencias en la expresión evaluadas por el método $2\Delta\Delta C_t$ [63]. Las secuencias de los primers humanos están detalladas en la Tabla 3.1.

3.4.9 Análisis estadístico

Todos los test cuantitativos fueron desarrollados, por lo menos, en triplicado, calculados valores medios y desvío estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). Test-t de Student con probabilidad de error menores de 0,05 ($p < 0,05$) fueron considerados significativamente diferentes. Los datos cuantitativos se expresan como media \pm desvío estándar (SD).

Tabla 3.1. Secuencias primer humanas usadas en el estudio de PCR. ALPL, fosfatasa alcalina, hígado/hueso/riñón; BMP2, proteína morfogenética de hueso 2; COL1A1, colágeno, tipo I, alfa 1; OC, osteocalcina; ON, osteonectina; OPG, osteoprotegerina; OPN, osteopontina; OSX, osterix; RANKL, ligando del receptor activador para el factor nuclear $\kappa \beta$; RUNX2, factor de transcripción 2 relacionado con runt; SOST, esclerostina; TFRC, receptor de transferrina; FGF-2, factor de crecimiento de fibroblastos.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia primer (5' - 3')</i>	
<i>Símbolo</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Desarrollo esquelético</i>		
ALPL	GGCTTCTTCTTGCTGGTGGA	CAAATGTGAAGACGTGGGAATGG
OC	GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC	AGCAGAGCGACACCCTA
ON	TGCATGTGTCTTAGTCTTAGTCACC	GCTAACTTAGTGCTTACAGGAACCA
OPG	AAACGCAGAGAGTGTAGAGAGG	TCGAAGGTGAGGTTAGCATGTC
OPN	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGG	GCTCATTGCTCTCATCATTGGC
RUNX2	AGCCTTACCAAACAACAACAG	CCATATGTCCTCTCAGCTCAGC
COL1A1	TGAGCCAGCAGATCGAGA	ACCAGTCTCCATGTTGCAGA
<i>Diferenciación celular y crecimiento</i>		
BMP2	CCACTAATCATGCCATTGTTTCAGAC	CTGTACTAGCGACACCCACAA
OSX	TCAGAATCTCAGTTGATAGGGTTTCTC	GGGTACATTCCAGTCCTTCTCC
RANKL	TCAGCATCGAGGTCTCCAAC	CCATGCCTCTTAGTAGTCTCACA
SOST	TGTGGTTTCTAGTCCTGGCTC	TTCTCTCTCTCTCTCTCACCTCTG
FGF-2	5'-GGCTTCTTCCTGCGCATCCA-3'	5'-GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA-3'
<i>Gen constitutivo</i>		
TFRC	TGTTTGTCATAGGGCAGTTGGAA	ACACCCGAACCAGGAATCTC

3.5 Nanorodillos de HA y el destino de las hADSCs

3.5.1 Adhesión, supervivencia y distribución de las hADSCs sobre los recubrimientos de HA nanoestructurada.

Para que los materiales sean capaces de conformar un buen soporte celular deben cumplir con diferentes requerimientos como estabilidad biofísica, sostén y desarrollo celular [64], [65]. Con este objetivo fueron estudiadas viabilidad y actividad metabólica de hADSCs cultivadas en presencia de los materiales de modo de poder evaluar su capacidad de contribuir con las funciones de proliferación y crecimiento celular. Los resultados de estos ensayos se pueden observar en la Figura 3.1 a-e.

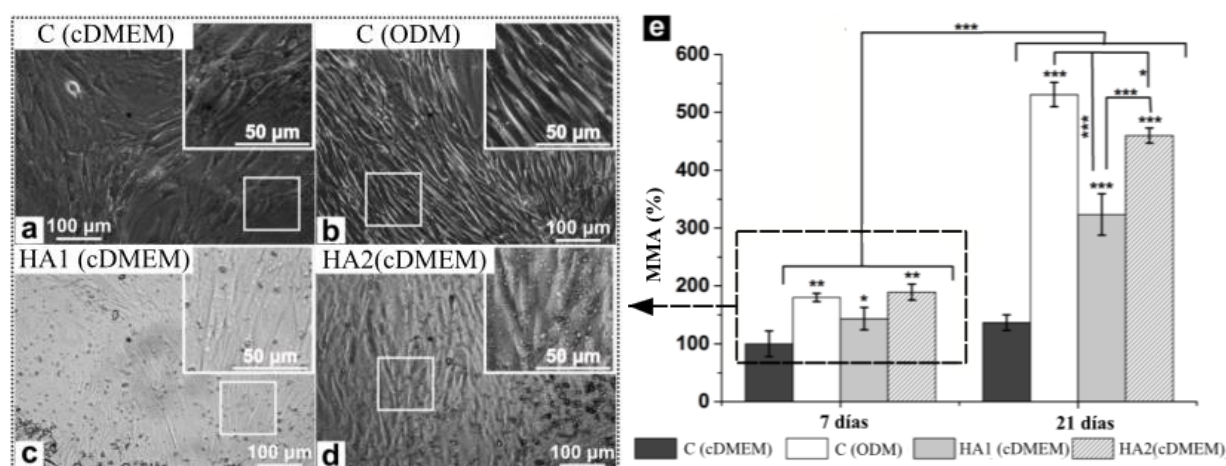


Figura 3.1 Imágenes de microscopía óptica: (a, b) hADSCs luego de 7 días de cultivo sin recubrimientos en ODM o cDMEM y; (c, d) hADSCs luego de 7 días de cultivo en cDMEM sobre recubrimientos con $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de HA (HA1 y HA2). (e) Actividad metabólica mitocondrial de hADSCs cultivadas en cDMEM sobre recubrimientos con $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de HA (HA1 y HA2), luego de 7 y 21 días. Los datos de MMA se encuentran normalizados a la performance celular luego de 7 días de cultivo en ausencia de nanomateriales; los asteriscos denotan diferencias estadísticas significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$). Diferencias significativas entre muestras se indican con corchetes. Cultivos celulares sin recubrimiento en ODM y cDMEM se utilizaron como controles (C).

Tanto los cultivos realizados en cDMEM como en ODM lograron una rápida adhesión celular conformando una monocapa confluyente sobre los recubrimientos nanoestructurados de HA y se vieron completamente organizadas luego de 7 días de sembradas; no se encontraron diferencias morfológicas significativas al compararlas con los controles, a partir de lo cual se deduce una buena viabilidad celular, Figura 3.1 a-d. Un incremento en los valores obtenidos de MMA, Figura 3.1 e se evidenció al analizar los resultados de los

cultivos en ODM y los cultivos con recubrimientos de HA1 y HA2, Figura 3.1 b-d. Por otra parte, se observó influencia del medio de cultivo sobre la actividad metabólica mitocondrial de hADSCs. Las células cultivadas sin recubrimiento de materiales en cDMEM no mostraron diferencias significativas a lo largo de los 21 días de tratamiento, mientras que si se encontraron diferencias en las cultivadas con ODM, Figura 3.1 e. Por el contrario, en cDMEM se pudo encontrar un incremento significativo en la MMA de hADSCs a partir de los 7 días de tratamiento, Figura 3.1 e; siendo este efecto superior en las células cultivadas con el recubrimiento de HA2. Los recubrimientos nanoestructurados no tuvieron efectos significativos en la evolución celular al ser cultivados con ODM, Figura 3.2. En conclusión, se puede decir que los materiales demostraron capacidad de inducir en cDMEM una MMA y viabilidad similar a la que se aprecia cuando se utilizan medios de cultivo con agregados osteogénicos por lo que el paso siguiente en el estudio fue evaluar la diferenciación.

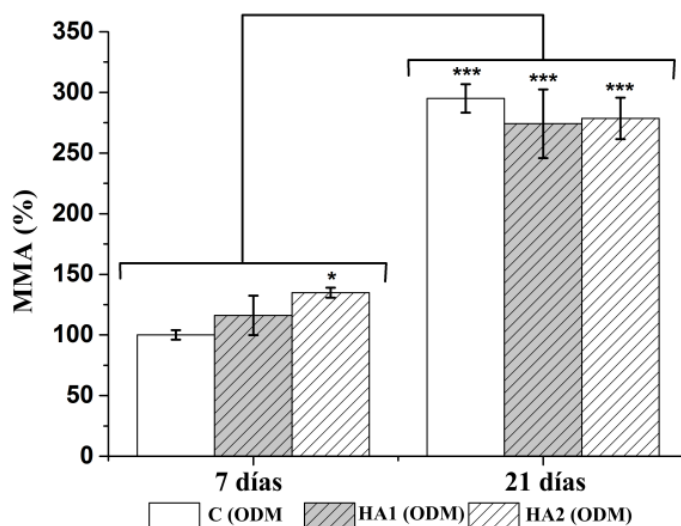


Figura 3.2 Actividad metabólica mitocondrial (MMA) de hADSCs cultivadas sobre recubrimientos (HA1 y HA2) luego de 7 y 21 días de tratamiento ODM. Los valores de MMA están normalizados respecto de la performance celular luego de 7 días de cultivo en ausencia de recubrimiento; los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$). Las diferencias significativas entre las muestras se indican con corchetes. Los controles fueron células cultivadas sin recubrimientos (C).

3.5.2 Influencia de los nanorodillos de HA en la diferenciación de hADSCs

La determinación de la actividad ALP nos permitió estudiar la inducción del linaje osteogénico por parte de los nanomateriales ya que es un marcador de diferenciación [58]. En

los primeros 7 días de cultivo, en cDMEM, no se evidenciaron diferencias respecto de los controles en la actividad ALP, Figura 3.3. Los bajos niveles iniciales de actividad se corresponden con una actividad proliferativa inicial de células comprometidas con el linaje osteogénico [66], lo que fue confirmado mediante microscopía óptica, Figuras 3.4 a-c; g-i; m-o; s-u.

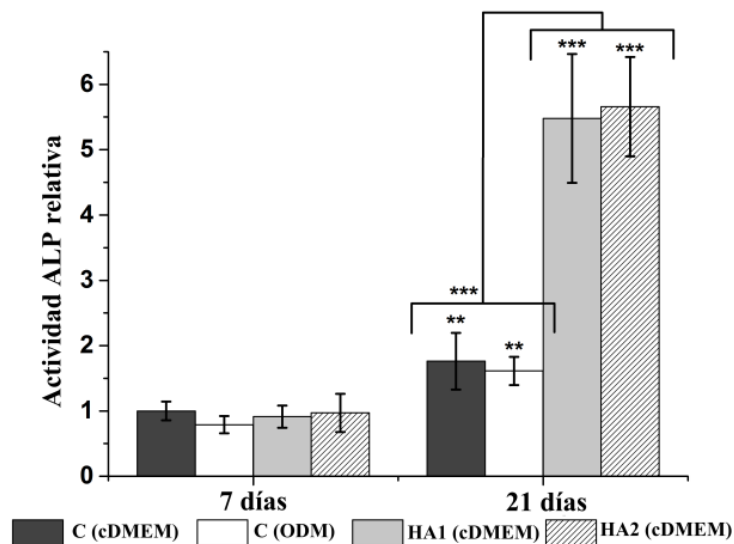


Figura 3.3 Actividad ALP de hADSCs adheridas sobre recubrimientos luego de 7 y 21 días de cultivo en cDMEM. Los datos fueron normalizados respecto de la performance celular luego de 7 días de cultivo en cDMEM en ausencia de HA. Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$), las diferencias entre muestras se encuentran señaladas con corchetes. Los controles utilizados fueron células sembradas en cDMEM y ODM en ausencia de HA1 y HA2 (C).

En ensayos sin recubrimientos y ambos medios de cultivo la actividad ALP se vio incrementada a los 21 días de tratamiento ($p < 0,01$), pero no se encontraron diferencias significativas cuando las células fueron cultivadas en ODM y sobre los materiales, Figura 3.5.

Los valores obtenidos de actividad ALP son indicadores del cese de la replicación que conduce el inicio de la diferenciación [67], [68]; nuevamente este hecho se confirmó a través de microscopía óptica, Figuras 3.4 d; j; p-r; v-x. Las células lograron una máxima capacidad de maduración [67], [68] luego de 21 días de cultivo sobre los recubrimientos y en cDMEM, lo que se vio gracias al incremento significativo observado en la actividad ALP; estos valores fueron superiores incluso a los detectados en el medio específico de diferenciación (ODM).

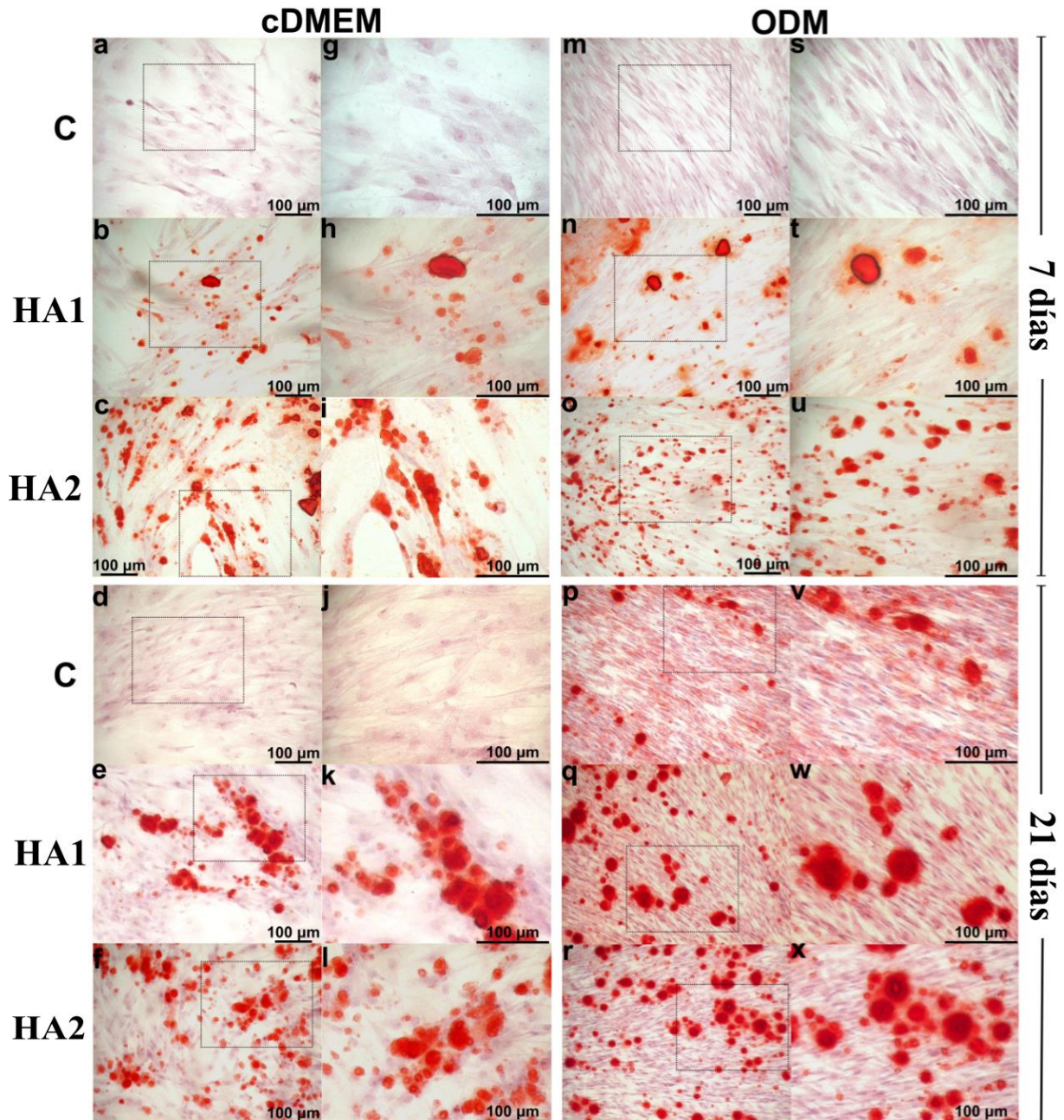


Figura 3.4 Coloración con ARS de hADSCs adheridas sobre recubrimientos con $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nano-HA cultivados por 7 y 21 días en cDMEM y ODM; microfotografías ópticas (a-f, m-r) magnificación x20 y (g-l, s-x) magnificación x40. Células cultivadas sin recubrimientos en cDMEM y ODM se usaron como controles (C).

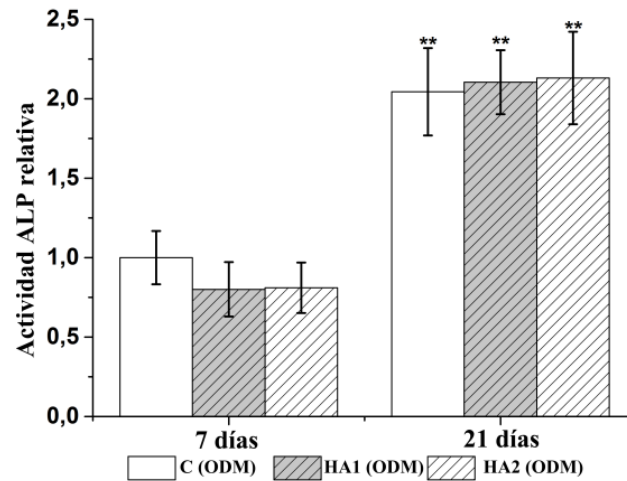


Figura 3.5 Actividad ALP de hADSCs adheridas sobre recubrimientos con $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de HA1 y HA2 y luego de 7 y 21 días de tratamiento en ODM. Los valores se normalizaron a la performance de 7 días en ODM y ausencia de HA; Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$), las diferencias entre muestras se encuentran señaladas con corchetes. Cultivos celulares sin recubrimiento se usaron como control (C).

El colorante utilizado en el ensayo de ARS se une específicamente a depósitos enriquecidos de calcio [58], y nos permitió reconocer la presencia de una matriz mineralizada. Con el objetivo de evitar los falsos positivos (compuestos basados en Ca-P) se colorearon los recubrimientos de HA en ausencia de células de modo de poder observar su morfología y coloración, Figura 3.6.

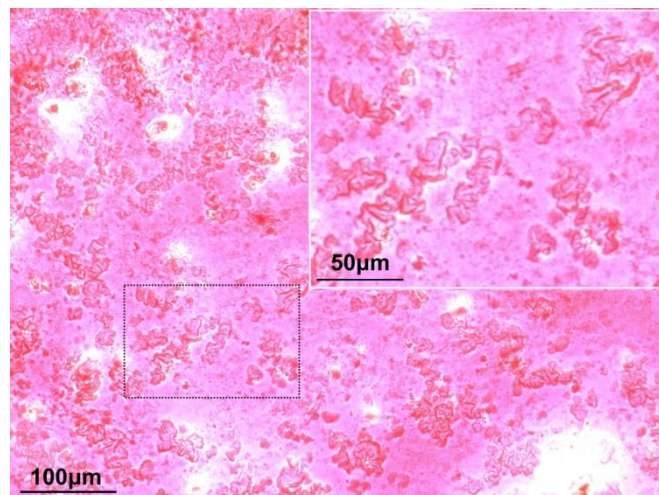


Figura 3.6 Recubrimientos con $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de materiales nanoestructurados coloreados con Rojo de Alizarina S. Magnificación $20 \times$.

La coloración del sustrato fue homogénea y las formas de los depósitos se vieron considerablemente diferentes a los que se generaron a lo largo del tiempo de cultivo de hADSCs. Los cristales originalmente presentaron una forma rectangular con una coloración semitransparente. Por el contrario, los depósitos generados por las células se caracterizan por una forma circular y un denso color rojo, lo que denota su origen en un centro de nucleación y crecimiento de forma radial. En la Figura 3.4 se pueden observar ejemplos de las acumulaciones de calcio en la MEC de las hADSCs en todas las condiciones de cultivo. Luego de 21 días de tratamiento de cultivos en cDMEM y ausencia de recubrimientos, no se detectaron aglomeraciones (mayormente denominadas en el ámbito científico como su término en inglés clusters, por lo que se utilizará este término en el transcurso de este trabajo) de MEC mineralizada, aunque la coloración roja interna detectada puede ser indicio del comienzo del proceso de mineralización, Figuras 3.4 a, g, d y j.

El número de hADSCs observado en ODM comparado con aquellas en cDMEM fue significativamente superior, Figuras 3.4 m y s; mientras que la formación de los depósitos de calcio solo fue observada luego de 21 días de cultivo, Figuras 3.4 p y v. En estas condiciones, las células se organizaron de manera paralela entre ellas, mostrando una morfología elongada con citoplasma abundante y grandes núcleos, Figuras 3.4 p y v, 3.7 c y d. Los clusters de depósitos Ca-P se lograron identificar a partir de los 7 días de cultivo cuando las hADSCs se cultivaron en cDMEM sobre los recubrimientos, Figuras 3.4 b, c, h e i; siendo los clusters de mayor tamaño en las muestras con material HA2, Figura 3.4 c, i.

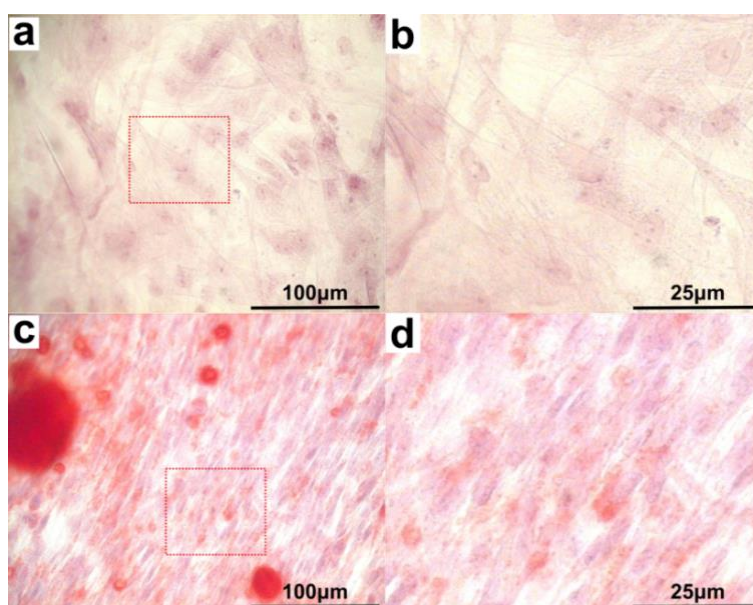


Figura 3.7 Cultivo de 21 días sin recubrimientos en cDMEM (a, b) y ODM (c, d), coloración Rojo de Alizarina S, magnificación 40 ×.

Se observó también que las células se organizan directamente en clusters alrededor de los nanomateriales; mientras que los nuevos depósitos de calcio crecen radialmente a partir del material que actúa como centro de nucleación, Figuras 3.8 a y b. A partir del séptimo día de tratamiento en ODM las células comienzan a perder su alineación paralela original, Figuras 3.8 c y d.

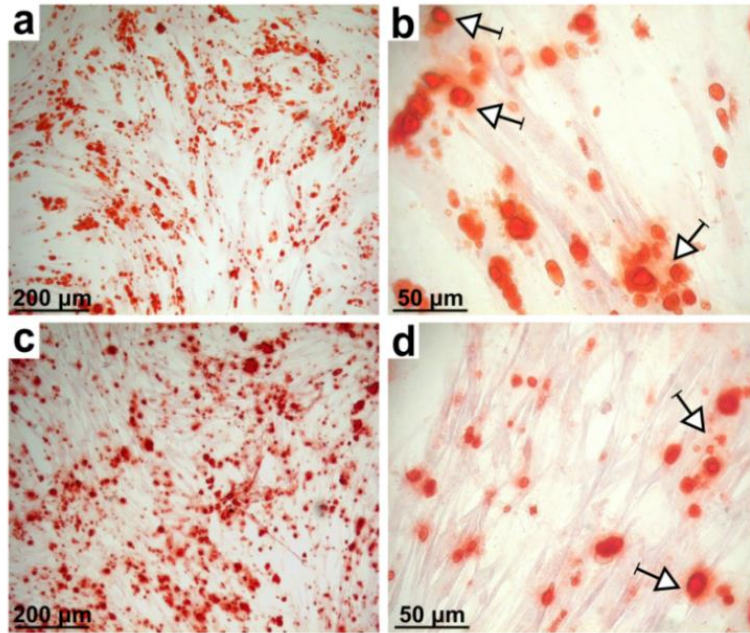


Figura 3.8 Cultivos de 7 días de hASCs sobre recubrimientos de HA con $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en cDMEM (a, b) y ODM (c, d). Micrografías ópticas, con magnificación $10\times$ (a, c) y $40\times$ (b, d).

Para corroborar la atracción celular por las nanoestructuras y el efecto del material sobre su evolución bajo la influencia del ODM, se utilizó un cubreobjetos recubierto en un 50%; observándose, luego de 7 días de tratamiento, los depósitos en el área recubierta, Figura 3.9. A los 21 días de tratamiento, se observó por parte de los materiales la inducción de un desarrollo significativo de MEC y depósitos de Ca-P ya sea en cDMEM o ODM, Figuras 3.4 e, f, k, l, q, r, w y x. Durante el cultivo en ODM, las hADSCs incrementaron su densidad y recobraron su disposición paralela, mientras que los depósitos de calcio permanecieron diseminados, Figuras 3.4 d, f, k, l, q, r, w y x. En conclusión, los ensayos realizados con ALP y ARS demostraron que los recubrimientos con los nanomateriales de HA son, por si mismos, capaces de inducir la diferenciación de hADSCs *in vitro* hacia el linaje osteogénico en ausencia de aditivos y que la tasa de este proceso es mayor que la lograda en ODM.

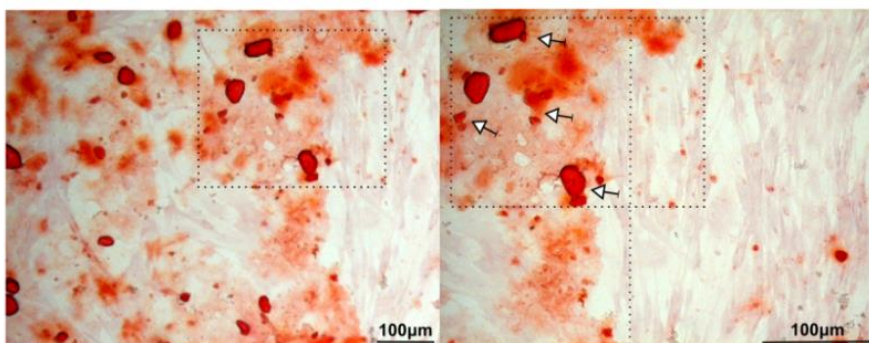


Figura 3.9 Cultivos de hADSCs luego de 7 días de tratamiento con recubrimientos de HA1 en ODM, coloreados con Rojo de Alizarina S; magnificación 10x y 20x.

La interacción entre célula y sustrato fue estudiada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observó que las hADSCs se adhirieron sobre los recubrimientos tanto en cDMEM como en ODM, aunque este proceso fue influenciado por el medio de cultivo y la evolución de la diferenciación celular. Luego de 7 días de cultivo, la superficie estaba prácticamente cubierta por células y no se apreciaron diferencias entre los medios de cultivo aplicados, Figuras 3.10 y 3.11.

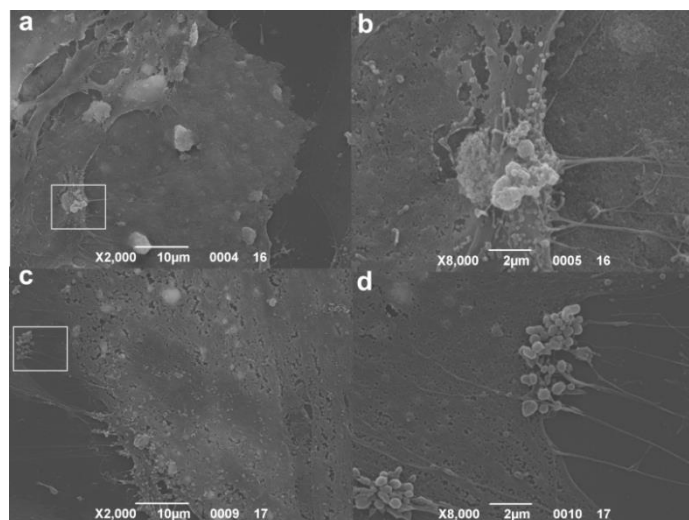


Figura 3.10 Microfotografías SEM de cultivos de hADSCs luego de 7 días de tratamiento con recubrimientos con $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de HA1 (a, b), y HA2 (c, d) en cDMEM.

Luego de 21 días de tratamiento, la superficie se encontró completamente cubierta por células que, incluso, se solaparon adquiriendo una estructura tridimensional que permite la comunicación intercelular, Figura 3.12 a y 3.13 a. Como se mencionó previamente, las células cultivadas en cDMEM interactúan directamente con el material, Figuras 3.12 a-c. Imágenes SEM con altas magnificaciones, Figuras 3.12 d-f, revelaron la presencia de

numerosas extensiones celulares en las hADSCs, filopodios, protruyendo de modo de anclarse directamente en la superficie de las nanoestructuras. El microanálisis de fluorescencia de rayos X nos permitió observar un material granular, originado a partir de componentes mineralizados de la matriz, formando acumulaciones concéntricas Figura 3.12f.

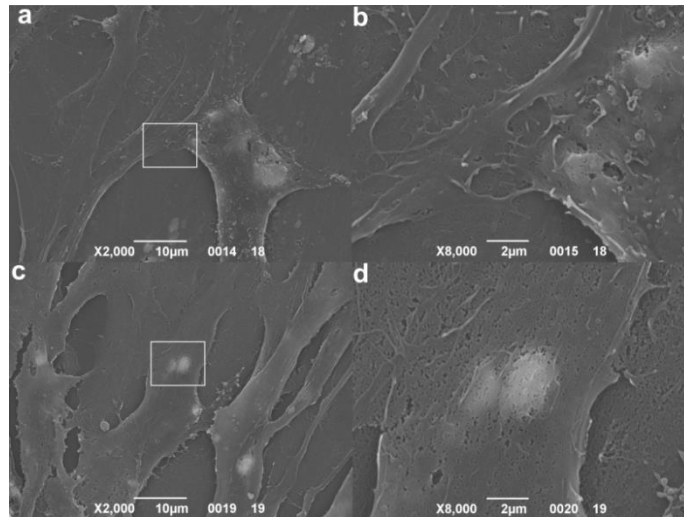


Figura 3.11 Microfotografías SEM de cultivos de hADSCs luego de 7 días de tratamiento con recubrimientos con $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de HA1 (a, b), y HA2 (c, d) en ODM.

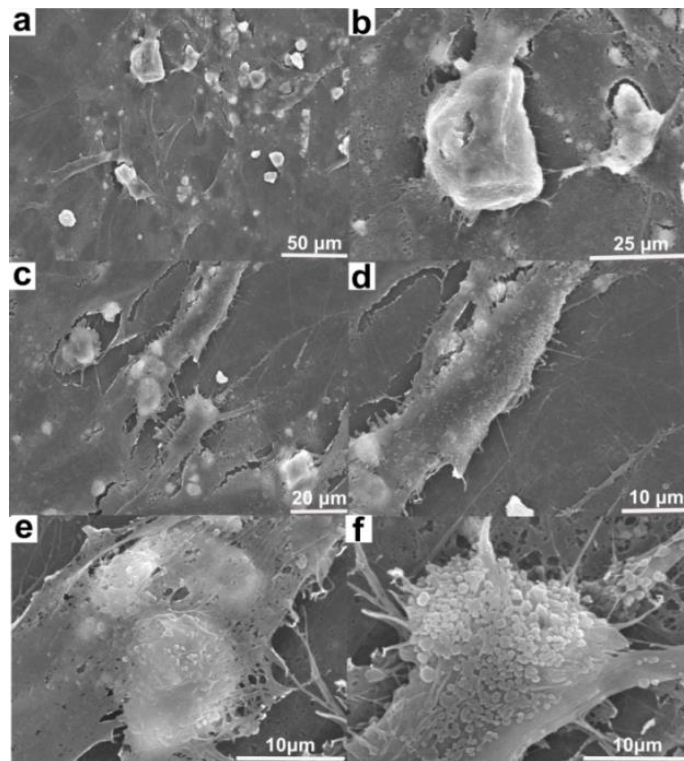


Figura 3.12 Microfotografías SEM de hADSCs adheridas sobre $60\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de recubrimientos con HA2 cultivadas a lo largo de 21 días.

Mediante microscopía óptica y electrónica se confirmó la presencia de rasgos como extensiones de cuerpo planas y depósitos de calcio extracelular, que confirmaron la buena proliferación y diferenciación de las hASCs en osteoblastos al ser cultivadas sobre los recubrimientos de HA en cDMEM. Por el contrario, en ODM las células se observaron con una disposición paralela (considerando su eje longitudinal) y no se pudieron detectar interacciones célula-material, Figuras 3.13 a-d.

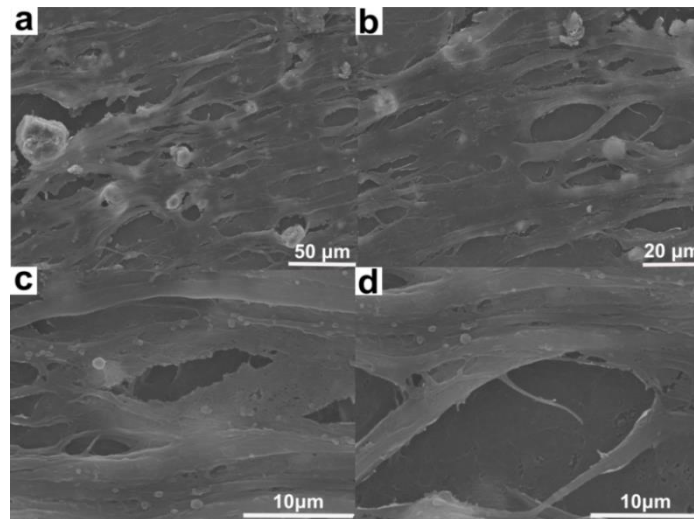


Figura 3.13 Microfotografías SEM de hADSCs adheridas sobre recubrimientos de $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ -de HA2 cultivados a lo largo de 21 días en ODM.

3.5.3 Perfiles progresivos de expresión genética

Para evaluar en mayor profundidad el efecto de los recubrimientos de HA nanoestructurada sobre el compromiso osteogénico celular, se analizó la expresión de genes relacionados con la diferenciación osteogénica. Los marcadores osteogénicos relacionados con el desarrollo esquelético y la regulación del destino celular utilizados fueron: osteocalcina (OC), un gen específicamente osteoblástico [69] asociado a la mineralización del hueso y la homeostasis del calcio [70]; Osteonectina (ON), una glicoproteína secretada por osteoblastos durante la formación ósea que se une al calcio, su presencia promueve la mineralización [71]; osteopontina (OPN), una proteína estructural extracelular, biosintetizada por osteoblastos e involucrada en la adhesión celular a la matriz ósea mineralizada; osteoprotegerina (OPG), una proteína excretora producida por osteoblastos en evolución, su presencia previene la resorción ósea y mejora la síntesis de la matriz ósea [72]; factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2), que posee un rol crucial en la determinación temprana del linaje osteoblástico [73]; fosfatasa alcalina no específica de tejido (ALPL), una enzima de membrana que puede actuar como un indicador temprano de actividad celular y

diferenciación osteoblástica [74]; colágeno tipo I alfa I (COL1A1), un constituyente importante de la MEC ósea, estableciendo conexiones con las integrinas de la superficie celular y otras proteínas de la matriz [66]; proteína morfogenética del hueso 2 (BMP2), expresada por las células osteoprogenitoras, puede estimular la diferenciación de osteoblastos y también mediar la expresión de OSX en células mesenquimales independientemente de la regulación de RUNX2 [75]; osterix (OSX), gen específico de osteoblastos [76], regula las etapas finales de la diferenciación y la formación ósea [73]; ligando del receptor activador del factor nuclear κ -B (RANKL), mediador clave de la osteoclastogénesis [77], su presencia está asociada con el control de la regeneración y remodelado óseo; esclerostina (SOST), su mRNA se expresa en muchos tejidos durante la embriogénesis, además de prevenir, durante la remodelación ósea, la activación de osteoblastos y formación ósea sin una previa resorción [78]; factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), sintetizado y secretado por adipocitos humanos y actúa incrementando la proliferación de osteoblastos [79].

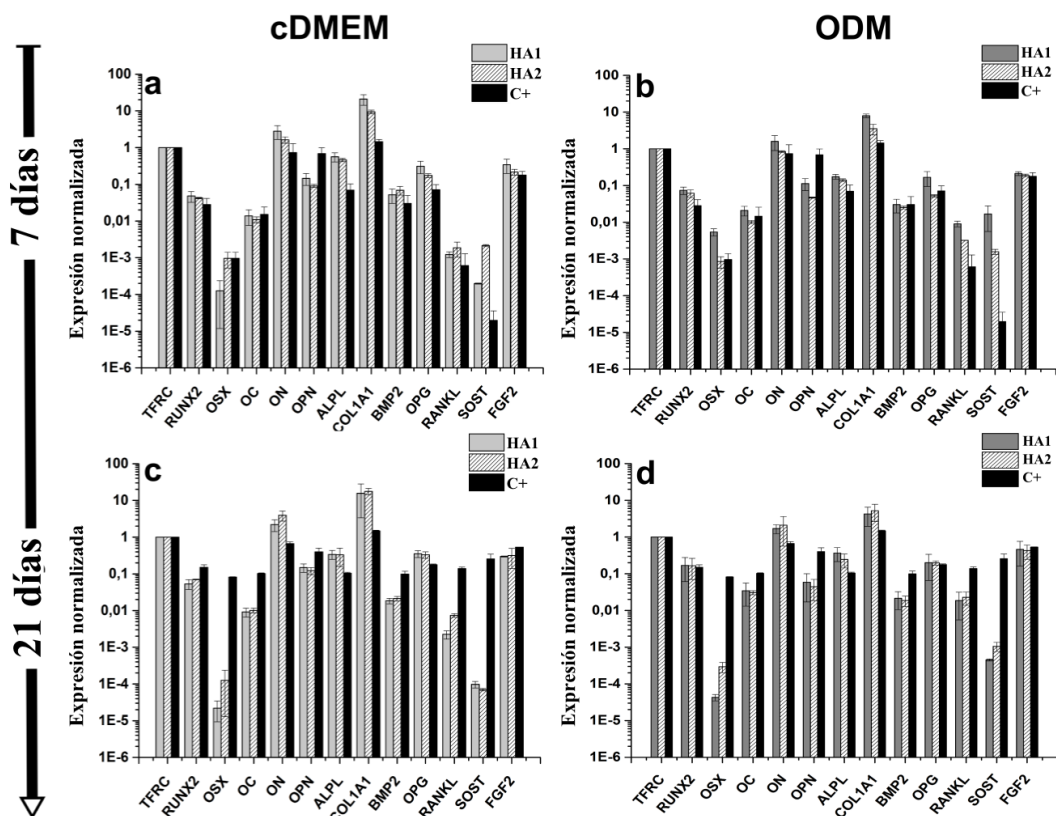


Figura 3.14 Análisis de la expresión de genes involucrados en el compromiso osteogénico. Efecto de los recubrimientos sobre hADSCs cultivadas tanto en medio osteogénico (ODM) como no osteogénico (cDMEM) a lo largo de 21 días. Los datos se encuentran normalizados respecto al gen constitutivo TFRC. Células cultivadas en ODM sin recubrimiento fueron utilizadas como control (C+).

Todos los factores de transcripción relacionados con el compromiso osteogénico estudiados se expresaron durante la diferenciación de hADSCs desde los 7 días de tratamiento en un medio no-osteogénico (cDMEM). Además los valores obtenidos son, en general, estadísticamente comparables con los obtenidos en cultivos desarrollados en medio específico con aditivos (C+), Figura 3.14. De este modo, podemos confirmar la habilidad de los nanomateriales de inducir un comportamiento osteogénico. Hay una influencia específica de los materiales sobre la expresión de los genes estudiados sujeta a las condiciones de cultivo y a la evolución temporal del proceso de diferenciación. Luego de los primeros 7 días de tratamiento, la presencia de los materiales induce, en cDMEM, una expresión superior respecto de los controles de ALPL, COL1A1, OPG y SOST. La Figura 3.14 a, permite apreciar un gran efecto producido sobre COL1A1 y SOST en recubrimientos con HA1 y HA2 respectivamente. En presencia de los materiales y luego de 21 días de tratamiento la expresión de RUNX2, OC, OSX, OPN, BMP2, RANKL y SOST disminuyó siendo mayor aún el efecto sobre OSX y RANKL. Por el contrario, aumentos de expresión se encontraron en ON, ALPL, COL1A1 y OPG, Figura 3.14 c. La utilización de un medio de diferenciación como ODM no enmascaró el efecto de los materiales en el proceso de compromiso celular. A pesar de la presencia de aditivos osteogénicos en el medio, la expresión de OPN y OSX a los 7 días de ensayo se vio disminuida en los materiales HA2 y HA1 respectivamente Figura 3.14 b. Por otro lado, la expresión de ALPL, COL1A1, RANKL y SOST se vio incrementada. Luego de 21 días de cultivo, se encontró una diferencia significativa en la disminución de la expresión de OSX, OPN, BMP2, RANKL y SOST respecto del C+, Figura 3.14 d. Asimismo, la disminución de la expresión en OSX fue superior en HA1 mientras que, por el contrario ALPL y COL1A1 aumentaron su expresión.

3.6 Expresión de mRNA relacionados con la osteogénesis

Un nicho celular se puede definir como un microambiente tisular que mantiene y regula la actividad de las células madre [80]; de lo que se desprende que un material sintético que imita con detalle nichos osteogénicos humanos funcionaría bien como un biorreactor. Hasta aquí, se ha determinado la aptitud de los recubrimientos basados en nanohidroxiapatita de soportar el anclaje-adhesión, subsistencia y compromiso de hADSCs. Los resultados fueron comparados con los obtenidos a partir de los mismos ensayos realizados en un medio de diferenciación osteogénica de células madre: dexametasona (Dex), ácido ascórbico (AA) y β -glicerofosfato (β -Gly) [81]. Ambos tipos de materiales incrementaron la actividad metabólica mitocondrial de las células y la proliferación en cDMEM, Figura 3.1 a-e, aunque

con el paso del tiempo de tratamiento, se pudo observar que HA2 arrojó valores mayores que los de HA1. A través de la información obtenida con el ensayo de ARS y la cuantificación de la actividad ALP, se determinó un estímulo del sustrato debido a la presencia de los recubrimientos en el potencial de diferenciación hacia el linaje osteogénico de las hADSCs a lo largo de los 21 días de tratamiento. El mantenimiento y supervivencia de las hADSCs se encuentra fuertemente influenciado por los estímulos locales en el microambiente, incluidas la morfología y rugosidad propia del material (su nano-topografía) [82]. Evidencia emergente ha señalado que la nano-topografía participa en el control del destino de las células madre [82], [83] y que su influencia es equivalente a la ejercida por los mediadores moleculares [81], [82]. De acuerdo con los parámetros de rugosidad, HA1 y HA2 exhiben rugosidad submicrométrica y asimétrica como resultado de la agregación de los nanorodillos [5], [84], semejantes a las dimensiones de la MEC, que contiene huecos, poros y proyecciones en la escala de 5-200 nm [85]. En cada uno de los medios de cultivo utilizados se encontró una determinada interacción célula-material. Luego de los 21 días de tratamiento, las células cultivadas en cDMEM, se extendieron, organizaron y distribuyeron mostrando fibras de estrés de actina y clusters focales de adhesión, como lo evidencia su característica morfología estrellada de estados de alta tensión [82]. A diferencia de esto, la morfología elongada y orientación paralela de las células cultivadas en ODM, nos indicó una movilidad incrementada [86]. La magnitud del área de propagación se correlaciona positivamente con la actividad de proliferación celular en la fase inicial de siembra [87]. Coincidentemente, la gran propagación sobre los recubrimientos observada con imágenes SEM y de microscopía óptica, Figuras 3.4-3.14, es coherente con los incrementos en viabilidad y MMA, Figura 3.1. Los resultados obtenidos coinciden completamente con lo reportado en literatura que señala que los sustratos que presentan rugosidad submicrométrica tienen influencia sobre la orientación y el contacto de las células siempre que sean tamaños comparables con los filopodios (50-100 nm) [85], [88]. Dalby *et al.* [89] afirmaron que, ante topografías asimétricas y desordenadas, se da un incremento en la adhesión de células osteoprogenitoras. En nuestro caso, consideramos que un efecto análogo se produce cuando las hADSCs se propagan sobre los recubrimientos. En células dependientes de anclaje, como las hADSCs, la adhesión participa en una serie de funciones celulares, incluyendo etapas de la diferenciación en las cuales la tensión derivada de la adhesión es un punto clave. Está ampliamente aceptado que las superficies que generan y estimulan gran adhesión están implicadas en el desarrollo de fenotipos de tejidos duros (hueso/osteoblastos) [82]. Los resultados de ALP luego de 21 días de tratamiento mostraron grandes valores de actividad en las células sembradas sobre

recubrimientos en cDMEM respecto de las cultivadas en ODM, Figura 3.3. Mientras tanto, la coloración con ARS, evidenció un aumento de la movilidad y la proliferación en ODM, Figura 3.4. No existe una relación lineal entre la propagación celular y la proliferación; el incremento en la propagación, la formación de unidades de adhesión y el ensamblaje del citoesqueleto de actina son capaces de provocar proliferación celular solo hasta cierto punto [87]. Los reportes bibliográficos proponen que la capacidad de proliferación y velocidad de migración de varios tipos celulares, incluyendo las células madre, tienen sus puntos más altos con niveles medios de fuerza de adhesión, mientras que la alta capacidad de adherencia se relaciona con etapas madurativas de las células [87]. En nuestros ensayos, se observó una gran adhesión a los recubrimientos de HA en cDMEM, una mayor maduración que la observada con aditivos solubles pero una proliferación más lenta, lo que concuerda con lo reportado en bibliografía. La menor maduración alcanzada en ODM implica una menor actividad ALP, así como una mineralización reducida, lo que también coincide con nuestros resultados. Los fundamentos de este efecto pueden ser originados en el mecanismo de anclaje célula-substrato. Es aceptado que la propagación celular estimula la proliferación y la diferenciación por mecanismos bioquímicos y mecánicos [82], [87], [89]. Ambos mecanismos comienzan por la adsorción sobre la superficie del material de moléculas mediadoras de adhesión (como por ejemplo, vitronectina y fibronectina [90]) a partir de fluidos biológicos *in vivo* y a partir de FBS *in vitro*. Luego, los sitios activos en estas moléculas adsorbidas se unen a receptores de adhesión celulares, que involucran moléculas de adhesión como integrinas y no integrinas [87]. Sobre sustratos moderadamente hidrofílicos y no deformables, como nuestros materiales [84], las proteínas flexibles y con formas ajustables adsorbidas adquieren una conformación accesible para los receptores de adhesión [87]. Asumimos que este proceso ocurre favorablemente en cDMEM; mientras que en ODM los aditivos (Dex, AA, β -Gly) compiten e interfieren en la adsorción de proteínas de FBS. Al analizar las formas moleculares de los componentes de ODM, se aprecia que las estructuras químicas poseen un gran número de grupos oxidrilos (-OH), que pueden adsorberse fuertemente en las posiciones Ca^+ de los cristales de HA superficiales que actúan como ácidos de Lewis [91]. Además, sus tamaños son menores que los proteicos, por lo que difunden con mayor velocidad limitando los sitios activos de adsorción. Cuando las proteínas adsorbidas sobre los recubrimientos no son suficientes, hay una adhesión transicional que favorece la movilidad y proliferación celular pero no tiene el mismo efecto en la maduración.

Respecto del perfil de regulación de la expresión genética, la activación transcripcional de los genes seleccionados de hADSCs sobre los recubrimientos de nanomateriales cultivados en cDMEM fue consistente con la diferenciación osteogénica; la expresión de ALPL, COL1A1, OPG, SOST se vio incrementada respecto de las condiciones ODM. Los resultados obtenidos revelaron que RUNX2 y OSX, reguladores transcripcionales positivos de genes como COL1A1, OC, ON y OPN [92] se encuentran completamente modulados durante la osteogénesis con un determinado patrón de expresión. Mientras que RUNX2 no presenta diferencias a lo largo de los 21 días de tratamiento, los niveles de OSX se incrementan hasta el día 7 y luego disminuyen en las etapas de mineralización. La compleja interacción entre RUNX2 y OSX se ve reflejada en la modulación de los genes que regulan durante las diferentes fases de diferenciación. Mientras que la activación de OSX durante la formación de osteoblastos contribuye a la activación temprana de OPN, su disminución promueve la diferenciación osteoblástica en estadios tardíos independientemente de RUNX2 [93]. Por otro lado, los altos niveles de RUNX2 son coherentes con su rol en la activación secuencial de COL1A1, ALPL, y OC, que están involucrados en estadios intermedios y tardíos de la maduración de la matriz y la mineralización ósea. La activación de BMP2, ALPL, COL1A1, OC, OPN y FGF2 que tienen un rol en la adhesión, proliferación, maduración de MEC y diferenciación del fenotipo osteoblástico, [66], [70], [74], [75], [79], [94] mostró que la proliferación celular y progresión a través del ciclo celular son rápidamente promovidas por la inducción genética desde las fases iniciales de la diferenciación osteogénica. Además, la regulación temporal del sistema OPG/RANKL y SOST (su activación está relacionada funcionalmente con el remodelado óseo [72], [77], [78]) sugiere una capacidad del material de soportar los procesos íntimamente relacionados de resorción y formación ósea, permitiendo un proceso de formación a continuación de cada ciclo de resorción, manteniendo una integridad esquelética; en otras palabras, pudiendo actuar como nichos óseos.

En resumen, los recubrimientos de HA proveen de un marco en el cual el crecimiento de las hADSCs es más lento que en un medio con aditivos osteogénicos pero parecen ser un mejor soporte para la adhesión y la diferenciación en el linaje celular adecuado (osteoblastos).

3.7 Conclusiones

Hemos demostrado la habilidad de recubrimientos nanoestructurados de HA, para dirigir el destino osteogénico de hADSCs en un medio de cultivo no específico para la

diferenciación, y que la interacción de las adhesiones focales de las células sobre las superficies de los materiales provee un efecto superior al alcanzado bajo la influencia de aditivos osteogénicos como: dexametasona (Dex), ácido ascórbico (AA) y β -glicerofosfato (β -Gli).

Los resultados obtenidos demostraron que la activación transcripcional de genes seleccionados en hADSCs sembradas en presencia de los nanomateriales está completamente modulada por un perfil osteogénico distintivo que deriva en la evolución temporal adecuada de las sucesivas etapas de la regeneración ósea: proliferación, diferenciación y maduración. Los resultados obtenidos durante nuestro estudio resaltan la importancia de la nanotopografía en la regulación de la evolución de las células madre y valida el potencial de las nanoestructuras de HA para actuar como biorreactores óseos una vez sembradas con hADSCs. Considerados ambos materiales, más allá de que uno de los mismos mostró un mejor desempeño, en ambos casos los resultados fueron satisfactorios. Por lo tanto y teniendo en cuenta el marco de nuestro estudio, los resultados mencionados en bibliografía, lo expuesto particularmente en este capítulo y los pasos siguientes de nuestra investigación consideramos HA1 el nanomaterial más apropiado en la continuación de la búsqueda de un andamio adecuado.

Referencias bibliográficas

- [1] H. Zhou & J. Lee, “Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [2] M. Bongio, J. J. J. P. van den Beucken, S. C. G. Leeuwenburgh, & J. a. Jansen, “Development of bone substitute materials: from ‘biocompatible’ to ‘instructive,’” *J. Mater. Chem.*, vol. 20, p. 8747-8759, 2010.
- [3] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, & X. Wang, “Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template,” *Mater. Lett.*, vol. 60, pp. 1484–1487, 2006.
- [4] S. V. Dorozhkin, “Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine,” *Materials (Basel)*, vol. 2, pp. 1975–2045, 2009.
- [5] N. L. D’Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, pp. 5014–5026, 2013.

- [6] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, & T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, pp. 721–734, 1990.
- [7] M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi, & T. Nakamura, “Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 64, pp. 164–170, 2003.
- [8] P. S. Vanzillotta, M. S. Sader, I. N. Bastos, & G. De Almeida Soares, “Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments,” *Dent. Mater.*, vol. 22, pp. 275–282, 2006.
- [9] T. Kokubo, H. Kushitani, Y. Ebisawa, T. Kitsugi, S. Kotani, K. Oura, & T. Yamamuro, “Apatite formation on bioactive ceramics in body environment,” *Bioceramics*, vol. 1, pp. 157–162, 1989.
- [10] N. L. D’Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures,” *Nanoscale*, vol. 7, pp. 18751–18762, 2015.
- [11] K. D. Poss, “Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 11, pp. 710–722, 2010.
- [12] A. B. Thomas Hodgkinson, Xue-Feng Yuan, “Adult stem cells in tissue engineering,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 6, pp. 621–640, 2009.
- [13] Y. Xiao, S. Mareddy, & R. Crawford, “Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration.,” *Int. J. Oral Sci.*, vol. 2, pp. 127–135, 2010.
- [14] R. Ciccocioppo, M. E. Bernardo, A. Sgarella, R. Maccario, M. A. Avanzini, C. Ubezio, A. Minelli, C. Alvisi, A. Vanoli, F. Calliada, P. Dionigi, C. Perotti, F. Locatelli, & G. R. Corazza, “Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn’s disease.,” *Gut*, vol. 60, pp. 788–798, 2011.
- [15] Y. Sun, W. Li, Z. Lu, R. Chen, J. Ling, Q. Ran, R. L. Jilka, & X.-D. Chen, “Rescuing replication and osteogenesis of aged mesenchymal stem cells by exposure to a young extracellular matrix.,” *FASEB J.*, vol. 25, pp. 1474–1485, 2011.
- [16] A. Sterodimas, J. de Faria, B. Nicaretta, & I. Pitanguy, “Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications,” *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.*, vol. 63, pp. 1886–1892, 2010.
- [17] M. A. Rupnick, D. Panigrahy, C.-Y. Zhang, S. M. Dallabrida, B. B. Lowell, R. Langer, & M. J. Folkman, “Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature.,”

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, pp. 10730–10735, 2002.
- [18] D. B. Hausman, M. DiGirolamo, T. J. Bartness, G. J. Hausman, & R. J. Martin, “The biology of white adipocyte proliferation,” *Obes. Rev.*, vol. 2, pp. 239–254, 2001.
- [19] B. A. Bunnell, M. Flaat, C. Gagliardi, B. Patel, & C. Ripoll, “Adipose-derived Stem Cells: Isolation, Expansion and Differentiation,” *Methods*, vol. 45, pp. 115–120, 2008.
- [20] A. M. Bailey, S. Kapur, & A. J. Katz, “Characterization of Adipose-Derived Stem Cells: An Update,” *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 5, pp. 95–102, 2010.
- [21] G. Ailhaud, P. Grimaldi & R. Negrel, “Cellular and Molecular Aspects of Adipose Tissue Development,” *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 12, pp. 207-233, 1992.
- [22] D. Dixon-shanies, J. Rudick, J. L. Knittle, & J. Hirsch, “Observations on the Growth and Metabolic Functions of Cultured Cells Derived from Human Adipose Tissue,” *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol. 545, pp. 541–545, 1975.
- [23] G. J. Hausman & R. J. Martin, “The influence of human growth hormone on preadipocyte development in serum-supplemented and serum-free cultures of stromal-vascular cells from pig adipose tissue,” *Domest. Anim. Endocrinol.*, vol. 6, pp. 331–337, 1989.
- [24] D. A. De Ugarte, Z. Alfonso, P. A. Zuk, A. Elbarbary, M. Zhu, P. Ashjian, P. Benhaim, M. H. Hedrick, & J. K. Fraser, “Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow,” *Immunol. Lett.*, vol. 89, pp. 267–270, 2003.
- [25] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, A. J. Katz, P. Benhaim, H. P. Lorenz & M. H. Hedrick, “Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies,” *Tissue Eng.*, vol. 7, pp. 211–228, 2001.
- [26] Patricia A. Zuk, D. A. D. U. Min Zhu, Peter Ashjian, Z. C. A. Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, J. K. Fraser, & M. H. H. Prosper Benhaim, “Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 13, pp. 4279–4295, 2002.
- [27] M. Q. Wickham, G. R. Erickson, J. M. Gimble, T. P. Vail, & F. Guilak, “Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, pp. 196–212, 2003.
- [28] A.-M. M. Rodriguez, D. Pisani, C. A. Dechesne, C. Turc-Carel, J.-Y. Y. Kurzenne, B. Wdziekonski, A. Villageois, C. Bagnis, J.-P. P. Breittmayer, H. Groux, G. Ailhaud, & C. Dani, “Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse,” *J. Exp. Med.*, vol. 201, pp. 1397–1405, 2005.

- [29] A. M. Rodriguez, C. Elabd, E. Z. Amri, G. Ailhaud, & C. Dani, “The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells,” *Biochimie*, vol. 87, pp. 125–128, 2005.
- [30] S. Baglioni, M. Francalanci, R. Squecco, A. Lombardi, G. Cantini, R. Angeli, S. Gelmini, D. Guasti, S. Benvenuti, F. Annunziato, D. Bani, F. Liotta, F. Francini, G. Perigli, M. Serio, & M. Luconi, “Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue.,” *FASEB J.*, vol. 23, pp. 3494–505, 2009.
- [31] M. Rodbell, “Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue Localization of Lipoprotein of Rat Adipose Lipase in Fat Cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 239, pp. 753–755, 1964.
- [32] R. L. R. Van & D. A. K. Roncari, “Cell and Tissue Isolation of Fat Cell Precursors from Adult Rat Adipose Tissue,” *Cell*, vol. 203, pp. 197–203, 1977.
- [33] Y. G. Illouz, “Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases.,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 72, pp. 591–597, 1983.
- [34] Z.-J. Liu, Y. Zhuge, & O. C. Velazquez, “Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 106, pp. 984–991, 2009.
- [35] M. L. Zocchi & F. Zuliani, “Bicompartmental breast lipostructuring,” *Aesthetic Plast. Surg.*, vol. 32, pp. 313–328, 2008.
- [36] T. S. Housman, N. Lawrence, B. G. Mellen, M. N. George, J. San Filippo, K. A. Cerveny, M. DeMarco, S. R. Feldman, & A. B. Fleischer, “The safety of liposuction: Results of a national survey,” *Dermatologic Surg.*, vol. 28, pp. 971–978, 2002.
- [37] N. Jaiswal, S. E. Haynesworth, a I. Caplan, & S. P. Bruder, “Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 64, pp. 295–312, 1997.
- [38] S. A. Wexler, C. Donaldson, P. Denning-Kendall, C. Rice, B. Bradley, & J. M. Hows, “Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal ‘stem’ cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not,” *Br. J. Haematol.*, vol. 121, pp. 368–374, 2003.
- [39] S. Gronthos, D. M. Franklin, H. a Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, & J. M. Gimble, “Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells.,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 189, pp. 54–63, 2001.
- [40] D. A. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P. A. Zuk, M. Zhu, J. L. Dragoo, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, & M. H. Hedrick, “Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow,”

- Cells Tissues Organs*, vol. 174, pp. 101–109, 2003.
- [41] Y.-D. Halvorsen, D. Franklin, B. A. L. D. C. Hitt, C. Auchter, A. L. Boskey, E. P. Paschalis, W. O. Wilkison, & J. M. Gimble, “Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells,” *Tissue Eng*, vol. 7, pp. 729–741, 2001.
- [42] F. Lu, J. H. Gao, R. Ogawa, H. Mizuro & H. Hykusoku, “Adipose tissues differentiated by adipose-derived stem cells harvested from transgenic mice,” *Chin J. Traumatol*, vol. 9, pp. 359–364, 2006.
- [43] Y.-S. Zhang, J.-H. Gao, F. Lu, M. Zhu, & Y.-J. Liao, “Cellular compatibility of type collagen I scaffold and human adipose-derived stem cells,” *J. South. Med. Univ.*, vol. 27, pp. 223–225, 2007.
- [44] K. Hemmrich & D. von Heimburg, “Biomaterials for adipose tissue engineering.,” *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 3, pp. 635–645, 2006.
- [45] J. L. Drago, J. Y. Choi, J. R. Lieberman, J. Huang, P. A. Zuk, J. Zhang, M. H. Hedrick, & P. Benhaim, “Bone induction byBMP-2 transduced stem cells derived from human fat,” *J. Orthop. Res.*, vol. 21, pp. 622–629, 2003.
- [46] S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis, K. Heidinger, J. Wolff, J. K. Fraser, M. H. Hedrick, L. Berthold, & H. P. Howaldt, “Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report,” *J. Cranio-Maxillofacial Surg.*, vol. 32, pp. 370–373, 2004.
- [47] D. García-Olmo, M. García-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro, & J. A. Rodríguez-Montes, “A phase I clinical trial of the treatment of crohn’s fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation,” *Dis. Colon Rectum*, vol. 48, pp. 1416–1423, 2005.
- [48] S. Huang, C. Huang, J. Shyu, H. Lee, S. Chen, J. Y. Chan, & S. Huang, “Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model,” *J. Biomed. Sci.*, vol. 20, pp. 1-10, 2013.
- [49] S. Heydarkhan-hagvall, K. Schenke-layland, & J. Q. Yang, “Human Adipose Stem Cells : A Potential Cell Source for,” *Cells Tissues Organs*, vol. 187, pp. 263–274, 2008.
- [50] Y. S. Choi, G. J. Dusing, S. Stubbs, S. Arunothayaraj, X. L. Han, P. Collas, W. A. Morrison, & R. J. Dille, “Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 14, pp. 878–889, 2010.
- [51] H. Tapp, E. N. J. Hanley, J. C. Patt, & H. E. Gruber, “Adipose-Derived Stem Cells :

- Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair,” *Exp. Biol. Med.*, pp. 1–9, 2008.
- [52] M. Tobita & H. Mizuno, “Adipose-Derived Stem Cells for Periodontal Tissue Regeneration,” in *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols*, J. M. Gimble and B. A. Bunnell, Eds. Totowa, NJ: Humana Press, 2011.
- [53] D. A. Banyard, A. A. Salibian, A. D. Widgerow, & G. R. D. Evans, “Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery Methods of ADSC isolation & identification Clinical applications Soft tissue,” *J. Cell Mol. Med.*, vol. 19, pp. 21–30, 2015.
- [54] R. J. P. Corriu, F. Embert, Y. Guari, A. Mehdi & C. Reye, “A simple route to organic–inorganic hybrid materials containing Eu³⁺ complexes,” *Chem Commun*, pp. 1116–1117, 2001.
- [55] J. Brown, R. Richer, & L. Mercier, “One-step synthesis of high capacity mesoporous Hg²⁺ adsorbents by non-ionic surfactant assembly,” *Microporous mesoporous Mater.*, vol. 37, pp. 41–48, 2000.
- [56] A. Pozzuoli, C. Gardin, R. Aldegheri, E. Bressan, M. Isola, J. L. Calvo-Guirado, C. Biz, P. Arrigoni, L. Feroni, & B. Zavan, “Genetical stability and osteogenic ability of mesenchymal stem cells on demineralized bone matrices,” *J. Osseointegration*, vol. 7, pp. 2–7, 2015.
- [57] Z. Ding, Z. Fan, X. Huang, Q. Lu, W. Xu, & D. L. Kaplan, “Silk-Hydroxyapatite Nanoscale Scaffolds with Programmable Growth Factor Delivery for Bone Repair,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, pp. 24463–24470, 2016.
- [58] G. Kaur, M. T. Valarmathi, J. D. Potts, E. Jabbari, T. Sabo-Attwood, & Q. Wang, “Regulation of Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells on 2D Nanorod Substrates,” *Biomaterials*, vol. 31, pp. 1732–1741, 2010.
- [59] F. Denizot & R. Lang, “Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.,” *J. Immunol. Methods*, vol. 89, pp. 271–277, 1986.
- [60] N. J. Marshall, C. J. Goodwin, & S. J. Holt, “A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function.,” *Growth Regul.*, vol. 5, pp. 69–84, 1995.
- [61] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, & L. Minor, “Cell Viability Assays,” en *Assay Guidance Manual*, G. S. Sittampalam, N. P. Coussens & K. Brimacombe, et al., Eds, Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and

- the National Center for Advancing Translational Sciences, 2017.
- [62] E. R. Fischer, B. T. Hansen, V. Nair, F. H. Hoyt, & D. W. Dorward, “Scanning Electron Microscopy,” *Curr Protoc Microbiol*, pp. 1–76, 2013.
- [63] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, p. 2003-2007, 2001.
- [64] J. M. Ruso, J. Sartuqui, & P. V Messina, “Multiscale inorganic hierarchically materials: towards an improved orthopaedic regenerative medicine,” *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 15, pp. 2290–2305, 2015.
- [65] P. Janicki & G. Schmidmaier, “What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and / or stem cells,” *Injury*, vol. 42, pp. S77–S81, 2011.
- [66] C. Gentili & R. Cancedda, “Cartilage and Bone Extracellular Matrix,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 15, pp. 1334–1348, 2009.
- [67] H. Prins, A. K. Braat, D. Gawlitta, W. J. A. Dhert, D. A. Egan, E. Tjissen-slump, H. Yuan, P. J. Coffey, H. Rozemuller, & A. C. Martens, “In vitro induction of alkaline phosphatase levels predicts in vivo bone forming capacity of human bone marrow stromal cells,” *Stem Cell Res.*, vol. 12, pp. 428–440, 2014.
- [68] E. E. Golub & K. Boesze-battaglia, “The role of alkaline phosphatase in mineralization,” *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, pp. 444–448, 2007.
- [69] E. Puchacz, J. B. Lian, G. S. Stein, J. Wozney, K. Huebner, & C. Croce, “Chromosomal Localization of the Human Osteocalcin Gene,” *Endocrinology*, vol. 124, pp. 2648–2650, 1989.
- [70] H. M. Ryoo, H. M. Hoffmann, T. Beumer, B. Frankel, D. A. Towler, G. S. Stein, J. L. Stein, A. J. Van Wijnen, & J. B. Lian, “Stage-Specific Expression of Dlx-5 during Osteoblast Differentiation: Osteocalcin Gene Expression,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 11, pp. 1681–1694, 2015.
- [71] J. D. Termine, H. K. Kleinman, S. W. Whitson, K. M. Conn, M. L. McGarvey, & G. R. Martin, “Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen,” *Cell*, vol. 26, pp. 99–105, 1981.
- [72] N. Udagawa, N. Takahashi, H. Yasuda, M. T. Gillespie, T. J. Martin, & K. Higashio, “Osteoprotegerin Produced by Osteoblasts Is an Important Regulator in Osteoclast Development and Function *,” *Endocrinology*, vol. 141, pp. 3478–3484, 2014.
- [73] T. Koga, Y. Matsui, M. Asagiri, T. Kodama, B. De Crombrughe, K. Nakashima, & H. Takayanagi, “NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation,” *Nat.*

- Med.*, vol. 11, pp. 880–885, 2005.
- [74] S. Gronthos, A. C. W. Zannettino, S. E. Graves, S. Ohta, S. J. Hay, & P. J. Simmons, “Differential Cell Surface Expression of the STRO-1 and Alkaline Phosphatase Antigens on Discrete Developmental Stages in Primary Cultures of Human Bone Cells,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 14, pp. 47–56, 1999.
- [75] J. Yang, P. Shi, M. Tu, Y. Wang, M. Liu, F. Fan, & M. Du, “Bone morphogenetic proteins: Relationship between molecular structure and their osteogenic activity,” *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 3, pp. 127–135, 2014.
- [76] M. Milona, J. E. Gough, & A. J. Edgar, “Expression of alternatively spliced isoforms of human Sp7 in osteoblast-like cells,” *BMS Genomics*, vol. 7, pp. 43–54, 2003.
- [77] S. Khosla, “Minireview: The OPG/RANKL/RANK System,” *Endocrinology*, vol. 142, pp. 5050–5055, 2001.
- [78] M. J. C. Moester, S. E. Papapoulos, R. L. Van Bezooijen, & C. W. G. M. Lo, “Sclerostin: Current Knowledge and Future Perspectives,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 87, pp. 99–107, 2010.
- [79] M. C. Kühn, H. S. Willenberg, M. Schott, C. Papewalis, U. Stumpf, S. Flohé, W. A. Scherbaum, & S. Schinner, “Adipocyte-secreted factors increase osteoblast proliferation and the OPG / RANKL ratio to influence osteoclast formation,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 349, pp. 180–188, 2012.
- [80] S. J. Morrison & D. T. Scadden, “The bone marrow niche for haematopoietic stem cells,” *Nature*, vol. 505, pp. 327–334, 2014.
- [81] F. Langenbach & J. Handschel, “Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro,” *Stem Cell Res. Ther.*, vol. 4, pp. 1–7, 2013.
- [82] M. J. Dalby, N. Gadegaard, & R. O. C. Oreffo, “Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, pp. 558–569, 2014.
- [83] E. Bressan, A. Carraro, F. Letizia, C. Gardin, L. Sbricoli, R. Guazzo, E. Stellini, M. Roman, P. Pinton, S. Sivoletta, & B. Zavan, “Nanotechnology to drive stem cell commitment Review,” *Nanomedicine*, vol. 8, pp. 469–486, 2013.
- [84] N. L. D’Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures,” *Nanoscale*, vol. 7, pp. 18751–18762, 2015.
- [85] M. S. Lord, M. Foss, & F. Besenbacher, “Influence of nanoscale surface topography

- on protein adsorption and cellular response,” *Nano Today*, vol. 5, pp. 66–78, 2010.
- [86] S. Foldberg, M. Petersen, P. Fojan, L. Gurevich, T. Fink, C. P. Pennisi, & V. Zachar, “Patterned poly (lactic acid) films support growth and spontaneous multilineage gene expression of adipose-derived stem cells,” *Colloids Surf. B*, vol. 93, pp. 92–99, 2012.
- [87] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, & V. Svorcik, “Modulation of cell adhesion , proliferation and differentiation on materials designed for body implants,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, pp. 739–767, 2011.
- [88] M. O. Riehle, M. J. Dalby, H. Johnstone, A. Macintosh, & S. Affrossman, “Cell behaviour of rat calvaria bone cells on surfaces with random nanometric features,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 23, pp. 337–340, 2003.
- [89] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. W. Wilkinson, & R. O. C. Oreffo, “The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 6, pp. 997–1003, 2007.
- [90] K. M. Hennessy, W. C. Clem, M. C. Phipps, A. A. Sawyer, F. M. Shaikh, & S. L. Bellis, “The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 29, pp. 3075–3083, 2008.
- [91] V. Bolis, C. Busco, G. Martra, L. Bertinetti, Y. Sakhno, P. Ugliengo, F. Chiatti, M. Corno, & N. Roveri, “Coordination chemistry of Ca sites at the surface of nanosized hydroxyapatite: interaction with H₂O and CO,” *Philos. Trans. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 370, pp. 1313–1336, 2012.
- [92] P. Ducy, C. Desbois, B. Boyce, G. Pinero, B. Story, C. Dunstan, E. Smiths, J. Bonadio, S. Goldstein, K. Gundberg, A. Bradley, & G. Karsenty, “Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice,” *Lett. to Nat.*, vol. 382, pp. 448–452, 1996.
- [93] C. A. Yoshida, H. Komori, Z. Maruyama, T. Miyazaki, & K. Kawasaki, “SP7 Inhibits Osteoblast Differentiation at a Late Stage in Mice,” *PLoS One*, vol. 7, pp. 1–11, 2012.
- [94] F. P. Reinholt, K. Hultenby, A. Oldberg, & D. Heinegård, “Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, pp. 4473–4475, 1990.

Capítulo 4

Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA

Como se ha mencionado en el capítulo 1, el hueso está constituido por diferentes niveles de organización jerárquica. En el nivel inferior se organizan e interaccionan los componentes orgánicos (la mayor parte es colágeno) con los inorgánicos (cristales de apatita), siendo ésta la base a partir de la cual se conforman los niveles de organización superiores que luego varían en relación al tipo de hueso. En consecuencia, la organización en el más bajo nivel toma un papel fundamental en cuanto a propiedades y funcionalidad de los diferentes huesos encontrados en el organismo [1], [2]. Por esta razón se convierte en una parte importante de nuestro trabajo el estudio de la interacción de la gelatina (GEL) con los nanorodillos de HA, la porción orgánica y la porción inorgánica respectivamente de nuestro andamio.

4.1 Soluciones de gelatina

Hasta el momento, fueron sintetizados los nanorodillos de HA, para luego ser evaluados en cuanto a su efecto sobre la viabilidad, proliferación y diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo humano. Una vez confirmada la capacidad de las nanopartículas de HA para inducir una respuesta celular adecuada en las células madre se procedió con el siguiente paso: conferirle al andamio las propiedades estructurales y mecánicas adecuadas.

Como continuación de este estudio referente al desarrollo de materiales con forma de andamio para su uso potencial en implantes de tejidos calcificados, se investigó la evolución hidrodinámica de los sistemas compuestos por gelatina/nanorodillos de HA (GEL-HA). El objetivo específico de este estudio se basa en incrementar el conocimiento sobre la biomimesis de la mineralización de la proteína, y cómo este proceso puede ser manipulado para la preparación de estructuras de gelatina con características morfológicas específicas. Son muchos los estudios de literatura acerca del proceso de mineralización del colágeno[3]–[6]. Todos se refieren a la existencia de la red proteica como un factor determinante en el

Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA

proceso de mineralización y un parámetro a considerar en el momento de seleccionar las condiciones de síntesis apropiadas para la preparación de los andamios basados en proteínas. Nuestro grupo de investigación cuenta con las experiencias previas de manipulación de hidrogeles con proteínas como andamios biológicos y las metodologías utilizadas para la construcción de redes bioactivas y biocompatibles basadas en nanorodillos de hidroxiapatita similares a las encontradas en el hueso [7], [8].

Como se ha mencionado, el colágeno fue reemplazado por la gelatina (GEL) ya que se conoce que la performance del material está muy vinculada al origen de la proteína y es usual encontrar fuentes comerciales pobremente detalladas en este aspecto [9]–[11]. A lo largo del siguiente capítulo detallaremos la confección de diferentes combinaciones de gelatina-HA en forma de soluciones que nos permitirán, a partir de medidas de viscosidad y densidad, estudiar su comportamiento, interacciones y el efecto de los cristales sobre la hidrodinámica de la estructura proteica con el objetivo final de seleccionar la composición adecuada considerando la finalidad principal de nuestro trabajo. Para esto, fueron considerados parámetros como $[\eta]$: viscosidad intrínseca, η_{sp} : viscosidad específica, η_r : viscosidad relativa, K_H : coeficiente de Huggins, K_m : constante de auto-asociación, α : fracción en peso de clusters, R : viscosidad aportada por clusters / viscosidad aportada por cadenas aisladas, $\langle[\eta]\rangle$: viscosidad intrínseca promedio.

El efecto de la HA en la conformación de la gelatina fue estudiado también mediante técnicas espectroscópicas, para confirmar la intra-asociación de las cadenas de proteínas asociadas a partir de la adición de los nanorodillos. Finalmente, la actividad estructuradora de la HA sobre las redes de GEL fue analizada considerando la posibilidad de ser transferida a la morfología final de los andamios preparados. En este trabajo también fue utilizado el ión Ca^{2+} como agregado a las soluciones, de modo de poder comparar la influencia de la presencia de nanorodillos de HA con un sistema de referencia, buscando poder estudiar el efecto de los cristales completos de HA y no solo del Ca^{2+} . En literatura es posible encontrar estudios de la influencia de iones di- y tri-valentes en la inducción de agregados en diversas soluciones [12], [13] y en la influencia sobre cadenas de gelatina en solución [14].

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados para la conformación de las soluciones estudiadas fueron los siguientes: gelatina comercial de piel bovina (GEL, Grade OR, Tipo B, Bloom 225, $\text{PM} \approx 50.000 \text{ g mol}^{-1}$, Merck, $\text{PI} = 4,5\text{-}5,6$), cloruro de calcio (CaCl_2 , $\text{PM} = 91 \text{ g mol}^{-1}$, 99%

Sigma), ácido acético ($C_2H_4O_2$, $PM = 60,05 \text{ g mol}^{-1}$, 99% Sigma), acetato de sodio trihidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, $PM = 136,03 \text{ g mol}^{-1}$, 99% Sigma), hidróxido de sodio (NaOH, $PM = 40 \text{ g mol}^{-1}$, 90%, Sigma) y bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$, $PM = 84,02 \text{ g mol}^{-1}$, 99% Sigma) fueron utilizados sin mayores purificaciones.

Además de estos reactivos fueron utilizados los nanorodillos de HA (PPG) cuya síntesis fue descrita en el capítulo 3.

4.2.2 Preparación de las soluciones gelatina-HA

En primer lugar se confeccionaron soluciones de diferente concentración de gelatina (0,0045, 0,006, 0,0075, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1 y 0,12 g ml^{-1}). Las mezclas acuosas fueron elaboradas dejando hidratar por 30 minutos en solución reguladora de acetato de sodio/ácido acético ($pH = 4,2$) y temperatura ambiente la cantidad correspondiente a cada concentración. Esta solución reguladora fue seleccionada para la disolución de la proteína debido a que la gelatina, a pH mayores a 5-6 es propensa a auto-entrecruzarse [15] pero para esta etapa de nuestra investigación es necesario conocer su interacción con los nanorodillos. Seguido a esto, se culminó con la disolución mediante agitación a 500 rpm y $59 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Finalmente las soluciones fueron colocadas en baño termostático por 24 horas con el fin de alcanzar el equilibrio definitivo. Una vez logrado el equilibrio fueron agregados, en cada una de las soluciones, las diversas cantidades de HA y $CaCl_2$, (aporte de calcio). Ambos compuestos se incorporaron a las soluciones bajo sonicación vigorosa en tres diferentes cantidades (20, 30 y 50 mg /35 ml).

4.2.3 Medidas de viscosidad y densidad

Las medidas de viscosidad y densidad fueron tomadas para cada una de las combinaciones posibles entre las diferentes concentraciones de gelatina, las tres distintas cantidades de HA y Ca^{2+} ; y las tres temperaturas: 25, 30 y 37 $^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ con un viscosímetro A&D Company Limited SV-10 y con un densímetro DMA 35N portátil. Un baño termostático fue utilizado para el mantenimiento de la temperatura. En medidas de viscosidad a bajas concentraciones, es posible que se dé el efecto de absorción por capilaridad [16], obstáculo que fue evitado mediante la utilización de un vibro-viscosímetro.

La viscosidad de una solución acuosa proteica se relaciona profundamente con las propiedades hidrodinámicas, dependiendo de las propiedades intrínsecas del biopolímero (como la masa molecular, el volumen, forma, tamaño, carga superficial, posibilidad de deformación y contenido de amino ácidos) y de los estímulos externos (como el pH ,

temperatura, fuerza iónica, efecto del solvente, etc). La viscosidad de una solución, η , se puede relacionar con la viscosidad del solvente, η_0 , y con la concentración de la proteína, C , en g/mL mediante la serie [17]:

$$\eta = \eta_0(1 + k_1C + k_2C^2 + k_3C^3 + \dots) \quad (1)$$

donde k_1 refiere a la contribución de las moléculas individuales de proteína, mientras k_2 y los coeficientes siguientes se asocian a los efectos de las interacciones de 2, 3 o más moléculas proteicas. La constante k_1 es también conocida como la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y la Ec. (1) se puede reescribir para obtener una expresión específica de la relación viscosidad/concentración como función de la concentración de la solución [18]:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_2[\eta]^2C + k_3[\eta]^3C^2 + k_4[\eta]^4C^3 + \dots \quad (2)$$

donde $\eta_{sp} = \eta_r - 1$ es la viscosidad específica y $\eta_r = \eta/\eta_0$ es la viscosidad relativa. La viscosidad intrínseca, $[\eta]$ se puede definir como la habilidad del polímero para incrementar la viscosidad del solvente y contiene información acerca de la forma macromolecular, flexibilidad, y, para partículas no esféricas, la masa molar [18]. Es un parámetro que puede ser experimentalmente obtenido extrapolando la concentración de la proteína a cero:

$$[\eta] = \lim_{\eta_{sp} \rightarrow 0} \eta_{sp}/C \quad (3)$$

Cuando la asociación es descartada, la ley de Einstein de la viscosidad es válida y todas las cadenas disueltas se encuentran aisladas, por lo tanto la viscosidad relativa del polímero sería:

$$\eta_r = 1 + [\eta]C \quad (4)$$

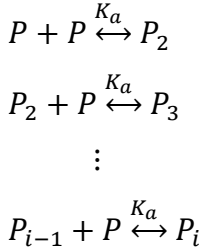
y $[\eta]$ puede ser evaluada por las medidas de viscosidad a concentraciones finitas aplicando diversos métodos de extrapolación lineal para diluciones infinitas, [19], [20], [21] como la ecuación de Huggins' [22]:

$$\eta_r = 1 + [\eta]C + K_H[\eta]^2C^2 \quad (5)$$

donde, K_H es el coeficiente de Huggins. Si comparamos las ecuaciones (2) y (5), el coeficiente de Huggins pertenece al segundo término en la expansión de η_{sp}/C en términos de C , ecuación (2). Como las poblaciones relativas de las diferentes especies dependen de más

Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA

altas concentraciones que las primeras, su presencia debe contribuir a los términos k_i . Estas poblaciones pueden ser expresadas formalmente en términos de constantes de equilibrio. Considerando los siguientes equilibrios de moléculas proteicas (P) con idénticas constantes de auto-asociación, K_a , para todos los equilibrios:



y cualquier desviación de la ecuación (4) se debe a auto-asociaciones macromoleculares o formación de clusters. Por lo tanto, en lugar de la ecuación convencional de Huggins (Ec.5), la $\eta_{r,real}$ de una solución polimérica puede ser representada por:

$$\eta_{r,true} = 1 + [\eta]C + 6K_m[\eta]C^2 \quad (6)$$

donde K_m es la constante de auto-asociación. Esta constante está relacionada con el tamaño y las interacciones entre las cadenas de polímero en solución y relacionándose con el coeficiente de Huggins (K_H) y $[\eta]$ del siguiente modo:

$$K_m = \frac{K_H[\eta]}{6} \quad (7)$$

El coeficiente de Huggins es una característica de interacciones poliméricas tanto hidrodinámicas como termodinámicas [23] y es una función decreciente del factor de expansión de radio de viscosidad, α_n :

$$\alpha_n = ([\eta]/[\eta]_0)^{1/3} \quad (8)$$

donde $[\eta]_0$ es la viscosidad intrínseca para cadenas no perturbadas por el efecto de volumen excluido y $[\eta]$ la viscosidad intrínseca de cadenas perturbadas por este efecto; ambos en sistemas de buen solvente, donde la interacción polímero-solvente es favorecida; de forma contraria a lo que ocurre en un mal solvente, donde esa interacción no se ve favorecida.

Basándonos en el procedimiento de Pan y col. [24], cuando ocurre el auto-ensamblado, la viscosidad intrínseca debe ser promedio de la viscosidad intrínseca de cadenas aisladas $[\eta]$ y la de clusters formados $[\eta]c$,

$$[\eta] = \alpha[\eta]_c + (1 - \alpha)[\eta] \quad (9)$$

donde α es la fracción en peso de los clusters. De este modo, la ecuación (4) puede ser reescrita del siguiente modo:

$$\eta_r = 1 + [\eta](1 + R\alpha)C \quad (10)$$

donde

$$R = ([\eta]_c - [\eta])/[\eta] \quad (11)$$

Asumiendo que la constante molar de auto-ensamblado Ka es idéntica para todas las macromoléculas en equilibrio, el parámetro α puede ser definido de la siguiente manera [24]:

$$\alpha = [2(K_m C)^2 + (1 + 4K_m C)^{1/2} - 2K_m C - 1]/[2(K_m C)] \quad (12)$$

Por otra parte, es habitual medir la densidad de la solución del polímero como un método independiente para evaluar el comportamiento hidrodinámico de las redes proteicas. La viscosidad intrínseca (dinámica), $[\eta]_{din}$, se define del siguiente modo [25]:

$$[\eta]_{din} = \{(1 - \bar{v}\rho_0)/\rho_0\} + [\eta] \quad (13)$$

$$\bar{v} = \left\{ \frac{1 - \partial\rho/\partial C}{\rho_0} \right\} \quad (14)$$

donde \bar{v} se define como el volumen específico parcial y corresponde al volumen ocupado en solución por la proteína no hidratada por gramo de proteína seca; ρ_0 y ρ son la densidad del solvente y de la solución respectivamente y $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca definida previamente sin la corrección de densidad, también conocida como viscosidad intrínseca cinemática [25].

4.2.4 Espectroscopía de fluorescencia y UV-Vis

El espectro de absorción UV-Vis fue obtenido a 25 °C y a 37 °C mediante un JASCO V-630 bio-espectrofotómetro con controlador de temperatura (ETCS-761 JASCO). El espectro de emisión de fluorescencia fue registrado a 25 °C con un Varian Cary Eclipse espectrofluorómetro. La solución buffer fue empleada como blanco.

4.2.5 Estudio de la capacidad de moldeado de las soluciones por microscopía óptica

Cuando la solución estuvo ya formada, las muestras se introdujeron en un freezer a -50°C por 24 horas, luego se liofilizaron en un Rificor L-A-B4 para realizar el estudio preliminar con microscopía óptica.

Las fotografías de microscopía óptica fueron obtenidas con un microscopio Nikon Eclipse E-200 POL (Tokyo, Japan). Las muestras fueron situadas entre porta y cubre objetos. Las microfotografías fueron tomadas sin utilizar la técnica de la polarización.

4.3 Análisis Hidrodinámico

4.3.1 Análisis de la Viscosidad Intrínseca

Los datos obtenidos y la interpretación de los parámetros derivados proveyeron de una clara idea de la organización macromolecular de la estructura de la red [26], [27]. La dependencia de η_{sp}/C respecto de la concentración de las soluciones puras de gelatina se muestra en la Figura 4.1. Luego de la adición de nanorodillos de HA e iones Ca^{2+} fueron obtenidos resultados similares. Se puede observar una relación directa entre η_{sp}/C y C al tiempo que no se observan comportamientos anómalos que puedan indicar efectos electroviscosos o precipitación salina [18], [28]. Es posible observar que η_{sp}/C aumenta velozmente a grandes concentraciones presentando los gráficos una curvatura positiva. A grandes concentraciones, los órdenes más altos de la serie de la ecuación (2) son dominantes, siendo la viscosidad significativamente afectada por los coeficientes viriales relacionados con interacciones moleculares. Debido a las asociaciones de los polímeros, no sería adecuado utilizar ecuaciones lineales y los valores de $[\eta]$ y K_H deben ser obtenidos de la aplicación de la ecuación general (2). Los resultados del análisis de regresión polinomial se encuentran detallados en la Tabla 4.1. Se puede observar que las soluciones de gelatina sin la presencia de aditivos son bien descritas por una función polinómica de segundo orden; mientras que la adición de nanorods de HA o iones Ca^{2+} incrementa el orden polinomial a 3 y 4, respectivamente. La incorporación de aditivos en todos los casos incrementa la asociación del polímero; su efecto específico sobre la red macromolecular se analizará continuación.

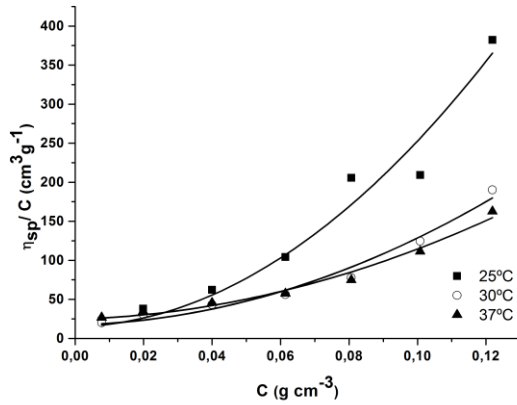


Figura 4.1 Variación de η_{sp}/C vs concentración de gelatina, C , a diferentes temperaturas.

Tabla 4.1 Coeficientes de la ecuación polinomial (2): $\eta_{sp}/C = P_1 + P_2C + P_3C^2 + P_4C^3 + \dots$, donde $P_1 = [\eta]$, $P_2 = k_2[\eta]^2$, $P_3 = k_3[\eta]^3$, $P_4 = k_4[\eta]^4$ y así sucesivamente.

25°C						
GEL	$P_1/cm^3 g^{-1}$	$P_2/cm^6 g^{-2}$	$P_3/cm^9 g^{-3}$	$P_4/cm^{12} g^{-4}$	$P_5/cm^{15} g^{-5}$	R^2
	14,9	105,4	22729			0,99877
HA						
+20mg	16,4	130,5	1286	82373		0,99879
+30mg	6,9	15,5	45744,8	$-8,22 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$	0,99154
+50mg	11,3	60,4	$3,17 \times 10^4$	$-5,9 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	0,99478
Ca²⁺						
+20mg	18,6	100,2	$2,6 \times 10^4$	$-4,6 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	0,99879
+30mg	11,3	55,9	$1,7 \times 10^4$	$-2,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	0,99979
+50mg	16,4	102,9	$-4,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$-1,7 \times 10^6$	0,99225
30°C						
GEL	17,5	98	10133,2			0,98998
HA						
+20mg	17,6	110,9	2304	32506,7		0,99975
+30mg	12,05	100,2	$2,5 \times 10^4$	$-4,5 \times 10^5$	$2,3 \times 10^6$	0,98998
+50mg	9,0	45,7	$2,5 \times 10^4$	$-4,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	0,99387
Ca²⁺						
+20mg	14,4	66,4	$3,2 \times 10^4$	$-6,3 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	0,99678
+30mg	9,13	13,4	$2,7 \times 10^4$	$-5,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	0,99298
+50mg	11,9	34	$1,1 \times 10^3$	$-1,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^6$	0,99837
37°C						
GEL	24,6	130,4	7990			0,99678
HA						
+20mg	19,3	122,2	4323	7949,7		0,98997
+30mg	18,4	219,3	$2,4 \times 10^4$	$-4,7 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	0,99126
+50mg	6,10	20,21	$3,1 \times 10^4$	$-5,4 \times 10^5$	$2,7 \times 10^6$	0,99689
Ca²⁺						
+20mg	22,2	45,4	$2,7 \times 10^4$	$-5,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$	1
+30mg	14,4	19,1	$1,5 \times 10^4$	$-2,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	0,99899
+50mg	19,5	45,4	$-9,2 \times 10^3$	$3,4 \times 10^4$	$-2,4 \times 10^6$	0,97309

4.3.2 Rol de los nanorodillos de HA en los parámetros $[\eta]$, K_H y K_m

Los parámetros $[\eta]$, K_H y K_m obtenidos se encuentran detallados en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Parámetros $[\eta]$, K_H y K_m obtenidos

25°C				
GEL	$[\eta]_{kin}/cm^3 g^{-1}$	$[\eta]_{dyn}/cm^3 g^{-1}$	K_H	$K_m/cm^3 g^{-1}$
	14,9	15,2	0,474	1,177
HA				
+20mg	16,4	16,7	0,484	1,324
+30mg	6,9	7,2	0,321	0,372
+50mg	11,3	11,5	0,474	0,889
Ca ²⁺				
+20mg	18,6	18,8	0,291	0,899
+30mg	11,3	11,6	0,430	0,810
+50mg	16,4	16,7	0,386	1,053
30°C				
GEL	17,5	17,8	0,322	0,936
HA				
+20mg	17,6	17,9	0,357	1,047
+30mg	12,1	12,3	0,690	1,386
+50mg	9,0	9,3	0,568	0,849
Ca ²⁺				
+20mg	14,4	14,7	0,321	0,769
+30mg	9,1	9,4	0,160	0,245
+50mg	12	12,3	0,238	0,474
37°C				
GEL	24,6	24,8	0,216	0,884
HA				
+20mg	19,3	19,6	0,327	1,053
+30mg	18,4	18,7	0,648	1,986
+50mg	6,1	6,4	0,539	0,548
Ca ²⁺				
+20mg	22,2	22,5	0,092	0,340
+30mg	14,4	14,7	0,092	0,221
+50mg	19,5	19,8	0,119	0,387

El K_H debe ser menor en buenos solventes, con valores de aproximadamente 0,33 mientras que valores más altos que 0,521 son frecuentes en solventes pobres [29]. Estos últimos valores son atribuidos a las asociaciones de cadenas de polímero [23]. En el caso de las soluciones puras de gelatina, el valor de K_H a $T = 25$ °C es cercano a 0,5 y decrece a medida que aumenta la temperatura. A $T > 25$ °C, las interacciones proteína-solvente están favorecidas y la solución buffer actuaría como un buen solvente. De acuerdo con la ecuación (7) K_H tiene una relación directa con la asociación del polímero, y una correlación inversa con la viscosidad intrínseca; además, la viscosidad intrínseca depende directamente de la

Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA

forma del polímero y del volumen excluido [27]. La reducción de los valores de K_H con la temperatura en soluciones de gelatina pura puede deberse a disociaciones del polímero gracias al incremento de los movimientos Brownianos (pequeño decrecimiento de los valores de K_m) y el volumen excluido de la proteína. El cambio en el volumen excluido puede deberse a la asociación de los grupos carboxilo y amino con el solvente mediante enlaces puente de hidrógeno (incremento de $[\eta]$). Al comparar las soluciones de gelatina pura con las soluciones a las cuales se les adicionó 20 mg de HA, a $T < 30$ °C no se encontraron diferencias en los valores de K_H , K_m y $[\eta]$, hecho que sugiere que no existe un efecto estructurador extra por parte de la HA. Por otro lado, a $T = 37$ °C, hubo un decrecimiento significativo de $[\eta]$ complementado con un incremento de los valores de K_m y K_H . Evidentemente la presencia de nanorodillos de HA, incluso en pequeñas cantidades, genera un tipo de asociación que supera el movimiento molecular generado por el incremento de la temperatura. La incorporación de 30 mg de nanorodillos de HA en las soluciones de gelatina a 25 °C causa un descenso en el coeficiente de Huggins, $K_H = 0,321$. Este efecto ocurre simultáneamente con una gran disminución de los valores de K_m y $[\eta]$. La adición de una gran cantidad de nanorodillos genera una reducción en la asociación inter-catenaria de la proteína y en el volumen excluido de las cadenas proteicas; hecho que sería posible si las moléculas de proteína se enrollasen sobre sí mismas o alrededor de los nanorodillos formando pequeños agregados. En estas condiciones y a una $T > 25$ °C, los valores de K_m y $[\eta]$ se incrementan probablemente por efecto del movimiento térmico causando que los pequeños agregados se asocien formando agregados más grandes. Debido al incremento de los valores de K_H , se puede observar que el efecto de la asociación de agregados de proteínas excedería el efecto del volumen excluido. La adición de aun más grandes cantidades de nanorodillos (50 mg) genera un simultáneo decrecimiento en las asociaciones entre las cadenas proteicas y su volumen excluido. Este efecto se incrementa con el aumento de la temperatura y es presumiblemente debido a una intensificación de las asociaciones intercatenarias de la gelatina alrededor de los cristales de HA. En los procesos industriales que se realizan sobre la gelatina, muchos de los enlaces peptídicos se rompen, y un gran número de grupos ACOOH y ANH_2 son disociados. A $\text{pH} = 4$, más bajo que el IP de la gelatina, las moléculas proteicas tienen carga positiva. Fue demostrado que esos grupos pueden interactuar con los grupos $-\text{OH}$ del vidrio [16] y probablemente ellos tienen el mismo comportamiento con los grupos hidroxilos de los cristales de HA negativamente cargados (IP = 3,1-3,4) [30]. Una representación esquemática de la asociación de la gelatina luego de la adición de nanorodillos de HA se puede observar en la Figura 4.2.

Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA

- Hidroxiapatita +

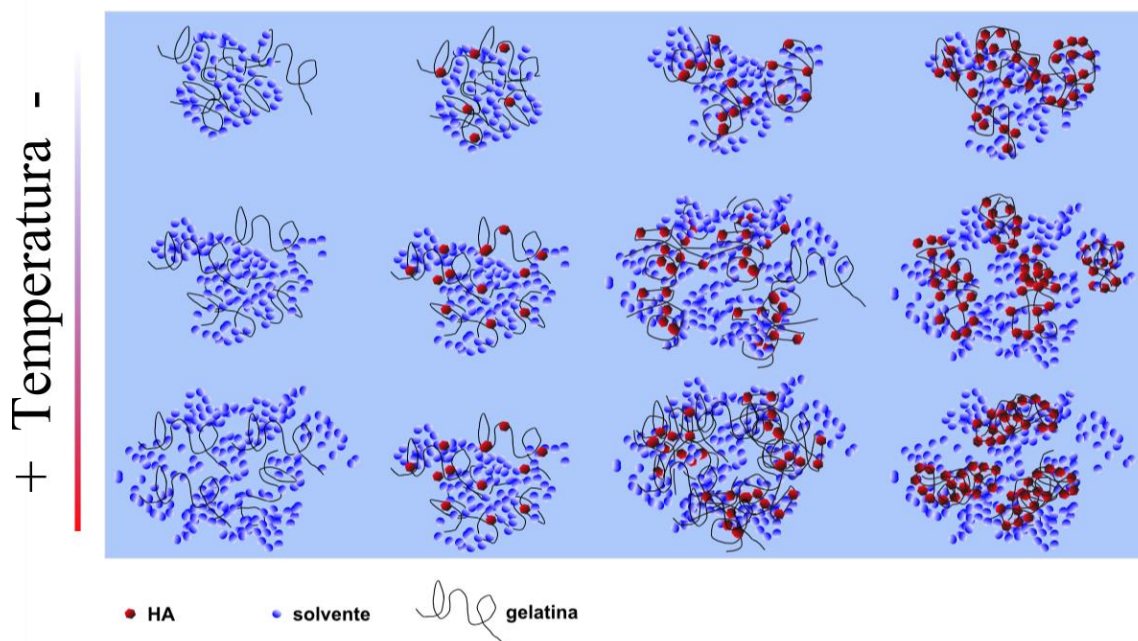


Figura 4.2. Representación esquemática de la evolución de las redes acuosas de gelatina-HA.

La presencia de cationes divalentes (Ca^{2+}) induce la agregación de polielectrolitos sintéticos [12], [13] incluyendo la gelatina [14]. Para confirmar el efecto de los nanorodillos de HA como un todo en la asociación de la gelatina, y poder descartar la responsabilidad del Ca^{2+} en el ensamblado proteico, fue evaluado el efecto de la incorporación de diferentes cantidades de Ca^{2+} sobre el comportamiento hidrodinámico de las soluciones de gelatina. La adición de 20 mg de Ca^{2+} causa un decrecimiento en los valores de K_H por debajo de 0,33, efecto que aumenta con la temperatura. Muchos fenómenos en ciencia de polímeros coloidales e interfaces relacionados con electrolitos muestran especificidad por iones. Hace más de un siglo, Hofmeister encontró un orden particular de iones en la habilidad de sales de un contraión común para precipitar proteínas de huevo [31]. Se pensaba que la influencia de un ion en las propiedades macromoleculares era causada, por lo menos en parte, creando o rompiendo la estructura de masa del agua. Los iones llamados cosmotropos, los cuales son considerados “generadores de la estructura del agua” son fuertemente hidratados y tienen efectos estabilizantes de proteínas. Por otro lado, los iones caotrópicos pueden quebrar estructuras acuosas y son conocidos por desestabilizar estructuras proteicas [32]. El Ca^{2+} es un ión caotrópico; su presencia en una solución desestabiliza las interacciones intramoleculares de la gelatina, incrementando la aleatoriedad de las cadenas de gelatina y rompiendo la estructura del agua. Todos los efectos mencionados favorecen los contactos

solvente- Ca^{2+} -proteína, disminuyendo la asociación intercatenaria de la proteína (descenso significativo de los valores de Km) e incrementando mínimamente el volumen de hidratación. Ambos factores causan un descenso en K_H . Aunque la gelatina a $\text{pH} = 4$ tiene una carga general positiva, al estar cerca del punto isoeléctrico existen muchos grupos $-\text{COOH}$ para asociarse con iones calcio mediante uniones electrostáticas. Un mayor incremento en la cantidad de Ca^{2+} agregado (30 mg) a $25\text{ }^\circ\text{C}$ causa un pequeño incremento en el valor de K_H asociado a una reducción en $[\eta]$ y Km . El efecto en el volumen excluido es superior al efecto en la asociación de las cadenas proteicas; se asume que este hecho se debe a la existencia de conexiones entre las cadenas de proteínas por la presencia de iones calcio. Las interacciones intercatenarias son más efectivas que las intracatenarias en el desarrollo la complejidad por la rigidez de las cadenas. El aumento de la temperatura ($T > 25\text{ }^\circ\text{C}$) aumentaría la flexibilidad de la cadena y la probabilidad de la eficacia de las interacciones intracatenarias; favoreciendo la reducción de K_H , Km y $[\eta]$. Luego de la adición de grandes cantidades de Ca^{2+} (50 mg) además de las uniones intramoleculares, una mayor proporción de entrecruzamientos intermoleculares podrían aparecer. Por lo tanto, para las soluciones de GEL con 50 mg de Ca^{2+} a $25\text{ }^\circ\text{C}$ los parámetros Km y $[\eta]$ muestran un nuevo aumento. Este efecto persiste con el subsecuente incremento de la temperatura.

4.3.3 Asociación de los sistemas de gelatina y gelatina-HA

La agregación proteica también puede ser analizada a partir del estudio de los parámetros α , R y $\langle[\eta]\rangle$, considerando el incremento de la concentración proteica, temperatura y aditivos, Figuras 4.3 y 4.4; Ca^{2+} y HA respectivamente. Como fue discutido previamente, la agregación de las cadenas de las soluciones de gelatina sin aditivos se incrementa linealmente con la concentración y decrece con la temperatura. La incorporación de HA y de Ca^{2+} intensificó el efecto de la temperatura en la asociación de proteínas. La Figura 4.3 muestra una gran disminución de los parámetros α y R a $37\text{ }^\circ\text{C}$ luego de la incorporación de 20 mg de Ca^{2+} lo que se acrecienta con las siguientes adiciones de ion calcio. Un efecto similar se puede observar luego de la adición de HA, Figura 4.4. Por el contrario, incorporar nanorodillos de HA muestra un efecto diverso sobre los parámetros α y R comparado a lo observado con el Ca^{2+} .

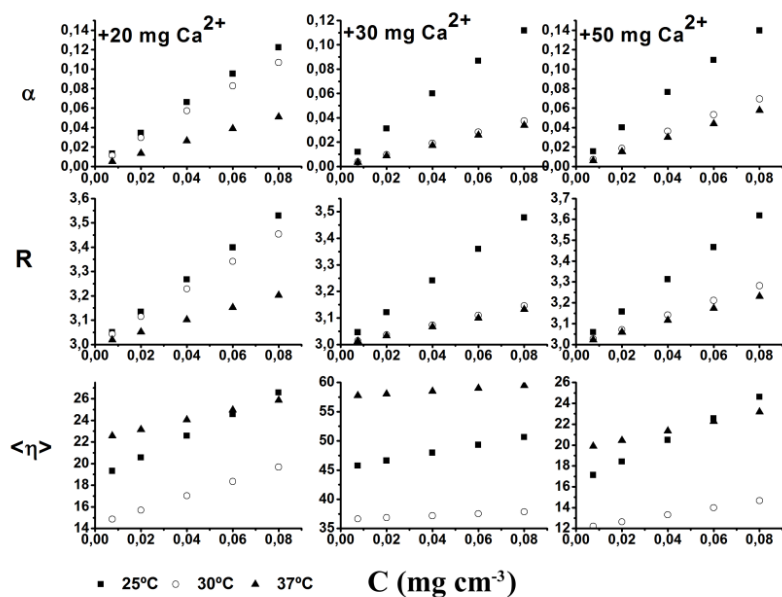


Figura 4.3 Dependencia de los parámetros α , R , $\langle[\eta]\rangle$ de la concentración de gelatina, C , luego de la adición de diferentes cantidades de Ca^{2+} .

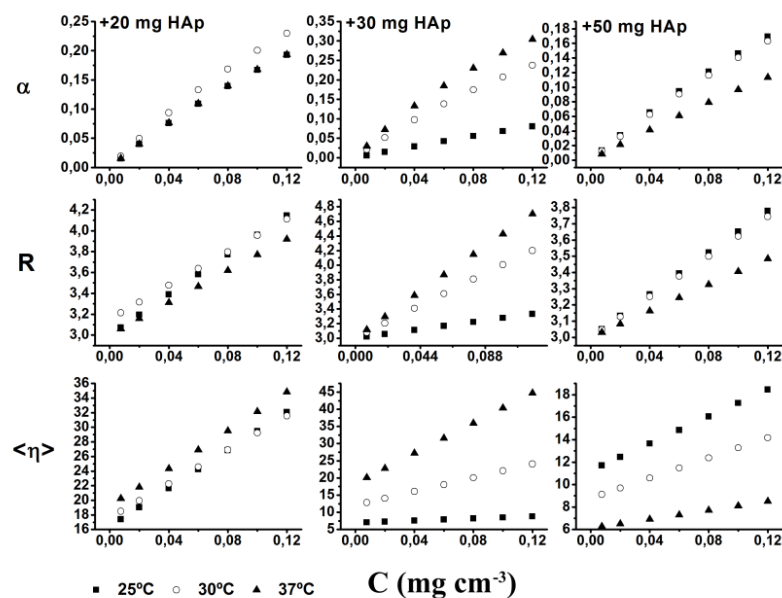


Figura 4.4 Dependencia de los parámetros α , R , $\langle[\eta]\rangle$ de la concentración de gelatina, C , luego de la adición de diferentes cantidades de HA.

La adición de 30 mg de nanorodillos de HA incrementa la agregación de la gelatina, mientras que el agregado de cantidades más allá de la mencionada causa un decrecimiento en el parámetro, de acuerdo a lo sucedido previamente con los valores reportados de Km . La viscosidad intrínseca promedio $\langle[\eta]\rangle$, muestra un gran crecimiento con el incremento de la

temperatura en las soluciones originales de gelatina que decrece con la adición de 20 mg de HA. La adición de 30 mg de HA hace descender fuertemente los valores de la viscosidad intrínseca media a $T < 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que es consistente con la agregación de la proteína y el decrecimiento del volumen excluido. La situación se revierte con la adición de 50 mg de HA, lo que muestra que la viscosidad intrínseca media cae con la temperatura. La presencia de grandes cantidades de nanorodillos de HA provocó una alteración en el volumen excluido de la proteína y, por lo tanto, un decrecimiento en la viscosidad. Hay una gran reducción en los valores de la viscosidad intrínseca promedio debido a los efectos del Ca^{2+} a $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que se incrementa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Este hecho confirma nuestra asunción previa de las interacciones internas entre las cadenas de proteínas debido a la presencia de iones calcio. A temperaturas más altas las cadenas son más flexibles y estas interacciones se ven favorecidas. Asimismo, un mayor incremento en la temperatura aumenta la agitación térmica por lo que se comienza a priorizar las interacciones entre las cadenas de proteína. Esto puede ser claramente observado a partir de la variación de $[\eta]c$ (contribución de la viscosidad intrínseca debida a la existencia de agregados proteína + proteína) respecto de la concentración de proteína. La presencia de clusters proteicos ejerce un pequeño efecto sobre $\langle[\eta]\rangle$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuando la proteína es lo suficientemente flexible para doblarse sobre sí misma y las interacciones intramoleculares suceden.

4.3.4 Influencia de los nanorodillos de HA en la hidratación y rigidez de las cadenas de gelatina

La hidratación consiste en la unión de los dipolos del agua a iones o grupos iónicos, fenómeno que toma lugar también en soluciones. La extensión de la hidratación puede ser determinada y medida por el incremento en peso. De todas formas, esta extensión en biopolímeros acuosos está acompañada por un pequeño cambio en el volumen de contracción del soluto y del solvente, por lo que es difícil de medir directamente. Una forma de estudiar el comportamiento hidrodinámico de las redes es la medición de la densidad de las soluciones. La Figura 4.5 muestra la variación del volumen específico parcial (\bar{v}) respecto de la cantidad de nanorodillos de HA y Ca^{2+} agregado a la solución proteica a diferentes temperaturas.

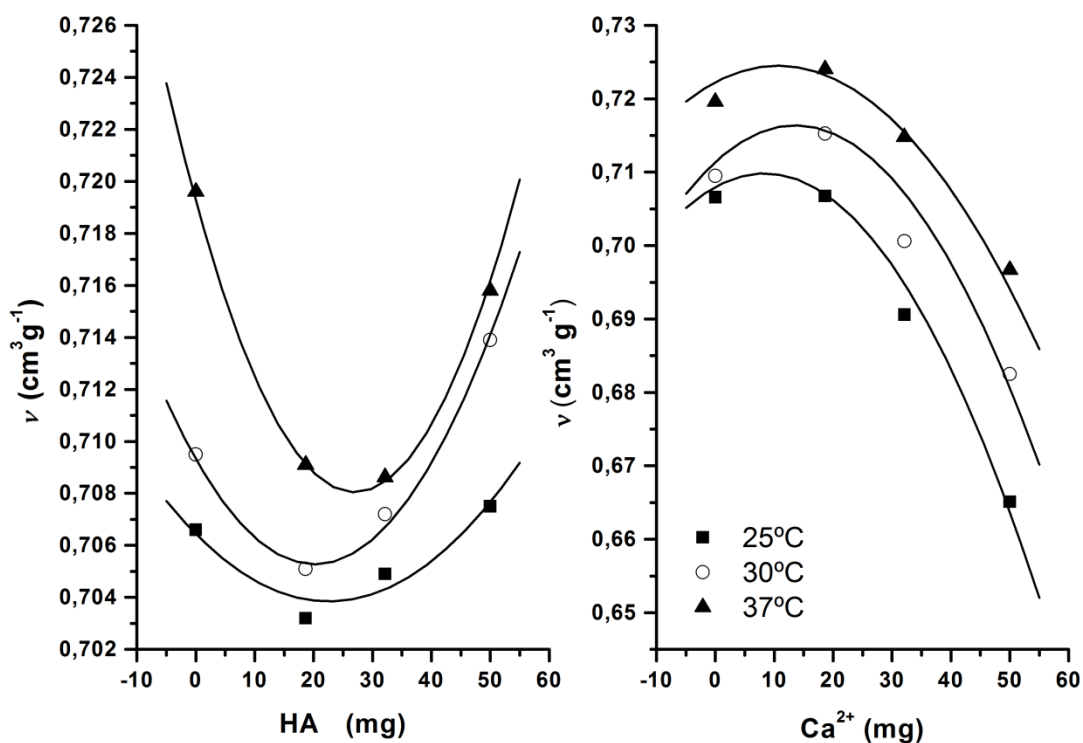


Figura 4.5 Efecto de la cantidad de aditivo en el volumen específico parcial, \bar{v} .

Los valores de \bar{v} siempre aumentan con el incremento de la temperatura; efecto que concuerda con un incremento del desorden y desenrollamiento de las cadenas de gelatina. La variación de \bar{v} con la cantidad de HA añadida puede ser interpretada con una parábola que presenta un mínimo alrededor de 20 mg de HA a 25 °C y 30 °C; dicho mínimo se desplaza a 28 mg de HA con el incremento de la temperatura. La reducción de \bar{v} hasta la adición de 20 mg de HA puede ser asignada a la mayor complejidad de las interacciones intracatenarias que resultan de la contracción de las cadenas individuales de gelatina. Adiciones subsiguientes de nanorodillos de HA provocan un efecto de mayor complejidad intercatenaria en la red luego del primer acomplejamiento y la formación de clusters más grandes, de acuerdo con los datos de viscosidad previamente analizados. A diferencia del comportamiento con la incorporación de HA, el agregado de Ca^{2+} causa un continuo decrecimiento en el parámetro \bar{v} . La formación de complejos de Ca^{2+} con los grupos ACOOA se encuentra bien documentada y el modelo “caja de huevos” fue propuesto para la comprensión de las intrincadas formas de estas uniones [33]. Desde la estructura molecular de las moléculas de gelatina, la formación de un complejo $\text{Ca}^{2+}/\text{COOH}$ es una posibilidad definida y un hecho que puede explicar la reducción de los valores de \bar{v} . Generalmente, el efecto de la temperatura sobre las soluciones de

proteínas es significativo. Las propiedades teóricas de un fluido Newtoniano o un polímero líquido son consistentes con la ecuación de Arrhenius [34]:

$$\eta_{\text{apparent}} = Ae^{E_a/RT} \quad (15)$$

donde A es una constante característica de cada polímero que tiene una resistencia al flujo y peso molecular específico, E_a es la energía de activación para el proceso de flujo, R es la constante de gases, y T es la temperatura absoluta. Si la viscosidad aparente, η_{app} , se reemplaza con la viscosidad intrínseca o la viscosidad relativa, la curva $d\text{Ln}[\eta]/d(1/T)$ o $d\text{Ln}(\eta_r)/d(1/T)$ puede también ser utilizada como un índice de la resistencia de un polímero a fluir ya que es proporcional a E_a . Además, la pendiente crece con la resistencia al flujo del polímero. Por otra parte, para una serie de sistemas, el incremento en la resistencia al flujo puede estar relacionado con el incremento de su dureza relativa [34]. La variación de $d\text{Ln}[\eta]/d(1/T)$ muestra que la rigidez del polímero decrece con la temperatura para la gelatina pura y para gelatina- Ca^{2+} , Tabla 4.3; niveles mayores de rigidez fueron observados en las soluciones formadas en un ambiente de Ca^{2+} .

Tabla 4.3 Variación de $d\text{Ln}[\eta]/d(1/T)$.

T/°C	$d\text{Ln}[\eta]/d(1/T)$ of GEL Solution						
	+ HA/mg			+Ca ²⁺ /mg			
		20	30	50	20	30	50
25	-18890	-23282	-86889	39590	10562	9513	12576
30	-69345	-23282	-86889	39590	-801	-1125	-721
37	-241882	-23282	-86889	39590	-12692	-12650	-14584

Este hecho puede ser atribuido a la formación de uniones adicionales entre las cadenas de gelatina mediada por iones Ca^{2+} . Diferentes consecuencias pueden ser apreciadas en presencia de los nanorodillos de HA: (i) el efecto de la temperatura en la rigidez de las cadenas de gelatina desaparece, (ii) una cantidad pequeña de HA causa una preservación de la estructura de las cadenas de gelatina sobre el efecto de la temperatura, probablemente debido a la formación de complejos intracatenarios, (iii) una cantidad moderada de HA incorporada a la solución de gelatina decrece la rigidez de la cadena, probablemente debido a la formación intracatenaria de agregados, y finalmente (iv) hay un alto incremento en la rigidez de la cadena debido a la formación de una gran cantidad de agregados intracatenarios.

4.3.5 Estudios de quimioluminiscencia

Los cambios en la conformación de las proteínas, como desdoblamiento o agregación, generalmente llevan a grandes cambios en sus emisiones UV-vis y fluorescencia. En principio, las emisiones de grupo aromático de una proteína original pueden ser más grandes o más pequeñas que la emisión en soluciones acuosas. Consecuentemente, ambos cambios, incremento y decrecimiento en la intensidad UV pueden ocurrir debido a cambios en la conformación de la proteína [35]. Para estudiar más profundamente el efecto de la incorporación de HA en la construcción de redes acuosas de gelatina, analizamos la variación de la conformación de la proteína a través de métodos espectroscópicos. Un espectro de gelatina pura se muestra en la Figura 4.6.

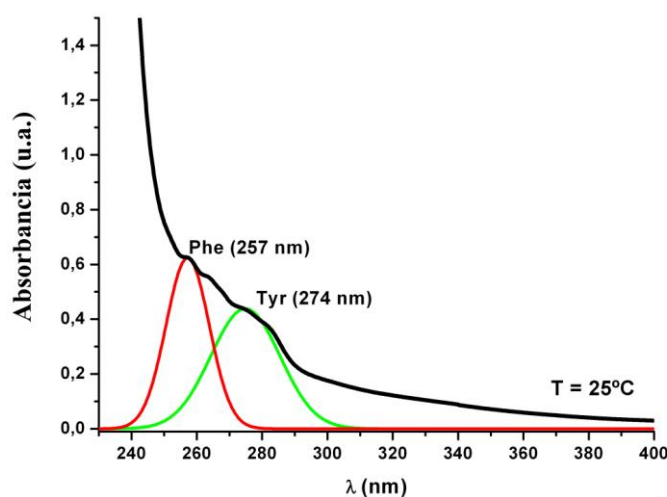


Figura 4.6 Espectro de absorción UV-vis de la solución de gelatina a 25 °C.

El espectro de absorción UV de la gelatina tipo-B exhibe una fuerte banda debajo de los 240 nm que puede ser atribuida a los aminoácidos no aromáticos de las estructuras [36]. Las bandas observadas en el intervalo de longitudes de onda más grande (250-300 nm) se deben a la presencia de aminoácidos aromáticos. La deconvolución de las bandas de absorción confirmó la existencia de dos picos centrados a 257 nm correspondiente a la fenilalanina y 274 nm, a la tirosina, que son los aminoácidos presentes en la gelatina en proporción de 14 y 1,2 residuos cada/1000 residuos totales respectivamente [36]. En la región espectral más allá de los 300 nm no fueron detectadas señales indicando la ausencia de especies oxidantes o impurezas. Los espectros de absorción UV-vis de las soluciones de gelatina luego de la adición de diferentes cantidades de nanorodillos de HA se muestran en la Figura 4.7a.

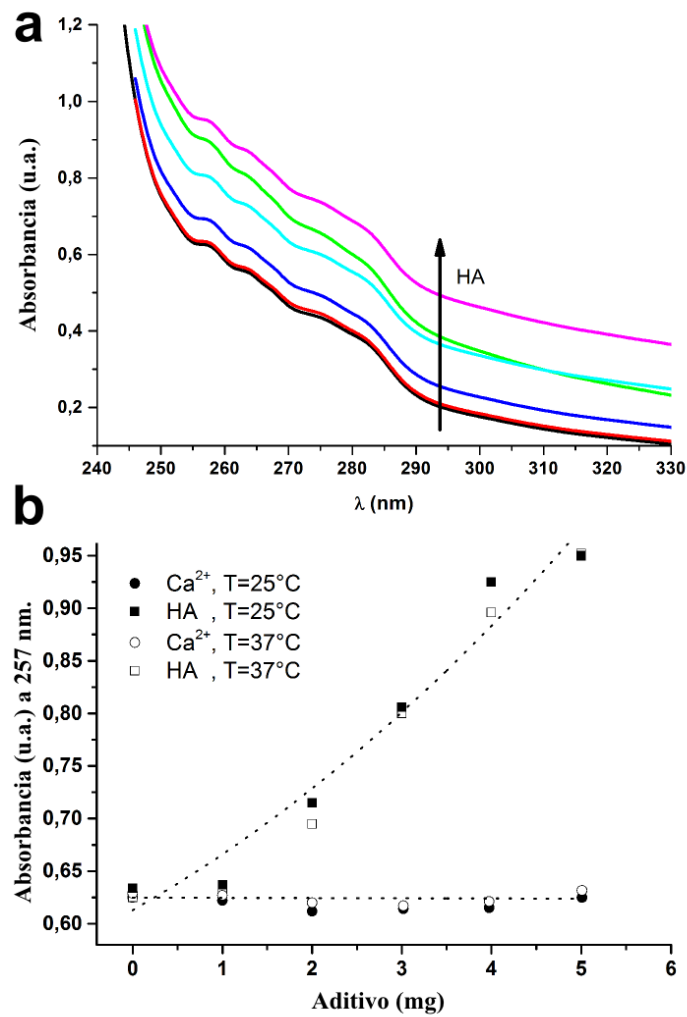


Figura 4.7 Espectro de absorción UV-vis de soluciones de gelatina a 25 °C luego de la incorporación de cantidades crecientes de nanorodillos de HA (a). Dependencia de la absorción de aminoácidos aromáticos con la cantidad de aditivos y la temperatura (b).

Se puede observar un radical aumento de las emisiones de absorción con el aumento de la concentración de HA; este efecto no se advirtió en la presencia de Ca^{2+} y permanece luego del incremento de la temperatura, Figura 4.7 b. La emisión de fluorescencia usando una longitud de onda en la región de absorción ($\lambda_{\text{EX}} = 260$ nm) genera una amplia banda en el rango (255-325 nm). La deconvolución espectral confirmó la presencia de residuos de Fenilalanina ($\lambda_{\text{EX}} = 282$ nm) y tirosina ($\lambda_{\text{EX}} = 303$ nm) en la estructura de la gelatina. Una excitación a 335 nm y 355 nm expuso la existencia los grupos Piridinolina ($\lambda_{\text{EX}} = 295$ nm/ $\lambda_{\text{EX}} = 395$ nm) [37] y Pentosidina ($\lambda_{\text{EX}} = 235$ nm / $\lambda_{\text{EX}} = 385$ nm) [36], cuya presencia está asociada con el entrecruzamiento de las cadenas proteicas, Figura 4.8 a [37], [36].

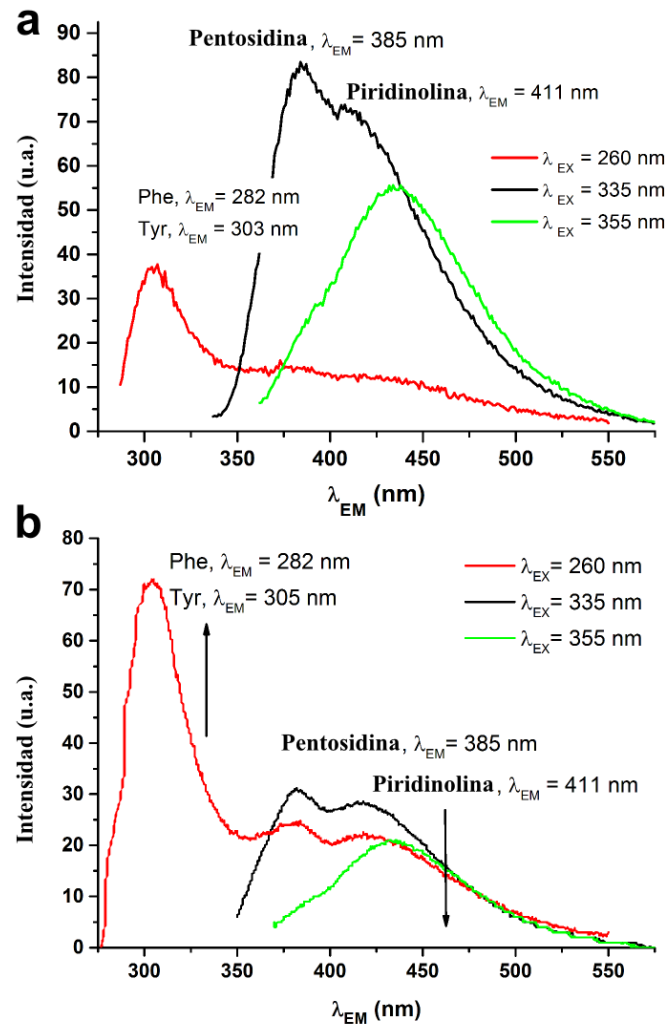


Figura 4.8 Espectro de emisión de fluorescencia de soluciones de gelatina (a) y gelatina con 30 mg de nanorods de HA a 25 °C (b).

La comparación de las emisiones de fluorescencia de las soluciones proteicas antes y después de la adición de HA indicó que hay un simultáneo incremento de los aminoácidos aromáticos y una reducción de las emisiones de entrecruzamiento con la adición de los nanorodillos de HA, Figura 4.8 b. En un ambiente hidrofóbico (encerrado en el centro de la proteína), Tirosina, y Fenilalanina tienen una alta intensidad de fluorescencia; en contraste, en un ambiente hidrofílico (expuesto al solvente) su intensidad de fluorescencia es baja. Ambos hechos confirmaron el enrollamiento y la intra-asociación de las cadenas proteicas con la adición de HA.

4.3.6 Actividad de moldeado de las soluciones gelatina-HA

Un estudio preliminar microscópico de las soluciones se realizó para confirmar que el efecto de la organización de las soluciones de gelatina puede ser transferido a la estructura de los materiales preparados a partir de ellas; las diferentes soluciones de gelatina, gelatina- Ca^{2+} , gelatina-HA fueron congeladas y luego liofilizadas. Esta técnica no requiere químicos adicionales, dependiendo únicamente del hecho que el agua presente en la solución/hidrogel forme cristales de hielo que luego puedan ser separados del polímero por sublimación, dando origen a una microarquitectura particular. La dirección de crecimiento y tamaño de los cristales de hielo son función del gradiente de temperatura y las propiedades de la solución del polímero [38]. Manteniendo constante el gradiente de temperatura, la estructura adquirida por las muestras fue considerada solo dependiente de las propiedades de la solución. El efecto de la concentración de gelatina y aditivos en la morfología de los andamios fue estudiado. Secciones longitudinales y transversales fueron obtenidas y analizadas con microscopía óptica, resultados que se presentan en la Figura 4.9.

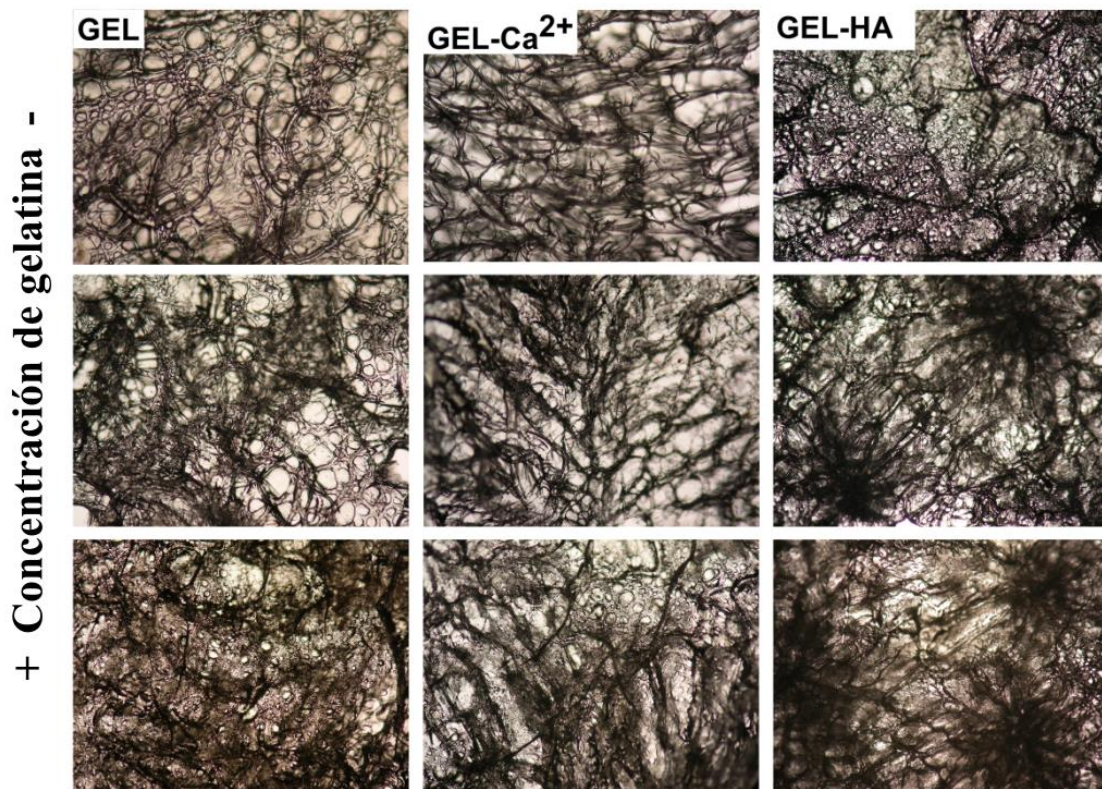


Figura 4.9 Micrografías ópticas de andamios gelatina (GEL), gelatina-calcio (GEL- Ca^{2+}), y gelatina-HA (GEL-HA) en secciones longitudinales. Magnificación 10X. Ca^{2+} = 50 mg. HA = 50 mg.

Secciones transversales y verticales de las muestras son análogas mostrando homogeneidad en la disolución. En las redes de gelatina pura, los poros, que son resultado de los arreglos de conexión de la gelatina, tienen forma circular y están distribuidos aleatoriamente; mientras que en los materiales con Ca^{2+} e HA se observan elongados y con una distribución regular en ciertas áreas. La porosidad de los andamios de gelatina se incrementó casi linealmente con el decrecimiento de la concentración de la proteína. Esto fue atribuido al efecto de los entrecruzamientos de la gelatina sobre el crecimiento de los cristales de hielo durante el congelamiento. En la solución de gelatina, las moléculas de agua están separadas por las macromoléculas de gelatina que evitan su acumulación y organización durante el congelamiento. Cuando la concentración de la gelatina se incrementa, como fue discutido en las secciones anteriores, las viscosidades de las soluciones aumentan.

El crecimiento de los cristales de hielo se encuentra restringido debido a las conexiones de las cadenas de gelatina. Finalmente, los cristales de hielo se comportaron como un molde y su forma se ve reflejada en los andamios porosos de gelatina luego del tratamiento de sublimado. Como resultado, los pequeños cristales de hielo se hicieron más finos, y la porosidad se redujo. Un efecto similar se produce cuando los cristales de HA o los iones de calcio se añaden a la solución. En las muestras obtenidas a partir de soluciones GEL- Ca^{2+} se observa una estructura con menores entrecruzamientos y mayor porosidad. Esto concuerda con los resultados previamente discutidos que muestran que la presencia de iones Ca^{2+} perturba la agregación de cadenas proteicas. En las imágenes de los materiales preparados a partir de las soluciones GEL-HA fue posible apreciar un patrón repetitivo de áreas de alta densidad. Estos son consistentes con la auto-agregación de cadenas proteicas alrededor de los nanorodillos de HA y la formación de clusters en la solución. Los resultados obtenidos sugirieron que el tamaño de poro y la forma de los andamios de gelatina pueden ser ajustados controlando la concentración de gelatina y los agregados durante su preparación. Al mismo tiempo, sugieren que la asociación de proteínas no solo ocurre durante la formación de los cristales de hidroxiapatita sino que sería influenciada por ellos una vez formados.

4.4 Conclusiones

Los datos de viscosidad intrínseca sumados a la información obtenida a partir de técnicas espectroscópicas permitieron analizar con profundidad la evolución hidrodinámica y las interacciones de cadenas poliméricas de gelatina bajo la influencia de nano cristales de hidroxiapatita en solución acuosas. Se determinó que la fase continua de las soluciones estudiadas, la solución buffer, está en equilibrio dinámico con las macromoléculas dispersas

de gelatina constituyendo un ensamblado de unidades físicamente interconectadas, que se mantienen unidas gracias a uniones intra e intermoleculares. La estructura del agua de las soluciones sufre cambios significativos a medida que el sistema es alterado por la incorporación de los nanorodillos de HA, afectando también todo el ambiente hidrodinámico de las redes proteicas y sus características teniendo, en consecuencia, seria influencia sobre la estructura del andamio definitivo.

A partir de los resultados de esta sección de nuestro trabajo, se realizó la selección de las concentraciones más adecuadas, a nuestra consideración, de gelatina y cristales de HA para la construcción del andamio. La elección se llevó a cabo mediante la observación de factores como el efecto de los cristales sobre la forma de los poros, seleccionándose aquellos con forma elongada y orden en diferentes regiones; el efecto de la concentración de proteína en la porosidad, la pobre consistencia de las estructuras de bajas concentraciones y la facultad de los cristales de actuar como nucleadores de cadenas proteicas. Considerando todos los puntos mencionados llegamos a la conclusión de que la mejor opción para la continuación de nuestros estudios en busca de un entrecruzamiento efectivo en la matriz de gelatina y para la obtención de un marco de poros orientados uniaxialmente es el material conformado a partir de $0,08 \text{ g mL}^{-1}$ de gelatina y 30 mg de cristales de HA por cada 35 mL de solución.

Referencias bibliográficas

- [1] J. Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, & P. Zioupos, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, pp. 92–102, 1998.
- [2] Y. H. An & R. A. Draughn, *Mechanical testing of bone and the bone implant interface*. Y. H. An & R. A. Draughn, Eds, Boca Raton, FL: CRC Press, 2000.
- [3] W. J. Landis, K. J. Hodgens, M. J. Song, J. Arena, S. Kiyonaga, M. Marko, C. Owen, & B. F. McEwen, “Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging,” *J. Struct. Biol.*, vol. 117, pp. 24–35, 1996.
- [4] D. Magne, P. Weiss, J. Bouler, O. Laboux, & G. U. Y. Daculsi, “Study of the Maturation of the Organic (Type I Collagen) and Mineral (Nonstoichiometric Apatite) Constituents of a Calcified Tissue (Dentin) as a Function of Location: A Fourier Transform Infrared Microspectroscopic Investigation,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 16, pp. 750–757, 2001.
- [5] J. An, S. Leeuwenburgh, J. Wolke, & J. Jansen, “Mineralization processes in hard tissue: Bone,” en *Biomimetalisation and biomaterials: Fundamentals and Applications*,

- C. Aparicio & M. P. Ginebra, Eds, Amsterdam: Elsevier, 2016.
- [6] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, & L. B. Gower, "Bone structure and formation: A new perspective," *Mater. Sci. Eng. R Reports*, vol. 58, pp. 77–116, 2007.
- [7] N. Hassan, A. Soltero, D. Pozzo, P. V. Messina, & J. M. Ruso, "Bioinspired templates for the synthesis of silica nanostructures," *Soft Matter*, vol. 8, no. 37, pp. 9553–9562, 2012.
- [8] P. V. Messina, N. Hassan, A. Soltero, & J. M. Ruso, "Identifying emerging trends of protein hydrogels for biological scaffolding," *RSC Adv.*, vol. 3, pp. 24256–24265, 2013.
- [9] S. Deville, E. Saiz, & A. P. Tomsia, "Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 27, pp. 5480–5489, 2006.
- [10] H. W. Kim, H. E. Kim, & V. Salih, "Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds," *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5221–5230, 2005.
- [11] E. Landi, F. Valentini, & A. Tampieri, "Porous hydroxyapatite/gelatin scaffolds with ice-designed channel-like porosity for biomedical applications," *Acta Biomater.*, vol. 4, pp. 1620–1626, 2008.
- [12] S. Peng & C. Wu, "Comparison of the $\text{Ca}^{2+}/\text{COO}^-$ complexation induced controllable aggregation of P(VCL-co-NaA) spherical microgels and linear chains," *Macromol.*, vol. 34, pp. 6795–6801, 2001.
- [13] S. Peng & C. Wu, " Ca^{2+} -induced complexation between thermally sensitive spherical poly(N-vinyl-caprolactam-co-sodium acrylate) microgels and linear gelatin chains in water," *Polymer*, vol. 42, pp. 7343–7347, 2001.
- [14] W. Lin, Y. Zhou, Y. Zhao, Q. Zhu, & C. Wu, " $\text{Cr}^{3+}/\text{COO}^-$ complexation induced aggregation of gelatin in dilute solution," *Macromolecules*, vol. 35, pp. 7407–7413, 2002.
- [15] T. R. Keenan, "Gelatin," *Polym. Sci. A Compr. Ref.*, vol. 10, pp. 237–247, 2012.
- [16] Y. Li & R. Cheng, "Viscometric study of gelatin in dilute aqueous solutions," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 44, pp. 1804–1812, 2006.
- [17] J. Liu, M. D. Nguyen, J. D. Andya & S. J. Shire, "Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution," *J Pharm Sci*, vol. 95, pp. 234–235, 2006.
- [18] K. Nishida, K. Kaji, T. Kanaya, & N. Fanjat, "Determination of intrinsic viscosity of
- Capítulo 4: Estudio de la organización y evolución de soluciones de gelatina en presencia de nanorodillos de HA*

- polyelectrolyte solutions,” *Polymer*, vol. 43, pp. 1295–1300, 2001.
- [19] W. D. Lansing, “The Molecular Weights Of Cellulose And Cellulose Derivatives,” *J Phys. Chem.*, vol. 39, pp. 153–168, 1934.
- [20] G. V. Schulz & F. Blaschke, “Eine Gleichung zur Berechnung der Viscositätszahl für sehr kleine Konzentrationen, [Molekulargewichtsbestimmungen an makromolekularen Stoffen, IX],” *J. für Prakt. Chemie*, vol. 158, pp. 130–135, 1941.
- [21] A. F. Martin, “Toward a referee viscosity method for cellulose,” *Tappi*, vol. 34, pp. 363–366, 1951.
- [22] M. L. Huggins, “The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 64, pp. 2716–2718, 1942.
- [23] K. Lewandowska, D. U. Staszewska, & M. Bohdanecký, “Huggins viscosity coefficient of aqueous solution of poly(vinyl alcohol),” *Eur. Polym. J.*, vol. 37, pp. 25–32, 2001.
- [24] Y. Pan & R. Cheng, “A novel interpretation of concentration dependence of viscosity of dilute polymer solution,” *Chin. J. Polym. Sci.*, vol. 18, pp. 57–67, 2000.
- [25] S. E. Harding, “The intrinsic viscosity of biological macromolecules. Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution,” *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 68, pp. 207–262, Sep. 1997.
- [26] Y. Lu, L. An, & Z.-G. Wang, “Intrinsic Viscosity of Polymers: General Theory Based on a Partially Permeable Sphere Model,” *Macromolecules*, vol. 46, pp. 5731-5740, 2013.
- [27] M. Masuelli, M. Sansone, & D. Aplicada, “Hydrodynamic Properties of Gelatin–Studies from Intrinsic Viscosity Measurements,” *Prod. Appl. Biopolym*, pp. 85-116, 2012.
- [28] K. Nishida, K. Kaji, & T. Kanaya, “Theoretical calculation of reduced viscosity of polyelectrolyte solutions,” *Polymer.*, vol. 42, pp. 8657–8662, 2001.
- [29] H. G. Barth & J. W. Mays, “*Modern Methods of Polymer Characterization*,” H. G. Barth & J. W. Mays, Eds, New York: Wiley-Interscience, 1991.
- [30] N. Puvvada, P. K. Panigrahi, & A. Pathak, “Room temperature synthesis of highly hemocompatible hydroxyapatite, study of their physical properties and spectroscopic correlation of particle size.,” *Nanoscale*, vol. 2, pp. 2631–2638, 2010.
- [31] N. Vlachy, B. Jagoda-Cwiklik, R. Vácha, D. Touraud, P. Jungwirth, & W. Kunz, “Hofmeister series and specific interactions of charged headgroups with aqueous ions.,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 146, pp. 42–47, 2009.

- [32] Y. Zhang & P. S. Cremer, “Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series,” *Curr Opin Chem Biol*, vol. 6, pp. 658–663, 2006.
- [33] I. M. El-Sherbiny, & H. D. C. Smyth, “Smart Magnetically Responsive Hydrogel Nanoparticles Prepared by a Novel Aerosol-Assisted Method for Biomedical and Drug Delivery Applications.,” *J. Nanomater.*, vol. 2011, pp. 1–13, 2011.
- [34] Z. K. Muhidinov, M. L. Fishman, K. K. Avloev, M. T. Norova, A. S. Nasriddinov, & D. K. Khalikov, “Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins,” *Polym. Sci. Ser. A*, vol. 52, pp. 1257–1263, 2010.
- [35] P. V. Messina, G. Prieto, & J. M. Ruso & F. Sarmiento, “Conformational Changes in Human Serum Albumin Induced by Sodium Perfluorooctanoate in Aqueous Solutions,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, pp. 15566-15573, 2005.
- [36] C. Abrusci, A. Martín-González, A. Del Amo, F. Catalina, P. Bosch, & T. Corrales, “Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 163, pp. 537–576, 2004.
- [37] K. L. Herrmann, A. D. McCulloch, & J. H. Omens, “Glycated collagen cross-linking alters cardiac mechanics in volume-overload hypertrophy.,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 284, pp. H1277-H1284, 2003.
- [38] A. L. Oliveira, L. Sun, H. J. Kim, X. Hu, W. Rice, J. Kluge, R. L. Reis, & D. L. Kaplan, “Aligned silk-based 3-D architectures for contact guidance in tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 8, pp. 1530–1542, 2012.

Capítulo 5

Caracterización estructural de andamios de gelatina-nanorodillos de HA (GEL-HA)

Como paso lógico a continuación del análisis de las soluciones integradas por gelatina y nanorodillos de HA se llevó a cabo la preparación de materiales con forma de andamios constituidos por gelatina e hidroxiapatita empleando como entrecruzante ácido tánico (del inglés, tannic acid, TA). Posteriormente se caracterizaron evaluándose el efecto de la incorporación de las nanopartículas en las propiedades físico-químicas finales de los mismos, los resultados obtenidos dan origen al contenido de este capítulo.

5.1 Entrecruzamiento de materiales

Los biomateriales han sido y son actualmente utilizados para un sinnúmero de aplicaciones, tanto *in vivo* como *in vitro*; films, fibras, hidrogeles, estructuras 2D y 3D, micro y nano partículas hechas de biopolímeros pueden encontrarse como objeto de diversas investigaciones [1]–[5]. Son conocidas las variadas ventajas que aportan en el campo de las aplicaciones biomédicas pero, al mismo tiempo, las problemáticas que se presentan al trabajar con ellos terminan restringiendo su uso [2]. En cuanto a lo que nos compete, los materiales biopoliméricos carecen de las adecuadas propiedades mecánicas y estabilidad que en muchas oportunidades son necesarias en biomedicina para obtener una buena prestación mecánica en ambientes acuosos y fisiológicos [6].

Con el objetivo de superar las desventajas, el entrecruzamiento ha sido la herramienta más utilizada [7], [8]. Los entrecruzantes interconectan moléculas, incrementan el peso molecular y, generalmente, proveen de propiedades mecánicas y estabilidad mejorada. Dependiendo de los tipos de biopolímeros utilizados se pueden seleccionar a partir de la diversa variedad existente [7], [9], [10]. Entre ellas se halla el entrecruzamiento químico, que es una forma efectiva de introducir enlaces covalentes entre los segmentos de una proteína y, consecuentemente, mejorar las propiedades mecánicas y resistencia de la matriz generada [11]. Entre los entrecruzantes químicos, el predominantemente utilizado es el glutaraldeído que, a pesar de su citotoxicidad, es elegido por su capacidad de reaccionar con grupos funcionales en proteínas y carbohidratos además de su conocida influencia en el mejoramiento de propiedades de tracción [12], [13]. Por otro lado, entrecruzantes naturales

como la proantocianidina (PA) encontrada en semillas de uvas, incrementan la resistencia térmica y a la degradación enzimática sin afectar a la citocompatibilidad [14]. Otra metodología de entrecruzamiento, pero no tan extensamente utilizada, es el tratamiento con radiación ultravioleta (UV) [15].

Para el entrecruzamiento de gelatina, el glutaraldeído ha sido ampliamente utilizado debido a su alta eficiencia de acción [16], [17]. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es un compuesto tóxico y puede dar lugar a sub-productos biológicamente perjudiciales al momento de la degradación del andamio [18]. Algunas alternativas para su reemplazo son las carbodiimidas, resinas epoxy y genipinas [19], [20]. Actualmente se están investigando compuestos fenólicos naturales que se han comenzado a utilizar en diferentes campos como el procesado de comida y la fabricación de cuero [21]; siendo también señalados como mejoradores de las propiedades de materiales basados en gelatina [22]–[25].

5.1.1 Ácido tánico como entrecruzante

En nuestro trabajo, el entrecruzante utilizado para mejorar la performance de la gelatina fue el ácido tánico (TA). La estructura química del TA ha sido explicada en literatura [26], [27]; es un polifenol natural derivado de las plantas, que pertenece al grupo de los galotaninos [28], hidrolizable y con múltiples funcionalidades debido a su alto peso molecular. De fórmula $C_{76}H_{52}O_{46}$ y estructura que se puede observar en la Figura 5.1, puede interactuar específicamente con regiones hidrofóbicas de proteínas ricas en prolina como la elastina y el colágeno [29] mediante enlaces de hidrógeno. Los posibles caminos de las reacciones entre la gelatina y el TA han sido publicados; de acuerdo con Strauss & Gibson, 2004 y Zhang y col, 2010 involucran una oxidación inicial de las estructuras fenólicas, bajo condiciones alcalinas, para formar quinonas, que actúan como intermediarios que pueden reaccionar con nucleófilos de los aminoácidos de las cadenas proteicas, como el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el amino de la lisina y arginina, el anillo imidazol de la histidina, etc, para formar redes entrecruzadas [23], [30]. Peña y col, 2010 describieron las interacciones como enlaces de hidrógeno formados a partir de grupos hidroxilos de los taninos y grupos polares de la gelatina [31]. Por otro lado, Kim y col, 2005 indicaron que los grupos hidroxilos presentes en los polifenoles interactúan directamente con los grupos carboxilos de la gelatina formando ésteres [32]. La extensión de todas estas interacciones sería la responsable de las propiedades mecánicas finales del compuesto. El TA, tiene actividad antioxidante, además de las propiedades reportadas como anti-alérgico, anti-inflamatorio, anti-biótico, cardio-protector y

anti-trombótico [31]. Estas características hacen de éste un compuesto prometedor en el campo de las aplicaciones biomédicas.

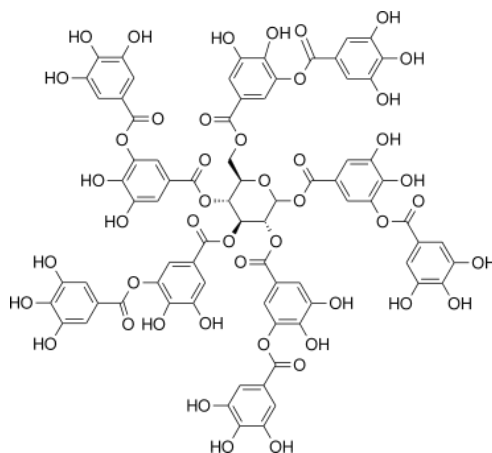


Figura 5.1 Ácido tánico.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados fueron los siguientes: gelatina comercial de piel bovina (GEL, Grade OR, Tipo B, Bloom 225, $PM \approx 50.000 \text{ g mol}^{-1}$, Merck, PI = 4,5-5,6), ácido acético ($C_2H_4O_2$, $PM = 60,05 \text{ g.mol}^{-1}$, 99% Sigma), acetato de sodio tri-hidratado ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$, $PM = 136,03 \text{ g.mol}^{-1}$, 99% Sigma), hidróxido de sodio (NaOH, $PM = 40 \text{ g.mol}^{-1}$, 90%, Sigma), bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$, $PM = 84,02 \text{ g.mol}^{-1}$, 99% Alcor) y ácido tánico ($C_{76}H_{52}O_{46}$, $PM = 1701,20 \text{ g mol}^{-1}$, 99% Sigma-Aldrich) fueron utilizados sin mayores purificaciones. Además de estos reactivos fueron utilizados los nanorodillos de HA (PPG) cuya síntesis fue descrita en el capítulo 3.

5.2.2 Ensamble

Para el ensamble de los andamios, Tabla 5.1, se partió del mismo procedimiento que dio origen a las soluciones. Como mencionamos en el capítulo 4, considerando los efectos observados de los cristales y la concentración de la proteína sobre la constitución y características estructurales de los andamios seleccionamos la concentración de gelatina de $0,08 \text{ g.mL}^{-1}$ y 30 mg HA cada 35 mL de solución persiguiendo nuestro objetivo de alcanzar un entrecruzamiento efectivo en la matriz de gelatina y la obtención de una porosidad adecuada. Una vez culminada la confección de la solución se llevó a $pH = 11$ mediante la adición de $NaHCO_3$. Luego fue añadido el agente entrecruzante, TA, en dos diferentes concentraciones (12,4 y 33,3 mg/g de gelatina) en agitación a 500 rpm.

Finalmente, cuando la solución estaba ya formada, fue magnéticamente agitada por otros 20 minutos para lograr el proceso de entrecruzamiento. Inmediatamente luego del tiempo necesario para el entrecruzamiento las muestras se introdujeron en un freezer a -50°C por 24 horas para luego ser liofilizados en un Rificor L-A-B4.

A modo de control, para evaluar la actividad de las nanopartículas de HA sobre la del entrecruzante se sintetizaron andamios sin la presencia de HA con cada una de las dos concentraciones de TA seleccionadas.

Tabla 5.1 Se detalla la composición de los diferentes materiales ensayados.

Material	GEL (g mL^{-1})	HA (mg mL^{-1})	TA (mg g^{-1} GEL)
GEL-HA	0,08	0,85	0,00
GEL-TA1 (12,4mg TA/ g GE)	0,08	0,00	12,4
GEL-HA-TA1 (12,4mg TA/ g GE)	0,08	0,85	12,4
GEL-TA2 (33,3mg TA/ g GE)	0,08	0,00	33,3
GEL-HA-TA2 (33,3mg TA/ g GE)	0,08	0,85	33,3

5.2.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

La morfología de la superficie fue estudiada mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS) equipado con un detector de electrones secundarios para adquirir las imágenes. El voltaje de aceleración aplicado (EHT) fue 3,00 kV con una resolución (WD) de 2,1 nm. La compensación local de carga (mediante inyección de gas nitrógeno) fue aplicada evitando la coloración de la muestra. El espectrofotómetro de energía dispersiva acoplado a este instrumento permitió obtener información cualitativa acerca de la composición elemental de la superficie. La topografía fue estudiada a partir del coeficiente de asimetría (conocido en el ámbito académico como Skewness, R_{sw}) y el coeficiente de escarpadura (conocido en el ámbito académico como Kurtosis, R_{ku}) de las muestras que fueron cuantificados a partir de las microfotografías SEM mediante un software de análisis de imágenes (Image J 1,34 s, NIH Image, USA) [33] con una incerteza del 5 %. Las ecuaciones para obtener los coeficientes de asimetría (R_{sw} , 5.1) y escarpadura (R_{ku} , 5.2) son las siguientes:

$$R_{sw} = \frac{1}{NR_q^3} \left(\sum_{i=1}^N y_i^3 \right) \quad (5.1)$$

$$R_{ku} = \frac{1}{NR_q^4} \left(\sum_{i=1}^N y_i^4 \right) \quad (5.2)$$

Para esto, es necesario conocer R_q :

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

Donde y_i es la altura en el punto número i y n el número de intersecciones del perfil en su línea media.

5.2.4 Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (H-TEM)

Las microfotografías de H-TEM fueron tomadas utilizando un Libra 200 FEOMEGA operado a 200 kV con una magnificación de 1.000.000 x y las observaciones fueron realizadas en campo claro. Las muestras pulverizadas fueron colocadas en soportes de carbono de 2000 mesh. El equipo posee un sistema de difracción de electrones (ED); el espacio interplanar d se obtiene a partir de la ecuación derivada de la ley de Bragg ($rd = L\lambda$), donde “ r ” es la distancia en el patrón ED, y $L\lambda = 1$ es la constante de la cámara.

5.2.5 Difracción de rayos X

Los espectros de difracción de rayos X fueron obtenidos con un difractómetro Philips PW 1710 con radiación Cu $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418$ nm) y monocromador de grafito operado a 45 kV; 30 mA y 25 °C.

5.2.6 Espectroscopía FT-IR

Para los ensayos fue utilizado un espectrofotómetro VARIAN FT-IR 670. Con el objetivo de evitar el agua co-adsorbida, las muestras fueron secadas en vacío hasta peso constante. El polvo fue diluido con KBr antes de la obtención de los datos.

5.2.7 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X

El análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (del inglés X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) fue llevado a cabo en un espectrómetro SPECS Sage HR 100. La fuente de rayos X fue una línea Mg- $K\alpha$ (1253,6 eV y 250 W). La muestra se colocó perpendicularmente al eje analizador y fue calibrada con la línea 3d5/2 de Ag con un ancho a altura media (del inglés del inglés Full Width at Half Maximum, FWHM) de 1,2 eV. La

resolución seleccionada fue de una energía de paso de 30 y 15 eV y 0,5 y 0,15 eV/etapa de escaneo para el ensayo general y el espectro de alta resolución respectivamente.

5.2.8 Caracterización térmica

Las propiedades térmicas de los andamios de GEL-HA entrecruzados fueron analizadas usando un Calorímetro Diferencial Q20. La temperatura y las escalas de entalpía fueron calibradas usando muestras estándar de indio (CAS N0. 7440-74-6/1, $T_m = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_m = 3,295 \text{ kJ/mol}$) y zinc (CAS No. 7440-66-6/3, $T_m = 419,53 \text{ }^\circ\text{C}$, $\Delta H_m = 7,103 \text{ kJ/mol}$). La muestra del andamio fue completamente secada por liofilización y sellada en un recipiente de aluminio para prevenir cualquier pérdida de humedad durante el desarrollo del ensayo. Además fueron previamente enfriadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante un minuto. Luego del enfriamiento fueron calentadas hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $1 \text{ }^\circ\text{C/minuto}$. Luego de completado el primer escaneo, la muestra fue rápidamente enfriada a una velocidad de $10 \text{ }^\circ\text{C/minuto}$ hasta $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ para ser corrida nuevamente. Durante el desarrollo del ensayo, nitrógeno ultrapuro fue usado como gas de purga a una tasa de 20 mL/minuto . La sustracción de la línea de base fue realizada para corregir cualquier diferencia en la capacidad calorífica entre la muestra y el horno de referencia. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. El calor específico C_p en $\text{Jg}^{-1}\text{K}^{-1}$ de cada una de las muestras fue calculado a partir del termograma que muestra el flujo de calor (Wg^{-1}) usando la siguiente ecuación (5.1) [34]:

$$C_p = Q' \times 60/r \quad (5.1)$$

donde r es la velocidad de calentamiento del proceso en K/min , mientras que Q' es el flujo de calor en Wg^{-1} . Los datos obtenidos fueron utilizados para construir curvas de calor específico vs temperatura.

5.2.9 Degradación hidrolítica y enzimática in vitro

Los andamios entrecruzados de GEL-HA fueron seccionados en cubos de aproximadamente $0,71 \text{ cm}$ de lado para estudios de degradación in vitro. Cada una de las muestras fue pesada (W_0) y sumergida en 50 mL de PBS ($\text{pH} = 7,4$, $0,05 \text{ \% w/w}$ de NaN_3). Como segundo paso, las muestras fueron incubadas en baño termostático ($37 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$) por 3, 12, 16 y 25 días; el PBS fue cambiado cada 7 días. En cada punto de tiempo, las muestras fueron colectadas por triplicado, enjuagadas con agua destilada, escurridas con papel de filtro y secadas en estufa hasta lograr un peso constante (W_t). Asumiendo que el pH local en el ambiente circundante a los osteoclastos durante la remodelación ósea es de $4,0$ a $5,0$ [35] se

evaluó la degradación in vitro bajo condiciones ácidas sumergiendo los andamios en una solución buffer de ácido acético/acetato de sodio (AcOH buffer) con un pH = 4,24 de acuerdo al método propuesto por Matsumoto y col [36]. La degradación enzimática fue llevada a cabo de manera similar al proceso hidrolítico, incluyendo lisozima (LSZ) en PBS para confeccionar un medio adecuado con una concentración de 4 mg/mL de LSZ. Esta concentración fue elegida simulando la concentración normal de LSZ en plasma que va de 4 a 13 mg/mL [37]. El PBS con la lisozima también fue cambiado cada semana durante el ensayo. La degradabilidad de los andamios entrecruzados fue estimada a partir de la tasa de pérdida de peso (% WL) de acuerdo a Tampieri y col [38] (Ec 5.2):

$$\% \text{WL} = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100 \quad (5.2)$$

5.2.10 Incubación de los andamios entrecruzados de gelatina-HA en fluido fisiológico simulado (SBF)

Con el objetivo de evaluar el potencial de osteointegración del andamio, los materiales fueron mantenidos en contacto con fluido fisiológico simulado (SBF) de composición y concentración iónica similar al plasma humano; conteniendo Na^+ (142,0 mM), K^+ (5,0 mM), Mg^{2+} (1,5 mM), Ca^{2+} (2,5 mM), Cl^- (148,8 mM), HCO_3^- (4,2 mM), HPO_4^{2-} (1,0 mM) y SO_4^{2-} (0,5 mM). Siguiendo el procedimiento estándar descrito por Kokubo y col [39], los materiales sintetizados fueron incubados en 1,5 mL SBF en baño termostático ($37 \pm 0,1$ °C) por períodos de 7, 14 y 21 días; finalmente las muestras fueron extraídas del SBF, enjuagadas con agua destilada y secadas en estufa a 40 °C hasta peso constante.

5.3 Andamios mineralizados y entrecruzados sintetizados a partir de gelatina-HA

5.3.1 Caracterización micro-estructural, morfológica y topológica

El éxito de un andamio requiere la activación de las respuestas apropiadas y beneficiosas de las células con las cuales se cultiva o del tejido en el cual es implantado [40]. Por otro lado, la preservación de un implante requiere del buen ensamblaje con el tejido circundante, lo que se encuentra íntimamente relacionado con la fuerza de unión y características de ambas superficies de anclaje [41] que, de ser inapropiadas, pueden llevar a situaciones que resulten en la resorción ósea [42]. Con el objetivo de estudiar si estas características pueden ser logradas por la interacción gelatina y nanorods de HA bajo las condiciones seleccionadas de experimentación, secciones transversales y longitudinales de las soluciones liofilizadas fueron analizadas mediante FE-SEM, resultados que se pueden observar en la Figura 5.2.

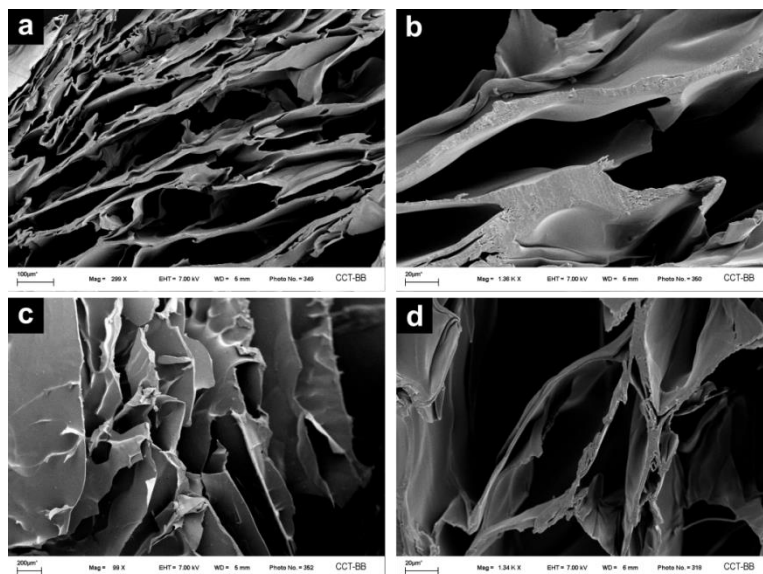


Figura 5.2 Microfotografías longitudinales (a-b) y transversales (c-d) de FE-SEM de muestras liofilizadas de GEL-HA; 0,08 g/mL GEL y 0,85 mg/mL HA. Escala: (a) 100 μm , (c) 200 μm , y (b, d) 20 μm .

Las secciones de las muestras exhibieron una estructura con macroporos altamente interconectados, observándose homogeneidad entre las nanopartículas de HA y el polímero orgánico en el cual se encuentran inmersas, Figura 5.2 a-d. Las nanopartículas de HA se encontraron uniformemente distribuidas en las paredes de los poros y no se divisaron agregados. Su presencia fue confirmada por patrones de difracción de rayos X, Figura 5.3.

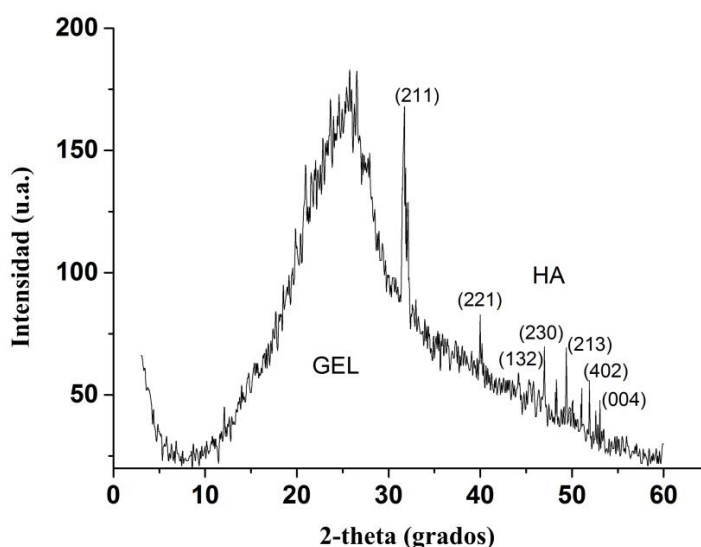


Figura 5.3 Espectro de difracción de rayos X de las muestras liofilizadas de GEL-HA. Los picos pertenecientes a los nanorodillos de HA pueden ser observados inmersos en el amorfismo característico presentado por la proteína.

La superficie de la pared de los poros del material compuesto por GEL-HA se observa como una superficie rugosa producto de un ensamblado de fibras alineadas con más de diez micras de longitud, Figura 5.4 a, b.

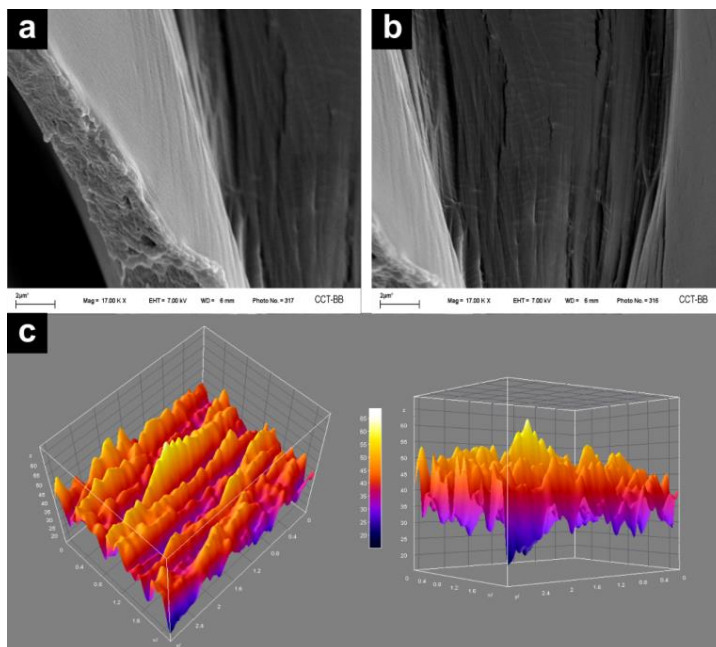


Figura 5.4 Morfología de la pared de los poros (a, b) de muestras liofilizadas de GEL-HA, 0,08 g/mL GEL and 0,85 mg/mL HA; escala: 2 μm . Perfiles 3D de la superficie de la pared de los poros (c).

En el hueso, los puntos de estrés se localizan adyacentes a la rugosidad del implante como resultado del módulo de elasticidad del material que lo compone, que es sustancialmente más alto que el del tejido nativo [43]. Con el objetivo de evaluar la rugosidad de la superficie de la pared del poro y caracterizar su asimetría, se realizaron perfiles de superficie y se evaluaron los coeficientes de escarpadura (R_{ku}) y asimetría (R_{sw}) mediante imágenes de microscopía electrónica de barrido, Figura 5.4 b.

El coeficiente de asimetría (R_{sw}), como su nombre lo indica, otorga información acerca de la falta de simetría de una superficie. Se utiliza para medir la simetría de una superficie respecto de la línea media ya que es sensible a la presencia de valles profundos o picos altos. Una distribución de alturas simétrica, es decir, con proporciones iguales de valles profundos y picos altos, tiene un coeficiente de asimetría de cero, mientras que coeficientes positivos se dan en perfiles con mayor cantidad de picos altos que valles profundos; y coeficientes negativos se dan en perfiles con mayor cantidad de valles profundos que picos altos. Este coeficiente es normalmente relacionado con la resistencia del material a la cizalladura, que es

mayor cuanto más cantidad de picos altos respecto de valles existan en la muestra [42], [44], [45].

Otra representación de la rugosidad de una superficie se puede obtener con el coeficiente de escarpadura (R_{ku}). Este parámetro nos provee de información acerca de la densidad de picos y valles presentes en la superficie del material. A partir de estos parámetros también se puede estimar de manera comparativa, la agudeza o grosor de picos y valles. En el ámbito de los implantes este parámetro es importante debido a que cuanto más agudos sean los picos y los valles presentes en la superficie, más alto es el nivel de estrés presente en la zona de contacto material-tejido [42], [44], [45].

Las paredes de los poros de los andamios presentan valores positivos de asimetría ($R_{sw} = 1,592$) siendo esto producto de la presencia de un perfil de superficie que consta de valles rellenos y picos altos. En cuanto al coeficiente R_{ku} , el valor obtenido fue 2,165; un $R_{ku} < 3$ indica un modelo platicurtoico caracterizado por la presencia de pocos picos altos y valles poco profundos, Figura 5.4 c.

Cuanto más agudas sean las rugosidades de la superficie del material, más altos serán los picos de estrés en la interfaz del hueso [46] lo que produce como resultado la resorción del hueso [47]. Nuestro material exhibe cierto grado de rugosidad en la superficie de la pared de los poros aunque sin un exceso de picos altos. Debido a este hecho se piensa que una vez en contacto con el tejido huésped el estrés que genere sea reducido, existiendo una razonable posibilidad de aceptación por parte del mismo. Las imágenes SEM que se muestran en la Figura 5.5 permiten observar la estructura morfológica de los andamios entrecruzados preparados con las dos concentraciones del TA seleccionadas; del análisis de las mismas se apreció que no existen diferencias significativas entre las vistas longitudinales y transversales denotando la homogeneidad del material.

Además, una vez entrecruzados los andamios retienen la estructura y rugosidad macroporosa ($R_{ku} = 2,261$ y $R_{sw} = 1,425$) y muestran un incremento de los valles en el perfil de su topografía. Entre las concentraciones de entrecruzante seleccionadas no se encuentran diferencias significativas en la morfología y rugosidad de los andamios. Por último, es posible observar claramente la disposición aleatoria de los andamios conformando una estructura similar a una red.

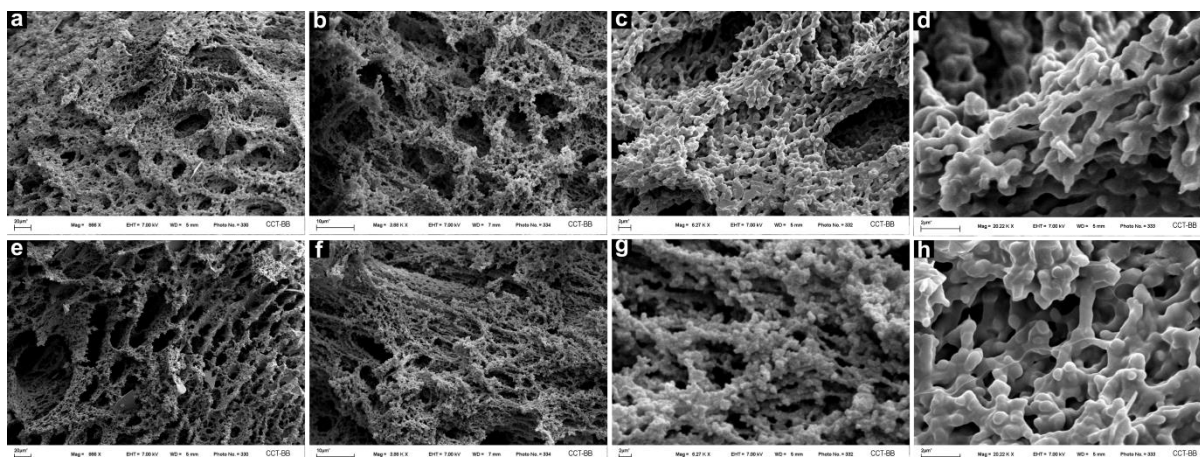


Figura 5.5 Microfotografías de andamios entrecruzados. (a–d) Muestras GEL-HA-TA1: vista transversal (a) y longitudinal (b–d). Muestras GEL-HA-TA2: vista transversal (e) y longitudinal (f–h). Escala: (a, e) 20 μm , (b, f) 10 μm y (c, d, g, h) 2 μm .

5.3.2 XPS

Mediante XPS es posible detectar elementos cuyo porcentaje sobrepase el 0,1 % de proporción en el material, pero no puede detectar H_2 ni He. En la Tabla 5.3 es posible observar la composición elemental que se encontró en los andamios a partir de esta técnica. En nuestro material fue estudiada la superficie de las muestras encontrando una composición adecuada considerando la materia prima con la que fueron constituidos los andamios: fosfatos cálcicos, gelatina y ácido tánico.

Tabla 5.3 Composición elemental de una superficie de los andamios

P (at %)	Ca (at %)	C (at %)	O (at %)
2,8	0,5	71,5	25,2

En cuanto a los enlaces entre los elementos detectados por el análisis se pueden observar los resultados en la Figura 5.6. Los enlaces encontrados fueron los esperados, a partir de la presencia de fosfatos y el enlace Ca-PO_4 se pudo confirmar la presencia de los cristales de HA inmersos en la estructura del andamio. Por otro lado, C-O-C puede ser adjudicado al ácido tánico, mientras que C-O es propio tanto del TA como de la proteína. El caso de los enlaces C-C también son propios de ambos compuestos orgánicos. Además de estos enlaces, se encontraron energías correspondientes a electrones Auger de Na, que se lo adjudicamos a una posible contaminación de la muestra siendo, de todos modos, una cantidad despreciable.

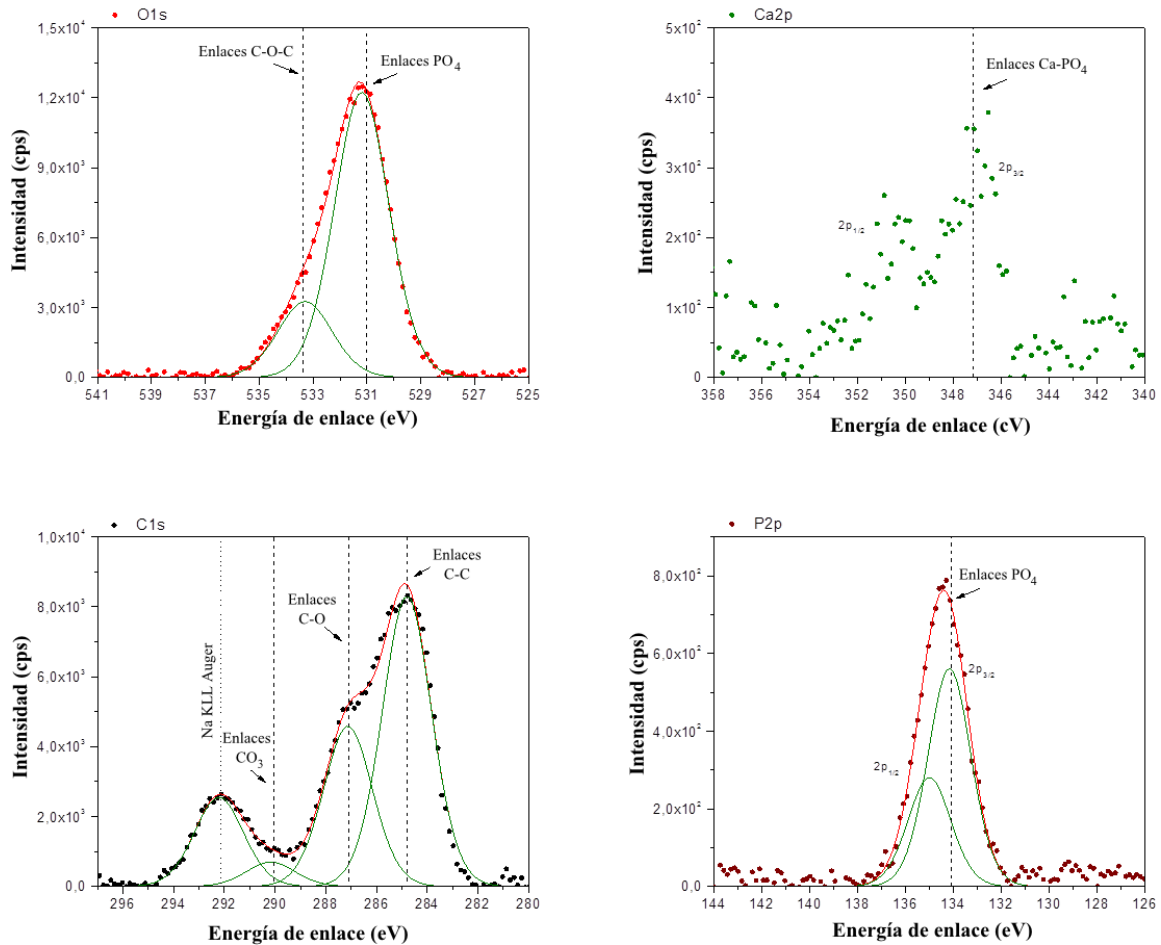


Figura 5.6 Espectros XPS de los andamios.

5.3.3 Propiedades térmicas

Los cambios en la estabilidad térmica son buenos indicadores de la estructura y grado de entrecruzamiento en los materiales. Por esta razón es importante llevar a cabo estudios acerca de sus propiedades térmicas. Sabemos que la gelatina es la forma desnaturalizada del colágeno [48], no obstante sus cadenas son capaces de experimentar una transición desorden-orden y recuperar un porcentaje de la estructura de triple hélice gracias a un proceso parcial de renaturalización [48]. Esto sucede bajo condiciones apropiadas, como puede ser un proceso de formación de andamio activado por un agente entrecruzante. Los termogramas obtenidos en la calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la gelatina y de los andamios confeccionados a partir de gelatina-ácido tánico y gelatina-HA-ácido tánico, con las dos diferentes concentraciones de TA, se pueden observar en la Figura 5.7.

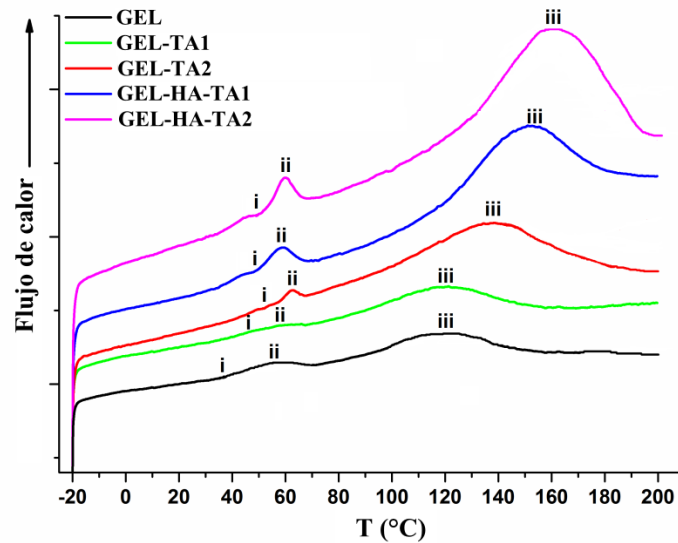


Figura 5.7 Termogramas de los andamios confeccionados.

En las curvas se pueden observar dos transiciones debido al calentamiento. La temperatura de la primera transición fue determinada como un punto de un repentino incremento en la línea de base del termograma (región i-ii), mientras que la temperatura de la segunda fue evaluada como el máximo de su pico endotérmico (iii). Estas temperaturas representan la transición vítrea (del inglés glass transition, T_g) y el punto de fusión (del inglés melting point, T_m), respectivamente. La transición vítrea pareciera solaparse con un fenómeno entálpico de relajación. Algunos fenómenos similares en temperaturas por debajo de la T_g pueden ser observados regularmente en los polímeros [49]. En materiales de colágeno, podrían corresponder a la movilidad intermolecular de las moléculas de tropocolágeno (relajación α) y a la movilidad intermolecular de las secuencias polares (relajación β) [50]. Estos movimientos de cadenas son altamente sensibles a la hidratación y a la formación de puentes de hidrógeno. Un incremento de la concentración del agente entrecruzante o la presencia de nanorodillos de HA provoca estas transiciones y la determinación de una temperatura de relajación, probablemente debido a alteraciones en los enlaces intermoleculares y a los re-arreglos de los segmentos de cadenas de gelatina enlazados por estos puentes de hidrógeno. Los valores de T_g obtenidos se pueden observar en la Tabla 5.4; una temperatura más alta de transición vítrea respecto de la gelatina sin entrecruzante pudo ser observada con el aumento de la concentración de TA y la incorporación de los nanorodillos de HA. Esto es indicio de una mayor estabilidad térmica como consecuencia del aumento del grado de entrecruzamiento.

Tabla 5.4 Propiedades térmicas de los andamios de gelatina: Temperatura de transición vítrea (T_g); temperatura de relajación Sub- T_g (T_{sub-g}); entalpía de relajación durante envejecimiento físico ($\Delta H_{relajación}$); capacidad calorífica diferencial (ΔC_p); temperatura de fusión (T_m); puntos de fusión de diferentes clases de agua asociados a la fusión ($T_{i, i=1,2,3}$); energía de activación del cambio de estado (fusión) (E_a); entalpía de fusión ($\Delta H_m / J g^{-1}$); entropía de fusión (ΔS_m).

Parámetro termodinámico	GEL	GEL-TA1	GEL-TA2	GEL-HA-TA1	GEL-HA-TA2
Transición vítrea					
$T_{sub-g} / ^\circ C$			54,33	43,91	45,59
$T_g / ^\circ C$	45,20	47,88	62,08	58,17	59,41
$\Delta H_{relajación} / J g^{-1}$			11,36	27,30	20,03
$\Delta C_p / J K^{-1} g^{-1}$	1,68	1,74	1,84	2,12	2,16
Punto de fusión					
$T_m / ^\circ C$	115,45	116,02	131,85	149,44	154,75
$\Delta H_m / J g^{-1}$	248,64	255,94	262,56	333,28	375,12
$\Delta S_m / J K g^{-1}$	0,640	0,657	0,648	0,790	0,877
$E_a / KJ mol^{-1}$	15,20	16,56	34,85	33,90	33,48

En el caso de los andamios preparados con alto contenido de TA y nanorodillos de HA, los termogramas de DSC mostraron un pico o una transición endotérmica en el rango de temperaturas de la transición vítrea-liquida. Estos saltos son el principal indicador de la relajación entálpica durante el envejecimiento físico [51]. Sistemáticamente estos se aprecian a temperaturas más bajas y de mayor intensidad en magnitud con la presencia de los nanorodillos, Tabla 5.4. Para la muestra de gelatina sin entrecruzante, T_m hace referencia a una transición hélice-ovillo [52]. El área debajo del pico endotérmico de fusión dividido por el peso total de la muestra (ΔH , J/g) indica el porcentaje del orden estructural en el andamio. La estabilidad de la hélice es principalmente dependiente de las características especiales de tres hebras polipeptídicas que se sostienen juntas en una conformación helicoidal por puentes de hidrógeno, suplementado por puentes intercatenarios en las posiciones ocupadas por glicina [53]. Cabe destacar que todas las muestras usadas en el análisis de DSC fueron liofilizadas y presentaron un contenido de agua despreciable, lo que excluye su potencial influencia en la temperatura de denaturalización y la entalpía de la transición hélice-ovillo, por lo que las diferencias en los respectivos comportamientos térmicos fueron una consecuencia del proceso de interacción con las nanopartículas de HA y del entrecruzamiento. En todos los casos el entrecruzamiento incrementa la temperatura de fusión, el agente entrecruzante sumado a los nanorodillos de HA causa un incremento en la estabilidad térmica en comparación con la gelatina no entrecruzada, Tabla 5.4. La

intensificación de la entalpía de transición asociada con este pico está relacionada con la cantidad relativa de estructura de triple hélice presente en las muestras, y es significativamente mayor para los andamios que contienen más cantidad de TA y nanorodillos de HA. Además, el valor superior de entalpía para los andamios preparados con la incorporación de nanorodillos indica que tuvieron un mayor nivel de renaturalización que su contraparte preparado sin la agregación de las nanopartículas, lo que podría resultar en un incrementado porcentaje de valores de elongación y fuerza mecánica [54].

Los valores de energía de activación (E_a) para la desnaturalización de los andamios son mayores que los obtenidos para las muestras no entrecruzadas de gelatina, Tabla 5.4. Esto muestra claramente que se requiere más energía para desnaturalizar los andamios entrecruzados en comparación con la gelatina pura. Se tiende a considerar que la capacidad calorífica cambia debido a los entrecruzamientos, en mucho menor medida que el efecto producido sobre la T_m y la subsecuente contribución a la entalpía. Los resultados de los andamios GEL-HA-TA2 (mayor cantidad de agente entrecruzante) muestran un ligero incremento ΔC_p en comparación con la muestra sin entrecruzante. Es necesario aclarar que los cambios son demasiado pequeños para establecer si el entrecruzamiento afecta la contribución vibracional y configuracional de la estabilidad de la proteína. La capacidad calorífica puede ser expresada como la covarianza de los cambios de entalpía-entropía [55]. Por lo tanto, a partir de los valores de ΔH y ΔC_p que se pueden observar en la Tabla 5.4 podemos inferir que los cambios entrópicos son importantes.

5.3.4 Mineralización biomimética

Las fibras de colágeno mineralizadas organizadas en una estructura jerárquica compleja son responsables de las propiedades mecánicas del tejido óseo [56]. Por lo tanto, para proveer al andamio sintético de las propiedades correctas, es necesario, además de la estructura entrecruzada, replicar el proceso de mineralización de las fibras de colágeno en el tejido. En general, el proceso de mineralización puede verse afectado tanto por la morfología del andamio donde los cristales son insertados, como por la presencia de centros de nucleación que actúan como iniciadores del crecimiento. La influencia de las diferentes concentraciones de TA utilizadas en el proceso de mineralización fue descartada ya que, aunque tiene efecto en la estructura y estabilidad térmica del andamio, no se vieron afectadas la morfología y la rugosidad. Sin embargo, la presencia de nanopartículas pre-embebidas que pueden actuar como centros de nucleación podría tener control sobre la progresión de la mineralización. Las imágenes SEM obtenidas, Figura 5.8, revelaron que la mineralización ocurrió en ambos

andamios entrecruzados, independientemente de la presencia o no de los nanorodillos de HA. Dicho proceso se observó no solo en la superficie del material, sino también en el interior de los poros formando una estructura núcleo a partir de la combinación gelatina-mineral que eventualmente se extiende formando una red continua. La morfología cristalina varía de una muestra a la otra: cristales con forma de placas hexagonales y con forma de agujas crecen en andamios que no contienen nanopartículas (GEL-TA), Figura 5.8, mientras que solo cristales con forma de plato de diferentes tamaños se depositan en los andamios con presencia de nanorodillos (GEL-HA-TA), Figura 5.8.

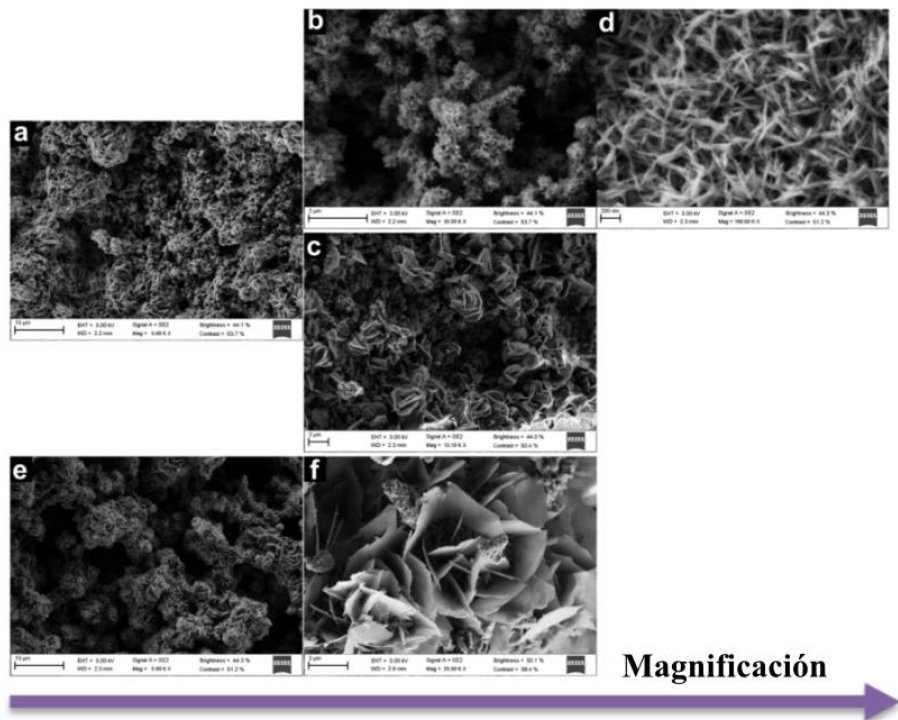


Figura 5.8 Microfotografías FE-SEM de los andamios GEL-TA (a-d) y GEL-HA-TA (e, f) mineralizados. Magnificación de cristales de HA tipo agujas (b, d) y hexagonales tipo plato (c, f). Escalas: (a, e) 10 μm ; (b, c y f) 2 μm y (d) 200 nm.

Los patrones de difracción de rayos X indicaron que tanto en los andamios de GEL-TA como en los GEL-HA-TA la fase cristalina implicada en matrices mineralizadas se asemeja a hidroxiapatita pobremente cristalizada, exhibiendo un pico similar a la hidroxiapatita deficiente en calcio (cd HA) presente en el hueso [57], Figura 5.9.

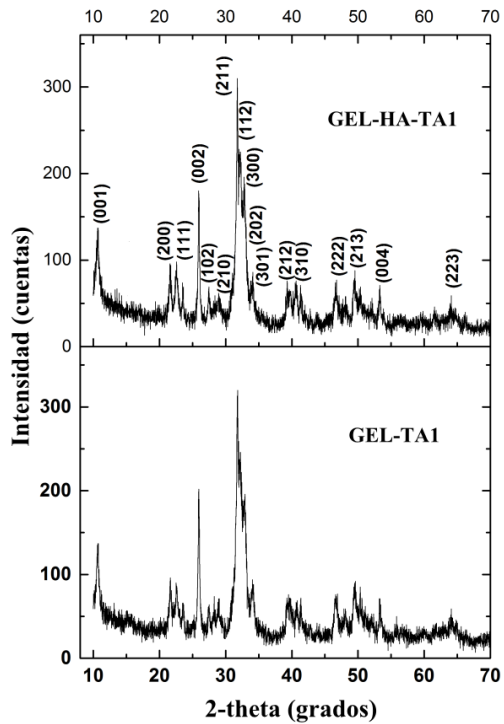


Figura 5.9. Patrones de difracción de rayos X de andamios de GEL-TA y GEL-HA-TA mineralizados.

Utilizando refinamientos de estructura cristalina de modelado molecular y el método de Rietveld [58], la información detallada se encuentra en las Figuras 5.10 y 5.11, se puede observar que hay una pequeña diferencia entre los datos de difracción experimental y los datos teóricos para la hidroxiapatita estequiométrica, Figura 5.12 a.

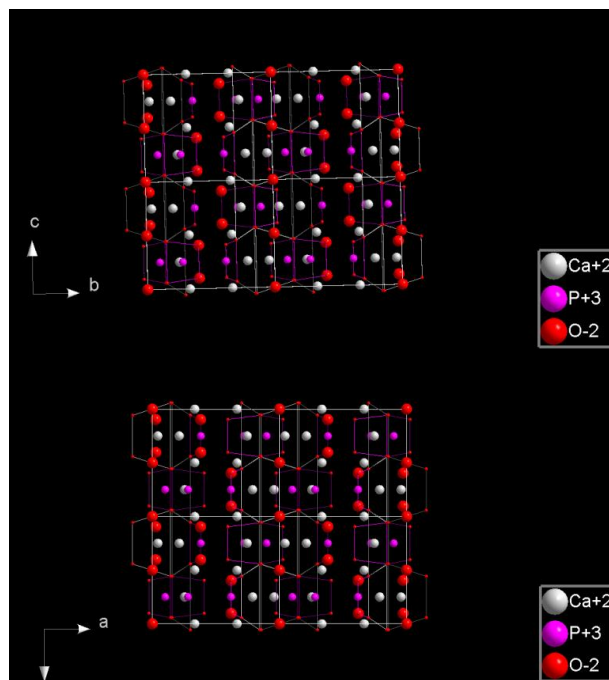


Figura 5.10 Representación teórica del cristal de HA estequiométrica.

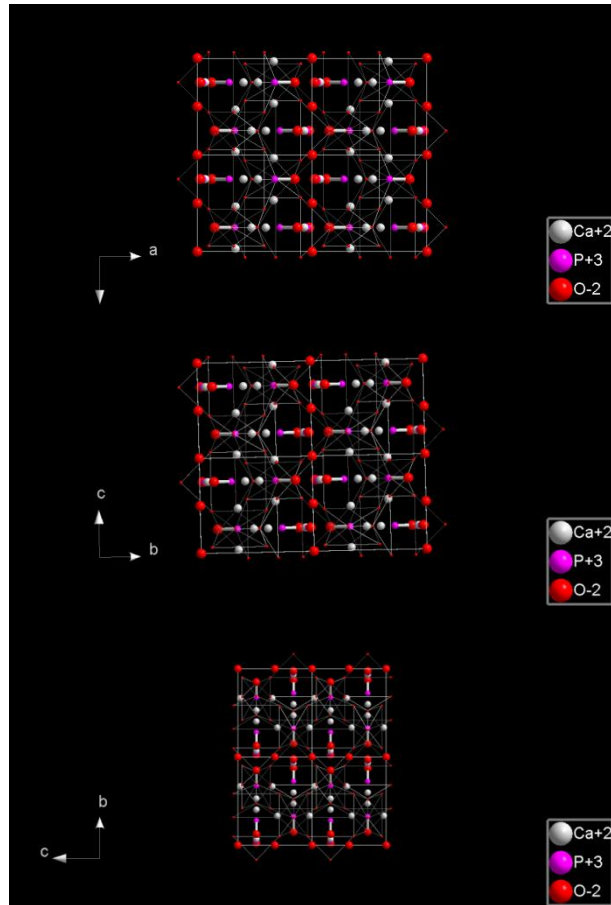


Figura 5.11 Representación teórica del cristal de HA defectuoso.

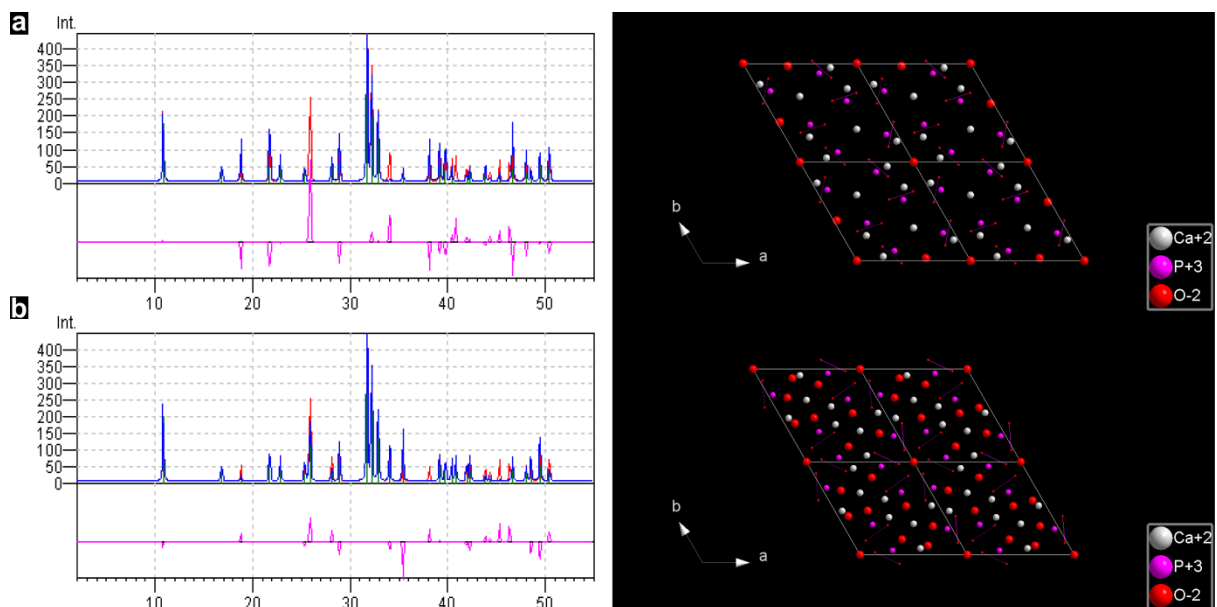


Figura 5.12 Modelado molecular de patrones de difracción de rayos X de cristales de HA estequiométrica (a) y defectuosos (b): datos teóricos (azul), datos experimentales (rojo).

Consistentemente, obtuvimos una réplica de un cristal defectuoso de hidroxiapatita con una mínima discrepancia con los datos experimentales, Figura 5.12 b. No se detectaron picos en los patrones de difracción de rayos X analizados que sugieran la existencia de un polimorfismo de fosfato cálcico diferente de cd HA; de todas formas el microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) muestra una relación Ca/P de 1,56 y 1,33 para los andamios GEL-HA-TA y GEL-HA respectivamente, información detallada se puede observar en la Figura 5.13 y 5.14.

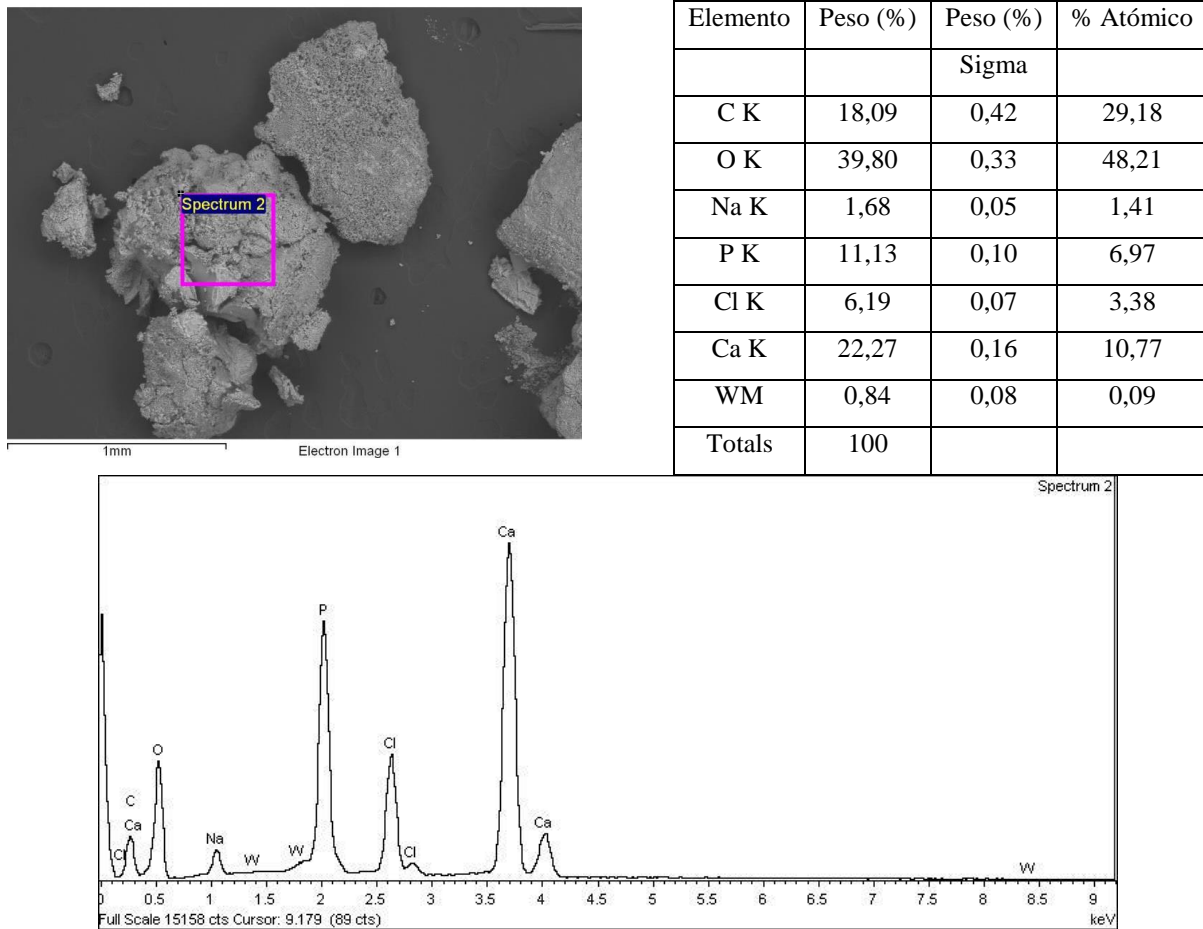


Figura 5.13 Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) del andamio mineralizado de GEL-HA-TA.

La menor relación Ca/P observada en el andamio GEL-TA puede ser asociada con la existencia de una mezcla de cdHA y fases amorfas de fosfatos cálcicos (ACP). Las ACP son de fórmula $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3-4,5$ con un 5–20 wt % de contenido de agua y una relación variable de Ca/P de 1,2-2,2 [59]. Este polimorfismo presenta un patrón de difracción de rayos X sin picos discernibles de las periodicidades de la red [60].

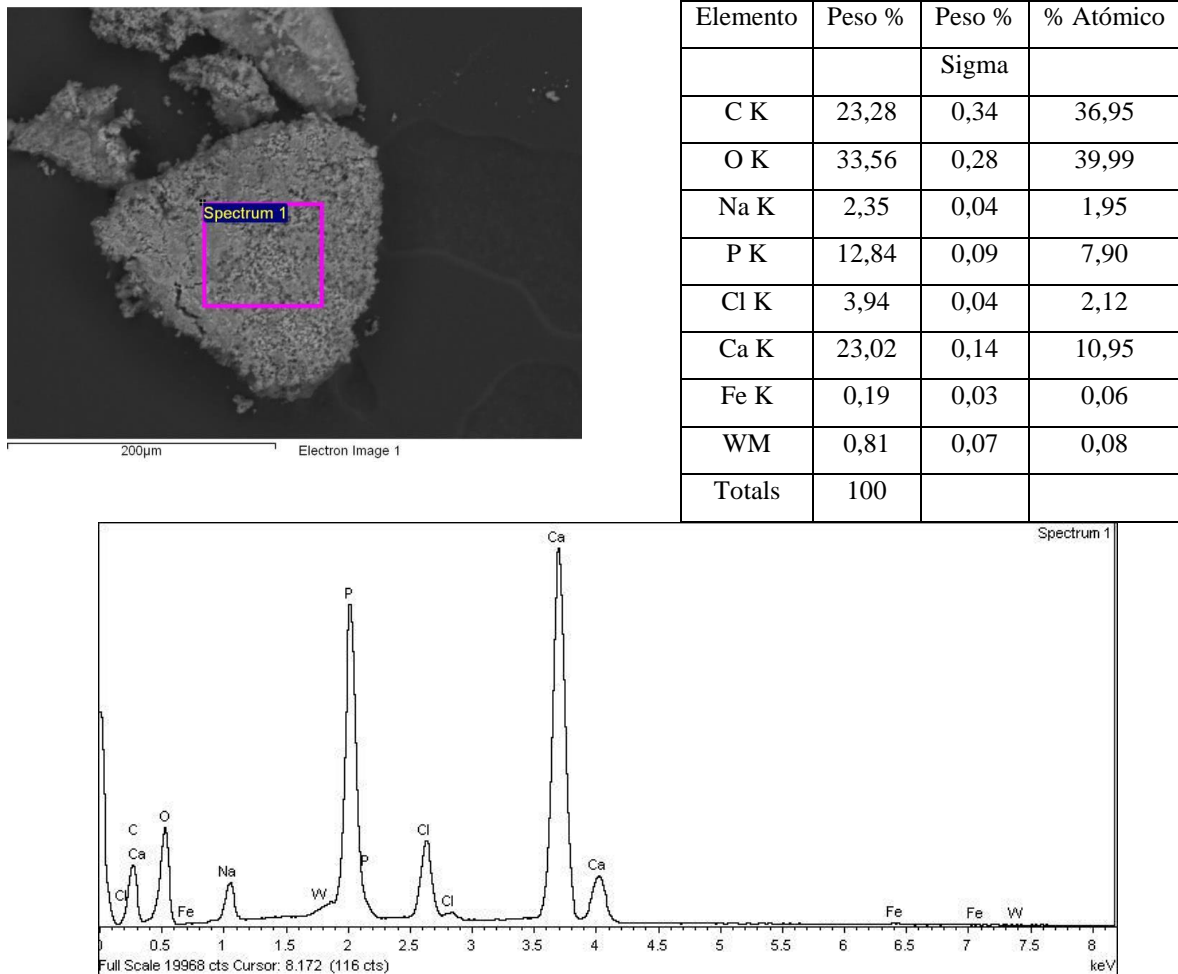


Figura 5.14 Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDX) del andamio mineralizado de GEL-TA.

A pesar de las aparentes similitudes de los perfiles de rayos X de los diferentes andamios mineralizados, pequeñas diferencias pueden ser encontradas en el análisis de espaciado interplanar, Figura 5.15, y los parámetros cristalográficos, Tabla 5.4. Tanto el espaciado interplanar como el incremento en el volumen de la celda unidad puede variar con la deshidratación parcial de acuerdo con lo previamente expuesto sugiriendo la presencia de ACP en la fase mineralizada del andamio de GEL-TA.

Cuando la relación c/a de los parámetros de la celda unidad es evaluada, Tabla 5.4, puede evidenciarse que la relación c/a que corresponde a la fase inorgánica de los andamios GEL-HA-TA ($c/a = 0,7333$) es un poco mayor que la relación c/a de la HA hexagonal estándar ($c/a = 0,7306$) pero comparable con el valor reportado por Smith y Smith [61], y Meneghini et al [57] para la apatita biogénica de hueso adulto ($c/a = 0,7326$). La difracción de rayos X puede ser utilizada para determinar la orientación de las caras cristalinas además del reconocimiento de fases y la resolución de las dimensiones de la celda unidad.

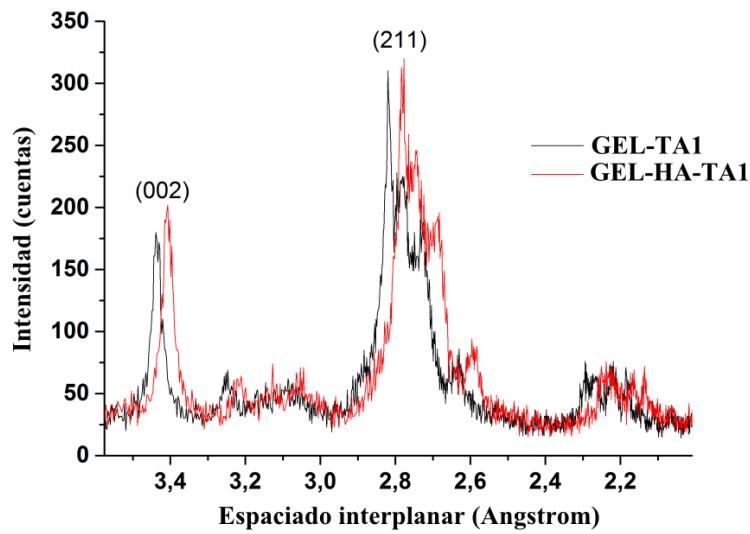


Figura 5.15 Patrones de espaciado interplanar de andamios mineralizados GEL-TA1 y GEL-HA-TA1.

Tabla 5.4 Microanálisis elemental y parámetros cristalográficos de la fase mineral presente en andamios GEL-TA y GEL-HA-TA comparados con los estándar para la HA hexagonal.

	GEL-TA1	GEL-HA-TA1	HA (JCPDS 9-436)
Ca/P	1,34	1,57	1,67
$d_{002} / \text{Å}$	3,436	3,408	3,440
$d_{211} / \text{Å}$	2,820	2,778	2,800
$a = b / \text{Å}$	9,447	9,294	9,418
$c / \text{Å}$	6,871	6,816	6,881
c/a	0,7273	0,7333	0,7306
$\alpha / ^\circ$	90,00	90,00	90,00
$\beta / ^\circ$	90,00	90,00	90,00
$\gamma / ^\circ$	120,00	120,00	120,00
$V / \text{Å}^2$	531,1	509,2	528,6
$\Phi_{a-b} \%$	27,0	26,7	-
$\Phi_c \%$	73,0	73,3	-

Los perfiles de las muestras mineralizadas de GEL-TA y GEL-HA-TA muestran signos de fuerte anisotropía en la amplitud de sus picos. A partir de un análisis más profundo de los perfiles de difracción, Figura 5.9, se puede notar que las reflexiones 001 ((001), (002) y (004)) en ambas muestras son más aguzadas que las restantes reflexiones del patrón XRD. Estas reflexiones más aguzadas de 001 sugieren que los dominios de difracción se extienden preferentemente a lo largo de la dirección cristalográfica c , como en los cristales de apatita biogénica [57]; de hecho, se encontró un 73% de orientación en el plano c ($\Phi\%$) en ambos andamios mineralizados, Tabla 5.4. La extensión de los dominios cristalográficos a lo largo

del eje c y a lo largo de las fibrillas mineralizadas de los andamios fue confirmada mediante estudios de H-TEM, Figura 5.16.

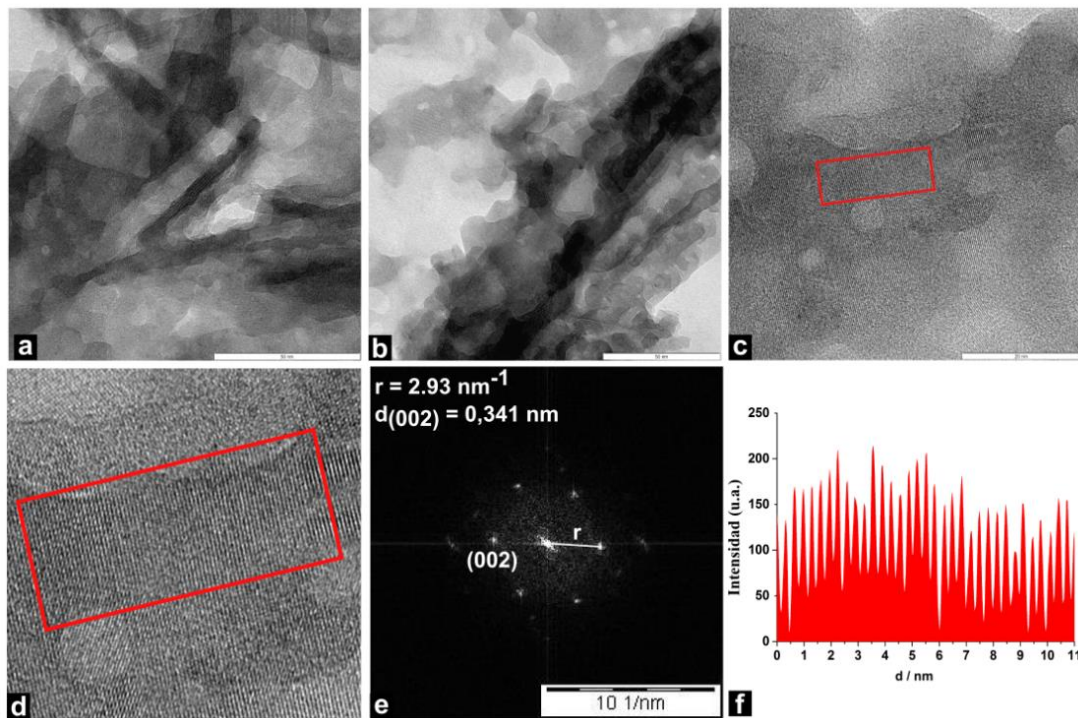


Figura 5.16 Microfotografías H-TEM de andamios mineralizados de GEL-HA-TA (a–c); área seleccionada para el análisis de difracción de electrones (SAED) exhibiendo los planos (002) (d, e); perfil de distancias interplanares (002) (f). Barras de escala (a, b) 50 nm and (c) 20 nm.

La naturaleza cristalina de la fase cd HA y la distancia interplanar de $0,34 \pm 0,041$ nm que corresponde al (002) plano cristalográfico fueron confirmadas por patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) extraídos de la transformada de Fourier (FFT) de imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, Figura 5.17.

Los resultados obtenidos sugieren una íntima relación entre la presencia de nanopartículas de HA pre-embtidas en los andamios de gelatina y la deposición de la fase mineralizada resaltando su rol potencial en el proceso de bio-mineralización.

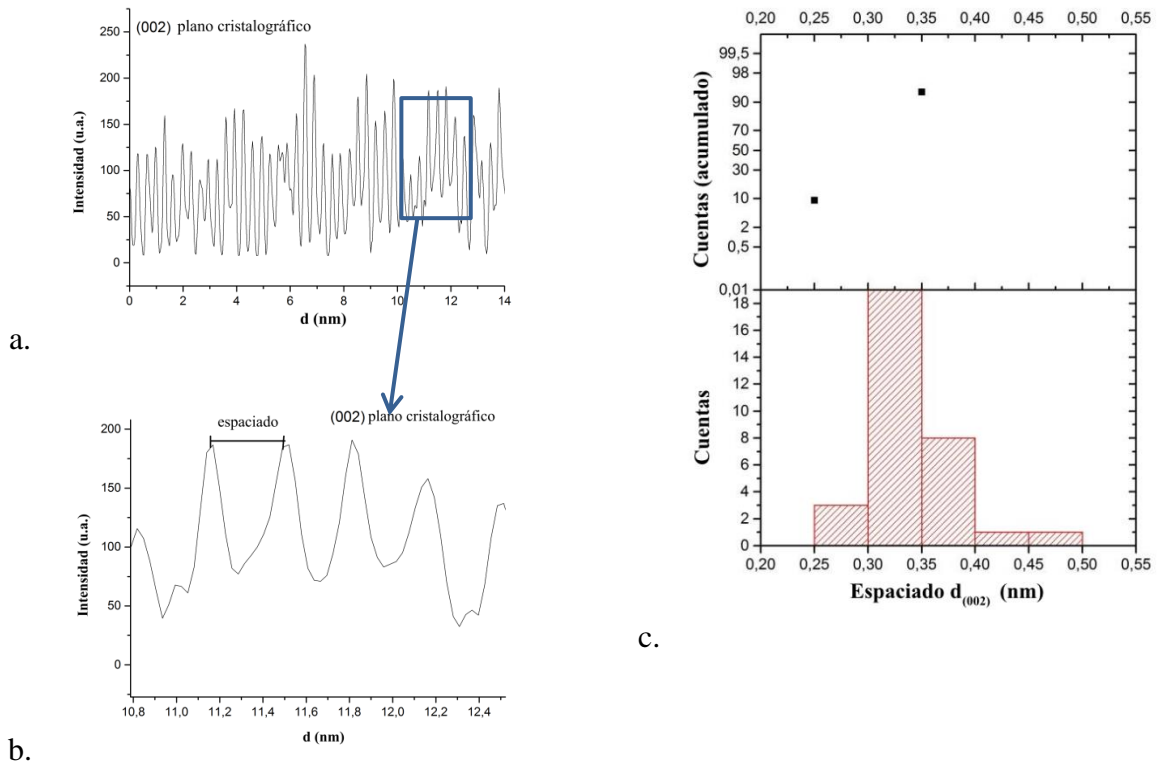


Figura 5.17 (002) distancia interplanar de los andamios mineralizados de GEL-TA y GEL-HA-TA medidos a partir de microfotografías H-TEM usando Image J 1,34s, NIH Image, USA (a y b). Histograma de distancia interplanar (002) (c).

5.3.5 Estudio de osteointegración potencial y biodegradabilidad *in vitro*.

En vivo, la degradabilidad puede ser lograda por simple disolución en fluidos biológicos o interacciones mediadas por células [35], [62]. Para el desarrollo de este estudio fue ensayada en tres situaciones diferentes: (i) disolución bajo condiciones simuladas de fluidos fisiológicos, pH = 7,4; (ii) disoluciones en condiciones simulando procesos de resorción ósea en presencia de osteoclastos, pH = 4,2; (iii) disolución en condiciones de catalización enzimática. Los resultados, Figura 5.18 h, claramente muestran que la mayor tasa de degradación inicial así como la degradación máxima del andamio se logró bajo efecto enzimático, seguido por la degradación en condiciones de resorción (pH = 4,2). El andamio también experimenta una degradación parcial (15%) bajo fluidos fisiológicos y afecta a la deposición de cristales de HA biogénicos, Figura 5.18 a-f, un proceso esencial para asegurar la osteointegración [39].

La bioactividad se define como la propiedad de los materiales de osteointegrarse, es decir desarrollar una unión directa, adherente y fuerte con el tejido óseo. Un método simple para estimar la bioactividad potencial de los materiales consiste en la inmersión de los

materiales en fluido fisiológico simulado (SBF). De acuerdo con Kokubo et al [39], un requerimiento esencial es la formación de una capa de fosfato cálcico sobre la superficie del material, usualmente llamado “apatita símil ósea”. Esta apatita parece activar señales proteicas y celulares que desencadenan la cascada de eventos resultantes en la formación ósea [63]. En otras palabras, un modelo in vitro para evaluar el comportamiento in vivo es a partir de la inmersión del material sintético en solución SBF [64].

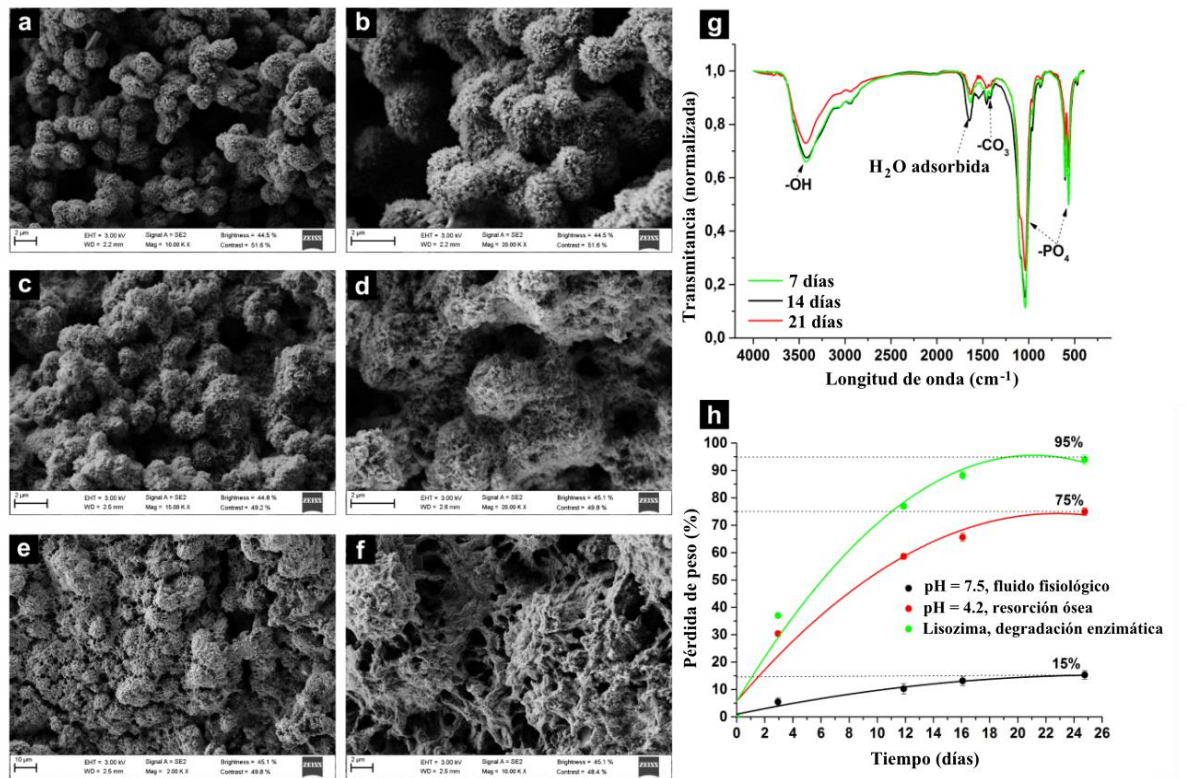


Figura 5.18 Crecimiento biomimético de cristales HA luego de (a–b) 7 días; (c–d) 14 días y (e–f) 21 días de inmersión en SBF. Espectro FT-IR de andamio GEL-HA-TA luego de la inmersión en SBF (g). Cinética de degradación del andamio GEL-HA-TA (h). Escala 2 μm (a–e) y 10 μm (f).

La Figura 5.18 a-e, muestra las micrografías SEM con cubiertas de apatita depositadas sobre los materiales luego de 7, 14 y 21 días de incubación en 1.5 ml SBF. Luego de los primeros 7 días de inmersión, una continua capa de cubierta mineral, exhibiendo micromorfología esférica, se observó en la superficie de los andamios, Figura 5.18 a y b. Los núcleos poseen morfología esférica como glóbulos de 2 μm de diámetro compuestos por aglomerados de cristales en forma de plato de ≈ 150 nm de longitud. Luego de 14 días de inmersión en 1,5ml de SBF, las cubiertas de cristales de HA exhibieron la misma micromorfología pero con una reducción de la resolución; los aglomerados esféricos de cristales de

HA visibles luego de 7 días, se observaron elongados y erosionados, Figura 5.18 c y d. Subsecuentemente, luego de 21 días de inmersión pueden ser apreciados espacios (gaps) entre las estructuras esféricas, Figura 5.18 e y f. Asumimos que esto se debe a la degradación parcial del andamio y por lo tanto a una destrucción parcial de la estructura que soporta la capa de HA depositada. Como se observó en el espectro de FT-IR, hay una reducción en los picos relacionados con hidroxiapatita con el aumento de la inmersión, Figura 5.18 g. El microanálisis EDX, Figuras 5.19, 5.20 y 5.21, mostró que luego del ensayo de bioactividad el material con cubierta esférica mostró una relación $Ca/P = 1,64$ que puede ser atribuida a los cristales de HA. Una reducción de la relación Ca/P puede ser apreciada con el incremento del tiempo de inmersión, de acuerdo con la evolución de la degradación del andamio en el tiempo. Por otra parte, a todos los tiempos, los glóbulos Ca-P que cubren la superficie del andamio mostraron una relación Ca/P cercana a la existente en el hueso trabecular y cortical, siendo además su morfología similar a la considerada esencial para el desarrollo de eventos que implican osteoblastos para lograr la osteointegración [39], [63].

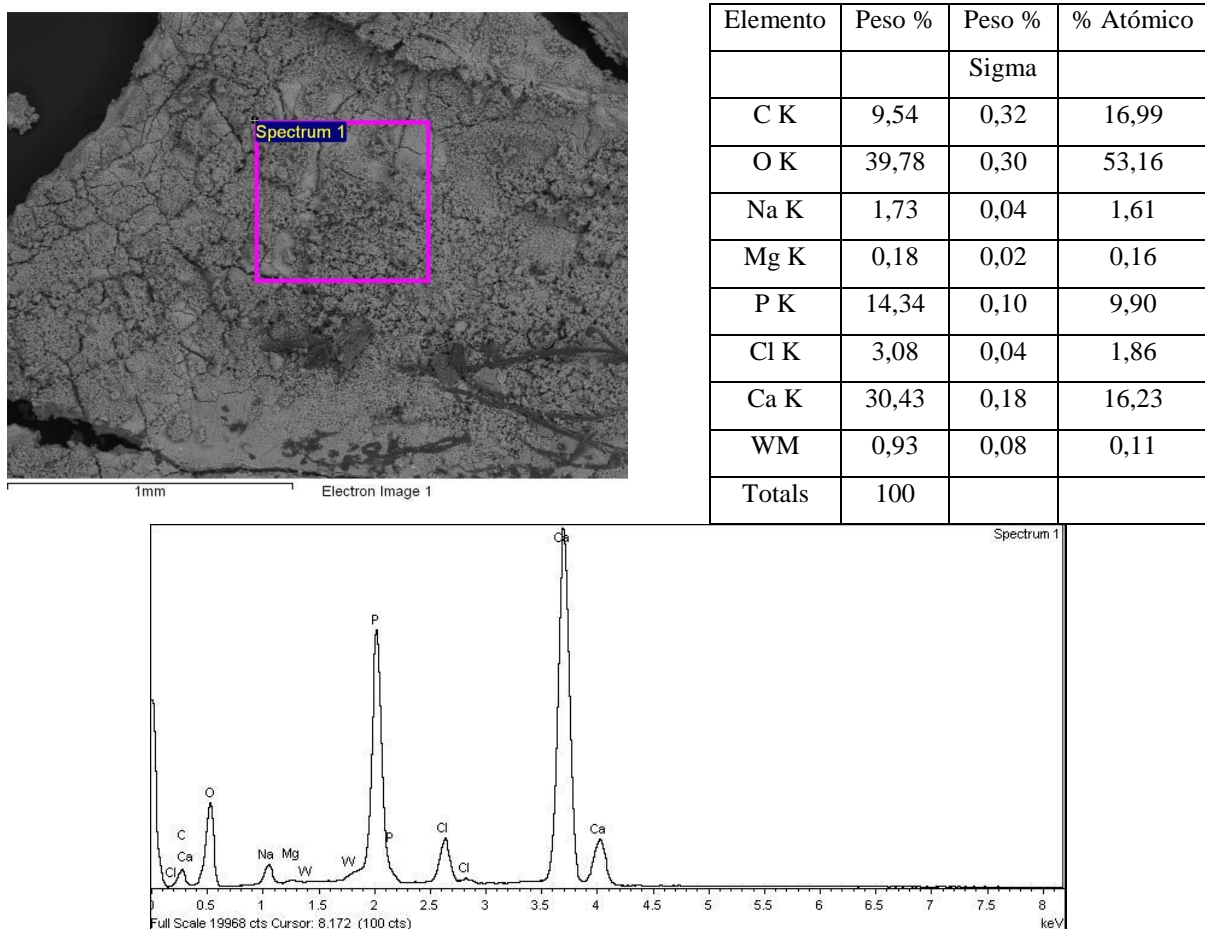
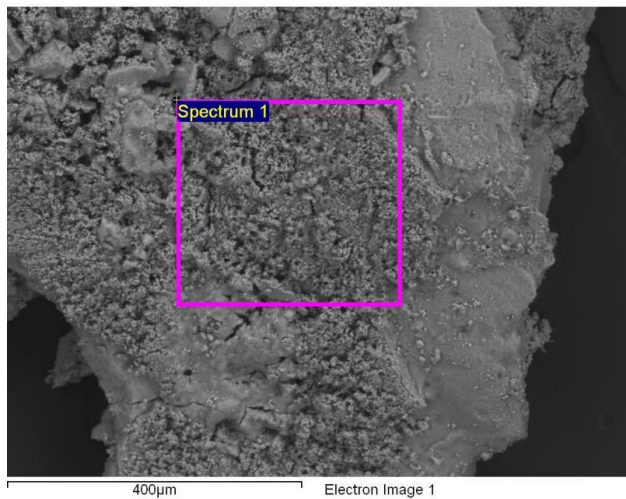


Figura 5.19 Microanálisis de dispersión de rayos X (EDX) de cubiertas minerales de Ca-P luego de 7 días de inmersión en SBF.



Elemento	Peso %	Peso % Sigma	% Atómico
C K	12,57	0,86	21,61
O K	39,88	0,49	51,46
Na K	1,27	0,05	1,14
Mg K	0,28	0,03	0,24
P K	13,72	0,17	9,14
Cl K	2,08	0,04	1,21
K K	0,13	0,02	0,07
Ca K	29,20	0,33	15,04
WM	0,87	0,08	0,10
Totals	100		

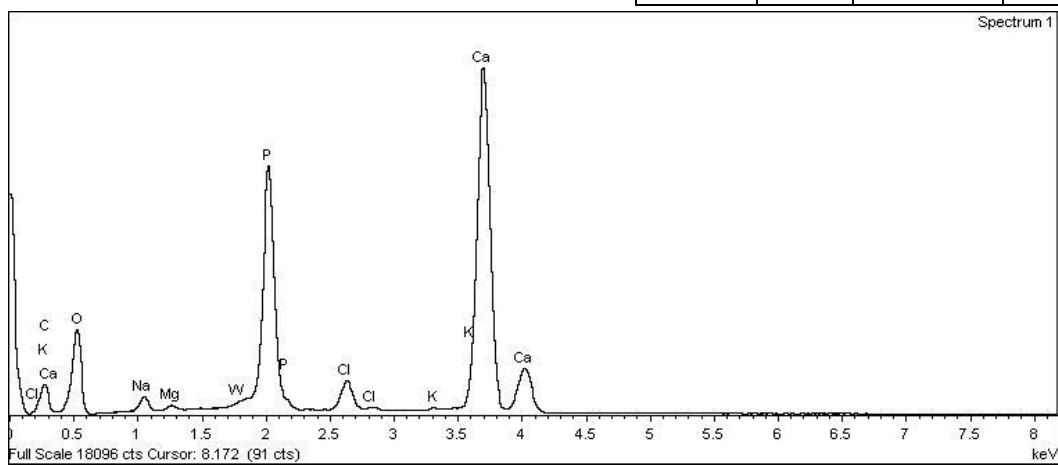
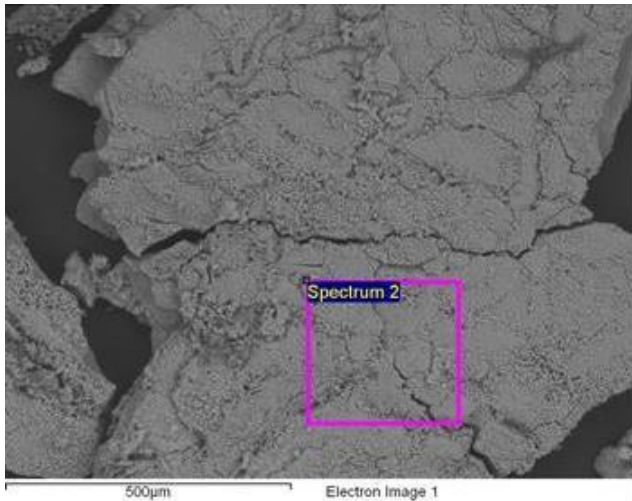


Figura 5.20 Microanálisis de dispersión de rayos X (EDX) de cubiertas minerales de Ca-P luego de 14 días de inmersión en SBF.



Elemento	Peso %	Peso %	% Atómico
		Sigma	
C K	10,32	0,50	18,54
O K	36,80	0,43	49,64
Na K	2,72	0,07	2,55
Mg K	0,20	0,04	0,18
P K	14,73	0,15	10,26
Cl K	4,04	0,07	2,46
Ca K	30,18	0,27	16,25
WM	1,00	0,11	0,12
Totals	100		

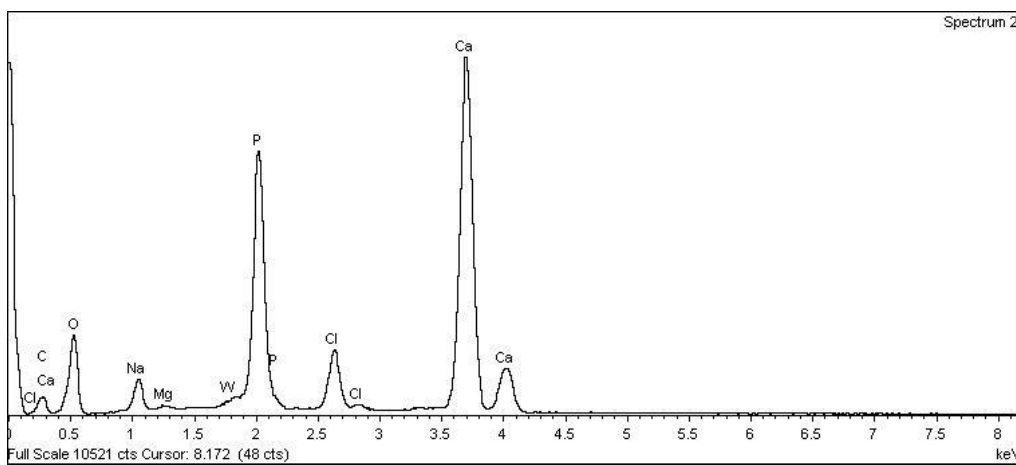


Figura 5.21 Microanálisis de dispersión de rayos X (EDX) de cubiertas minerales de Ca-P luego de 21 días de inmersión en SBF.

5.4 Conclusiones

A partir de las soluciones gelatina-hidroxiapatita-ácido tánico y optimizando la distribución homogénea de los nanorodillos de HA en la red, se obtuvo como resultado un mayor nivel de renaturalización en comparación con las muestras no entrecruzadas (que puede incrementar también la fuerza de la estructura), se ha desarrollado andamios estables, robustos que exhiben un entramado de fibras altamente entrecruzadas. Las muestras poseen un grado de rugosidad definido en la superficie de la pared de los poros, una característica requerida para lograr una adecuada aceptación por parte del tejido huésped. El efecto del entrecruzante (TA), tiene un pequeño impacto en el marco de los parámetros estructurales y de rugosidad mientras que genera un significativo aumento de la estabilidad térmica del andamio, a lo que se suma la distribución homogénea de los nanorodillos de HA entre el entrecruzante y las cadenas de proteína. La presencia de partículas de nano-HA, también induce una mejorada mineralización, logrando un crecimiento cristalino de la forma,

composición y orientación equivalente a la presentada por la fase mineral de tejidos calcificados. Sus propiedades de degradación en diversas condiciones biológicas, así como su capacidad de inducir, en fluidos fisiológicos, una cubierta de HA biogénica fueron evaluadas y logradas satisfactoriamente.

Referencias bibliográficas

- [1] N. Reddy & Y. Yang, “Potential of plant proteins for medical applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 29, pp. 490–498, 2011.
- [2] A. L. Butcher, G. S. Offeddu, & M. L. Oyen, “Nanofibrous hydrogel composites as mechanically robust tissue engineering scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, vol. 32, pp. 564–570, 2014.
- [3] N. Mahmoudifar & P. M. Doran, “Chondrogenesis and cartilage tissue engineering : the longer road to technology development,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, pp. 166–176, 2012.
- [4] C. N. Grover, R. E. Cameron, & S. M. Best, “Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 10, pp. 62–74, 2012.
- [5] E. Santos, R. M. Hernández, L. Pedraz, & G. Orive, “Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate : translation from 2D to 3D,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, pp. 331–341, 2012.
- [6] Q. Jiang, N. Reddy, & Y. Yang, “Cytocompatible cross-linking of electrospun zein fibers for the development of water-stable tissue engineering scaffolds,” *Acta Biomater.*, vol. 6, pp. 4042–4051, 2010.
- [7] A. W. Martinez, J. M. Caves, S. Ravi, W. Li, & E. L. Chaikof, “Effects of crosslinking on the mechanical properties , drug release and cytocompatibility of protein polymers,” *Acta Biomater.*, vol. 10, pp. 26–33, 2014.
- [8] T. Koide & M. Daito, “Effects of Various Collagen Crosslinking Techniques on Mechanical Properties of Collagen Film,” *Dent. Mater. J.*, vol. 16, pp. 1–9, 1997.
- [9] J. M. Orban, L. B. Wilson, J. A. Kofroth, M. S. El-kurdi, T. M. Maul, & D. A. Vorp, “Crosslinking of collagen gels by transglutaminase,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 68, pp. 756–762, 2003.
- [10] F. Lin, C. Yao, J. Sun, H. Liu, & C. Huang, “Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked

- gelatin,” *Biomaterials*, vol. 19, pp. 905–917, 1998.
- [11] N. Reddy, R. Reddy, & Q. Jiang, “Crosslinking biopolymers for biomedical applications,” *Trends Biotechnol.*, vol. 33, pp. 362–369, 2015.
- [12] J. Lai, “Interrelationship between cross-linking structure, molecular stability, and cytocompatibility of amniotic membranes cross-linked with glutaraldehyde of varying concentrations,” *RSC Adv.*, vol. 4, pp. 18871–18880, 2014.
- [13] L. Meng, J. M. Chem, L. Meng, O. Arnoult, & G. E. Wnek, “Electrospinning of in situ crosslinked collagen nanofibers,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, pp. 19412–19417, 2012.
- [14] B. Han, J. Jaurequi, B. W. Tang, & M. E. Nimni, “Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 65, pp. 118–124, 2003.
- [15] M. P. Ohan, K. S. Weadock, & M. G. Dunn, “Synergistic effects of glucose and ultraviolet irradiation on the physical properties of collagen,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, pp. 384–391, 2002.
- [16] X. Wu, Y. Liu, X. Li, P. Wen, Y. Zhang, Y. Long, X. Wang, Y. Guo, F. Xing, & J. Gao, “Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method,” *Acta Biomater.*, vol. 6, pp. 1167–1177, 2010.
- [17] J. F. Martucci, R. A. Ruseckaite, & A. Vázquez, “Creep of glutaraldehyde-crosslinked gelatin films,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 435–436, pp. 681–686, 2006.
- [18] D. Olde, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. van W. P. B Nieuwenhuis, & J. Feijen, “Glutaraldehyde as crosslinking agent for collagen based biomaterials,” *J. Mat. Sci. Mat Med.*, vol. 6, pp. 460–72, 1995.
- [19] G. Tillet, B. Boutevin, & B. Ameduri, “Chemical reactions of polymer crosslinking and post-crosslinking at room and medium temperature,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, pp. 191–217, 2011.
- [20] M. a. Kiechel & C. L. Schauer, “Non-covalent crosslinkers for electrospun chitosan fibers,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 95, pp. 123–133, 2013.
- [21] D. Huber, G. Tegl, M. Baumann, E. Sommer, E. G. Gorji, N. Borth, G. Schleining, G. S. Nyanhongo, & G. M. Guebitz, “Chitosan hydrogel formation using laccase activated phenolics as cross-linkers,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 157, pp. 814–822, 2017.
- [22] H. M. Rawel, J. Kroll, & U. C. Hohl, “Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins,” *Nahrung - Food*, vol. 45, pp. 72–81, 2001.
- [23] G. Strauss & S. M. Gibson, “Plant phenolics as cross-linkers of gelatin gels and gelatin-based coacervates for use as food ingredients,” *Food Hydrocoll.*, vol. 18, pp.

- 81–89, 2004.
- [24] F. Xing, G. Cheng, K. Yi, & L. Ma, “Nanoencapsulation of capsaicin by complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 96, pp. 2225–2229, 2005.
- [25] V. Natarajan, N. Krithica, B. Madhan, & P. K. Sehgal, “Preparation and properties of tannic acid cross-linked collagen scaffold and its application in wound healing,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101, pp. 560–567, 2013.
- [26] N. Cao, Y. Fu, & J. He, “Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid,” *Food Hydrocoll.*, vol. 21, pp. 575–584, 2007.
- [27] J. C. Isenburg, D. T. Simionescu, & N. R. Vyavahare, “Elastin stabilization in cardiovascular implants: Improved resistance to enzymatic degradation by treatment with tannic acid,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 3293–3302, 2004.
- [28] G. L. Henson, L. Niemeyer, G. Ansong, R. Forkner, H. P. S. Makkar, & A. E. Hagerman, “A modified method for determining protein binding capacity of plant polyphenolics using radiolabelled protein,” *Phytochem. Anal.*, vol. 15, pp. 159–163, 2004.
- [29] G. Luck, H. Liao, N. J. Murray, H. R. Grimmer, E. E. Warminski, M. P. Williamson, T. H. Lilley, & E. Haslam, “Polyphenols, astringency and proline-rich proteins,” *Phytochemistry*, vol. 37, pp. 357–371, 1994.
- [30] X. Zhang, M. D. Do, P. Casey, A. Sulistio, G. G. Qiao, L. Lundin, P. Lillford, & S. Kosaraju, “Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy,” *Biomacromolecules*, vol. 11, pp. 1125–1132, 2010.
- [31] C. Peña, K. de la Caba, A. Eceiza, R. Ruseckaite, & I. Mondragon, “Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition,” *Bioresour. Technol.*, vol. 101, pp. 6836–6842, 2010.
- [32] S. Kim, M. E. Nimni, Z. Yang, & B. Han, “Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 75, pp. 442–450, 2005.
- [33] C. a Schneider, W. S. Rasband, & K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 671–675, 2012.
- [34] G. Kaletunç, *Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems*. G. Kaletunç, Ed, Iowa: John Wiley & Sons, 2009.

- [35] R. Baron, L. Neff, D. Louvard, & P. J. Courtoy, “Acidification and Bone Cell-mediated Extracellular Evidence for a Low pH in Resorbing Lacunae Resorption : of a 100-kD Lysosomal Membrane Protein and Localization at the Osteoclast Ruffled Border,” *J Cell Biol.*, vol. 101, pp. 2210–2222, 1985.
- [36] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, & J. Takahashi, “Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein,” *Biomaterials*, vol. 25, pp. 3807–3812, 2004.
- [37] V. N. Uversky & A. L. Fink, *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases*. V. N. Uversky & A. L. Fink, Eds. Boston, MA: Springer US, 2007.
- [38] A. Tampieri, M. Iafisco, M. Sandri, S. Panseri, C. Cunha, S. Sprio, E. Savini, M. Uhlarz, & T. Herrmannsdörfer, “Magnetic Bioinspired Hybrid Nanostructured Collagen – Hydroxyapatite Scaffolds Supporting Cell Proliferation and Tuning Regenerative Process,” *ACS Appl. Mater. & Interfaces*, vol. 6, pp. 15697-15707, 2014.
- [39] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, & T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, pp. 721–734, 1990.
- [40] K. Lee, D. Kaplan, & J. Velema, “Biopolymer-Based Biomaterials as Scaffolds for Tissue Engineering,” *Tissue Eng. I*, vol. 102, pp. 187–238, 2006.
- [41] H. Wiskott & U. Belser, “Lack of integration of smooth titanium surfaces: a working hypothesis based on strains generated in the surrounding bone,” *Clin. Oral Implants Res.*, vol. 10, pp. 429–444, 1999.
- [42] K. N. Hansson & S. Hansson, “Skewness and Kurtosis: Important Parameters in the Characterization of Dental Implant Surface Roughness—A Computer Simulation,” *ISRN Mater. Sci.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [43] S. P. Timoshenko, & J. N. Goodier, “Theory of elasticity,” *Engineering societies monographs*, S. P. Timoshenko, & J. N. Goodier, Eds, New York: McGraw-Hill Education, 1970.
- [44] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. A. Maksoud, I. M. Elewa, & H. H. Soliman, “Roughness parameters,” *J. Mater. Process. Technol.*, vol. 123, pp. 133–145, 2002.
- [45] S. Hansson, “Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: A critical analysis,” *J. Biomech.*, vol. 33, pp. 1297–1303, 2000.
- [46] S. Hansson & M. Werke, “The implant thread as a retention element in cortical bone: The effect of thread size and thread profile: A finite element study,” *J. Biomech.*, vol. 36, pp. 1247–1258, 2003.

- [47] F. Isidor, "Loss of osseointegration caused by occlusal load of oral implants. A clinical and radiographic study in monkeys.," *Clin. Oral Impl. Res.*, vol. 7, pp. 143–152, 1996.
- [48] Y. Z. Zhang, J. Venugopal, Z. M. Huang, C. T. Lim, & S. Ramakrishna, "Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers," *Polymer.*, vol. 47, pp. 2911–2917, 2006.
- [49] Yeting Liu, Bhesh Bhandari, & Weibiao Zhou, "Glass Transition and Enthalpy Relaxation of Amorphous Food Saccharides: A Review," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, pp. 5701–5717, 2006.
- [50] B. Nasser, "Rehydration Mechanisms in Collagen As Seen By Thermally Stimulated Current," *Eur. Sci. J.*, vol. 9, pp. 123–133, 2013.
- [51] V. M. Boucher, D. Cangialosi, A. Alegría, & J. Colmenero, "Enthalpy recovery of glassy polymers: Dramatic deviations from the extrapolated liquidlike behavior," *Macromolecules*, vol. 44, pp. 8333–8342, 2011.
- [52] P. J. a Sobral & a. M. Q. B. Habitante, "Phase transitions of pigskin gelatin," *Food Hydrocoll.*, vol. 15, pp. 377–382, 2001.
- [53] M. D. Shoulders & R. T. Raines, "Collagen Structure and Stability," *Annu Rev Biochem*, vol. 78, pp. 929–958, 2010.
- [54] M. Jridi, N. Souissi, A. Mbarek, G. Chadeyron, M. Kammoun, & M. Nasri, "Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 61, pp. 17–25, 2013.
- [55] N. V Prabhu & K. A. Sharp, "Heat Capacity in Proteins," *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 56, pp. 521–548, 2005.
- [56] P. Fratzl, H. S. Gupta, P. Roschger, K. Klaushofer, P. Fratzl, H. S. Gupta, P. Roschger, & K. Klaushofer, "Bone Nanostructure and its Relevance for Mechanical Performance, Disease and Treatment," *Nanotechnology*, vol. 5, pp. 345-360, 2009.
- [57] C. Meneghini, M. C. Dalconi, S. Nuzzo, S. Mobilio, & R. H. Wenk, "Rietveld refinement on x-ray diffraction patterns of bioapatite in human fetal bones.," *Biophys. J.*, vol. 84, pp. 2021–2029, 2003.
- [58] H. M. Rietveld, "A profile refinement method for nuclear and magnetic structures," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 2, pp. 65–71, 1969.
- [59] S. V. Dorozhkin, "Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine," *Materials (Basel).*, vol. 2, pp. 1975–2045, 2009.
- [60] J. C. Elliott, "Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates," J. C. Elliott, Ed, Amsterdam: Elsevier, 1994.

- [61] C. B. Smith & D. A. Smith, “An x-ray diffraction investigation of age-related changes in the crystal structure of bone apatite,” *Calcif. Tissue Res.*, vol. 22, pp. 219–226, 1977.
- [62] X. Zhou, Q. Cai, N. Yan, X. Deng, & X. Yang, “In vitro hydrolytic and enzymatic degradation of nestlike-patterned electrospun poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 95, pp. 755–765, 2010.
- [63] P. S. Vanzillotta, M. S. Sader, I. N. Bastos, & G. De Almeida Soares, “Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments,” *Dent. Mater.*, vol. 22, pp. 275–282, 2006.
- [64] N. L. D’Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, pp. 5014–5026, 2013.

Capítulo 6

Propiedades mecánicas, porosidad y almacenamiento de agua de los andamios GEL-HA

A lo largo de los capítulos previos, hemos detallado la formación de los andamios partiendo desde el análisis de los nanorodillos, pasando por el estudio de la dinámica de las soluciones confeccionadas, para luego caracterizar los andamios sintetizados. Considerando el objetivo final de nuestros materiales, se convierte en un punto crítico lograr el diseño de estructuras que puedan mantener su integridad durante la aplicación de esfuerzos mecánicos [1]. Los requerimientos físicos y biológicos de cualquier sustituto ideal de hueso deben considerar imitar la morfología tisular del organismo, y al mismo tiempo es necesario que puedan desarrollar las funciones específicas del tejido [2]. En este sentido, el esqueleto humano tiene una fundamental participación en el sostén mecánico del cuerpo [3]. En consecuencia, en este capítulo los andamios van a ser evaluados en cuanto a sus propiedades mecánicas y, debido a que se encuentran íntimamente relacionadas, también serán tratados aspectos como la porosidad y la capacidad de almacenamiento de agua.

6.1 La deformación de los materiales

Cuando se somete una probeta a una fuerza uniaxial como puede ser tracción o compresión se produce una deformación. Si el material recupera sus dimensiones originales, lo que significa un retorno de los átomos a sus posiciones iniciales luego de eliminada la fuerza, se considera que ha sufrido una deformación elástica. En cambio, si el material se deforma tanto que no puede recuperar completamente sus dimensiones originales, se considera que ha sufrido una deformación plástica. Durante este tipo de deformación, los átomos se desplazan continuamente desde sus posiciones iniciales hasta otras nuevas [4].

Para considerar el uso de un determinado polímero en una aplicación específica es necesario tener en cuenta sus diversas propiedades. Entre ellas, un importante factor a evaluar es su comportamiento mecánico, es decir, su desempeño y deformación bajo esfuerzo. Dicho comportamiento puede ser analizado y estudiado a partir de sus propiedades esfuerzo-deformación [5], [6]. Esto usualmente implica observar la respuesta del polímero en tanto le

son aplicadas fuerzas como tracción o compresión hasta el punto de la ruptura. El resultado, usualmente, se muestra como una gráfica del esfuerzo vs deformación. El esfuerzo es usualmente expresado en Newtons por centímetro cuadrado ($\text{N}\cdot\text{cm}^{-2}$) o megapascales (MPa) donde $1\text{MPa} = 100\text{ N}\cdot\text{cm}^{-2}$. La deformación puede ser expresada como incremento porcentual en el largo de la muestra del polímero (es decir, $\Delta L/L \times 100$, donde L es la longitud de la muestra original) [7].

En la Figura 6.1 se pueden observar las curvas características de los grupos en los que se clasifican los polímeros dependiendo del comportamiento que presenten en el ensayo.

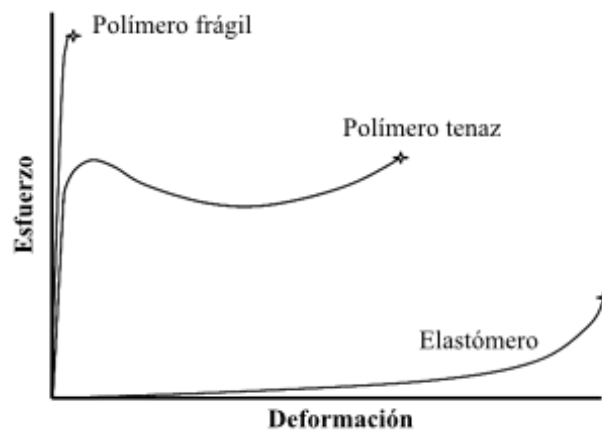


Figura 6.1 Esquema de las curvas tensión (σ) vs deformación (ϵ) de las 3 diferentes clases de polímeros.

La primera curva, “polímero frágil”, es característica de materiales duros pero frágiles que sufren la rotura al finalizar la región elástica, mientras que la segunda corresponde a los duros pero dúctiles que reciben el nombre de “tenaces” que sufren una deformación inicial elástica luego de la cual el material fluye para después deformarse plásticamente siendo caracterizados como dúctiles. En este caso puede haber materiales que muestren extensión uniforme y otros en los cuales se produce la deformación en un área limitada de la muestra formándose una región conocida como cuello que se modifica a medida que se va incrementando el esfuerzo. Por último, la tercera curva corresponde a polímeros elastoméricos que tienen un comportamiento totalmente elástico hasta la rotura [6], [8].

La pendiente del segmento lineal que se observa en los comienzos de cada una de las curvas corresponde al módulo de elasticidad E (o módulo de Young). Dicho parámetro puede ser interpretado como la rigidez de un material, su resistencia a la deformación elástica. A medida que se incrementa, el material es más rígido por lo que la deformación elástica es menor una vez aplicada la tensión [8].

Los polímeros varían ampliamente su comportamiento mecánico dependiendo del grado de cristalinidad, entrecruzamiento y los valores de temperatura de transición vítrea (T_g) y temperatura de fusión (T_m). Estructuras fuertes y poco extensibles son obtenidas a partir de varias combinaciones de altos grados de cristalinidad y entrecruzamiento o cadenas rígidas (asociados a altas T_g). Grandes extensibilidades y poca fuerza en polímeros es sinónimo de bajos grados de cristalinidad y entrecruzamiento y relacionados con bajas T_g . Se sabe que los polímeros pierden su fuerza a temperaturas cercanas a su T_g en el caso de ser amorfos y a temperaturas cercanas a su T_m para los cristalinos. En la ciencia de los polímeros se consideran especialmente las propiedades deseadas en el producto final para tomar una decisión correcta acerca de la síntesis y así lograr los comportamientos deseados buscando la combinación adecuada de las propiedades mencionadas [7].

Algunas de las propiedades mecánicas que son de interés para el diseño estructural, y que pueden obtenerse a partir de ensayos mecánicos, son [7]:

1. Módulo de Young (Módulo de elasticidad): En la primera parte del ensayo de tracción, el material se deforma elásticamente. Es decir, si la fuerza que actúa sobre la muestra desaparece, la probeta volverá a su longitud inicial. Este parámetro está relacionado con la fuerza del enlace entre los átomos [4]. En la gráfica se puede observar como la pendiente de la porción inicial de la curva, la porción recta de la misma [6].
2. Tensión de rotura (MPa): esfuerzo al cual está sometida la muestra en el momento de rotura. Es la tensión máxima que puede soportar [9].
3. Deformación a la tensión de rotura (%): la deformación de la probeta en el momento de la tensión de rotura [9].
4. Esfuerzo Máximo (MPa): Máximo esfuerzo que es capaz de soportar la probeta en el rango de deformación estudiado.
5. Deformación al Esfuerzo Máximo (%): Deformación sufrida por la probeta en el punto de esfuerzo máximo.
6. Límite Elástico (MPa): Esfuerzo máximo que soporta la probeta sin sufrir deformaciones permanentes, hasta este punto el material tiene comportamiento elástico.
7. Deformación al Límite Elástico (%): Deformación sufrida por la probeta en el punto de su límite elástico.

6.2 Porosidad

La porosidad es una propiedad importante en los materiales, y su estudio es un aspecto destacado en el desarrollo de implantes sintéticos de hueso. La porosidad efectiva de un sólido poroso, como una espuma, granos o materiales fibrosos se define como la fracción del volumen interconectado mediante los poros respecto del volumen total del agregado. Esta cantidad es un parámetro muy importante a la hora de la descripción de estructuras porosas [10]. A pesar de que muchos estudios han demostrado un mejor crecimiento de tejido relacionado con el porcentaje de porosidad, todavía parece haber discusiones acerca del tipo óptimo de porosidad. Una combinación de tamaño de poro, la proporción de la porosidad efectiva, la interconectividad de los poros, la permeabilidad y el comportamiento mecánico parecen ser los responsables de la tasa y calidad de integración de los materiales [11].

La regeneración ósea en un andamio in vivo implica reclutamiento y penetración de células del tejido circundante y vascularización. Diferentes estudios afirman que una alta porosidad mejora el crecimiento celular dentro del andamio y la osteointegración del implante luego de la cirugía y, por lo tanto, la osteogénesis, gracias a grandes superficies de intercambio de iones y sobre las que pueden adsorberse factores de inducción ósea [11]–[13]. En literatura son pocos los reportes que sostienen la independencia de la regeneración ósea y la porosidad del andamio [14], [15], así como los estudios con buenos resultados en andamios con bajas porosidades, por lo que altos valores de este parámetro son usualmente más aceptados. Junto con la porosidad, determinados niveles de rugosidad de la superficie mejoran el anclaje y, en consecuencia, la proliferación y diferenciación de las células responsables de la formación de hueso [16].

Factores como la tasa de degradación, estudiada en el capítulo 5, y el comportamiento mecánico de los andamios deben ser tenidos en cuenta al momento de estudiar la porosidad [17]. El incremento de la porosidad efectiva y el tamaño de los poros favorece a crecimiento óseo [19], [20], aunque también resulta en una reducción de las propiedades mecánicas, debido a que compromete la integridad estructural del andamio [21].

6.3 Hinchamiento y capacidad de absorción de solvente

A partir de una red tridimensional compuesta por un polímero central, agua y un agente entrecruzante se puede lograr una estructura compleja de alto peso molecular. Una de las características más importantes de una estructura como esta es su habilidad de hincharse en presencia de agua y deshincharse en ausencia de ella. Con el objetivo de lograr dominar este aspecto es necesario controlar factores como la hidrofiliidad de las cadenas poliméricas y la densidad de entrecruzamientos [22].

La tasa de hinchamiento o encogimiento está controlada por la difusión de las moléculas de agua a través de la red compuesta [23]. La interconectividad de los poros juega un rol crucial en la capacidad de absorción de solvente gracias a la posibilidad que le otorga a éste de moverse dentro de la red. Se conoce que a medida que la concentración del reactivo conformador de la red aumenta, el grosor de las paredes y la rigidez lo hacen también, lo que conduce a una capacidad de absorción menor. Por el contrario, con el aumento de la porosidad de la red, la absorción aumenta y una mayor cantidad de moléculas de solvente pueden difundir dentro de la estructura. La conectividad de los poros tiene un rol crucial y aumenta también la velocidad de absorción por parte de los materiales [24].

Luego del contacto con el solvente, es posible observar un comportamiento osmótico que lleva al hinchamiento o deshinchamiento, procesos que pueden dar lugar a un cambio significativo en su volumen [25], [26].

Los primeros estudios de hinchamiento temporal fueron realizados por Tanaka y Fillmore, 1979, quienes estudiaron la cinética de incorporación de agua de una partícula esférica [27]. Li y Tanaka, 1990, mostraron que la cinética está fuertemente afectada por la forma de la muestra; entre muestras con diferentes formas, encontraron diferencias en el tiempo en el cual alcanzan el equilibrio [28]. Por otro lado, Yoon, et al, 2010, demostraron una fuerte influencia geométrica en el almacenamiento de agua de los geles [29].

La hidrofiliidad puede ser mejorada mediante la incorporación de grupos ionizables como grupos carboxílicos. Se sabe que el incremento en cantidad de grupos iónicos puede aumentar su capacidad de hinchamiento. Esto se atribuye, principalmente, al simultáneo incremento en los contraiones que produce presión osmótica adicional que expande el gel [30]–[32]. Además, gracias a las estructuras 3D hidrofílicas y complejas que poseen pueden ser capaces de absorber grandes cantidades de soluciones acuosas.

6.4 Materiales y métodos

Los ensayos de porosidad, almacenamiento de agua y los ensayos mecánicos preliminares fueron realizados a partir de las diferentes composiciones que se estudiaron en el capítulo anterior, Tabla 6.1:

Tabla 6.1 Descripción de la composición de los cuatro materiales diferentes ensayados.

<i>Material</i>	<i>GEL (g mL⁻¹)</i>	<i>HA (mg mL⁻¹)</i>	<i>TA (mg g⁻¹ GEL)</i>
<i>GEL-TA1 (12,4mg TA/ g GE)</i>	0,08	0,00	12,4
<i>GEL-HA-TA1 (12,4mg TA/ g GE)</i>	0,08	0,85	12,4
<i>GEL-TA2 (33,3mg TA/ g GE)</i>	0,08	0,00	33,3
<i>GEL-HA-TA2 (33,3mg TA/ g GE)</i>	0,08	0,85	33,3

6.4.1 Porosidad efectiva

La porosidad efectiva de los andamios sintetizados fue estudiada a través del principio de Arquímedes utilizando una botella de gravedad específica. Este procedimiento fue optimizado mediante el testeado de diversos líquidos de inmersión y la puesta a punto del protocolo siguiendo los métodos estándar ASTM B962. Brevemente, la porosidad efectiva de las muestras de andamios cúbicos (0,71 cm de lado) fue determinada del siguiente modo [21]:

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{(W_2 - W_3 - W_s) / \rho_e}{(W_1 - W_3) / \rho_e} \quad (6.1)$$

donde, W_1 es el peso específico en la botella de gravedad con etanol, W_2 es el peso específico de la botella de gravedad con etanol y la sección de andamio, W_3 es el peso específico de la botella de gravedad luego de la remoción de la sección del andamio saturada de etanol, W_s es el peso de la sección del andamio saturada de etanol y ρ_e es la densidad del etanol; por lo tanto $(W_1 - W_3) / \rho_e$ es el volumen total del andamio incluyendo poros y $(W_2 - W_3 - W_s) / \rho_e$ es el volumen de poros en el andamio.

6.4.2 Cinética de hinchamiento y capacidad de almacenamiento de solvente

La cinética de hinchamiento de las muestras fue desarrollada siguiendo un procedimiento gravimétrico convencional [21]. Porciones de andamio en forma de cubos (0,71 cm de lado) fueron pesados previa y posteriormente a ser inmersos en suero fisiológico simulado (SFS) 0,1 M siendo permanentemente mantenidos en baño termostático a 37°C. Las muestras fueron removidas del SFS y pesadas a cinco intervalos de tiempo regulares siendo tres horas el último punto tomado. El peso de las muestras fue tomado en el momento en que alcanzó el equilibrio. Cada pesada fue repetida en tres oportunidades. La capacidad de absorción de agua (% W_u) está dada por [21]:

$$\%W_u = \frac{(W_t - W_d)}{W_e} \times 100 \quad (6.2)$$

donde, W_t es el peso del andamio a tiempo t , W_d es el peso del andamio seco y W_e es el peso del andamio hundido en equilibrio a una temperatura particular. La tasa peso-hinchamiento (W/S) fue tomada como un parámetro para calcular la capacidad de absorción de solvente y se considera del siguiente modo [21]:

$$W/S = \frac{(W_e - W_d)}{W_d} \quad (6.3)$$

6.4.3 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo

La porosidad de los andamios fue estudiada mediante un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (ZEISS FE-SEM ULTRA PLUS) equipado con un detector de electrones secundarios para adquirir las imágenes. El voltaje de aceleración aplicado (EHT) fue 3,00 kV con una resolución (WD) de 2,1 nm. La compensación local de carga (mediante inyección de gas nitrógeno) fue aplicada evitando la coloración de la muestra. El espectrofotómetro de energía dispersiva acoplado a este instrumento permitió obtener información cualitativa acerca de la composición elemental de la superficie. Los tamaños de poros de los andamios (determinados a partir de aproximadamente 100 medidas) de las muestras fueron cuantificados a partir de las microfotografías SEM mediante un software de análisis de imágenes (Image J 1,34 s, NIH Image, USA) [35] con una incerteza del 5 %.

6.4.4 Compresión - ensayos preliminares.

La fuerza de compresión de muestras cilíndricas a lo largo del eje longitudinal fue tomada con un analizador mecánico dinámico. El equipo utilizado fue un MTS Insight electromechanical testing system, usando una celda de carga de 1000 N a una velocidad de $0,01 \text{ mm.s}^{-1}$. Se seleccionó esta velocidad de aplicación de esfuerzo debido a que es un esfuerzo regular al cual está sometido el hueso [36] y es frecuentemente utilizado para testear los materiales implantables [37]. La fuerza de compresión (σ) fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula [9]:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (6.4)$$

donde F es la carga aplicada (N), y A es el área de la sección transversal del andamio de gelatina (m^2). El límite de rotura y de deformación plástica, σ_{ult} y σ_Y , así como el módulo de compresión E , fueron obtenidos a partir de los gráficos de esfuerzo-deformación [9].

6.4.5 Compresión - ensayos definitivos y ensayos de tracción.

A partir de este punto se seleccionó el andamio GEL-HA-TA1 para continuar con los estudios mecánicos. Los ensayos de compresión fueron realizados a lo largo del eje longitudinal de las muestras con forma cilíndrica. Para nuestro estudio, las muestras fueron ensayadas hasta que se evidenció un 20% de deformación de cada una de las probetas, sobrepasando la zona elástica del material, ya que más allá de ese valor su estudio carece de sentido. Además, la cátedra de Anatomía Humana nos donó una porción de fémur a partir de la cual se obtuvieron secciones de tejido para ensayar. Estas secciones estaban formadas por hueso trabecular en el interior rodeado por hueso cortical. Los dos tipos de hueso fueron estudiados en conjunto debido a impedimentos mecánicos para separarlos.

El equipo utilizado fue un instrumento de ensayos mecánicos Instron 3369, Figura 6.2. Este equipo tiene la capacidad de realizar medidas de propiedades mecánicas en tracción, flexión, compresión entre -70 y 200 °C. Cuenta con una capacidad de 5000 kgf, velocidad máxima de 500 mm/min y espacio de ensayado vertical de 1193 mm.



Figura 6.2 Equipo utilizado para los ensayos mecánicos.

Luego de una revisión bibliográfica acerca de ensayos mecánicos realizados tanto en tejido óseo como materiales sintetizados [38]–[42] se seleccionaron tres velocidades de aplicación de carga diferentes: $0,01 \text{ mm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (V1), $0,5 \text{ mm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (V2) y $1 \text{ mm}\cdot\text{seg}^{-1}$ (V3). Las muestras ensayadas tenían forma cilíndrica, representadas en la Figura 6.3. Además se estudiaron dos condiciones de humedad: el primer grupo de muestras fue mantenido en un ambiente herméticamente cerrado en condiciones de 0% de humedad de donde fueron

removidas en el instante previo a la toma de la medida; mientras que el segundo grupo se mantuvo durante 48 horas en un ambiente controlado al 50% de humedad siendo también extraídas al momento del ensayo. En ambos casos la temperatura seleccionada fue ambiente. La fuerza de compresión fue calculada con la fórmula 6.4.

Los parámetros que fueron estudiados a partir de los ensayos de compresión fueron los siguientes: Módulo de Young (MPa), Esfuerzo Máximo (MPa), Deformación al esfuerzo máximo (%), Límite Elástico (MPa) y Deformación al límite elástico (%) que, a excepción del Módulo que fue provisto por el software, fueron obtenidos a partir de la curva esfuerzo-deformación.

Utilizando el mismo equipo adaptado, fueron realizados ensayos de tracción a las mismas velocidades de aplicación de la carga que se realizaron los de compresión pero, en este caso, solo a 0% de humedad. Los ensayos consistieron en la sujeción de una probeta por los extremos, Figura 6.3, y la temperatura seleccionada también fue la ambiente. Una vez colocada, la probeta de longitud l_0 se somete a una fuerza de tracción uniaxial, un estiramiento a velocidad constante, culminando el ensayo al momento de la rotura del material de, ahora, longitud l . Módulo de Young (MPa), Tensión de rotura (MPa), Deformación a la tensión de rotura (%) son los parámetros que se estudiaron a partir de este ensayo siendo los últimos dos extraídos de las gráficas obtenidas.

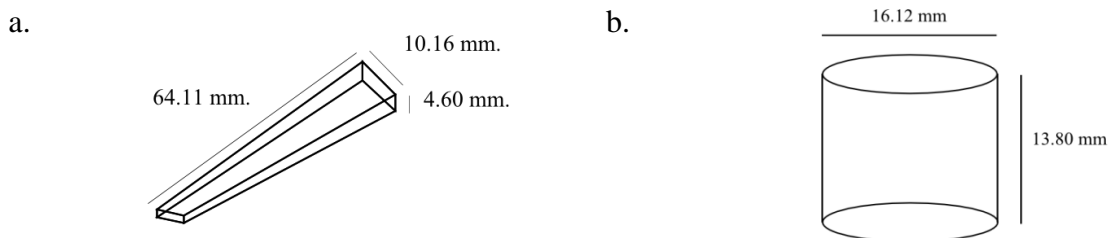


Figura 6.3 Se observan esquemas de las medidas promedio de las probetas de tracción (a) y las medidas promedio de los cilindros de compresión (b).

La información recolectada a partir de los ensayos de tracción y compresión fue procesada por el software Bluehill provisto junto con el equipo utilizado obteniéndose una gráfica de esfuerzo vs deformación [4].

6.4.6 Análisis estadístico

Todos los test cuantitativos fueron desarrollados, por lo menos, en triplicado, calculados valores medios y desvío estándar. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). Test-t de Student con

probabilidad de error menores de 0,05 ($p < 0,05$) fueron considerados significativamente diferentes. Los datos cuantitativos se expresan como media \pm desvío estándar (SD).

6.5 Características y propiedades mecánicas de los andamios

La proporción y circunstancias adecuadas para la integración de los implantes óseos han sido asociadas con un requerimiento en tamaño de poro, porosidad efectiva e interconectividad, tanto en función de permeabilidad estructural como en cuestiones mecánicas [3]. Además, con el fin de determinar cómo se comportan mecánicamente los andamios mineralizados y si sus propiedades son adecuadas para evitar el colapso durante el manejo y las actividades normales del paciente, se llevaron a cabo ensayos de compresión y tracción uniaxial bajo condiciones ambientales controladas. Para el estudio mecánico preliminar los experimentos se realizaron sobre los cuatro diferentes materiales detallados en la Tabla 6.1.

6.5.1 Porosidad efectiva y almacenamiento de solvente

Un rango de combinaciones en cuanto al grado de porosidad, interconexión, geometría, orientación y tamaño de poros es necesario para mantener la densidad celular, las interacciones célula-célula adecuadas y proveer del correcto grado de transferencia de oxígeno, nutrientes y productos de deshecho [19]. Con el objetivo de estudiar si estas características pueden ser logradas por la interacción gelatina-nanorodillos de HA bajo las condiciones seleccionadas de experimentación, secciones transversales y longitudinales de las soluciones liofilizadas de los andamios fueron analizadas en cuanto a su porosidad y capacidad de almacenamiento de agua. Las secciones de las muestras exhibieron una estructura con macroporos altamente interconectados y los andamios mostraron una porosidad efectiva promedio de alrededor del 70 ± 8 % sin diferencias significativas, Figura 6.4. A pesar de no exhibir diferencias significativas en su porosidad efectiva, se han encontrado grandes contrastes en cuanto a su permeabilidad, Figura 6.4.

El rango de los macroporos interconectados en los andamios tiene una amplitud de 35 a 288 μm con una media de poro de 102 ± 25 μm en su dimensión menor, y un rango de 90 a 1300 μm con una media de poro de 300 ± 32 μm en la dimensión mayor. En las Figuras 6.5 y 6.6 se pueden observar los respectivos histogramas de distribución de los poros. Las dimensiones de las muestras son comparables con las que se encuentran en la literatura [19], [20] para materiales que resultaron en una aceptable respuesta celular, sugiriendo que puede ser adecuado para lograr la regeneración ósea.

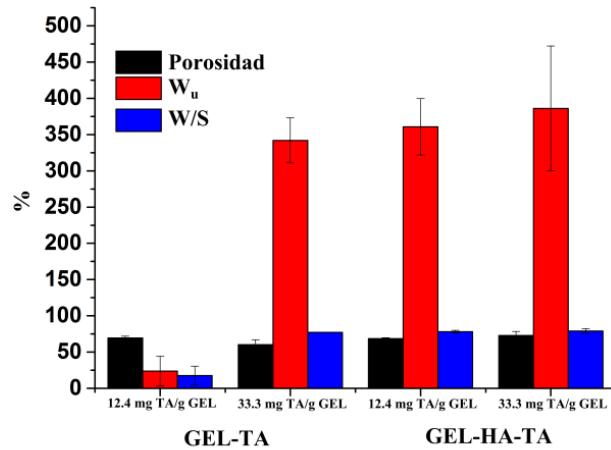
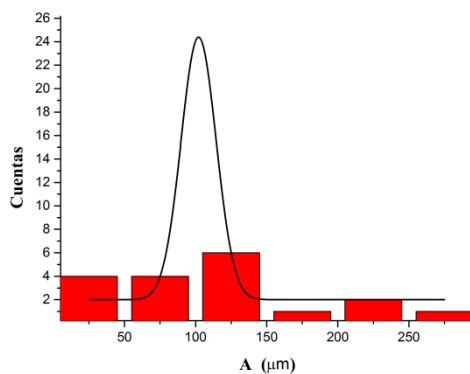


Figura 6.4 Porosidad y permeabilidad estructural de los andamios de GEL-TA y GEL-TA-HA. W_u y W/S fueron consideradas en el estado de equilibrio luego de tres horas de inmersión.

Las muestras altamente entrecruzadas evidencian una mayor facilidad para almacenar agua en su red, debido a la presencia de poros más “angostos” que, por capilaridad, capturan y retienen agua. Además, el comportamiento en cuanto al almacenamiento de agua de los andamios con presencia de HA es superior, lo que puede deberse a la incorporación de nanopartículas de HA que contribuyen al incremento del almacenamiento de agua por sus propiedades de absorción [43].

a.



b.

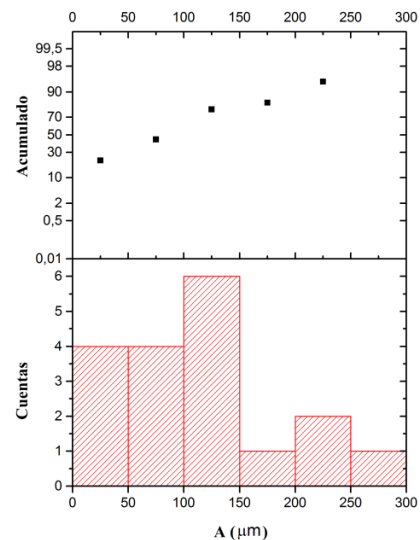
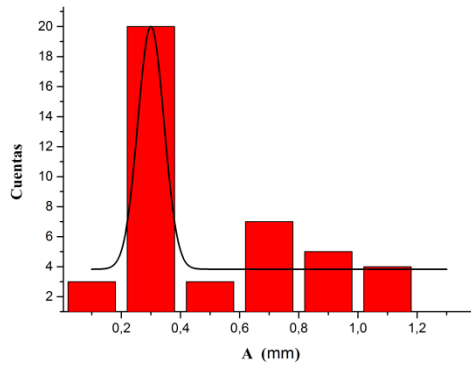


Figura 6.5 Amplitud de los macroporos interconectados en las muestras liofilizadas. Distribución Gausiana (a) e histograma (b) de la dimensión menor de los poros.

a.



b.

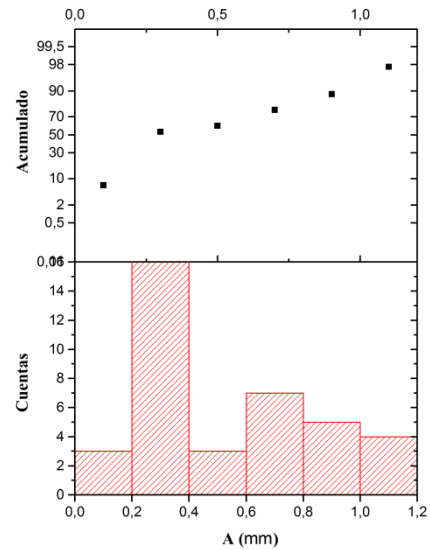


Figura 6.6 Amplitud de los macroporos interconectados en las muestras liofilizadas. Distribución Gausiana (a) e histograma (b) de la dimensión mayor de los poros.

6.5.2 Ensayos mecánicos preliminares

Considerando el objetivo final de la aplicación de los andamios de gelatina e hidroxiapatita, se estudió su respuesta ante los esfuerzos. Como mencionamos, la microestructura y la fuerza de compresión de los andamios pueden ser moduladas mediante el efecto del agente entrecruzante y por la imitación a nano-escala de la estructura ósea natural.









Los primeros parámetros obtenidos que describen el comportamiento mecánico de los materiales se pueden observar en la Tabla 6.2. Todos los materiales mostraron comportamientos similares al tejido óseo [44]. Se observó una rigidez incrementada en la fuerza del andamio, revelado por la expansión del módulo de compresión y los parámetros del límite de elasticidad y de ruptura, incrementando la cantidad de agente entrecruzante y la presencia de nanopartículas de HA. Por otra parte, la combinación de altas cantidades de agente entrecruzante y la presencia de nanopartículas decrece la capacidad de deformación del andamio lo que significa una menor ductilidad. La mejora en las propiedades mecánicas pueden ser atribuidas a la habilidad de los nanorodillos de HA de reforzar el entrecruzado covalente de la red gelatina-TA y su efecto en la mineralización del andamio a lo largo de la red del polímero.

Debido al efecto del entrecruzante, las paredes de gelatina se tornaron más rígidas pero más frágiles y fueron fácilmente quebradas mostrando una reducción de la deformación a la esfuerzo máximo, efecto que se observó claramente en el material con 33,3 mg TA/g GEL. Es importante mencionar que los valores de compresión obtenidos son comparables a los reportados en literatura para el hueso trabecular sano [45].

Como se explicó en el capítulo 5, la presencia de las nano-partículas de HA pre-embidas en los andamios posee un claro efecto en el crecimiento epitaxial de la fase mineralizada mostrando de este modo su rol potencial en el proceso de bio-mineralización y, subsecuentemente, en la bioactividad y biodegradabilidad. A partir de estos ensayos pudimos también confirmar un efecto sobre el comportamiento mecánico.

El andamio mineralizado GEL-HA-TA1 se seleccionó como la combinación con mejores propiedades mecánicas, porosidad efectiva, almacenamiento de agua y permeabilidad estructural para su potencial uso en reparación de tejido óseo y, al mismo tiempo, con la menor cantidad de entrecruzante posible. Estas características mencionadas, sumadas a lo tratado en el capítulo 5, nos permitieron seleccionar esta composición para continuar con nuestros estudios.

Tabla 6.2 Parámetros obtenidos en los ensayos mecánicos preliminares.

	<i>GEL-TA1</i>	<i>GEL-TA2</i>	<i>GEL-HA-TA1</i>	<i>GEL-HA-TA2</i>
<i>Vista superior</i>				
<i>Vista frontal</i>				
<i>Diámetro (mm)</i>	30,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1	30,0 ± 0,1
<i>Altura (mm)</i>	12,32 ± 0,01	10,59 ± 0,01	12,13 ± 0,01	12,03 ± 0,01
<i>Módulo de Young (MPa)</i>	7,16 ± 0,03	14,44 ± 0,02	16,62 ± 0,03	26,25 ± 0,03
<i>Esfuerzo Máximo (MPa)</i>	0,68 ± 0,01	1,10 ± 0,01	1,17 ± 0,01	1,25 ± 0,01
<i>Deform. al Esf. Máximo (mm)</i>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01

6.5.3 Comportamiento ante compresión

El campo de las propiedades mecánicas óseas es y ha sido ampliamente estudiado; éstas pueden ser diferentes dependiendo de la edad de la muestra, del tipo de hueso y, dentro del mismo hueso, la porción que se ensaye [46].

6.5.3.1 Respuesta ósea y de andamios a 0% de humedad ante esfuerzos mecánicos

El ensayo de compresión, puede no culminar en la fractura de la muestra. En el caso de las muestras óseas el módulo de Young y el límite elástico sufrieron disminuciones estadísticamente significativas en los dos aumentos sucesivos de velocidades de aplicación de esfuerzo; por el contrario, en el resto de los parámetros los cambios no fueron significativos, Tabla 6.3. También encontramos una diferencia estadísticamente significativa al comparar el esfuerzo máximo soportado entre V1 y V3. A medida que el ensayo avanzó y las velocidades de aplicación de cargas se incrementaron observamos que con menores esfuerzos el hueso sufre una deformación similar aunque sin culminar en una ruptura abrupta, Figura 6.7.

Tabla 6.3 Parámetros obtenidos a partir de muestras de tejido óseo a temperatura ambiente.

Las diferencias significativas se señalan entre velocidades considerando cada parámetro.

([□], Módulo de Young; ^σ, Esfuerzo Mayor; ^Δ, Límite Elástico)

Vel (mm/s)		Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo Mayor (MPa)	Deformación al Esfuerzo Mayor (%)	Límite Elástico (MPa)	Deformación al Límite Elástico (%)
V1	Media	91,28 [□]	4,13 ^σ	8,99	4,12 ^Δ	8,78
	Desvío	4,72	0,87	1,04	0,39	1,12
V2	Media	82,08 [□]	3,32	9,51	3,24 ^Δ	9,10
	Desvío	4,84	0,27	0,66	0,34	1,05
V3	Media	54,81 [□]	2,43 ^σ	7,41	2,21 ^Δ	7,91
	Desvío	6,99	0,52	0,39	0,38	1,06

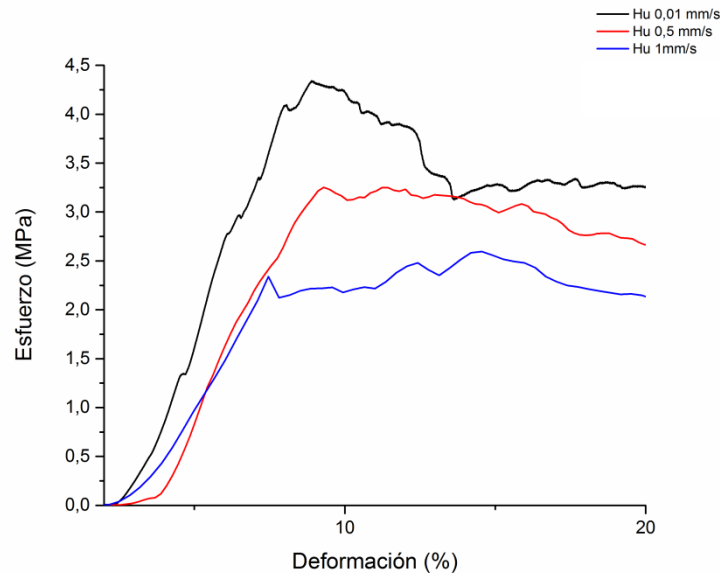


Figura 6.7 Curvas esfuerzo-deformación de las muestras óseas.

Ninguna de nuestras muestras mantenidas a 0% de humedad llegó a la fractura abrupta pero sí alcanzaron a una meseta, presentando una zona de deformación plástica, por lo que se pueden considerar materiales con un cierto grado de ductilidad [6]. Los andamios presentaron cambios de comportamiento ante la diferencia en la velocidad de aplicación de las fuerzas, pero manteniendo una cierta homogeneidad en las deformaciones sufridas durante el ensayo, Figura 6.8, Tabla 6.4. Al igual que los huesos, ninguna de las muestras sufrió una abrupta fractura, sino que el progreso de la deformación fue gradual. Los valores de módulo registrados en nuestros andamios son comparables con valores reportados por Martens y col, 1983 [47] y con los publicados por Brown y Ferguson, 1980 [39] en estudios de fémur proximal. Además, Misch y col, 1999 también encontraron valores semejantes a los nuestros pero en huesos de mandíbula humana [48].

Los resultados indican que ante el primer cambio de velocidad en la aplicación de la fuerza existe una adaptación del material, que se evidencia en un aumento significativo del Módulo de Young ($\alpha = 0,01$) y del límite elástico ($\alpha = 0,05$), lo que nos indica que, con la misma deformación, el material soporta mayores cargas sin desplazarse fuera de su zona elástica conservando, por lo tanto, su capacidad de volver a su conformación original. También se observa un aumento en la carga máxima que puede soportar pero, nuevamente, manteniendo la deformación correspondiente. Ante el segundo aumento de velocidad, el material presenta menor resistencia al esfuerzo, ya que ante una carga menor mostró una mayor deformación máxima siendo estos los únicos cambios significativos.

El material se adaptó ante un primer aumento de la velocidad de sometimiento a compresión soportando mayores esfuerzos pero, ante un nuevo aumento, se resultó incapaz de equiparar su rendimiento incluso al obtenido a la menor de las velocidades. Cabe destacar que Mozafari y col, 2010 y Wang y col, 2014 sintetizaron andamios de gelatina obteniendo resultados similares a los nuestros que, al mismo tiempo también concuerdan con los reportes de hueso proporcionados por Azami y col, 2010 [40], [49], [50].

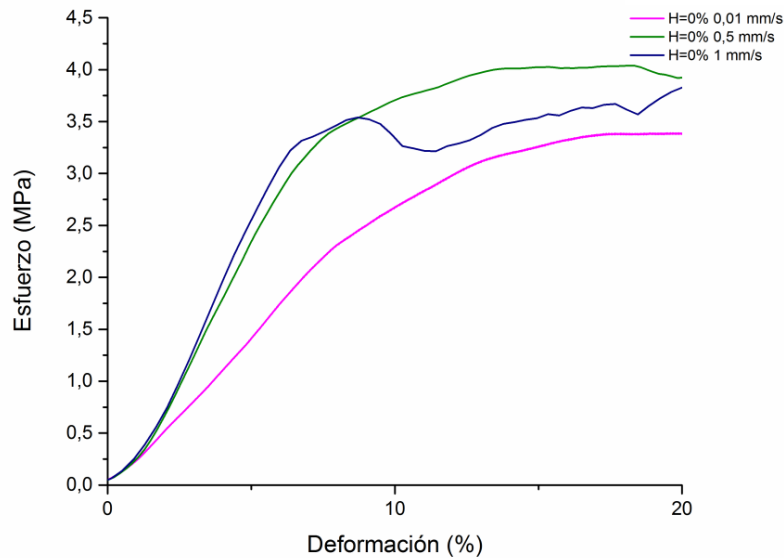


Figura 6.8 Curvas esfuerzo-deformación de las muestras de andamios a 0% humedad.

6.5.3.2 Comparación hueso - andamios

A la menor de las velocidades ensayadas el hueso presenta un módulo de Young, límite elástico y deformación al límite elástico significativamente mayores, pero una menor deformación al esfuerzo máximo. Por otro lado, el único parámetro que no presenta diferencias significativas es el esfuerzo máximo soportado por el material. A partir de esta información, podemos decir que tanto el hueso como nuestros materiales soportan un esfuerzo máximo similar, presentando los andamios una mayor deformación caracterizada por su región plástica y por tanto una mayor ductilidad. Además, el hueso tiene una mayor capacidad de soportar esfuerzos y luego volver a su disposición original sufriendo menores cambios temporales en el proceso.

Al analizar la segunda de las velocidades las diferencias encontradas fueron menores; el hueso continúa presentando un módulo de Young mayor, pero el máximo esfuerzo que soporta es menor que nuestros materiales, con una deformación menor también. En los

parámetros relacionados con el límite elástico y su deformación no se encontraron diferencias significativas.

En la máxima velocidad estudiada las diferencias encontradas fueron aún menores; solo la deformación al máximo esfuerzo presentó una disminución significativa por parte de las muestras óseas respecto del andamio. Por lo tanto, nuestros andamios fueron capaces de resistir los mismos esfuerzos que el hueso aunque sufriendo mayores deformaciones.

En líneas generales, las muestras óseas sufrieron menores deformaciones ante esfuerzos, en muchas oportunidades, similares presentando una menor ductilidad que los andamios construidos. El resto de los parámetros mostraron mayores similitudes siendo las diferencias menores a medida que se aumentó la velocidad de aplicación de carga.

6.5.3.3 Andamio seco y andamio al 50% de humedad

En cuanto a los andamios sometidos por 48 horas a un ambiente con 50% de humedad, lo primero que hay que mencionar es el hecho que en todas las velocidades los esfuerzos máximos soportados fueron menores que los materiales secos, es decir, la capacidad del material de soportar cargas decreció. El comportamiento de las curvas obtenidas se caracteriza por poseer una región inicial lineal, seguida por una porción de meseta a partir del cual existe una nueva región lineal que, finalmente, llega a una meseta definitiva, Figura 6.9.

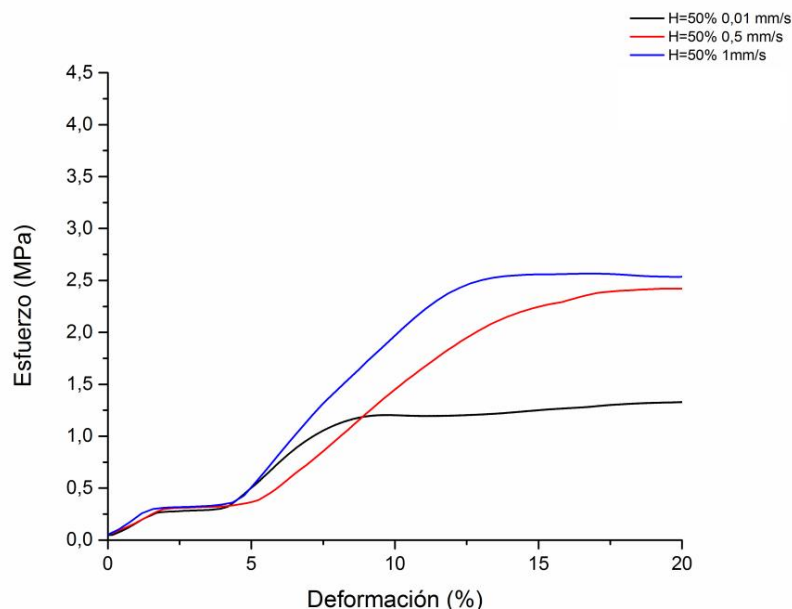


Figura 6.9 Curvas esfuerzo-deformación de las muestras a 50% humedad.

Tabla 6.4 Parámetros mecánicos de las muestras a temperatura ambiente. Diferencias significativas entre parámetros: * = V1 y V2; + = V2 y V3; Δ = V1 y V1H; α = V2 y V2H; ϵ = V3 y V3H

<i>Humedad 0%</i>						
<i>Vel</i> (mm/s)		<i>Módulo de Young</i> (MPa)	<i>Esfuerzo Máximo</i> (MPa)	<i>Deformación al Esfuerzo Máximo</i> (%)	<i>Límite Elástico</i> (MPa)	<i>Deformación al Límite Elástico</i> (%)
V1	Media	36,17 $^{*\Delta}$	3,11 $^{*\Delta}$	19,26	2,36 $^{*\Delta}$	7,18 $^{\Delta}$
	Desvío	4,82	0,59	1,06	0,40	1,57
V2	Media	57,56 $^{*\alpha}$	4,32 $^{*+\alpha}$	16,91 $^{+\alpha}$	3,56 $^{*\alpha}$	7,74 $^{\alpha}$
	Desvío	5,21	0,28	1,69	0,55	1,25
V3	Media	43,04	3,45 $^{+\epsilon}$	19,65 $^{+}$	3,02 $^{\epsilon}$	7,65 $^{\epsilon}$
	Desvío	11,84	0,45	0,03	0,43	1,19
<i>Humedad 50%</i>						
<i>Vel</i> (mm/s)		<i>Módulo de Young</i> (MPa)	<i>Esfuerzo Máximo</i> (MPa)	<i>Deformación al Esfuerzo Máximo</i> (%)	<i>Límite Elástico</i> (MPa)	<i>Deformación al Límite Elástico</i> (%)
V1H	Media	15,31 $^{\Delta}$	1,12 $^{<>\Delta}$	19,92	0,25 $^{\Delta}$	2,49 $^{\Delta}$
	Desvío	8,52	0,19	0,02	0,02	1,33
V2H	Media	23,45 $^{\alpha}$	2,25 $^{<\alpha}$	19,76 $^{\alpha}$	0,28 $^{\alpha}$	1,78 $^{\alpha}$
	Desvío	4,75	0,15	0,23	0,03	0,59
V3H	Media	26,58	2,48 $^{>\epsilon}$	18,66	0,30 $^{\epsilon}$	2,06 $^{\epsilon}$
	Desvío	5,00	0,15	1,78	0,02	0,42

Para estudiar el efecto de la humedad del ambiente, se compararon los comportamientos a cada una de las velocidades entre muestras secas y húmedas. A V1 la deformación al esfuerzo máximo sufrida por la muestra no cambió. En el resto de los parámetros obtenidos sí presentaron un decrecimiento con diferencias significativas, Tabla 6.4, lo que se traduce en una menor resistencia ante los esfuerzos. A V2, las diferencias entre las muestras secas y húmedas fueron incluso mayores. Siendo todas las diferencias significativas, la deformación fue mayor, mientras que la totalidad de los parámetros restantes sufrieron una disminución, Tabla 6.4. Las diferencias encontradas a V3 fueron menores en

relación a V2, solo el módulo y la deformación máxima no presentaron diferencias significativas, el resto de los parámetros decrecieron significativamente.

Luego de las comparaciones de los andamios secos con los sometidos por 48 hs a un ambiente con 50 % de humedad se pudo observar una clara disminución de la capacidad de soportar esfuerzos por parte de los materiales y disminución del límite elástico (altamente significativo en algunos casos), sufriendo mayores deformaciones en algunos casos. Es evidente que el ambiente con 50% de humedad tuvo un efecto importante sobre los andamios construidos.

A medida que los materiales poliméricos presentan mayor número de uniones intermoleculares y entrecruzamientos, disminuyen su ductilidad aumentando su fragilidad. Para contrarrestar este efecto se utilizan los plastificantes cuyo rol es disminuir la eficacia de las fuerzas intermoleculares en el polímero y, por lo tanto, reducir la rigidez de la estructura tridimensional general. Para un buen funcionamiento, un plastificante debe penetrar entre las moléculas del polímero y reducir sus fuerzas intermoleculares, neutralizando sus grupos polares o incrementando las distancias entre sus moléculas [51]. En algunos materiales, los plastificantes también pueden incrementar permeabilidad a gases, vapor de agua y solutos llegando a disminuir elasticidad y cohesión. Los más comúnmente utilizados son polialcoholes, mono-, di- u oligosacáridos y lípidos y sus derivados. Por otro lado, condiciones ambientales como la humedad relativa y la temperatura pueden también afectar a las propiedades mecánicas de los materiales [52], [53].

Como pudimos observar en los ensayos mecánicos con muestras sometidas a 48 hs de 50 % de humedad, nuestro material mostró una resistencia menor ante los esfuerzos mecánicos. Una razón para este efecto puede ser la capacidad del agua de actuar como plastificante influyendo sobre las propiedades de los andamios. Gontard y col, 1993 estudiaron el resultado de la hidratación sobre las propiedades mecánicas de la proteína llamada gluten. En su trabajo encontraron un efecto de mejora/mantenimiento de las propiedades mecánicas a bajos niveles de hidratación, pero a medida que la hidratación aumentó, el rendimiento disminuyó y las deformaciones fueron mayores que las muestras secas [52].

Además de las propiedades mecánicas, la temperatura de transición vítrea es también afectada (decrece) por la plastificación con agua, efecto que se ve en proteínas como gluten [54], gelatina [55], [56] y colágeno [57]. Como vimos en el capítulo anterior, un descenso de la temperatura de transición vítrea, es indicador de un menor grado de entrecruzamiento que, a su vez, puede ser consecuencia de la plastificación. Jabarin y col, 1986, estudiaron los

efectos de la absorción de agua sobre las propiedades físicas de polímeros. A medida que fueron expuestos a la humedad, la T_g decreció rápidamente hasta llegar a un valor de equilibrio.

En films conformados a partir de almidón, Mali y col, 2005 estudiaron las consecuencias de plastificantes y agua absorbida. En su estudio pudieron confirmar el descenso en propiedades mecánicas como el esfuerzo y el módulo de Young siendo este efecto causado por los plastificantes e incrementado por la presencia de agua [53]. Con ensayos en una serie de polímeros, Baschek y col, 1999 confirmaron el hecho de que la humedad presente en este tipo de materiales, actuando como plastificante, es capaz de reducir el módulo, la temperatura de transición vítrea además de aumentar la deformación de fractura [58].

Considerando el objetivo final de nuestro trabajo, sabemos que el hueso está compuesto, además de por proteínas y minerales, por agua que completa los espacios de la matriz en todos los niveles jerárquicos [59]. Uno de los efectos que puede tener sobre las propiedades mecánicas del tejido es hacerlo más dúctil [60], [61]. De acuerdo a Samuel y col, 2014 las moléculas de agua que se encuentran en los pequeños huecos ($< 0,4$ nm) poseen un rol dominante en el comportamiento mecánico [62]. Samuel y col, 2016 realizaron estudios acerca del efecto del agua en las propiedades mecánicas del hueso, donde los elementos secos se mostraron más fuertes y duros que los húmedos. Al mismo tiempo, las fallas de los materiales aparecieron junto con mayores niveles de deformación [63]. Por las razones recientemente mencionadas no podemos dejar de tener en cuenta la presencia de agua en el ambiente donde nuestros andamios van a ser implantados considerando necesaria la continuación del estudio bajo su influencia.

6.5.3.4 Ensayos de tracción

En principio, basándonos en las gráficas de comportamiento de materiales y las curvas obtenidas a partir de los ensayos de tracción, podemos decir que nuestras muestras pertenecen al grupo caracterizado como frágiles. Estos materiales experimentan una ruptura abrupta ni bien se termina la región elástica correspondiente. En todos los ensayos se pudo observar la región elástica de cada una de las muestras, pero una vez alcanzado el límite de esta región no se observa la región plástica debido a la rápida ruptura de la probeta, Figura 6.10. Los valores promedio obtenidos de los parámetros se muestran en la Tabla 6.5; a partir del análisis estadístico no fue posible encontrar diferencias significativas, las probetas presentaron el mismo comportamiento a las 3 velocidades ensayadas.

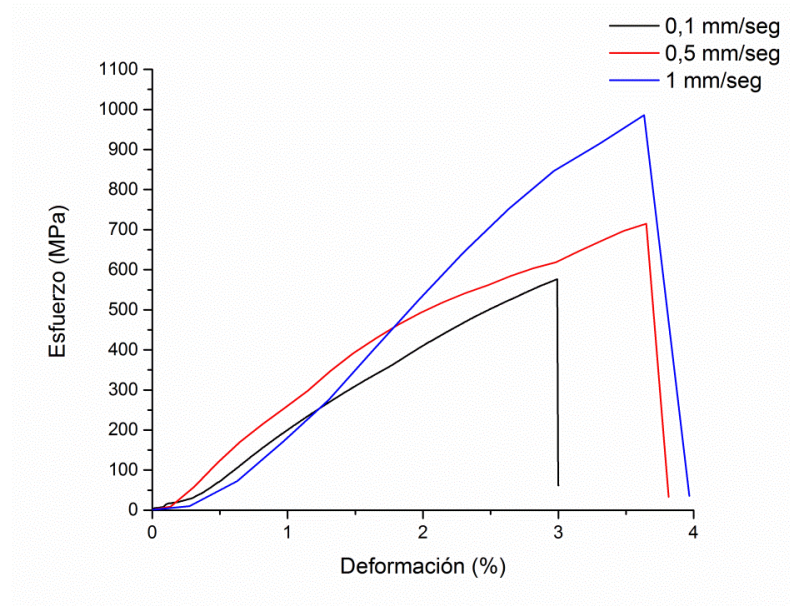


Figura 6.10 Se observan las curvas típicas obtenidas a cada una de las velocidades.

Tabla 6.5 Se expresan los valores promedio de cada una de los parámetros obtenidos en el ensayo de tracción.

Vel (mm/seg)		Módulo de Young (MPa)	Esfuerzo Máximo (MPa)	Deformación al Esfuerzo Máximo (%)
0,01	Media	26609,08	610,86	3,50
	Desvío	9047,07	145,81	0,44
0,50	Media	34084,92	662,52	2,93
	Desvío	1235,88	45,93	0,63
1,00	Media	32675,42	934,13	4,08
	Desvío	5632,22	248,96	1,36

En los ensayos de tracción es posible medir el porcentaje de deformación de una probeta luego de la fractura. Ésta medida de alargamiento previo a la fractura tiene importancia no sólo como estimación de la ductilidad, sino también como índice de calidad. Si existe porosidad o inclusiones en el material, o bien un deterioro, el porcentaje de

alargamiento decrecerá [4]. En la Tabla 6.6 se pueden observar las medias del porcentaje de elongación de las probetas a las 3 diferentes velocidades ensayadas. No se encontraron diferencias significativas entre las medias lo que coincide con lo mencionado anteriormente acerca de los parámetros mecánicos estudiados. Al igual que las curvas obtenidas a partir del ensayo, los porcentajes de elongación de las probetas indican la presencia de andamios poco dúctiles ya que las medias van desde 0,28 a 0,41 %.

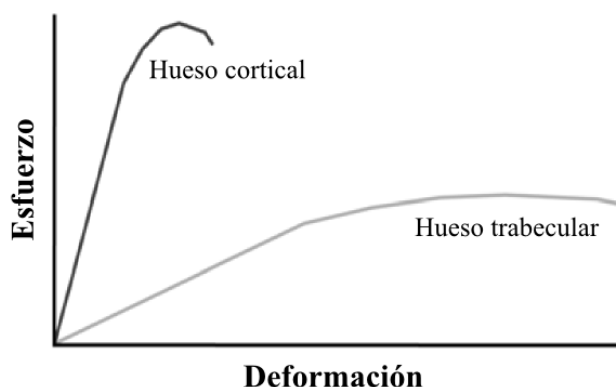
Tabla 6.6 Porcentaje de elongación de las probetas ensayadas a las distintas velocidades.

	<i>Velocidad (mm.s⁻¹)</i>		
	<i>0,01</i>	<i>0,50</i>	<i>1,00</i>
<i>Media (%)</i>	0,41	0,30	0,28
<i>Desvío</i>	0,36	0,16	0,48

Los estudios publicados en literatura respecto de las propiedades óseas en tensión son muy variables en cuanto a resultados. En el trabajo de Athanasiou y col, 2000 desarrollaron un estudio comparativo acerca una gran cantidad de resultados obtenidos [64], entre los que reportan módulos de Young comparables a los obtenidos en nuestros ensayos [38], [65] a partir de muestras de fémur de humano y tibia de bovino, siendo estos dos casos huesos corticales y las velocidades de aplicación de la fuerza inferiores a V2 y V3. En el caso de huesos trabeculares, los ensayos de tracción publicados por Rohl y col, 1991 presentaron valores de módulo inferiores a los obtenidos en nuestros andamios [66]. Los estudios realizados por Caeiro y col, 2013 [46] y Samuel y col, 2016 [63] sobre huesos corticales, presentan en los ensayos de tracción módulos comparables a los nuestros pero resistencias menores. Reilly y col, 1974, obtuvieron resultados en hueso bovino comparables a los nuestros [67].

El tejido óseo, en base a su estructura morfológica y su comportamiento se puede clasificar en dos tipos: trabecular y cortical. Estas diferencias estructurales producen distintas respuestas por parte del hueso ante los esfuerzos mecánicos. En la Figura 6.11 se pueden observar esquemas de las curvas que generalmente se obtienen como resultado de ensayos mecánicos con los dos tipos de hueso. El hueso cortical suele tener un módulo elástico mayor, por lo que la pendiente de la curva es mayor; tiene también una mayor capacidad de soportar esfuerzos con menores deformaciones y por lo tanto mayor rigidez. Por otro lado, la gráfica del hueso trabecular es más aplanada, de modo que soporta menor carga con mayores deformaciones siendo una estructura más dúctil [46]. A partir de esto podemos decir que nuestros andamios presentaron un comportamiento similar al del hueso cortical en los

ensayos de tracción, mientras que en los ensayos de compresión el comportamiento fue intermedio, o, debido a la ductilidad mostrada, con mayores similitudes al hueso trabecular.



6.11 Esquema de las gráficas obtenidas a partir de los ensayos mecánicos de los dos tipos óseos.

La influencia de la velocidad de deformación es un aspecto que es necesario tener en cuenta en la evaluación de las propiedades mecánicas. Generalmente, una disminución en la velocidad de aplicación de la fuerza tiene resultado similar al aumento de la temperatura haciendo que el material se comporte como más blando y dúctil [8]. En nuestro caso, los ensayos de tracción no mostraron diferencias significativas, por lo que este efecto no se puede apreciar. En el caso de los ensayos de compresión, el comportamiento presentado por nuestros andamios se corresponde con dicho cambio pero únicamente al considerar el cambio de V2 a V1. Por el contrario, con el otro cambio de velocidad estudiado, V3 a V2, no se aprecia este efecto, ni tampoco en la comparación de V3 con V1.

6.6 Conclusiones

El estudio de las características de la porosidad de nuestros andamios evidenció una similitud con lo expuesto en literatura de materiales con respuestas positivas a la hora de la regeneración de tejido óseo. Los andamios preparados con la menor cantidad de agente entrecruzante (12,4 mg TA/g GEL), mostraron que la alta porosidad efectiva afecta a la integridad estructural del material presentando una fuerza mecánica inferior; pero para sobreponerse a este hecho resultó suficiente la presencia de nanorodillos de HA que actuaron como un refuerzo de la estructura. Este efecto de las nanopartículas de HA en la fuerza mecánica del andamio fue notorio también en los materiales preparados con la concentración alta de agente entrecruzante. A partir de estos primeros estudios mecánicos pudimos seleccionar la combinación que consideramos más adecuada para la continuación del trabajo.

El atrapamiento de agua en la red indica la posibilidad de un almacenamiento de agua que prevendría la pérdida de fluidos y nutrientes al momento de implantado.

Una vez seleccionada esta composición se realizaron estudios mecánicos más amplios y profundos. Se estudió el comportamiento ante esfuerzos mecánicos de tracción y compresión a diferentes velocidades y condiciones de humedad. A partir de esta información observamos un comportamiento comparable con el expuesto en bibliografía para diferentes tipos de hueso. Además, el comportamiento ante el aumento de la velocidad de aplicación de la carga también se correspondió en parte con lo expresado en bibliografía para uno de los cambios, efecto que no se vio en el segundo.

En definitiva, tomando como punto de partida los estudios de caracterización realizados en el capítulo anterior, se logró seleccionar la combinación más adecuada sobre la cual se realizaron ensayos que mostraron resultados favorables en nuestra búsqueda del andamio adecuado.

Referencias bibliográficas

- [1] A. R. Amini, C. T. Laurencin, & S. P. Nukavarapu, “Bone tissue engineering: recent advances and challenges.,” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, pp. 363–408, 2012.
- [2] H. W. Kim, J. C. Knowles, & H. E. Kim, “Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: Characterization and antibiotic drug release,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 74, pp. 686–698, 2005.
- [3] P. Fratzl, H. S. Gupta, P. Roschger, K. Klaushofer, P. Fratzl, H. S. Gupta, P. Roschger, & K. Klaushofer, “Bone Nanostructure and its Relevance for Mechanical Performance, Disease and Treatment,” *Nanotechnology*, vol. 5, pp. 345-360, 2009.
- [4] W. F. Smith & J. Hashemi, “*Foundations of Materials Science and Engineering*,” W. F. Smith & J. Hashemi, Eds, New York: McGraw-Hill Education 2009.
- [5] F. W. Billmeyer, “*Textbook of Polymer Science*,” F. W. Billmeyer, Ed, New York: Wiley-Interscience, 1984.
- [6] L. Nielsen & R. Landel, “*Mechanical properties of polymers and composites*,” L. Nielsen, Ed, Boca Ratón: FL, CRC Press 1994.
- [7] G. Odian, “*Principles of polymerization*,” G. Odian, Ed, New York: Wiley-Interscience, 2004.
- [8] W. D. J. Callister, “*Materials Science and Engineering, An Introduction*,” W. D. J. Callister, Ed, New York: Wiley-Interscience, 2007.

- [9] T. M. Keaveny & W. C. Hayes, “Mechanical properties of cortical and trabecular bone.,” *Bone*, vol. 7, pp. 285–344, 1993.
- [10] Y. Salissou & R. Panneton, “Pressure/mass method to measure open porosity of porous solids,” *J. Appl. Phys.*, vol. 101, pp. 124913/1-124913/7, 2007.
- [11] K. A. Hing, “Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry.,” *Int J Appl Ceram Technol*, vol. 2, pp. 184–199., 2005.
- [12] K. A. Hing, “Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?,” *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 362, pp. 2821–2850, 2004.
- [13] V. Karageorgiou & D. Kaplan, “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis,” *Biomaterials*, vol. 26, pp. 5474–5491, 2005.
- [14] J. P. Fisher, J. W. M. Vehof, D. Dean, J. P. C. M. van der Waerden, T. A. Holland, A. G. Mikos, & J. A. Jansen, “Soft and hard tissue response to photocrosslinked poly(propylene fumarate) scaffolds in a rabbit model.,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 59, pp. 547–556, 2002.
- [15] S. Kujala, J. Ryhänen, A. Danilov, & J. Tuukkanen, “Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute,” *Biomaterials*, vol. 24, pp. 4691–4697, 2003.
- [16] R. Z. LeGeros, “Calcium phosphate-based osteoinductive materials.,” *Chem. Rev.*, vol. 108, pp. 4742–4753, 2008.
- [17] G. Hannink & J. J. C. Arts, “Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration?,” *Injury*, vol. 42, pp. S22–S25, 2011.
- [18] H. Seitz, W. Rieder, S. Irsen, B. Leukers, & C. Tille, “Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 74, pp. 782–788, 2005.
- [19] K. Lee, D. Kaplan, & J. Velema, “Biopolymer-Based Biomaterials as Scaffolds for Tissue Engineering,” *Tissue Eng. I*, vol. 102, pp. 187–238, 2006.
- [20] P. Sepulveda, A. H. Bressiani, J. C. Bressiani, L. Meseguer, & B. J. König, “In vivo evaluation of hydroxyapatite foams,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 62, pp. 587–592, 2002.
- [21] N. Kathuria, A. Tripathi, K. K. Kar, & A. Kumar, “Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering,” *Acta Biomater.*, vol. 5, pp. 406–418, 2009.
- [22] M. Şen, C. Uzun, A. Safrany, O. Kantoglu, & O. Güven, “Changing of network

- characteristics of acrylamide/maleic acid hydrogels by alteration of irradiation dose rate,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 67, pp. 371–374, 2003.
- [23] Y. Dogu & O. Okay, “Swelling-deswelling kinetics of poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels formed in PEG solutions,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 99, pp. 37–44, 2006.
- [24] A. Srivastava, E. Jain, & A. Kumar, “The physical characterization of supermacroporous poly(N-isopropylacrylamide) cryogel: Mechanical strength and swelling/de-swelling kinetics,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 464, pp. 93–100, 2007.
- [25] J. R. Khurma, D. R. Rohindra, & A. V. Nand, “Swelling and thermal characteristics of genipin crosslinked chitosan and poly(vinyl pyrrolidone) hydrogels,” *Polym. Bull.*, vol. 54, pp. 195–204, 2005.
- [26] W. W. Graessley, “*Polymeric Liquids & Networks: Structure and Properties*,” W. W. Graessley, Ed, New York: Garland Science, 2004.
- [27] T. Tanaka & D. J. Fillmore, “Kinetics of swelling of gels,” *J. Chem. Phys.*, vol. 70, pp. 1214–1218, 1979.
- [28] Y. Li & T. Tanaka, “Kinetics of swelling and shrinking of gels,” *J. Chem. Phys.*, vol. 92, pp. 1365–1371, 1990.
- [29] J. Yoon, S. Cai, Z. Suo, & R. C. Hayward, “Poroelastic swelling kinetics of thin hydrogel layers: comparison of theory and experiment,” *Soft Matter*, vol. 6, pp. 6004–6012, 2010.
- [30] S. Durmaz & O. Okay, “Phase separation during the formation of poly(acrylamide) hydrogels,” *Polymer.*, vol. 41, pp. 5729–5735, 2000.
- [31] D. Melekaslan & O. Okay, “Swelling of strong polyelectrolyte hydrogels in polymer solutions: Effect of ion pair formation on the polymer collapse,” *Polymer.*, vol. 41, pp. 5737–5747, 2000.
- [32] T. Caykara, “Effect of Maleic Acid Content on Network Structure and Swelling Properties of Poly (N-isopropylacrylamide-co-maleic acid) Polyelectrolyte Hydrogels,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 92, pp. 763–769, 2004.
- [33] M. E. Byrne, K. Park, & N. A. Peppas, “Molecular imprinting within hydrogels,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, pp. 149–161, 2002.
- [34] A. S. Hoffman, “Hydrogels for biomedical applications,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 43, pp. 3–12, 2002.
- [35] C. a Schneider, W. S. Rasband, & K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, pp. 671–675, 2012.
- [36] U. Hansen, P. Zioupos, R. Simpson, J. D. Currey, & D. Hynd, “The effect of strain rate

- on the mechanical properties of human cortical bone,” *J. Biomech. Eng.*, vol. 130, pp. 11011/1-011011/8, 2008.
- [37] G. Ciardelli, P. Gentile, V. Chiono, M. Mattioli-Belmonte, G. Vozzi, N. Barbani, & P. Giusti, “Enzymatically crosslinked porous composite matrices for bone tissue regeneration,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 92, pp. 137–151, 2010.
- [38] A. Simkin & G. Robin, “The mechanical testing of bone in bending,” *J. Biomech.*, vol. 6, pp. 31-39, 1973.
- [39] T. D. Brown & A. B. Ferguson, “Mechanical Property Distributions in the Cancellous Bone of the Human Proximal Femur,” *Acta Orthop.*, vol. 51, pp. 429–437, 1980.
- [40] C. Wang, H. Shen, Y. Tian, Y. Xie, A. Li, L. Ji, Z. Niu, D. Wu, & D. Qiu, “Bioactive Nanoparticle – Gelatin Composite Scaffold with Mechanical Performance Comparable to Cancellous Bones,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, pp. 13061–13068, 2014.
- [41] A. J. C. Ladd, J. H. Kinney, D. L. Haupt, & S. A. Goldstein, “Finite-element modeling of trabecular bone: Comparison with mechanical testing and determination of tissue modulus,” *J. Orthop. Res.*, vol. 16, pp. 622–628, 1998.
- [42] J. R. Hanson, C. E. Ackerman, & K. M. Scow, “Biodegradation of methyl tert-butyl ether by a bacterial pure culture,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, pp. 4788–4792, 1999.
- [43] N. L. D’Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, & P. V. Messina, “Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures,” *Nanoscale*, vol. 7, pp. 18751–18762, 2015.
- [44] G. K. Smith, “Biomechanics pertinent to fracture etiology, reduction, and fixation,” en *Textbook of Small Animal Orthopaedics*, C. H. Newton, D. M. Nunamaker, and C. Lippincott, Eds. Philadelphia: Lippincott, 1985.
- [45] K. Rezwani, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, & A. R. Boccaccini, “Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 27, pp. 3413–3431, 2006.
- [46] J. Caeiro, P. González, & D. Guede, “Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea,” *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.*, vol. 5, pp. 99–108, 2013.
- [47] M. Martens, R. Van Audekercke, P. Delpont, P. De Meester, & J. C. Mulier, “The mechanical characteristics of cancellous bone at the upper femoral region,” *J. Biomech.*, vol. 16, pp. 971–983, 1983.

- [48] C. E. Misch, Z. Qu, & M. W. Bidez, “Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: Implications for dental implant treatment planning and surgical placement,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 57, pp. 700–706, 1999.
- [49] M. Mozafari, M. Rabiee, M. Azami, & S. Maleknia, “Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocomposite scaffolds,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, pp. 1740–1749, 2010.
- [50] M. Azami, F. Moztafzadeh, & M. Tahriri, “Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques,” *J. Porous Mater.*, vol. 17, pp. 313–320, 2010.
- [51] A. Jabarin, E. A. Lofgren, S. A. Jabarin, & E. A. Lofgren, “Effect of Water Absorption on Physical Properties of High Nitrile Barrier Polymers,” *Polym. Eng. Sci.*, vol. 26, pp. 405–409, 1986.
- [52] N. Gontard, S. Guilbert, & J-L. Cuq, “Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film,” *J. Food Sci.*, vol. 58, pp. 206–211, 1993.
- [53] S. Mali, L. S. Sakanaka, F. Yamashita, & M. V. E. Grossmann, “Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 60, pp. 283–289, 2005.
- [54] R. C. Hosney, K. Zeleznak, & C. S. Lai, “Wheat gluten-a glassy polymer,” *Cereal Chem.*, vol. 63, pp. 285–286, 1986.
- [55] I. V Yannas, “Collagen and gelatin in the solid state,” *J. Macromol. Sci. Macromol. Chem.*, vol. 7, pp. 49–106, 1972.
- [56] A. S. Marshall & S. E. B. Petrie, “Thermal transitions in gelatin and aqueous gelatin solutions,” *J. Photogr. Sci.*, vol. 28, pp. 128–134, 1980.
- [57] H. Batzer & U. T. Kreibich, “Influence of water on thermal transitions in natural polymers and synthetic polyamides,” *Polym. Bull.*, vol. 5, pp. 585–590, 1981.
- [58] G. Baschek, G. Hartwig, & F. Zahradnik, “Effect of water absorption in polymers at low and high temperatures,” *Polymer.*, vol. 40, pp. 3433–3441, 1999.
- [59] R. A. Horch, D. F. Gochberg, J. S. Nyman, & M. D. Does, “Clinically compatible MRI strategies for discriminating bound and pore water in cortical bone,” *Magn. Reson. Med.*, vol. 68, pp. 1774–1784, 2012.
- [60] J. J. Broz, S. J. Simske, A. R. Greenberg, & M. W. Luttgess, “Effects of rehydration state on the flexural properties of whole mouse long bones,” *J. Biomech. Eng.*, vol.

- 115, pp. 447–449, 1993.
- [61] J. S. Nyman, A. Roy, X. Shen, R. L. Acuna, J. H. Tyler, & X. Wang, “The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone,” *J. Biomech.*, vol. 39, pp. 931–938, 2006.
- [62] J. Samuel, D. Sinha, J. C. G. Zhao, & X. Wang, “Water residing in small ultrastructural spaces plays a critical role in the mechanical behavior of bone,” *Bone*, vol. 59, pp. 199–206, 2014.
- [63] J. Samuel, J. S. Park, J. Almer, & X. Wang, “Effect of water on nanomechanics of bone is different between tension and compression,” *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 57, pp. 128–138, 2016.
- [64] K. A. Athanasiou, C. Zhu, D. R. Lanctot, C. M. Agrawal, & X. Wang, “Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone,” *Tissue Eng.*, vol. 6, pp. 361–381, 2000.
- [65] A. H. Burstein, J. D. Currey, V. H. Frankel, & D. T. Reilly, “The ultimate properties of bone tissue: The effects of yielding,” *J. Biomech.*, vol. 5, pp. 35–44, 1972.
- [66] L. Røhl, E. Larsen, F. Linde, A. Odgaard, & J. Jørgensen, “Tensile and compressive properties of cancellous bone,” *J. Biomech.*, vol. 24, pp. 1143–1149, 1991.
- [67] D. T. Reilly, A. H. Burstein, & V. H. Frankel, “The elastic modulus for bone,” *J. Biomech.*, vol. 7, pp. 271–275, 1974.

Capítulo 7

Conclusiones generales y perspectivas a futuro

A lo largo de este trabajo de investigación ha sido desarrollado un andamio conformado a partir de un derivado del colágeno (gelatina), nano partículas de hidroxiapatita y un agente entrecruzante (ácido tánico) con prometedoras posibilidades de convertirse en un biorreactor y/o implante para regeneración de tejido óseo. Mediante diferentes técnicas y caracterizaciones estas estructuras fueron estudiadas desde la base de su desarrollo, comenzando por los nanorodillos, siguiendo por las soluciones para, en última instancia, analizar los andamios propiamente dichos.

En primer lugar, se estudió la respuesta celular ante la presencia de dos tipos diferentes de nanorodillos de HA cuyo protocolo de síntesis fue puesto a punto previamente en el grupo de Materiales Nanoestructurados de la Universidad Nacional del Sur. Como primer y lógico paso, fue necesario confirmar que los cristales sintetizados no solo no representan un riesgo para las células sino que además poseen el potencial para inducir la regeneración de tejido nuevo y funcional. Ensayos de viabilidad, proliferación y diferenciación fueron llevados a cabo a partir del cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo sobre recubrimientos de ambos tipos de hidroxiapatita. A partir de estos estudios se pudo observar una buena adhesión, proliferación y diferenciación de las células hacia el linaje osteogénico sobre los dos tipos de recubrimientos. Además, y también con resultados satisfactorios, estudiamos la activación transcripcional de genes directamente relacionados con el linaje osteogénico en presencia de los nanorodillos y la expresión de las proteínas asociadas. Cabe destacar que todos estos ensayos se llevaron a cabo en dos medios de cultivo: uno genérico con el fin de evaluar los efectos de la HA y otro con presencia de aditivos osteogénico. Luego del análisis de la información obtenida se seleccionó uno de los tipos de HA.

Una vez confirmada la positiva interacción entre los nanorodillos de hidroxiapatita con las células madre derivadas de tejido adiposo consideramos necesario comprender como es el comportamiento de la proteína elegida en solución y la interacción con los nanorodillos de HA en busca de lograr el control del sistema. La evolución hidrodinámica de las soluciones

se estudió mediante técnicas espectroscópicas y a partir de propiedades como la viscosidad y densidad de soluciones con diferentes cantidades de gelatina, cristales de HA y a distintas temperaturas. A partir de estos ensayos pudimos comprender la interacción de las cadenas proteicas en solución y, a su vez, la influencia de los nanorodillos en este sistema. Por medio del estudio de las diferentes combinaciones y gracias al autoensamblado de las macromoléculas de gelatina (debido a sus interacciones intra e intermoleculares y las interacciones con los cristales de HA), logramos observar y seleccionar una apropiada combinación de los reactivos a fin de obtener formas, tamaños y disposición de poros adecuados en las estructuras obtenidas luego del proceso de liofilizado.

El mencionado proceso de liofilizado fue el elegido para obtener una estructura rígida y capaz de sostenerse por sí misma a partir de las soluciones. Consecuentemente, comenzaron los ensayos de caracterización en los que los andamios desarrollados mostraron estabilidad, robustez y un entramado de fibras altamente interconectadas. Conociendo la solubilidad característica de nuestra proteína, seleccionamos al ácido tánico (TA) como entrecruzante que se estudió en dos diferentes concentraciones. A través de su presencia en la confección de los andamios, logramos un aumento en la estabilidad térmica con la posibilidad de observar un efecto también en sus propiedades mecánicas y un mayor nivel de renaturalización proteico. Al mismo tiempo, el impacto sobre el resto de los parámetros estructurales fue mínimo y se logró mantener la distribución homogénea de los cristales de HA en el andamio. Por otro lado, se obtuvo una buena rugosidad superficial que es una característica importante a la hora de la aceptación del implante por parte del tejido. Los andamios entrecruzados mostraron una mejorada mineralización logrando un apropiado crecimiento cristalino mientras que los estudios de degradación y su capacidad de inducción de una cubierta de HA biogénica otorgaron resultados prometedores.

A continuación, se desarrollaron ensayos de porosidad, almacenamiento de agua y estudios mecánicos preliminares sobre las combinaciones de andamios con diferentes concentraciones de TA. A partir de estos ensayos logramos observar que los andamios presentaron un grado de porosidad adecuado para regeneración de hueso considerando la literatura. Este grado de porosidad se conoce que afecta a la integridad estructural de los andamios, haciéndolos menos resistentes a esfuerzos. Este hecho fue adecuadamente contrarrestado por la presencia de los nanorodillos que reforzaron la estructura GEL-TA. Además, gracias a esta estructura porosa y a sus componentes, el material fue capaz de absorber agua y retenerla, lo que indicaría la buena capacidad de prevenir la pérdida de fluidos y nutrientes al momento de implantado, cualidad también importante a la hora de la

regeneración de cualquier tipo de tejido. Considerando estos resultados se llevó a cabo la selección de la concentración de agente entrecruzante para la continuidad de los ensayos mecánicos. Una vez realizada la selección del andamio adecuado se llevaron a cabo estudios mecánicos de tracción a tres diferentes velocidades de aplicación de la carga, estudios de compresión a las mismas tres velocidades de aplicación y dos condiciones de humedad. Finalmente, los materiales desarrollados mostraron resistencias y comportamientos comparables a las encontradas en bibliografía para ensayos realizados en muestras óseas.

Actualmente uno de los grandes objetivos en el ámbito de la biomedicina es el desarrollo de estructuras que logren reemplazar a los diferentes tejidos y órganos del cuerpo que, por diferentes razones, fallan. En el caso puntual del tejido óseo, se sabe que pequeñas lesiones son reparadas por el mismo organismo pero, cuando se trata de daños mayores, eso ya no es posible. De este modo, aunque los metales tomaron mayor protagonismo en el área de implantes sustituyendo grandes defectos óseos, distan de ser soluciones ideales. Debido a todos estos hechos, se comenzó a investigar el desarrollo de biorreactores, sistemas vivos en los cuales se combina un andamio, células y en ocasiones complementos celulares, con el objetivo de lograr implantes dinámicos que favorezcan la regeneración del tejido; a lo largo de este trabajo fueron presentados los resultados de la investigación para el desarrollo de un andamio en busca de un sistema que logre acercarse a este tipo de funcionamiento. En nuestra investigación, estudiando cada uno de los puntos del proceso de confección, logramos obtener un andamio entrecruzado formado a partir de una proteína, nanopartículas de morfología y composición química homóloga a la fase mineral del tejido óseo y un agente entrecruzante con materias primas que no suponen un gran coste de capital; este último punto lo hace accesible a los requerimientos de la economía actual. Más allá de los buenos resultados obtenidos, todavía resta un considerable camino para cumplir el objetivo. En función del punto alcanzado por nuestro trabajo, existen diversas posibilidades para la continuación de esta investigación.

Como primer paso en la prosecución del estudio de estos andamios proponemos un más extenso estudio de la respuesta ante los esfuerzos mecánicos. Los diferentes huesos del esqueleto tienen funciones distintas y por ende están sometidos a diferentes tipos de estrés. La anisotropía ósea es una característica ya conocida; considerando esta propiedad sería adecuado llevar a cabo ensayos de flexión, tracción y compresión con diversos sentidos de aplicación del esfuerzo. Por otro lado, y teniendo en cuenta el ambiente en el que están inmersos los huesos, es indispensable conocer su respuesta luego de un tiempo de estar sumergidos en una solución como puede ser fluido fisiológico simulado.

Una vez culminada la fase de caracterización mecánica de los andamios lo más adecuado sería comenzar con los ensayos celulares dinámicos. Para que un implante sea aceptado, tiene que ser capaz que albergar, proporcionar anclaje y un ambiente adecuado a las células correspondientes, además de transmitir a través de su estructura estímulos mecánicos. Proponemos ensayos similares a los que se desarrollaron para evaluar la respuesta ante los cristales de nano-HA, en los que se estudie la capacidad de adhesión, proliferación y diferenciación celular en los andamios en presencia de estímulos mecánicos concretos, a través de la alteración de la velocidad de flujo y el patrón de los medios de cultivo en un biorreactor. Al igual que en el resto de los tejidos, en el óseo es necesario poseer un correcto flujo de nutrientes, por lo que otro aspecto importante a estudiar es la capacidad de la estructura de permitir el adecuado desarrollo de la angiogénesis.

Para concluir la batería de estudios propuestos, y como paso lógico luego de los mencionados, sería idóneo comenzar con los ensayos en animales, siempre respetando el principio de las tres R de los ensayos de experimentación animal: reemplazo, reducción y refinamiento.

Capítulo 8

Producción Científica

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos y/o reuniones científicas.

Publicaciones

- 2017 *Joining human adipose-derived stem cells and hydroxyapatite nano-rods frameworks: osteogenic niches in an additive-free medium.* Sartuqui J, Gardin C, Ferroni L, Zavan B, Messina PV. Manuscrito enviado para su publicación.
- 2016 *Biomimetic fiber mesh scaffolds based on gelatin and hydroxyapatite nano-rods: Designing intrinsic skills to attain bone reparation abilities.* Sartuqui J, Gravina N, Rial R, Benedini L, Yahia L, Ruso JM, Messina PV. *Colloids and Surfaces B – Biointerfaces*, 2016, 145: 382-391.
- 2016 *Application of Natural, Semi-synthetic, and Synthetic Biopolymers Used in Drug Delivery Systems Design.* Sartuqui J, D'Elía NL, Gravina N, Benedini L. In: *Biopolymers for Medical Applications.* Ruso JM, Messina PV, Eds. Boca Raton, Florida: CRC Press, p. 372.
- 2015 *Analyzing the Hydrodynamic and Crowding Evolution of Aqueous Hydroxyapatite-Gelatin Networks: Digging Deeper into Bone Scaffold Design Variables.* Sartuqui J, D'Elía NL, Gravina AN, Messina PV. *Biopolymers*, 2015, 103: 393–405.
- 2015 *Multiscale inorganic hierarchically materials: towards an improved orthopaedic regenerative medicine.* Ruso JM, Sartuqui J, Messina PV. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, 15:2290-2305

Presentaciones en congresos y/o reuniones científicas

- 2016 *Different biomimetic synthesis to obtain hydroxyapatite nanocrystals.* D'Elía NL, Karman S, Gravina N, Sartuqui J, Messina PV. XVI Surfaces

and Nanostructured Materials Meeting. Mayo 2016. Buenos Aires, Argentina.

- 2015 *Materiales híbrido-fibrilares basados en polímeros biodegradables.* Sartuqui J. 3ras Jornadas de Ciencia y Tecnología de los Materiales. 06 y 07 de Agosto de 2015, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- 2015 *Materiales nano-estructurados para afecciones óseos y dentales.* Messina PV, Benedini LA, D'Elía NL, Gravina AN, Sartuqui J. V Congreso Interdisciplinario de la Salud. 13 y 14 de Abril de 2015 , Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
- 2014 *Efecto de la Presencia de Nanorodillos de Hidroxiapatita (HA) en la Evolución Hidrodinámica y Organización de Soluciones Acuosas de Gelatina.* Sartuqui J, Gravina N, D'Elía N, Messina PV. Encuentro Argentino de Materia Blanda. 15-17 de Septiembre de 2014, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- 2013 *Nano-Hidroxiapatita cristalina: influencia de su topografía en la bioactividad.* D'Elía NL, Gravina AN, Sartuqui J, Messina PV. IX Reunión Anual de la AACr y I Reunión Latinoamericana de Cristalografía. 29 de octubre al 1 de noviembre de 2013, Pabellón Argentina, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.