



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Ingeniería de Tejido Óseo: Efecto del diseño de un biomaterial basado en copolímeros estadísticos y en bloque sobre la biocompatibilidad de células óseas

Tesista: Lic. María Leticia Bravi Costantino

Directora: Dra. Ana María Cortizo

Codirectora: Dra. Tamara G. Oberti

Año: 2020

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

Su realización ha sido posible gracias a la beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).



AGRADECIMIENTOS

Siempre es buen motivo para agradecer a todos los que formaron parte de este hermoso proyecto, quienes me acompañaron y quienes hicieron posible su realización. Es por ello que me gustaría dedicarles unas palabras a todos los que estuvieron presentes en esta etapa.

En primer lugar, quisiera agradecerle a mi directora, Ana Cortizo, por confiar en mí y formar parte de la dirección de este trabajo, quien me guio en este proceso y me ayudó mucho con la parte biológica del mismo, quien contribuyó en mi formación profesional y, quien siempre encuentra motivos para festejar, muchas gracias Ana!!.

A su gemela, Su Cortizo, quien me presento a la beca de CONICET junto a Ana, quien confió en mí desde el primer momento y quien también formo parte de la dirección de este trabajo, siempre escuchando todas mis inquietudes y guiándome en las múltiples síntesis de polímeros jaja, quien me hizo crecer mucho en lo profesional y quien siempre me ayudo en lo personal, muchas gracias Su!! Te quiero!.

A mi codirectora, Tamara Oberti, la mejor que me podría haber tocado, quien fue una parte fundamental de este proyecto, quien me ayudó muchísimo en lo experimental y personal, quien me hizo crecer y formarme, con quien tuvimos momentos de vida y profesionales buenos y malos y siempre salimos adelante, quien fue incondicional en todo momento, con quien nos mandamos algunas macanas en el laboratorio y quedaron muchas anécdotas, con quien compartimos múltiples risas de chancho jaja, quien siempre me escucho y estuvo ahí, muchísimas gracias Tama!! Te quiero mucho!!.

Y en especial, quiero agradecerles a las tres por haber contribuido en mi formación y por acompañarme en esta última etapa de escritura y sobre todo en el último tiempo, gracias por ayudarme y apoyarme!.

También quiero agradecer a los dos laboratorios que me abrieron sus puertas, al grupo Macromoléculas del INIFTA, hermoso grupo!, con quienes compartí muchos momentos y risas: al negro, quien siempre me ayudó y malcrío, a Fer, a quien cansé con las muestras para el GPC jaja, a Pablo, a quien siempre peleo jaja y con quien compartí múltiples charlas científicas, a Sole, quien siempre está, nos prepara mates y nos malcría como si fuéramos sus hijos, quien siempre me ayudo también y quien deja el material de vidrio impecable! Jaja. A los que formaron parte del grupo o forman y no veo tanto, pero con quienes también compartí lindos momentos: Maga, Lara, Juan, Elías, Vladi, Meli, María y Sofi. Al grupo del LIOMM, a Antonio y Silvina, con quienes compartí muchos almuerzos y algunos seminarios que me ayudaron a crecer en lo profesional, a Juanma y Vir, a quienes molesté un poco más en el LIOMM y me ayudaron con las células, a buscar reactivos, y con quienes también compartí charlas y lindos momentos, a todos ellos gracias!!!.

Al hermoso grupo de becarios, a Maluz, a quien le puse ese sobrenombre que no le gusta ja, con quien somos parecidas y distintas, con quien amamos dormir la siesta, con quien compartí múltiples congresos, charlas y caminatas a la salida del laboratorio,

quien nos soluciona todos los problemas informáticos, quien me esperaba a que terminé los experimentos, quien siempre está, quien siempre ayuda!! Gracias Maluzzz!!; a luqui, quien da los mejores abrazos jaja, con quien nos reímos sin parar, con quien podemos hablar de cualquier cosa, quien es de pueblo como yo y no pronunciamos las eses (aunque él no lo admita ja), quien siempre está también!! Gracias Luqui!!; a Laurita, quien siempre está dispuesta a ayudar y enseñar, quien es incondicional y pura pila, quien organiza los planes y hace las mejores tortas, quien me ayudó mucho también!! Gracias Lauriti!!; y a Nahue, que nunca me cebo un mate jaja y quien nos hizo reír mucho también!. A todos ellos muchas graciasss!! Los quiero!.

A todas las personas que colaboraron del INIFTA ya sea en la realización de medidas experimentales, elaboración y reparación de material, entre otros, siempre dispuestos a colaborar en todo lo que necesite durante este proyecto y a todos aquellos con los que compartimos charlas de pasillo y lindos momentos.

Quiero agradecer también, al CONICET por otorgarme la beca doctoral y a la Facultad de Ciencias Exactas por brindarme la posibilidad de inscribirme en la carrera de posgrado, así como también por el financiamiento otorgado por estas instituciones para la realización del presente trabajo de tesis.

Por último, quiero agradecer a todas aquellas personas que son una parte fundamental de mi vida, a mis papás y mi hermano, que siempre estuvieron acompañándome en todo lo que me propuse, quienes me permitieron estudiar y recibirme, quienes me dan todo y más, quienes siempre me apoyaron y son los mejores! Los quiero un monton!; a mis abuelos lindos, quienes siempre fueron mi ejemplo a seguir, siempre tan cariñosos e incondicionales, mi abuelo Carlos, quien me acompaña desde otro lugar, mi abuela Coca, siempre dispuesta a charlar, mi abuela Nilda, la mejor cebadora de mate y mi abuelo Polo, la persona más buena que conocí, mi todo!; a Rafa, mi compañero de vida, la mejor persona que me podía tocar para compartirla, quien me banca y acompaña en todo, quien siempre está, quien me ayuda todos los días, a quien quiero muchísimo también!; a Elda, quien me malcría siempre cuando voy a Belgrano y con quien compartimos lindos momentos desde que la conocí; a todos mis primos y tíos quienes me acompañan desde que soy chiquita y siempre están presentes en todos los momentos, con quienes seguimos compartiendo la vida!!. A todos ellos muchas gracias!!! Los quiero mucho!!.

También, quiero agradecer a todos mis amigos y amigas de siempre de mi querida ciudad 9 de Julio, a mis amigas de la facultad, a mi ahijada Amelia, a mis sobris del corazón Martincito e Isa y en especial a mis grandes amigas: Jose, Loly, Ro y la colo, las amo amigas!!!

Y, por último, solo decir que este trabajo va dedicado a mi gran amiga del alma, quien me dio las fuerzas para seguir, a quien quiero tanto y a quien voy a extrañar muchísimo!

A todos ellos gracias, gracias y más gracias!!!.

RESUMEN

Si bien el tejido óseo es capaz de repararse por sí mismo sin dejar cicatrices, existen algunas afecciones, como las grandes fracturas o las osteonecrosis, en las que no es posible la autoreparación ósea. A lo largo de la historia, se han diseñado distintas estrategias para reparar el hueso dañado. Tradicionalmente las lesiones en dicho tejido han sido tratadas con implantes de distintos tipos de injertos, lo cual presenta desventajas, como la baja disponibilidad de donadores de injertos, problemas de osteointegración de implantes y los grandes costos en el sistema de salud. Con el fin de buscar soluciones a estos problemas nace la Ingeniería de Tejido cuyo objetivo es obtener sustitutos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido dañado. Para lograr esta meta, la Ingeniería de tejidos utiliza principios de varias disciplinas, como la Ingeniería, la Biología y la Medicina. El objetivo del presente trabajo es obtener y caracterizar diversas matrices, utilizando polímeros sintéticos para diseñar andamios (*scaffolds*) que ayuden en la reparación del tejido óseo, además, de estudiar las interacciones célula-polímero en las diferentes superficies. Para ello, en una primera etapa del trabajo, se desarrollaron nuevos biomateriales basados en copolímeros fumáricos, obteniéndose copolímeros estadísticos de fumarato de diisopropilo (FIP) con metacrilato de polietilenglicol metil éter (OEGMA) o N-isopropilacrilamida (NIPAM) vía polimerización radicalaria convencional y polimerización radical controlada por transferencia adición-fragmentación reversible (RAFT). La aplicación de ambas metodologías de síntesis permitió obtener copolímeros con diferente arquitectura (lineal y estrella), y se evaluó la influencia de dicha característica macromolecular tendría efecto sobre las propiedades fisicoquímicas y de biocompatibilidad del material obtenido. En los sistemas sintetizados, se observaron algunas diferencias significativas en la biocompatibilidad con macrófagos de los *scaffolds*, siendo las propiedades finales de las matrices obtenidas a partir de FIP y NIPAM superadoras a las obtenidas con OEGMA y FIP.

En una segunda etapa del presente trabajo, se sintetizaron copolímeros en bloque, con la finalidad de obtener películas que se ensamblen de una forma diferente,

lográndose una nueva morfología, sin embargo, en las condiciones trabajadas no fue posible obtener los nuevos copolímeros en bloque diseñados.

Por último, en una tercera etapa del trabajo, se estudiaron nuevos biomateriales obtenidos a partir de copolímeros de fumarato de di-2-octilo (FDO) y NIPAM, sintetizados empleando dos iniciadores azoicos diferentes (azoisobutironitrilo (AIBN) y 2,2'-azobisisobutirato de metilo (MAIB)), logrando distintas características macromoleculares dependiendo del sistema de iniciación utilizado. Las matrices se prepararon por el método de *casting* y *electrospinning*, generándose *scaffolds* tridimensionales con diferente morfología y topografía superficial. Se estudió también el efecto de estas características sobre las propiedades de biocompatibilidad de los *scaffolds*. Además, dado que los polímeros obtenidos poseen diferente composición de NIPAM en su estructura, y conociendo que dicho monómero es responsivo a estímulos térmicos, se evaluó la característica termo-responsiva de los materiales obtenidos. Se observó un aumento de la temperatura crítica inferior (LCT) al aumentar la composición del comonómero fumárico en el copolímero empleado en la obtención de los *scaffolds*, con respecto al homopolímero NIPAM. En general, estos nuevos biomateriales presentaron buenas propiedades físico-químicas y de biocompatibilidad, por lo que podrían ser aplicados en la reparación de tejido óseo.

INDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 Introducción	12
1.1.1 Tejido óseo	12
1.1.2 Formación de tejido óseo	16
1.1.3 Reparación ósea	17
1.1.4 Ingeniería de tejido óseo	18
1.1.5 Biomateriales	20
1.2 Hipótesis	29
1.3 Objetivos	30
1.3.1 Objetivo general	30
1.3.2 Objetivo específicos	30

MATERIALES & MÉTODOS

2.1 Monómeros	32
2.1.1 Fumarato de diisopropilo: síntesis, purificación y caracterización	32
2.1.2 Fumarato de di-2-octilo: síntesis, purificación y caracterización	33
2.1.3 N-isopropilacrilamida	33
2.1.4 Metacrilato de polietilenglicol metil éter	33
2.1.5 Metacrilato de 2-hidroxietilo	34
2.1.6 Mecrilato de bencilo	34
2.1.7 Acrilato de tetrahidrofurfurilo	34
2.2 Iniciadores radicalarios	35
2.2.1 Azobisisobutironitrilo	35
2.2.2 Peróxido de bezoílo	35
2.2.3 Azobisisobutirato de dimetilo	35
2.3 Agente de transferencia de cadena	36
2.3.1 Pentaeritritol (3-(benziltritiocarbonil) propionato): síntesis, purificación y caracterización	36
2.3.2 Ácido 2-(deciltritiocarbonil) dimetil propanoico	40
2.4 Homopolímeros	40
2.4.1 Polimetacrilato de bencilo, estrella: síntesis, purificación y caracterización	40
2.4.2 Polifumarato de diisopropilo, estrella: síntesis, purificación y caracterización	41
2.4.3 Polifumarato de di-2-octilo, lineal	42
2.4.4 PoliN-isopropilacrilamida, lineal	43
2.5 Copolímeros estadísticos	44
2.5.1 Poli (fumarato de diisopropilo-co-metacrilato de polietilenglicol metil éter), lineal y estrella: síntesis, purificación y caracterización	44
2.5.2 Poli (fumarato de diisopropilo-co-metacrilato de hidroxietilo), lineal: síntesis	45
2.5.3 Poli (fumarato de diisopropilo-co-acrilato de tetrahidrofurfurilo), lineal: síntesis	45
2.5.4 Poli (fumarato de diisopropilo-co-N-isopropilacrilamida), lineal y estrella: síntesis, purificación y caracterización	45
2.5.5 Poli (fumarato de di-2-octilo-co-N-isopropilacrilamida), lineal: síntesis, purificación y caracterización	46
2.6 Copolímero en bloque	47
2.6.1 Polifumarato de di-2-octilo-b-poliN-isopropilacrilamida, lineal	47
2.7 Técnicas de caracterización del agente de transferencia de cadena y los homopolímeros obtenidos	47
2.7.1 Cromatografía de exclusión molecular	47
2.7.2 Espectroscopía infrarroja	48
2.7.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	49
2.7.4 Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico	49
2.7.5 Cromatografía gaseosa - espectrometría de masas	50

INDICE DE CONTENIDO



2.8 Obtención de membranas	50
2.8.1 Membranas de poli(FIP-co-OEGMA), lineal (FOL) y estrella (FOS)	50
2.8.2 Membranas de poli(FIP-co-NIPAM), lineal (FNL) y estrella (FNS)	51
2.8.3 Membranas de poli(FDO-co-NIPAM) (DFN)	52
2.9 Caracterización de las membranas	53
2.9.1 Apariencia y morfología	53
2.9.2 Determinación de la temperatura crítica de transición (Tc) de las matrices DFN por DSC	54
2.9.3 Determinación del Tc por transmitancia	54
2.9.4 Estudio de hinchamiento	54
2.9.5 Ángulo de contacto	56
2.9.6 Pruebas mecánicas	56
2.10 Ensayos de biocompatibilidad y citotoxicidad <i>in vitro</i>	57
2.10.1 Cultivos celulares	57
2.10.1.1 Células progenitoras de médula ósea	57
2.10.1.2 Células RAW 264.7	58
2.10.2 Viabilidad celular	58
2.10.3 Morfología celular	60
2.10.4 Citotoxicidad	60
2.10.4.1 Producción de NO	61
2.10.4.2 Producción de citoquinas	61
2.10.5 Estudios de degradación	62
2.10.6 Inducción osteogénica	63
2.10.6.1 Diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico	63
2.10.6.1.1 Actividad de fosfatasa alcalina	63
2.10.6.1.2 Determinación de la producción de nódulos de mineralización	64
2.10.7 Análisis estadísticos	64



RESULTADOS & DISCUSIÓN	
3.1 Caracterización fisicoquímica y biológica de matrices basadas en copolímeros estadísticos con diferente arquitectura	67
3.1.1 Pentaeritritol (3-(s-benciltritiocarbonil) propionato): síntesis y caracterización	67
3.1.2 Polimetacrilato de bencilo, estrella	73
3.1.3 Copolímeros estadísticos	75
3.1.3.1 Poli (fumarato de diisopropilo-co-metacrilato de polietilenglico metil éter), lineal y estrella, (FOL y FOS)	76
3.1.3.2 Poli (fumarato de diisopropilo-co-metacrilato de hidroxietilo), lineal (FH)	86
3.1.3.3 Poli (fumarato de diisopropilo-co-acrilato de tetrafurfurilo), lineal (FA)	87
3.1.3.4 Poli (fumarato de diisopropilo-co-N-isopropilacrilamida), lineal y estrella, (FNL y FNS)	87
3.1.4 Ensayos <i>in vitro</i>	94
3.1.4.1 Viabilidad celular	95
3.1.4.2 Producción de NO	97
3.1.4.3 Morfología celular	99
3.2 Copolímeros en bloque	103
3.2.1 Homopolímero estrella: poli fumarato de diisopropilo	103
3.2.2 Homopolímeros lineales: poli fumarato de di-2-octilo y poli N-isopropilacrilamida	107
3.2.3 Copolímero en bloque: poli fumarato de di-2-octilo-b-poliN-isopropilacrilamida lineal	108

INDICE DE CONTENIDO

III

3.3 Matrices basadas en copolímeros de FDO-NIPAM: diseño, propiedades y estudio de biocompatibilidad	110
3.3.1 Poli (fumarato de di-2-octilo-co-N-isopropil acrilamida) (DFN)	111
3.3.2 Caracterización de los <i>scaffolds</i>	124
3.3.3 Ensayos <i>in vitro</i>	129
3.3.3.1 Degradación por acción de los macrófagos	129
3.3.3.2 Estudios de citotoxicidad	131
3.3.3.3 Estudios de biocompatibilidad	134
3.3.4 Propiedades termo-responsivas de los <i>scaffolds</i>	143
3.3.4.1 Evaluación de la temperatura crítica	145
3.3.4.2 Análisis del ángulo de contacto	149
3.3.4.3 Estudios de hinchamiento	150

IV

CONCLUSIONES	
4. Conclusiones	156

REFERENCIAS

Referencias	160
--------------------	-----

ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

Esquemas	173
Figuras	174
Imágenes	177
Tablas	178
Abreviaturas	180

CAPITULO I



Introducción, hipótesis y objetivos

1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conectivo mineralizado dinámico que exhibe diferentes tipos celulares como osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, células osteoprogenitoras y de revestimiento. Es el constituyente principal de los huesos y se encuentra en constante remodelación por acción de las células óseas, incluyendo la resorción ósea por osteoclastos y formación ósea por osteoblastos, mientras que los osteocitos actúan como mecanosensores y orquestadores del proceso de remodelación ósea [Florencio-Silva et al., 2015]. Dentro del organismo cumple diversos propósitos especializados, entre ellos, proporciona la fortaleza necesaria al esqueleto para cumplir sus funciones de órgano de sostén y locomoción, ya que provee sitios de inserción de los músculos brindando en simultáneo cierta rigidez al organismo para permitir la posición erecta. Por otro lado, el esqueleto presenta importantes funciones protectoras, debido a que rodea distintos órganos vitales como el cerebro, la médula ósea hematopoyética, órganos de la cavidad torácica y pélvica. Metabólicamente mantiene la homeostasis mineral del organismo, principalmente de calcio y fósforo [Duplomb et al., 2007]. También, funciona como reservorio de citoquinas y factores de crecimiento, y provee el microambiente para la hematopoyesis en los espacios donde se aloja la médula ósea [Clarke, 2008].

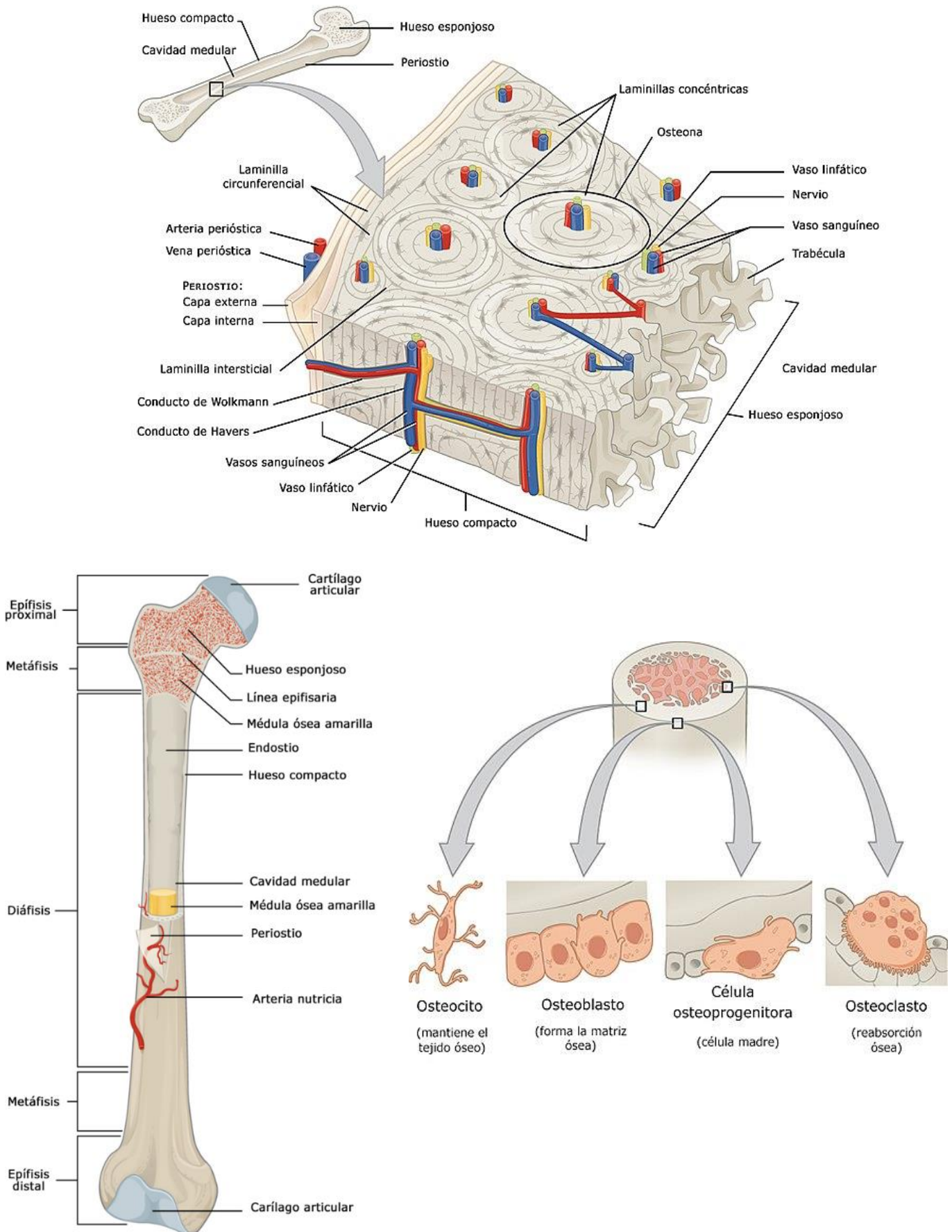
Además de los distintos tipos celulares, el tejido óseo está compuesto por una matriz extracelular, cuyos principales componentes son colágeno tipo I, hidroxapatita y agua. Por otro lado, en la médula ósea se encuentran células madres mesenquimales, denominadas Células Progenitoras de Médula Ósea (CPMO) por su ubicación anatómica. Las CPMO tienen la habilidad de auto-renovarse o de diferenciarse generando varios tipos celulares para dar lugar a la formación de tejido cartilaginoso, óseo, y/o adiposo. El compromiso de las células CPMO hacia un tipo celular u otro, depende de la acción de diferentes factores de transcripción, así como también de señales extracelulares e intracelulares [Spencer et al., 2011].

Con excepción de los osteoclastos, cada una de las células que constituyen el tejido óseo puede considerarse como una forma diferenciada de las células CPMO. Los osteoclastos son células grandes multinucleadas que derivan de precursores de la línea monocítica y son las células encargadas de la resorción ósea (Esquema 1.1.1). Los osteoblastos son células cúbicas y son los responsables de la síntesis y secreción de la matriz ósea orgánica, a través de un proceso que consiste principalmente en dos pasos: deposición de la matriz orgánica y su posterior mineralización. En el primer paso, los osteoblastos secretan proteínas de colágeno, principalmente colágeno tipo I, proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, etc) y proteoglicanos, que forman la matriz orgánica. A partir de entonces, tiene lugar la mineralización de la matriz en pequeñas vesículas extracelulares que poseen varias enzimas, como la fosfatasa alcalina, que incorporan Ca^{+2} y PO_4^{-3} . La calcificación comienza cuando los fosfatos de calcio cristalinos que se encuentran en el interior de estas vesículas, crecen y rompen la membrana para salir al espacio extracelular. Estos fosfatos de calcio se disponen en estructuras esféricas denominadas “nódulos de mineralización”, los cuales pueden ser observados al microscopio. A partir de entonces, los fosfatos de calcio hacen contacto con las fibrillas de colágeno y continúan el proceso de mineralización a lo largo de la matriz circundante [Boivin et al., 2008]. Por lo tanto, en este proceso juega un rol fundamental la enzima fosfatasa alcalina (FAL) secretada por los osteoblastos, produciendo fosfato de calcio, siendo su actividad uno de los primeros marcadores de la presencia del fenotipo osteoblástico.

Luego de la formación de hueso entre un 10 y 20 % de los osteoblastos quedan alojados en el seno del hueso y se diferencian paulatinamente a osteocitos. Los osteocitos comprenden entre un 90-95 % de las células óseas totales, se ubican dentro de lagunas rodeadas por matriz ósea mineralizada y presentan una morfología más alargada que los osteoblastos con un núcleo más grande y con algunas prolongaciones citoplasmáticas. Estas células son capaces de censar cambios mecánicos y traducirlos en señales bioquímicas que actúan sobre el hueso, de esta manera, pueden direccionar la remodelación ósea y reparar microfracturas [Burr et al, 2002; Bonewald, 2006]. Las células osteoprogenitoras presentan una morfología similar a la de los fibroblastos, con núcleos aplanados y citoplasma claro, las cuales, en el adulto, son importantes frente a la reparación de fracturas [Ross & Pawlina, 2013].

Por otro lado, la matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso, las fibras de colágeno le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tracción mientras que las sales inorgánicas le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión del tejido óseo [Geneser, 2006]. La matriz orgánica, presente en la matriz extracelular, es sintetizada por células óseas y está compuesta por fibras de colágeno y proteínas no colágenas incluidas en una sustancia fundamental, formada esencialmente por proteoglicanos, como se mencionó anteriormente. Además del colágeno tipo I (Col I), proteína principal del hueso, se encuentran otros colágenos como el tipo V, II, XI y XIII. Dentro de las proteínas no colágenas se hallan las proteínas glicosiladas (como la fosfatasa alcalina y la osteonectina), proteínas dependientes de vitamina K (como la osteocalcina) y glucoproteínas multiadhesivas. Las proteínas no colágenas asisten al colágeno y modulan la calcificación, por tanto, desempeñan un papel importante en la osteogénesis y la remodelación ósea [Golub, 2009]. Además, en el hueso encontramos citoquinas y factores de crecimiento como las proteínas morfogénicas óseas (BMP), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el factor transformante de crecimiento β (TGF- β) y factores de crecimiento insulino similares (IGF), que juegan un papel importante en el mantenimiento del tejido.

El tejido óseo se clasifica según su estructura, en cortical (o compacto), que constituye cerca del 80 % del total del esqueleto, y trabecular (o esponjoso), que corresponde al 20 % restante (Esquema 1.1.1). Mientras que el hueso cortical es casi sólido y posee un 10 % de porosidad, el hueso trabecular posee una porosidad que varía entre el 50-90 %, y la estructura esponjosa está formada por las trabéculas, que se entrecruzan en distintas direcciones formando el reticulado, entre las cuales queda contenida la médula ósea. Todos los huesos están compuestos por las estructuras cortical y trabecular, aunque las proporciones varían en los diferentes huesos del organismo o incluso entre regiones de un mismo hueso [Clarke, 2008]. El tejido que reviste tanto el hueso compacto que limita la cavidad medular, como las trabéculas del hueso esponjoso, se denomina endostio; consiste en una capa de células osteoprogenitoras que se pueden diferenciar a osteoblastos y células de revestimiento. Además, el endostio, tapiza los conductos que se encuentran en el interior del tejido (conductos de Havers y de Volkmann) [Geneser, F., 2006].



Esquema 1.1.1. Estructura del tejido óseo y células óseas.

1.1.2 FORMACIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

Durante la embriogénesis el desarrollo normal del esqueleto comienza con el reclutamiento y la agregación de células madre mesenquimales (MSCs); dentro de estas agregaciones las células se diferencian a condrocitos en la osificación endocondral o directamente a osteoblastos en la vía de la formación ósea intramembranosa. Mediante la osificación intramembranosa se originan los huesos planos del cráneo, de la mandíbula inferior y de las clavículas, mientras que la mayoría de los huesos del cuerpo (huesos cortos, huesos largos, columna vertebral y huesos de la base del cráneo) se originan a partir de la osificación endocondral [Geneser, 2006].

Se denomina osteogénesis al proceso de formación de tejido óseo nuevo, para que ocurra este proceso se requiere una población de células capaces de responder a estímulos moleculares que direccionen la diferenciación a células formadoras de hueso (osteoblastos), el principal regulador de este proceso es el factor RUNX2 [Dalle Carbonare et al., 2012]. En situaciones normales, la osteogénesis ocurre por el proceso de modelado y remodelado óseo. El proceso de modelado óseo, ocurre durante el período de crecimiento y conduce al incremento constante de masa ósea; este proceso tiene como característica que la formación y resorción son independientes entre sí, con un gran predominio de la primera. Por su parte, el proceso de remodelado óseo, por el cual se reemplaza tejido óseo existente por tejido nuevo, ocurre de manera continua durante toda la vida e involucra una serie de procesos celulares dirigidos hacia la resorción ósea seguidos de una fase de formación de hueso nuevo [Duplomb et al., 2007]. Este proceso es necesario para el mantenimiento estructural y funcional de la matriz ósea mineralizada; y depende de un equilibrado acoplamiento entre la formación de hueso por parte de los osteoblastos y la resorción por los osteoclastos, además de una importante regulación del proceso por parte de los osteocitos [Bellido, 2014; Niedźwiedzki & Filipowska, 2015]. El remodelado óseo es un proceso importante por tres razones: en primer lugar, el hueso, debido a su función de soporte estructural está sometido a fatigas que producen microfracturas que, de no ser reparadas, conducen a fallas estructurales; en segundo lugar, permite adaptar las propiedades materiales del hueso a las exigencias mecánicas variables y, por último, desempeña un papel crítico en

la homeostasis del calcio debido a que representa el mayor reservorio de dicho catión [Dunstan et al., 2007].

1.1.3 REPARACIÓN ÓSEA

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

1.1.4 INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

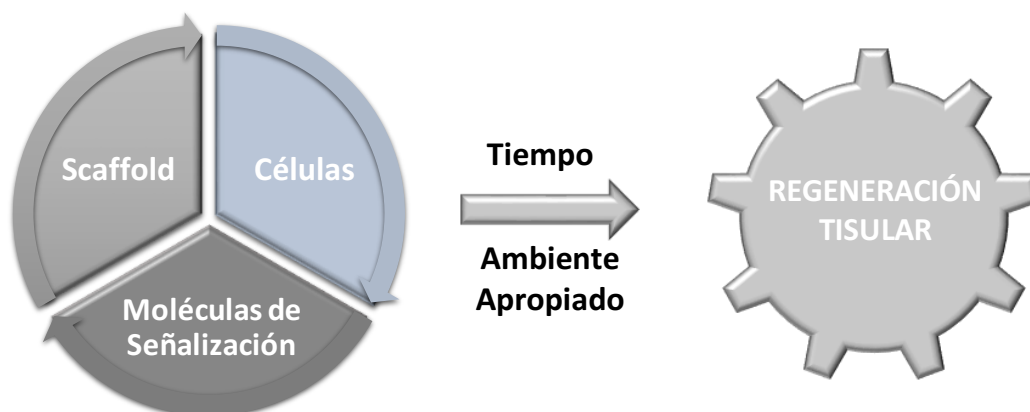
En las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia de lesiones en hueso, como consecuencia de una población cada vez más senil, enfermedades degenerativas, fallas terminales o accidentes traumáticos, que comprometen de manera significativa la calidad de vida, resultando en un creciente problema socio-económico [Lorentzon & Cummings, 2015]. En un futuro, se prevé el aumento en el número de casos de insuficiencia debido al aumento de la obesidad, el aumento de la esperanza de vida, y el alto porcentaje de sedentarismo en la población, provocando que el hueso sea uno de los tejidos más trasplantado en todo el mundo. A pesar de que el hueso es capaz de repararse a sí mismo, existe un gran número de situaciones en las cuales los mecanismos de reparación ósea no pueden llevarse a cabo; por ejemplo, lesiones extensas, como en grandes fracturas, tumores o malformaciones congénitas; en dichos casos, se debe recurrir a una intervención quirúrgica para reparar el hueso dañado [Khan et al., 2008].

Los tratamientos óseos restauradores consisten por lo general en el trasplante de tejido de un sitio a otro en un mismo paciente (autoinjertos) o, cuando ello no es posible, de un individuo a otro (alotrasplante o aloinjerto), y en algunos casos incluso, a partir de animales de otra especie (xenotrasplante). Esta última modalidad, es irrelevante para la mayoría de las necesidades médicas e incluso para las relacionadas con los defectos óseos, debido a las complicaciones de rechazo, dificultades de implantación generadas en dichos casos y escasez de donantes compatibles. El autotrasplante también está limitado en muchas ocasiones debido a que los tejidos que podrían cambiar de localización en el mismo paciente suelen ser insuficientes o están afectados en grado similar a las porciones que se pretenden sustituir. Otro enfoque común para tratar lesiones ortopédicas altamente problemáticas, como fracturas abiertas y de tamaño crítico, es intervenir las mismas, mediante una terapia anabólica [Little et al., 2007]. Dichas terapias incluyen además del injerto óseo (autoinjerto y aloinjerto), proteínas morfogenéticas óseas recombinantes (BMP). El objetivo de estas modalidades es proporcionar factores que facilitan que los osteoprogenitores se conviertan en osteoblastos maduros formadores de hueso funcional. Si bien las terapias mencionadas anteriormente resultan eficaces en el tratamiento de lesiones óseas [Friedlaender et al.,

2001; Govender et al., 2002], se supone que hay un grupo disponible de osteoprogenitores para que estos agentes actúen. Las lesiones traumáticas severas y el manejo ortopédico posterior que se aplique para la curación de la lesión, pueden conducir al agotamiento o al acceso reducido a los progenitores dentro del periostio o la médula. Como se mencionó anteriormente estas células juegan un rol muy importante en la curación ósea, por lo que estas terapias se encuentran en continuo debate [Xing et al., 2009]. Todo ello lleva a la necesidad de generar materiales que reemplacen los tejidos naturales degenerados o dañados. En este contexto, surge la ingeniería de tejidos como una alternativa para generar sustitutos biodegradables que puedan actuar como un sustituto temporal en los sitios defectuosos, con el fin de soportar y estimular la regeneración de tejido óseo mientras se degradan gradualmente y son reemplazadas por tejido nuevo.

La ingeniería de tejidos es un área interdisciplinaria que ha surgido en los últimos años como una nueva estrategia para la reparación de diversos tejidos. La misma se basa en la aplicación de los principios de la química e ingeniería de materiales y las ciencias de la salud. Su éxito radica en la comprensión de las interacciones entre las células progenitoras, las señales que las regulan y el biomaterial/matriz (*scaffold*) utilizado, lo cual se conoce como la “triada de la ingeniería de tejidos” (Esquema 1.1.4) [Murphy et al., 2013]. Un *scaffold* ideal no solamente debe mantener, inducir y restaurar las funciones biológicas, sino también debe poseer las propiedades adecuadas respecto a degradación, interacción celular, no inmunogenicidad, resistencia mecánica y flexibilidad [Billström et al, 2013]. Así, un aspecto muy importante es el diseño del *scaffold* en relación a la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

Unos de los principales desafíos de la ingeniería del tejido óseo es desarrollar un *scaffold* que cumpla con la lista de requisitos mencionada anteriormente, además de otras consideraciones generales de diseño que pueden alterar la idoneidad del mismo para su aplicación prevista, como la morfología superficial y la porosidad general de la matriz [Khan et al., 2008; Bose et al., 2012]. Por otra parte, las características del biomaterial a utilizar también dependerán del tipo de hueso a regenerar en donde ocurra la lesión.



Esquema 1.1.4. Componentes necesarios para la regeneración tisular.

1.1.5 BIOMATERIALES

Con la finalidad de diseñar *scaffolds* para ser aplicados en ingeniería de tejido, se han estudiado numerosos biomateriales, sintéticos y naturales, biocompatibles y biodegradables [Hutmacher, 2000]. Entre las diferentes alternativas empleadas como componentes de los biomateriales, se han propuesto diversos copolímeros, tales como estadísticos (polímeros compuestos por dos o más tipos de unidades monoméricas distribuidas al azar), en bloque (macromoléculas constituidas por bloques poliméricos de 2 o más unidades monoméricas dispuestos en una secuencia lineal), entre otros. Particularmente los copolímeros en bloque denominados anfifílicos, poseen en su estructura un monómero hidrofílico y otro hidrofóbico, y presentan la capacidad de separarse en fases en la micro y nanoescala, lo que les permite interactuar con los sistemas biológicos a nivel molecular [Bhushan & Schricker, 2014; Saltzman & Kyriakides, 2014]. Por lo tanto, mediante la selección adecuada de los comonomeros es posible obtener copolímeros estadísticos y en bloque anfifílicos con patrones de autoensamblado particulares [Ranade et al., 2005]. Se ha demostrado en estudios con polímeros sintéticos, que matrices relativamente hidrofílicas como la policaprolactona (PCL) o hidrofóbicas como polifumarato de diisopropilo (PFIP) presentan en general, buena biocompatibilidad, adecuada biodegradabilidad y baja citotoxicidad [Cortizo et al., 2008]. Sin embargo, sus características fisicoquímicas y su capacidad para promover la osteoinducción no fueron las más adecuadas. Con el fin de mejorar ambas

propiedades, se han diseñado matrices constituidas por mezclas de dichos polímeros compatibilizadas por ultrasonido, obteniéndose superficies más rugosas que las obtenidas con los polímeros individuales, lo cual mejora significativamente su interacción con las células [Fernández et al., 2010].

Además, la ventaja del empleo de biomateriales poliméricos, radica en la capacidad de los mismos para el llenado rápido de un defecto óseo, así como la posibilidad de permitir la invasión de células en la lesión, y la capacidad de proveer un microambiente activo que pueda admitir la liberación local de moléculas que a su vez estimularán la reparación tisular [Richter, 2009].

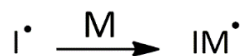
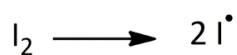
Se ha demostrado que las células madres responden a las características de la superficie a nanoescala, con cambios en el crecimiento y en la diferenciación celular, mediada por alteraciones en la adhesión celular. La interacción de las características nanotopográficas de los materiales con los receptores de integrina en las adhesiones focales de las células, altera la forma en que las mismas se adhieren a las superficies de los materiales y define el destino celular a través de cambios tanto en la bioquímica como en la morfología celular. Es conocido que las células se adhieren mejor en superficies desordenadas, que en aquellas con topografía que presentan un orden preciso, así como también, en superficies más rígidas se genera una mayor cantidad de adhesiones focales [Dalby et al., 2014]. Es por ello que es necesario un estudio más profundo de materiales con variadas arquitecturas y topografías, para conocer su implicancia en la adhesión celular y el destino celular de las mismas hacia un fenotipo osteoblástico.

Un aspecto importante para la elaboración de los biomateriales poliméricos son las distintas metodologías de síntesis de los mismos a través de las cuales es posible obtener polímeros con estructuras particulares. Entre ellas, se encuentra la metodología radicalaria convencional, la cual es una de las técnicas más antiguas de polimerización, consistiendo en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La etapa de iniciación se lleva a cabo a su vez en dos etapas. En la primera, se produce la ruptura homolítica del iniciador, que puede activarse a partir de formadores de radicales, por acción de la luz, de la temperatura o por ondas ultrasónicas dando lugar a radicales libres primarios (especie iniciadora). En una segunda etapa, se adiciona el radical libre primario a la primera molécula de monómero para dar lugar a una especie activa radicalaria con una

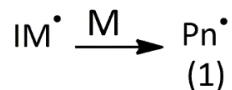
unidad monomérica. A continuación, la especie activa reacciona con otro monómero formando un radical mayor, que a su vez adiciona otro monómero y así sucesivamente, generando lo que se denomina macro-radical. Esta serie de reacciones consecutivas en cadena constituye la etapa de propagación, en donde ocurre el crecimiento del polímero. La propagación del macro-radical termina con las reacciones de destrucción de los mismos, en las que se desactivan ya sea por acoplamiento, uniéndose dos radicales por un enlace covalente o por desproporción, donde ocurre la transferencia de un átomo de un macro-radical a otro. Este tipo de metodología permite obtener copolímeros estadísticos y de injerto, entre otros.

Por otro lado, hace unos años existe la disponibilidad de nuevas metodologías de síntesis de polímeros, tanto aniónicas *living* como radicalarias controladas [Braunecker and Matyjaszewski, 2007], las cuales han permitido obtener una nueva generación de copolímeros con estructuras bien definidas, a través del control del peso molecular y su arquitectura, a diferencia de la polimerización radicalaria convencional. Dentro de las polimerizaciones radicalarias controladas, se encuentra la denominada: polimerización radical controlada por la reacción de transferencia adición-fragmentación reversible con transferencia de cadena (*Reversible addition-fragmentation chain-transfer*, RAFT) la cual permite obtener polímeros con arquitectura variada, mediante el empleo de agentes de transferencia de cadena (CTA) específicos [Gregory & Stenzel, 2012]. Además, es posible obtener polímeros con un bajo índice de polidispersidad, a través del equilibrio de adición-fragmentación reversible que ocurre en esta metodología [Favier & Charreyre, 2006], siendo el mismo el paso crítico de este tipo de polimerizaciones. A continuación, se detalla el mecanismo de este tipo de síntesis:

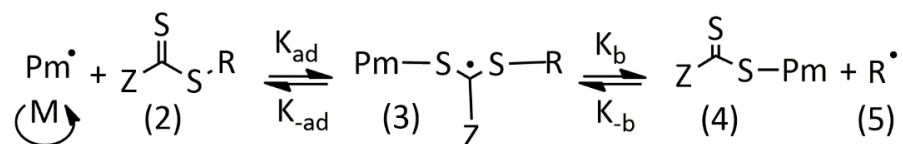
I) Iniciación



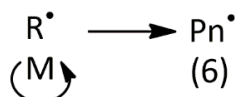
II) Propagación



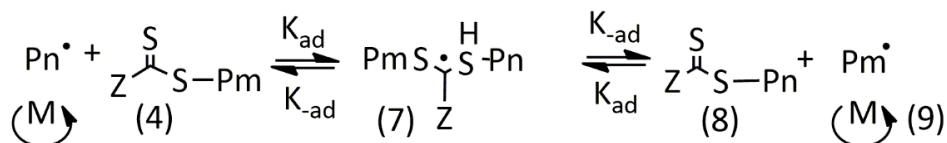
III) Transferencia de Cadena



IV) Reiniciación y propagación



V) Equilibrio de cadena



VI) Terminación

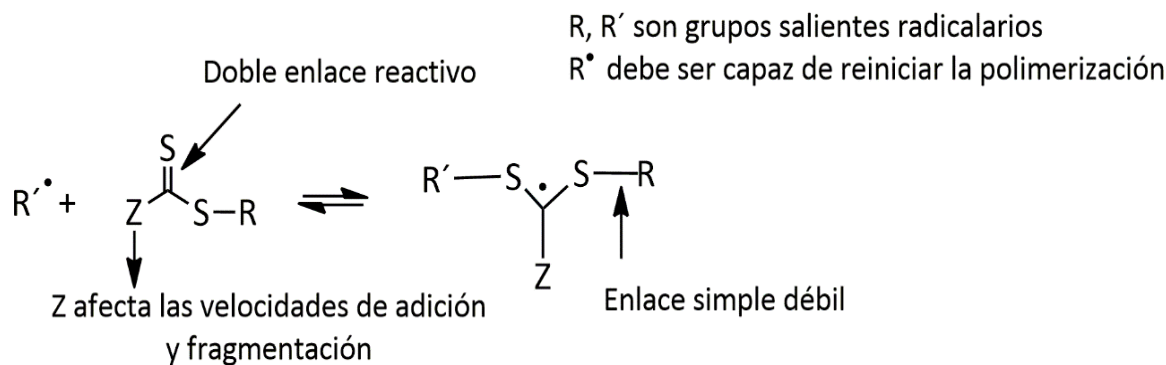


Esquema 1.1.5.a. Mecanismo de polimerización RAFT [Favier & Charreyre, 2006].

En el esquema anterior se muestra detalladamente el mecanismo de polimerización RAFT, donde, al igual que en la polimerización vía radicalaria convencional, la fuente de iniciación (paso I) típicamente es un compuesto azo, o peróxido. La adición del monómero al radical es rápida, creando cadenas oligoméricas radicalarias (1) (paso II). Al principio de la polimerización (paso III), la adición de los radicales propagadores se da sobre el agente de transferencia de cadena (2) con una constante de velocidad, K_{ad} generando una especie radicalaria intermedia (3). Las especies radicalarias intermedias se pueden fragmentar, generando bien sea los reactivos iniciales por la constante de velocidad K_{-ad} , o por la constante de velocidad K_b dando la nueva especie latente CTA (4)

y también una nueva especie radicalaria ($R\cdot$) (5). Las nuevas especies radicalarias pueden reaccionar con el nuevo macro CTA durmiente (4) con una constante K_b o reiniciar la polimerización por adición de monómero formando las especies propagadoras (6), en el paso IV. La secuencia de reacciones descrita en el Esquema 1.1.5.a es típicamente considerada como parte del proceso de pre-equilibrio el cual continúa hasta que todos los CTAs son activados. La formación de un rápido pre-equilibrio es esencial para asegurar el crecimiento de las cadenas propagadoras por un corto periodo antes de ser convertido al estado latente. Además, la rápida formación de los nuevos radicales ($R\cdot$) asegura que la mayoría de las cadenas sean iniciadas casi simultáneamente, permitiendo la obtención de polímeros con distribuciones de peso molecular bajas. Una vez que el CTA (2) es convertido a macro CTA (4), el pre-equilibrio se completa, llevando al estado de equilibrio principal. Durante el equilibrio principal (paso V), un intercambio rápido de los grupos-finales ditioéster ocurre entre las especies intermediarias latentes (2,4) y las especies propagadoras (1,6) impartiendo una característica “*living*” en la reacción de polimerización. Por ello, bajo las condiciones de equilibrio, la fragmentación de las especies radicalarias intermedias (7) a cualquiera de los lados de la ecuación, resulta en la producción de especies poliméricas idénticas. Como sucede con todas las técnicas de polimerización radical controlada los eventos de terminación no pueden ser enteramente suprimidos. Los dos eventos de terminación, acoplamiento y desproporción típicos en una polimerización convencional, son también parte de la polimerización RAFT, dando lugar al paso VI [Chiefari et al., 1998].

La estructura genérica de un CTA se muestra en el Esquema 1.1.5.b. El grupo R, representa un grupo saliente radical y Z es el sustituyente que modifica la reactividad del doble enlace del grupo tiocarbonilo.



Esquema 1.1.5.b. Estructura de un CTA y de los radicales intermediarios en una polimerización RAFT.

El grupo Z determina la estabilidad de las especies radicalarias intermedias y establece la posición del equilibrio entre las especies activas y durmientes, por otra parte, el grupo R presenta su mayor efecto en las primeras etapas de la polimerización (pre-equilibrio).

De lo anterior puede notarse que la selección, síntesis y purificación de un agente de transferencia de cadena es crucial para la obtención de polímeros bajo polimerización RAFT. Además, como se mencionó anteriormente, utilizando distintos tipos de CTA, como por ejemplo de estructura ramificada o lineal, es posible obtener materiales con diferente arquitectura que presenten un reordenamiento en particular.

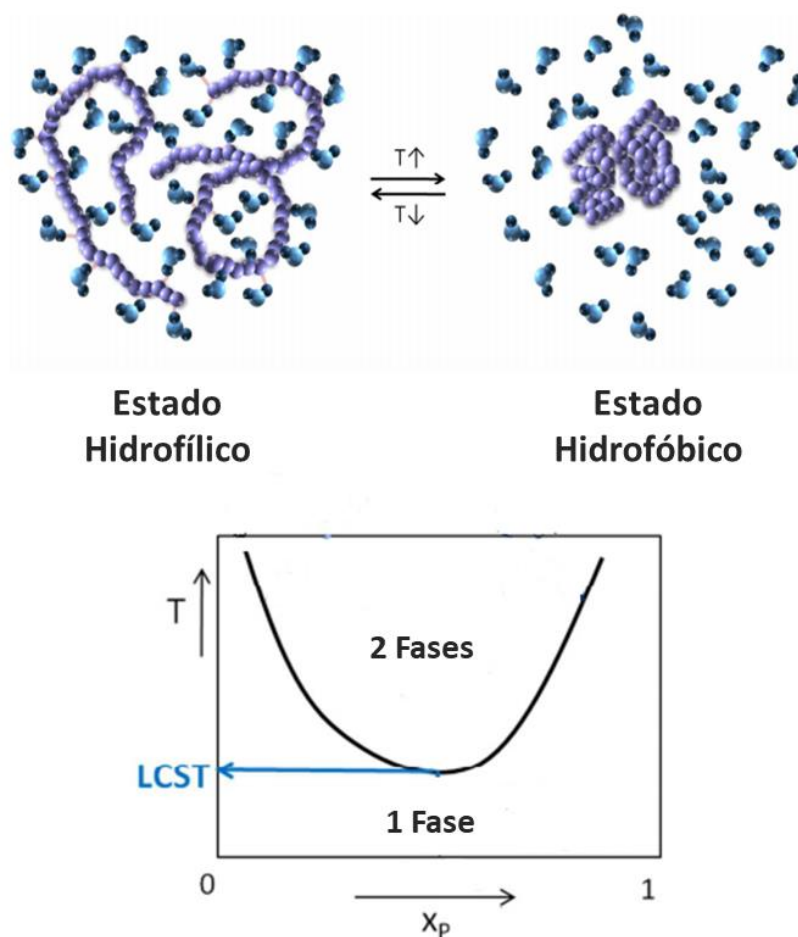
Otro aspecto importante, en la síntesis de polímeros son las condiciones en las que se llevará a cabo la reacción. Entre ellas, se encuentran los modos de calentamiento, los cuales pueden ser por calentamiento clásico convencional (calentamiento térmico), en donde la energía se transmite por convección o por energía de microondas, donde el calentamiento se produce en todo el volumen de la mezcla de reacción ya que la misma absorbe la energía de microondas y mediante energía cinética genera el calentamiento del sistema, permitiendo aumentar la velocidad de las reacciones. Estas modificaciones en las condiciones de reacción junto a otras variables como la atmósfera en la que se produce la reacción (nitrógeno, presión reducida, vacío, etc), los tipos de iniciadores y monómeros empleados, etc; permitirán obtener una amplia variedad de polímeros que podrán ser utilizados en la fabricación de distintos materiales.

Por otra parte, un requisito no menor que debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar *scaffolds* es su accesibilidad de fabricación, con la posibilidad de darle una arquitectura tridimensional al material, factible de esterilizar y, al mismo tiempo, poseer potencial comercialización. De esta manera, se han planteado diferentes técnicas para la obtención de matrices, como el método de *casting*, a través del cual se obtienen películas no porosas; liofilización, que permite la obtención de matrices porosas y de *electrospinning*, la cual es una de las metodologías más utilizada y eficiente para la producción de *scaffolds* fibrosos. En este último caso, regulando diferentes variables como el campo eléctrico aplicado, el caudal de flujo, la distancia entre la aguja y el colector, el tipo de polímero utilizado y su concentración, se pueden obtener fibras cuyos diámetros alcanzan magnitudes nano y micrométricas [Li & Xia, 2004]. Mediante el ajuste de estos parámetros pueden obtenerse *scaffolds* altamente porosos con poros interconectados, que parecen ser óptimos candidatos para aplicación en ingeniería de tejidos [Park et al., 2008; Ko et al., 2014]. Además, el diseño de andamios tridimensionales con estructuras de poros interconectados o propiedades de superficie apropiadas es muy importante para guiar la adhesión y proliferación celular, como una primera etapa hacia la diferenciación celular específica que promueva la regeneración del tejido.

Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de biomateriales disponibles para tratar los defectos óseos, solo un pequeño número ha alcanzado un uso clínico, esta es la razón por la que todavía son necesarios nuevos desarrollos [Winkler et al., 2018].

Por otro lado, existe una gran variedad de polímeros “inteligentes”, llamados de esta manera por su capacidad de respuesta frente a algún estímulo. Dentro de estos estímulos, se encuentran, por ejemplo, los cambios en la temperatura, denominando a los polímeros que presentan una transición frente a ellos, termo-responsivos. Es conocido que homo y copolímeros termo-responsivos sufren una transición debido al cambio de solubilidad a una temperatura de solución crítica (CST), la cual puede ser la mínima de una curva binodal de un diagrama de fases, llamada temperatura de solución crítica inferior (LCST, *Lower Critical Solution Temperature*) o, máxima, denominada temperatura de solución crítica superior (UCST, *Upper Critical Solution Temperature*) [Zhang et al., 2017]. Entre los polímeros termo-responsivos, se encuentra el homopolímero de N-isopropilacrilamida (PNIPAM), el cual ha sido el polímero más

estudiado debido a que exhibe una clara transición a una temperatura inferior crítica de solución (LCST) en medio acuoso de 31-32 °C, cercana a la temperatura corporal [Heskins & Guillet, 1968]. La transición ocurre por un cambio repentino del comportamiento del mismo, pasando de un estado hidrofílico a uno hidrofóbico, basado en las interacciones por puente de hidrógeno que están presentes entre el polímero y las moléculas de agua circundantes en temperaturas bajas (por debajo de 32 °C para PNIPAM). Por lo tanto, las cadenas de polímeros se encuentran hidratadas y solubilizadas en el medio resultando un sistema de una sola fase. A temperatura elevada (por encima de 32 °C para el caso de PNIPAM), las interacciones por puente de hidrógeno se debilitan y las cadenas de polímeros se deshidratan y el mismo se vuelve insoluble (Esquema 1.1.5.c).



Esquema 1.1.5.c. Transición del polímero termo-responsivo en una solución acuosa y diagrama de fase correspondiente a la LCST [Zhang et al., 2017].

En los últimos años diversos polímeros termo-responsivos han sido investigados, debido a sus potenciales aplicaciones, principalmente en el área biomédica, siendo ampliamente utilizados en sistemas de liberación controlada de drogas [Constantin et al., 2011] o para controlar la adhesión celular, en donde es posible que se produzcan cambios en la morfología celular, según el estado hidrofóbico o hidrofílico del sustrato, provocando el desprendimiento celular en función de la temperatura. Así también, se han utilizado estos polímeros para la inmovilización de enzimas o proteínas, como, por ejemplo, el péptido RGD (*Arginine-Glycine-Aspartic Acid*), el cual es una secuencia peptídica que se encuentra en la matriz extracelular y es reconocido por las integrinas, que son las proteínas involucradas en la adhesión celular, proporcionando una gran mejora en este proceso [Uhlig et al., 2014; Hatakeyama et al., 2007]. Además, dicha temperatura puede ser regulada por la inclusión de un comonomero en la estructura macromolecular, lo que amplía su rango de aplicaciones.

En el presente trabajo, se propone desarrollar y caracterizar nuevos *scaffolds* empleando copolímeros fumáricos, estadísticos y en bloque. La selección de comonomeros fumáricos radica en que los mismos son factibles de sintetizar a partir de una fuente de origen nacional, a través del precursor anhídrido maleico, un producto secundario de la industria petrolera. Dichos copolímeros se sintetizaron bajo diferentes mecanismos de polimerización con la finalidad de obtener matrices con diferentes arquitecturas para analizar el efecto de la topografía superficial en el desarrollo y crecimiento celular para una futura aplicación en ingeniería de tejido óseo. Además, se desarrollaron copolímeros con NIPAM como comonomero, por lo que resulta de gran importancia conocer la temperatura de transición crítica de los copolímeros sintetizados, ya que se debe conocer el estado hidrofóbico/hidrofílico de los mismos a la temperatura corporal, debido a la aplicación buscada.

1.2 HIPÓTESIS

Se ha demostrado que los copolímeros en bloque y estadísticos pueden ser utilizados como modelos para comprender mejor las interacciones célula-polímero, así como el rol de estas morfologías sobre la adhesión de proteínas y su implicancia en la adhesión celular. En base al peso molecular promedio y la configuración de los bloques es posible crear superficies con la misma composición, pero diferente nanomorfología. Además, a través de diferentes metodologías se pueden construir matrices tridimensionales con morfología y topografía superficial. Es por ello que se propone el desarrollo de nuevos biomateriales con arquitecturas y composiciones diferentes. Así, la *hipótesis* del presente plan se basa en que el diseño racional del biomaterial considerando no solo su composición química sino también su arquitectura macromolecular y morfología superficial permitirá lograr un *scaffold* con las mejores propiedades para promover las interacciones célula-matriz y así facilitar el proceso de regeneración del tejido.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las características estructurales micro y macroscópicas de matrices basadas en copolímeros estadísticos y en bloque sobre la biocompatibilidad de células de tejido óseo.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar biomateriales basados en copolímeros estadísticos y en bloque con estructura definida que permita diseñar matrices con variada composición, morfología y arquitectura a fin de estudiar dichas modificaciones sobre el comportamiento celular.
2. Caracterizar los copolímeros obtenidos mediante técnicas espectroscópicas (FT-IR, RMN), cromatográficas y calorimétricas.
3. Obtener matrices por *casting* de un solvente adecuado o liofilización o *electrospinning*. Caracterizar las mismas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM), hinchamiento (*swelling*), propiedades mecánicas y propiedades térmicas.
4. Evaluar la cinética de degradación *in vitro* de los biomateriales.
5. Evaluar la posible citotoxicidad de los biomateriales desarrollados empleando un modelo de macrófagos murinos en cultivo.
6. Analizar la biocompatibilidad de las matrices desarrolladas previamente, empleando células progenitoras de medula ósea (CPMO) de rata.

CAPITULO II



Materiales & métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MONÓMEROS

La selección de los monómeros empleados en la síntesis de los copolímeros a utilizar en el presente trabajo, se realizó en base a la polaridad de los mismos. Con la finalidad de obtener copolímeros anfifílicos, se sintetizaron y/o purificaron varios tipos de monómeros, tal como se detalla a continuación:

2.1.1 FUMARATO DE DIISOPROPILO: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis del fumarato de diisopropilo (FIP) se llevó a cabo mediante un procedimiento previamente descrito [Cortizo et al., 2007]. Brevemente, la reacción consiste en una esterificación de Fischer a partir de ácido fumárico (122 gr, 1,05 moles, Biopack), e isopropanol (216 ml, 2,83 moles, Sintorgan). Los reactivos fueron agregados en un balón de 2 litros, el cual contenía 480 ml de Tolueno (Cicarelli), por último, se adicionaron 30 ml de ácido sulfúrico concentrado (Merck, 95-97 %). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 22 horas (temperatura del baño: 120 °C).

Una vez transcurrido el tiempo de reacción se realizó el aislamiento, el cual consistió en sucesivos lavados con agua destilada, seguido de dos lavados con una solución saturada de bicarbonato de sodio, y por último, se utilizó nuevamente agua destilada hasta llegar a pH neutro de las aguas de lavado, con la finalidad de extraer restos de ácido.

Posteriormente se realizó una destilación fraccionada para eliminar el azeótropo agua-tolueno y el exceso de alcohol isopropílico (temperatura del baño: 130 °C, temperatura fracción cabeza: 60 °C, temperatura fracción corazón: 60-85 °C). Por último, a partir de la fracción cola de la destilación, se purificó el monómero obtenido mediante destilación fraccionada a presión reducida (5 mmHg, temperatura baño: 130 °C, temperatura fracción cabeza: 78-87 °C, fracción corazón: 100 °C). El rendimiento de la reacción fue del 55 %.

El monómero fue caracterizado e identificado por Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H -RMN).

2.1.2 FUMARATO DE DI-2-OCTILO: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

El fumarato de di-2-octilo (FDO) se sintetizó mediante una adaptación de la síntesis del fumarato de diisopropilo como se reportó previamente [Pasqualone et al., 2013; Pasqualone, 2016], empleando como reactivo 2-octanol (Sigma-Aldrich, 97 %) en lugar de isopropanol. La presente síntesis requirió un paso extra de purificación del monómero debido a la baja presión de vapor del mismo, lo cual impide su purificación completa mediante destilación fraccionada a presión reducida. Dicha purificación consistió en el pasaje a través de una columna de sílica gel; el control de pureza se realizó por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en placas de Silica gel 60 F254 (Merck), se utilizó cloroformo (Cicarelli) como fase móvil y se reveló con permanganato de potasio. El rendimiento de la reacción fue del 60 % y el producto fue caracterizado por FT-IR y ^1H -RMN.

2.1.3 N-ISOPROPILACRILAMIDA

El monómero N-isopropilacrilamida (NIPAM) (Sigma-Aldrich, 97 %) fue adquirido comercialmente y purificado previo a su utilización mediante recristalización desde hexano (Anedra) caliente [Housni et al., 2007; Shiraishi et al., 2009]. El control de pureza del monómero se realizó por CCF y se caracterizó por FT-IR luego de su purificación.

2.1.4 METACRILATO DE POLIETILENGLICOL METIL ÉTER

Metacrilato de Polietilenglicol metil éter (OEGMA $M_n = 500$ g/mol, Sigma-Aldrich) se purificó utilizando una columna de alúmina básica para remover el inhibidor hidroquinona (Fluka) [Munro et al., 2009; Zhang et al., 2015]. La pureza del monómero se controló por CCF en placa de sílica gel sobre la cual se sembró una muestra de OEGMA

impura, proveniente del recipiente comercial, OEGMA purificado y un patrón de hidroquinona (Mallinckrodt®), todos disueltos en acetona (Anedra). Se utilizó cloroformo como fase móvil y como revelador una lámpara UV-vis.

2.1.5 METACRILATO DE 2-HIDROXIETILO

El monómero metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, Sigma-Aldrich) se purificó previo a su uso, a través del pasaje por columna de alúmina neutra (Fluka) [Lin et al., 2014]. El control de pureza se evaluó siguiendo la misma metodología descrita para el monómero anterior, OEGMA.

2.1.6 METACRILATO DE BENCILO

El monómero metacrilato de bencilo (MB) fue adquirido comercialmente (Sigma Aldrich) y purificado previo a su uso mediante lavados primeramente con una solución de hidróxido de sodio, luego se realizaron lavados con agua hasta pH = 7, se secó la fase orgánica con desecante (cloruro de calcio) y finalmente se realizó una destilación a presión reducida para remover el inhibidor [Coustet, 2014].

2.1.7 ACRILATO DE TETRAHIDROFURFURILO

El acrilato de tetrahidrofurfurilo (ATHF) fue adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich). El producto se comercializa sin inhibidor de polimerización dado que es estable en condiciones ambientales, por lo que no fue necesaria su purificación previa utilización. La ausencia de inhibidor fue corroborada a través de CCF y espectrometría de masas, [Oberti, 2011].

2.2 INICIADORES RADICALARIOS

Distintos iniciadores radicalarios se emplearon en las diferentes polimerizaciones radicalarias convencionales y polimerizaciones RAFT llevadas a cabo en el presente trabajo de tesis.

2.2.1 AZOBISISOBUTIRONITRILO

Se empleó el azobisisobutironitrilo (AIBN) comercial (Merck). Se purificó por recristalización desde metanol [Armarego & Perrin, 1996].

2.2.2 PEROXIDO DE BENZOILO

El peróxido de benzoílo (PB) se adquirió comercialmente (Merck) y su purificación consistió en la disolución del mismo en cloroformo a temperatura ambiente, posterior precipitación por adición de metanol y por último cristalización en frío [Armarego & Perrin, 1996].

2.2.3 AZOBISISOBUTIRATO DE DIMETILO

El 2,2'-azobisisobutirato de metilo (MAIB) se sintetizó en el grupo de investigación mediante adaptación de técnicas previamente descritas [Mortimer, 1965; Bourdauducq, 2002]. Brevemente, el procedimiento consistió en la disolución del AIBN a temperatura ambiente en una mezcla tolueno/metanol (90/10), posterior filtrado y agregado a un balón de 3 bocas. La disolución se llevó a cabo a una temperatura inferior a 5 °C, en donde se burbujeó ácido clorhídrico, generado en otro balón, en este último se colocaron 30 gr de cloruro de sodio, al cual se adicionaron 30 ml de ácido sulfúrico desde una ampolla de compensación. Luego de 3 horas de reacción se llevó el balón a la heladera y por último al freezer. Los cristales obtenidos se filtraron por succión empleando un embudo Buchner y se lavaron con agua fría. Posteriormente, estos se

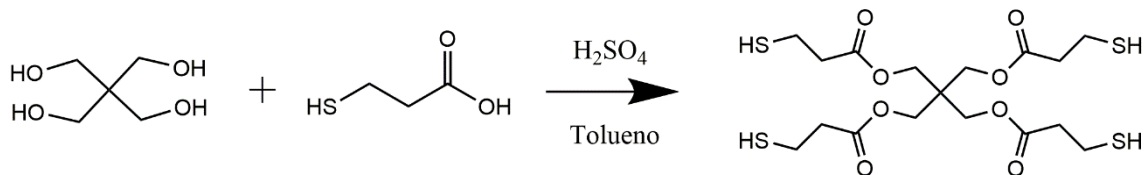
colocaron en una mezcla agua/hielo para su hidrólisis durante 5 horas. Finalmente, se dejó el sistema agitando a temperatura ambiente y se lo llevó al freezer nuevamente, donde los cristales obtenidos se separaron por filtración. La purificación se realizó por recristalización en hexano a temperatura ambiente. El producto final fue caracterizado por FT-IR.

2.3 AGENTES DE TRANSFERENCIA DE CADENA

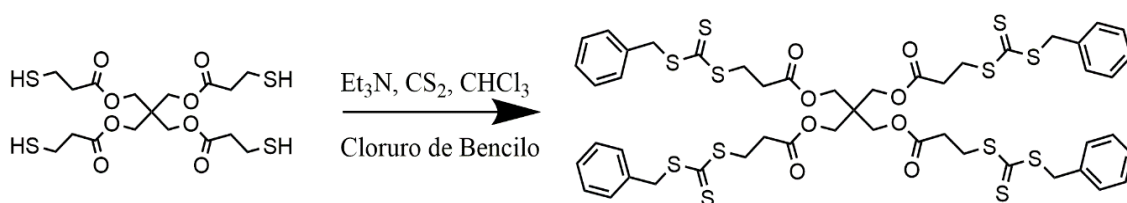
Algunos de los copolímeros sintetizados en el presente trabajo de tesis se obtuvieron empleando un mecanismo de polimerización radical controlado, denominado adición-fragmentación transferencia reversible (RAFT, *Reversible addition-fragmentation chain-transfer*). Dicho mecanismo de polimerización requiere de la presencia de un agente de transferencia de cadena (CTA), además de los tradicionales iniciadores radicalarios presentados anteriormente. A continuación, se detalla las síntesis de los CTAs utilizados.

2.3.1 PENTAERITRITOL (3-(S-BENCILTRITIOCARBONIL) PROPIONATO): SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

El agente de transferencia de cadena (CTA₁, Pentaeritritol(3-(S-benciltritiocarbonil) propionato)), necesario para sintetizar polímeros con arquitectura estrella, se preparó mediante 2 etapas de reacción (esquemas 2.3.1 a y b, respectivamente).



Esquema 2.3.1.a. Etapa 1 de reacción para obtener CTA₁.



Esquema 2.3.1.b. Etapa 2 de reacción para obtener CTA₁.

La primera etapa de síntesis, se realizó a través de una esterificación del pentaeritritol (1,08 g; 8 mmol, Sigma-Aldrich) y ácido 3-mercaptopropanoico (3 ml; 34,5 mmol, Sigma-Aldrich) empleando tolueno (100 ml; 940,9 mmol, Cicarelli) como solvente y ácido sulfúrico (0,6 ml; 1,1 mmol, Merck) como catalizador. La reacción se llevó a cabo durante 1 día en atmósfera de nitrógeno, con agitación magnética, a una temperatura de aproximadamente 150 °C. Al equipo de reacción se le adaptó un refrigerante y una trampa de Dean-Stark, (Imagen 2.3.1.a) con el fin de aumentar el rendimiento de la reacción. En la salida del refrigerante se conectó una trampa con NaOH (2,5 %p/v, Merck) para neutralizar los vapores ácidos.



Imagen 2.3.1.a. Equipamiento empleado en la reacción realizada en la etapa 1 de la síntesis del CTA₁.

El aislamiento de la mezcla obtenida consistió en 2 lavados con agua destilada, seguido de 2 lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio (Cicarelli), y a continuación, se realizaron otros lavados con agua destilada hasta llegar a pH neutro de las aguas de lavado. La solución se secó con el desecante cloruro de calcio y posteriormente, se realizó una destilación fraccionada con el fin de eliminar el tolueno de la mezcla de reacción. Posteriormente se llevó a cabo una filtración a través de columna de sílica, empleando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo/hexano (2/1, Anedra).

La segunda etapa de síntesis se realizó de acuerdo a una metodología previamente descrita [Mayadunne et al., 2003], en donde se agregó gota a gota trietilamina (4,04 g, 40 mmol, Sigma-Aldrich) disuelta en 10 ml de cloroformo, a una solución de pentaeritritol(3-mercaptopropionato) (2,44 g, 5 mmol) y disulfuro de carbono (3,04 g, 40 mmol, Baker) disuelto en 15 ml de cloroformo a temperatura ambiente. La solución se tornó gradualmente de color amarillo durante la adición, luego se dejó en agitación

durante 1 hora. Posteriormente se agregó gota a gota cloruro de bencilo (3,76 g, 22 mmol, Sigma-Aldrich) disuelto en 10 ml de cloroformo y se dejó bajo agitación magnética durante 2 horas (Imagen 2.3.1.b). La mezcla se volcó en una solución acuosa fría de HCl 10 % (Anedra) y se extrajo 3 veces con acetato de etilo (Anedra). La purificación se realizó en una columna cromatográfica sílica gel, utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo/éter de petróleo (Sintorgan) (30/70). El rendimiento de la síntesis del CTA₁ fue del 50 %.

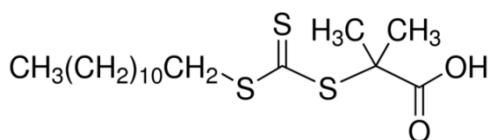


Imagen 2.3.1.b. Equipamiento empleado en la reacción llevada a cabo en la etapa 2 de la síntesis del CTA₁.

La caracterización del producto de la primera etapa de reacción y el CTA₁ se llevó a cabo por FT-IR. A su vez el producto final fue caracterizado por ¹H-RMN y cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG-Masa).

2.3.2 ÁCIDO 2-(DODECILTRITIOCARBONIL) DIMETILPROPANOICO

El agente de transferencia de cadena ácido 2-(dodeciltritiocarbonil) dimetilpropanoico (DDMAT o CTA₂) necesario para obtener polímeros con arquitectura lineal (Esquema 2.3.2) fue adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, 98 %).



Esquema 2.3.2 Estructura CTA₂ lineal.

2.4 HOMOPOLÍMEROS

2.4.1 POLIMETACRILATO DE BENCILO, ESTRELLA: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Con el fin de testear la reactividad del CTA₁ estrella sintetizado, se realizaron diferentes reacciones de homopolimerización en atmósfera de nitrógeno, aplicando energía de microondas a diferentes tiempos (5, 10 y 15 min) y potencias (140 y 210 w) de reacción. Para ello, se colocó en un Erlenmeyer de 25 ml el CTA₁ sintetizado previamente, el iniciador radicalario AIBN y el monómero metacrilato de bencilo (Sigma-Aldrich), en una relación molar de 1:0,4:1300, respectivamente [Mayadunne et al., 2003]. Se purgó con nitrógeno, en baño de hielo durante media hora por medio de una jeringa hipodérmica, ya que es esencial trabajar bajo atmósfera inerte para obtener resultados reproducibles. Una vez que el Erlenmeyer que contiene la muestra alcanzó la temperatura ambiente se colocó en el centro de un horno microondas (Zenith) y se irradió a diferentes potencias y a distintos tiempos. Se detuvo la polimerización por enfriamiento y agregado de 5 ml de metanol y se dejó en freezer durante 1 día. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se secó la muestra en tambor de vacío

hasta peso constante. Para la purificación del polímero se preparó una solución 10 %p/v en cloroformo y se agitó durante 1 día. Luego se precipitó sobre aproximadamente 50 ml de metanol, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y se llevó a peso constante. El porcentaje de conversión (%C) (Ecuación 2.4.1.a) de la reacción se determinó gravimétricamente de la siguiente manera:

$$\%C = \frac{\text{masa polímero obtenido}}{\text{masa monómero inicial}} \times 100 \quad (2.4.1.a)$$

La caracterización del homopolímero se realizó mediante FT-IR. El peso molecular promedio en peso (M_w) y en número (M_n), así como el índice de polidispersidad (IP) (Ecuación 2.4.1.b) se evaluaron por cromatografía de exclusión molecular (SEC).

$$IP = \frac{\text{Peso molecular promedio en peso } (M_w)}{\text{Peso molecular promedio en número } (M_n)} \quad (2.4.1.b)$$

2.4.2 POLIFUMARATO DE DIISOPROPILO, ESTRELLA: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Las reacciones de homopolimerización del fumarato de diisopropilo se llevaron a cabo a través de un mecanismo RAFT en atmósfera de vacío. Para ello se adicionó en un tubo de línea de vacío el agente de transferencia de cadena ramificado (CTA₁), el iniciador radicalario AIBN y el monómero fumarato de diisopropilo (FIP), en una relación molar de 1:0,35:250, respectivamente [Matsumoto et al., 2016]. Luego de 3 ciclos de congelamiento con N₂ líquido y evacuación en línea de vacío (Imagen 2.4.2), el tubo se selló al vacío, y se colocó en un baño previamente termostatzado a 70 °C. Transcurrido el tiempo de reacción, la polimerización se detuvo por enfriamiento y agregado de metanol.

La purificación se realizó por disolución del homopolímero en cloroformo (10 %p/v) y posterior precipitación en metanol (1/5). Se determinó la conversión de reacción gravimetricamente, como se muestra en la ecuación 2.4.1.a. El polímero obtenido fue caracterizado e identificado por SEC y $^1\text{H-RMN}$.



Imagen 2.4.2. Línea de vacío.

2.4.3 POLIFUMARATO DE DI-2-OCTILO, LINEAL

Las síntesis del polifumarato de di-2-octilo (PFDO) lineal se llevaron a cabo en línea Schlenk (Imagen 2.4.3), mediante la técnica de polimerización radical controlada, RAFT. En un tubo Schlenk de 10 ml se adicionó el CTA_2 , el iniciador radicalario MAIB y el monómero fumarato de di-2-octilo (FDO) utilizando distintas relaciones molares (1:0,2:500 y 1:0,35:250, respectivamente). Posteriormente, se realizaron 6 ciclos de congelamiento y evacuación. Finalmente, se colocó en un baño termostatizado a $80\text{ }^\circ\text{C}$,

a distintos tiempos (24, 36 y 42 h). La purificación consistió en el proceso de disolución/precipitación en cloroformo/metanol, respectivamente. Los polímeros se caracterizaron por SEC y $^1\text{H-RMN}$.

Además, se sintetizó un homopolímero de FDO vía polimerización radicalaria convencional. La reacción se llevó a cabo en masa, empleando una concentración de iniciador MAIB de 40 mM, bajo energía de microondas a 140 w y 15 min. La purificación del homopolímero obtenido se realizó empleando el procedimiento previamente descrito (sección 2.4.2).



Imagen 2.4.3. Línea Schlenk.

2.4.4 POLIN-ISOPROPILACRILAMIDA, LINEAL

Se sintetizó el homopolímero de NIPAM vía polimerización RAFT y radicalaria convencional. En la primera síntesis, se utilizó una relación molar del CTA_2 , iniciador AIBN, y monómero de 1:0,35:250, respectivamente. La reacción se realizó en solución

de THF en línea Schlenk como se detalla en la sección 2.4.3., durante 24 h. En el segundo caso, la polimerización se llevó a cabo en masa por energía de microondas con una concentración de 40 mM del iniciador AIBN, a 140 w durante 10 min. El polímero fue caracterizado por ^1H -RMN.

2.5 COPOLÍMEROS ESTADÍSTICOS

2.5.1 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-METACRILATO DE POLIETILENGLICOL METIL ETER), LINEAL Y ESTRELLA: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Las reacciones de copolimerización de FIP y metacrilato de polietilenglicol metil eter (OEGMA) con arquitectura lineal y estrella (FO_L Y FO_S) se realizaron mediante polimerización radicalaria convencional y RAFT, respectivamente, en solución de tolueno (25 %v/v), en atmósfera de nitrógeno y por energía de microondas. Para ello, en un Erlenmeyer de 25ml se adicionaron los monómeros FIP/OEGMA (75/25) con una cantidad previamente pesada de iniciador AIBN (40 mM) en el caso de la polimerización radicalaria convencional y en el caso del mecanismo RAFT se adicionó además el CTA_1 como iniciador del sistema, con la siguiente relación molar $[\text{M}]/[\text{CTA}_1]/[\text{AIBN}]$: 3042/2,3/1. Luego de purgar ambas soluciones con N_2 durante 30 minutos, se irradiaron a 140 W durante 15 minutos por energía de microondas. Además, se ensayaron otras relaciones molares de los monómeros y distintos iniciadores para evaluar el mejor sistema de polimerización.

Los copolímeros fueron aislados por enfriamiento y agregado de hexano y purificados 2 veces por disolución/precipitación en cloroformo/hexano (1/10). Posteriormente se secaron en tambor de vacío hasta llegar a peso constante. El porcentaje de conversión se determinó gravimétricamente, como se muestra en la ecuación 2.4.1.a.

La caracterización del producto se realizó mediante espectroscopía FT-IR, ^1H -RMN, cromatografía de exclusión molecular y análisis termogravimétrico (TGA).

2.5.2 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-METACRILATO DE HIDROXIETILO), LINEAL: SÍNTESIS

La síntesis del copolímero de FIP y metacrilato de hidroxietilo (HEMA) se realizó en un Erlenmeyer de 25 ml cerrado con un septum en un baño termostatzado a 60 °C (mgw Lauda) en atmósfera de nitrógeno a diferentes tiempos (1/2, 1 y 3 horas), a través de polimerización radicalaria convencional en presencia de AIBN (40 mM) como iniciador y, en otros casos, peróxido de benzoilo (PB, 40 mM). Se realizó la reacción en masa y en solución de THF (25 %v/v y 50 % v/v); se utilizaron distintas relaciones molares de los comonomeros [FIP/HEMA]= 50/50; 75/25. Los copolímeros obtenidos se denominaron FH. La reacción finalizó por enfriamiento y agregado de 10 ml de metanol. No fue posible determinar la conversión de la reacción.

2.5.3 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-ACRILATO DE TETRAHIDROFURFURILO), LINEAL: SÍNTESIS

La reacción de copolimerización de FIP y acrilato de tetrahidrofurfurilo (ATHF) en una relación molar 50/50 se realizó en masa, térmicamente a 60 °C, en atmósfera de nitrógeno a diferentes tiempos (4 y 20 h), mediante polimerización radicalaria convencional con PB como iniciador (40 mM) colocando los reactivos en un Erlenmeyer de 25ml. Los copolímeros obtenidos se denominaron FA. La síntesis finalizó por enfriamiento y agregado de 10 ml de metanol. No fue posible determinar la conversión de la reacción.

2.5.4 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA), LINEAL Y ESTRELLA: SINTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

La copolimerización radicalaria convencional y RAFT de FIP/NIPAM (FN_L y FN_S, 75/25) se llevó a cabo en solución de tolueno (25 %v/v) térmicamente a 60 °C durante 2 o 4 días, respectivamente. En el primer caso, se colocaron los monómeros en un tubo

de reacción para línea de vacío junto al iniciador, AIBN (40 mM). En el segundo caso, para las reacciones llevadas a cabo bajo un mecanismo radical controlado, RAFT, la relación molar de los reactivos empleados fue: $[M]/[CTA_1]/[AIBN]: 3042/2,3/1$, donde la $[M]$ representa la concentración molar total de los monómeros. En ambos casos, se colocaron los tubos de reacción con los correspondientes reactivos mencionados, en la línea de vacío y se realizaron 3 ciclos de congelamiento y evacuación del oxígeno remanente.

También se sintetizaron copolímeros en solución, empleando tolueno como solvente y la misma relación molar descrita previamente, aplicando energía de microondas y en atmósfera de nitrógeno, con la finalidad de obtener el mejor sistema para este tipo de reacciones.

Los polímeros fueron aislados por agregado de hexano y purificados 2 veces por disolución/precipitación en cloroformo/hexano (1/10). La conversión de la reacción se determinó gravimétricamente y la caracterización de los polímeros obtenidos se realizó por SEC, FT-IR, $^1\text{H-RMN}$ y TGA.

2.5.5 POLI (FUMARATO DE DI-2-OCTILO-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA), LINEAL: SÍNTESIS, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis de los copolímeros de FDO y NIPAM (DFN) se realizó en diferentes condiciones de reacción con el fin de evaluar y seleccionar las mejores variables de síntesis y así obtener un copolímero adecuado para diseñar un biomaterial con aplicación en ingeniería de tejidos. Los DFN se obtuvieron mediante polimerización radicalaria convencional térmica, a 60 °C, en diferentes atmósferas (nitrógeno y vacío), variados tiempos de reacción (2, 3 y 4 días), empleando diferentes iniciadores radicalarios (AIBN y MAIB), en masa, en solución (tolueno y THF) y a distintas relaciones molares de monómeros (FDO/NIPAM: 70/30, 60/40, 50/50, 45/55, 40/60, 30/70). Los procedimientos experimentales utilizados fueron los mismos que han sido descriptos para polimerizaciones anteriores.

La purificación consistió en disolución/precipitación en cloroformo/hexano y/o metanol (1/10) según la composición de comómeros empleada.

Los DFN obtenidos se caracterizaron mediante SEC, FT-IR, ^1H -RMN, TGA y DSC.

2.6 COPOLÍMERO EN BLOQUE

2.6.1 POLIFUMARATO de DI-2-OCTILO-b-POLIN-ISOPROPILACRILAMIDA, LINEAL

La síntesis del copolímero en bloque se realizó mediante 2 rutas. La primera, consistió en utilizar como macro-CTA el polifumarato de di-2-octilo lineal sintetizado previamente y en la segunda, se partió del poliN-isopropilacrilamida lineal como agente RAFT. Ambos procedimientos se llevaron a cabo en una línea Schlenk a través del mecanismo RAFT. En un tubo de vidrio Pyrex de 10 ml se colocaron en cada caso el macro-CTA correspondiente, el iniciador radicalario MAIB, y el monómero (NIPAM en la primera ruta y FDO en la segunda) en una relación molar de 1:0,2:500, respectivamente. Ambas síntesis se realizaron en solución de tolueno (25 %v/v). Se efectuaron 6 ciclos de congelamiento y evacuación, luego se dejó reaccionar durante 24 h en un baño termostático a 60 °C. La reacción se detuvo por enfriamiento y agregado de 10 ml de hexano. No fue posible determinar la conversión de reacción.

2.7 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DEL AGENTE DE TRANSFERENCIA DE CADENA Y LOS HOMO- O COPOLÍMEROS OBTENIDOS

2.7.1 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

El peso molecular promedio en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (IP) de los diferentes polímeros sintetizados, se determinaron mediante cromatografía de exclusión molecular (*Size Exclusion Chromatography*, SEC). Se utilizó un equipo de HPLC

que consta de una bomba LKB-2249, inyector y un set de cuatro columnas en serie, μ -Styragel que cubren un rango de pesos moleculares entre 500 y 10^6 g/mol. El solvente de elusión fue cloroformo (99,99 % (ASC), J.T. Baker) en el cual también se prepararon las soluciones a inyectar en concentraciones variadas entre 10 y 30 mg/ml. Las mismas se prepararon con 24 horas de antelación a ser cromatografiadas y se mantuvieron con agitación durante ese tiempo. La velocidad de flujo empleada fue de 0,5 ml/min y el análisis se realizó a temperatura ambiente. Se emplearon dos detectores en serie: uno UV-Vis Shimadzu SPD-10A seleccionado a una longitud de onda de 254 nm, que permite evidenciar el monómero residual, así como aquellos polímeros con grupos funcionales aromáticos. El otro detector es un infrarrojo Miram IA seleccionado a $5,75 \mu\text{m}$, frecuencia característica del grupo carbonilo presente como sustituyente a lo largo de la cadena de polímeros acrílicos, metacrílicos, fumáricos, entre otros [Cortizo et al., 1989]. La calibración se realizó a partir de estándares de polimetacrilato de metilo o poliestireno (Polymer Laboratories y Polysciences, Inc), utilizando acetato de etilo o triclorobenceno como estándar interno, según el detector empleado.

2.7.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

El análisis de los grupos funcionales se realizó mediante espectroscopía infrarroja con transformadas de Fourier (FT-IR) empleando un equipo Shimadzu FT-IR (IR Affinity-S1)), entre 4000 y 400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} y 40 scans de acumulación. Para este ensayo, se preparó una solución del polímero en cloroformo (10 %p/v) y se depositó sobre una pastilla de cloruro de sodio, con posterior evaporación del disolvente a temperatura ambiente y secado en estufa. En el caso del monómero N-isopropilacrilamida, la medida se hizo en estado sólido, utilizando la técnica "Drifts" (Reflectancia Difusa), disponible en el equipo. Para ello se trituraron 10 mg de la muestra seca en un mortero con aproximadamente 0,30 gramos de bromuro de potasio y se depositó la mezcla en una cápsula de aluminio. Los análisis de los espectros se efectuaron mediante el software EZ-OMNIC 7.4.127 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA).

2.7.3 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La identificación estructural y la composición de los copolímeros, calculada a partir de los desplazamientos de los distintos tipos de hidrógenos presentes en los comonomeros, se realizó utilizando Resonancia Magnética Nuclear de Protón (^1H -RMN). Las muestras se analizaron empleando un equipo Bruker Avance Neo 500, previamente solubilizadas en cloroformo- d_3 . Se usó tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

2.7.4 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO Y ANÁLISIS TERMOGRAVIMÉTRICO

El estudio del comportamiento térmico de los copolímeros sintetizados, se realizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y análisis termogravimétrico (TGA). Se determinó la temperatura de transición vítrea (T_g), parámetro que caracteriza el cambio entre el estado amorfo y el elastomérico de una muestra polimérica, empleando un equipo de DSC Shimadzu-TA60. Las medidas se realizaron colocando 5-10 mg de la muestra en una cápsula de aluminio. Con el fin de borrar el historial térmico, se realizaron 2 ciclos de calentamiento/enfriamiento a una velocidad de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde $-50\text{ }^\circ\text{C}$ a $200\text{ }^\circ\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno ($30\text{ ml}/\text{min}$). Para calcular la T_g se empleó la curva correspondiente al segundo ciclo de calentamiento.

La estabilidad térmica de los copolímeros, se estudió mediante análisis termogravimétrico (TGA). Se empleó un equipo Q500-TA y una rampa de calentamiento desde temperatura ambiente hasta $700\text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, aplicando un flujo de nitrógeno de $90\text{ ml}/\text{min}$. A partir de los termogramas fue posible determinar la temperatura inicial de descomposición (TID) y la temperatura de descomposición máxima de cada etapa del proceso (T_{max}).

2.7.5 CROMATOGRAFÍA GASEOSA – ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis se realizó empleando un cromatógrafo de gases SHIMADZU QP2010 con detector de masas (CG-MS). Como gas portador se empleó hidrógeno. La columna utilizada fue SPB1 de 24,0 m x 0,25 mm x 0,10 μm . El programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial 120 °C, se incrementó la temperatura a 5 °C/min hasta 165 °C, se realizó otro aumento a 14 °C/min hasta 280 °C, por último, se mantuvo constante a 280 °C. Todas las muestras inyectadas fueron corridas en el modo de control de iones totales (TIC). La muestra a analizar fue disuelta en acetato de etilo en una proporción 1 en 100.

2.8 OBTENCIÓN DE MEMBRANAS

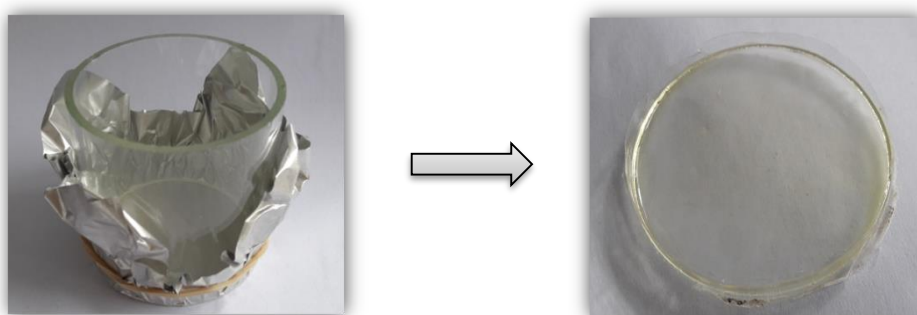
Las películas se elaboraron mediante los métodos de *solvent-casting* y *electrospinning*. El primero, consiste en disolver un polímero en un solvente adecuado, colocar la solución obtenida en un molde y finalmente evaporar el solvente, permitiendo así la formación de un film. Por otro lado, la técnica de *electrospinning*, a través de la utilización de un campo eléctrico, permite la obtención de *scaffolds* fibrosos [Li & Xia, 2004]. Para ello, se deben ajustar ciertos parámetros como el flujo, volumen a depositar, el potencial eléctrico, concentración y solvente a utilizar de la solución del polímero, diámetro de la aguja, distancia entre aguja y colector.

2.8.1 MEMBRANAS DE POLI(FIP-co-OEGMA), LINEAL (FO_L) O ESTRELLA (FO_S)

Las membranas de FO_L o FO_S se obtuvieron a partir de la técnica de *solvent-casting*, previamente descrita [Mukherjee et al., 2005] empleando como sostén una membrana de alcohol polivinílico (PVA) sobre la cual se depositó una solución del copolímero.

La preparación de las membranas consistió en la utilización de secciones de tubos de vidrio (4,7 cm de diámetro interno y 5 cm de altura) como moldes, cuyas bases fueron recubiertas previamente con papel aluminio. Sobre cada una de estas se formó una

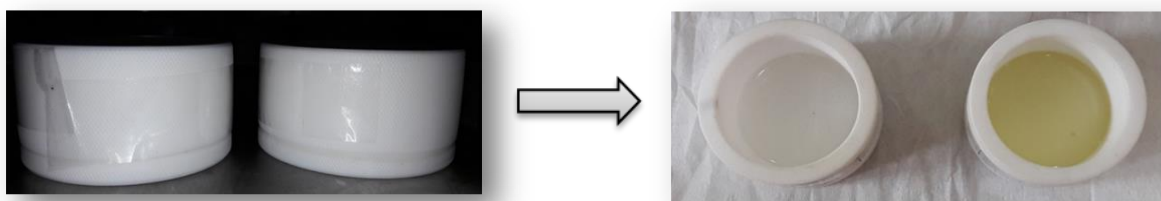
película de PVA (Merck, 72000, grado de hidrolisis >98 %) a partir de una solución 6 %p/v en una mezcla agua/etanol 90/10. Posteriormente, sobre la membrana de PVA previamente formada, se depositó una solución del copolímero de 6 %p/v en acetato de etilo (99,9 %, Anedra) (Esquema 2.8.1). Una vez vertida la solución en el molde, el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente durante 24 h. Las trazas de solvente fueron eliminadas por secado en tambor de vacío hasta peso constante de las membranas.



Esquema 2.8.1. Obtención de las membranas de FO_L Y FO_S

2.8.2 MEMBRANAS DE POLI(FIP-co-NIPAM), LINEAL (FN_L) Y ESTRELLA (FN_S)

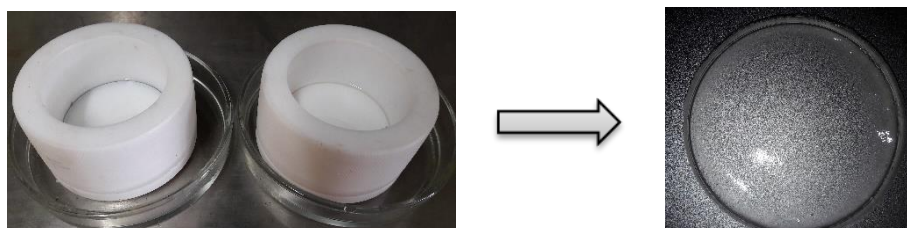
Las membranas de Poli(FIP-co-NIPAM) lineal y estrella (FN_L y FN_S, respectivamente) se prepararon mediante la técnica de *solvent-casting* colocando una solución al 5 %p/v del copolímero en cloroformo sobre moldes de teflón (Esquema 2.8.2), se dejó evaporar el solvente durante 24 h a temperatura ambiente y luego se llevaron a peso constante en tambor de vacío.



Esquema 2.8.2. Obtención de las membranas FN_L y FN_S

2.8.3 MEMBRANAS DE POLI(FDO-co-NIPAM) (DFN)

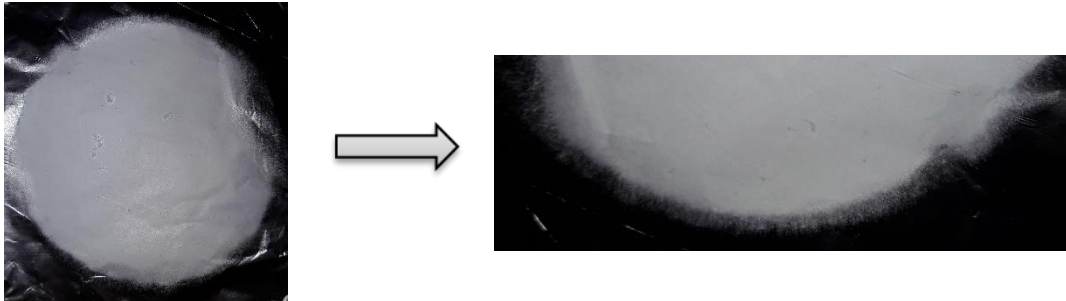
Se obtuvieron membranas de Poli(FDO-co-NIPAM) (DFN) por el método de *solvent-casting*, para ello se volcó una solución del copolímero al 10 %p/v en cloroformo sobre un molde de teflón, se dejó evaporar durante 6 h a temperatura ambiente y se secó en tambor de vacío (Esquema 2.8.3.a).



Esquema 2.8.3.a. Preparación de las membranas DFN por el método de *solvent casting*.

También se obtuvieron membranas de estos copolímeros por la metodología de *electrospinning*. En este caso, se cargó en una jeringa (Rymco) 5 ml de una solución del copolímero con una concentración de 5 %p/v en cloroformo, se adosó a la misma una aguja hipodérmica (Neojet) con punta roma (21 G de calibre). Posteriormente se seleccionó en la bomba de infusión un flujo de 2 ml/h y un volumen de 2,5 ml por membrana. La distancia entre la aguja y la placa que contiene el papel aluminio donde

se depositarán las fibras fue de 10 cm. Por último, se conectó el terminal positivo del potencióstato en la punta de la aguja y el negativo en el borne que contiene la placa metálica y se aplicó una diferencia de potencial de 12 kv.



Esquema 2.8.3.b. Preparación de las membranas DFN por el método de *electrospinning*. Imagen izquierda (membrana completa) e Imagen derecha (zoom de la membrana).

2.9 CARACTERIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS

La caracterización de las membranas se realizó con la finalidad de seleccionar un material cuyas propiedades resulten apropiadas para ser empleado como *scaffold* para su posterior aplicación en ingeniería de tejido óseo. Se llevaron a cabo los siguientes estudios.

2.9.1 APARIENCIA Y MORFOLOGÍA

La apariencia macroscópica de las películas se determinó a través de la observación visual y el espesor de las mismas fue determinado empleando un micrómetro Mahr (MarStand 821 FG/NG). La morfología de la superficie se analizó, en primer lugar, mediante el uso de microscopio de epifluorescencia Olympus BX51, conectado a una cámara digital a color Olympus DP73. Con el objetivo de analizar en mayor detalle la topografía superficial se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM), con un equipo Philips 505 (The Netherlands), y una aceleración de voltaje de 20 kV. En este caso las muestras fueron previamente metalizadas con oro para realizar la observación.

2.9.2 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA CRÍTICA DE TRANSICIÓN (T_c) DE LAS MATRICES DFN POR DSC

La técnica de DSC se utilizó también para medir la temperatura crítica de transición (T_c) de los polímeros DFN que contienen NIPAM como comonomero. Para ello se castearon los polímeros en la cápsula de aluminio propias del equipo y luego fueron hinchados durante 24 h en agua destilada. La medida se realizó, sometiendo a la muestra a 2 ciclos de calentamiento/enfriamiento a una velocidad de 1 °C/min desde 15 °C a 60/80 °C [Pei et al, 2004].

2.9.3 DETERMINACIÓN DEL T_c POR TRANSMITANCIA

La T_c de transición de las membranas de DFN también se determinó empleando un espectrofotómetro UV-Visible (PG Instruments T60) y una celda de cuarzo de 1 cm. Para ello se colocó en la celda de cuarzo, 1 ml de agua destilada y una sección de membrana del polímero a estudiar de 0,8 cm de ancho y 2,5 cm de largo, luego, el sistema fue calentando a una velocidad de 1 °C/min empleando un baño termostático lauda y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm [Qin et al., 2006] desde 15 °C hasta 60 °C.

2.9.4 ESTUDIO DE HINCHAMIENTO

La capacidad máxima de hinchamiento y absorción de agua del material se determinó mediante el siguiente procedimiento: se pesaron (w_0) porciones de membrana previamente secadas en tambor de vacío hasta peso constante y posteriormente se sumergieron en solución salina de buffer fosfato (PBS, 0,01 M, pH = 7,4) a 25, 37 y 50 °C (con el objetivo de estudiar temperaturas por encima y debajo de la T_c , y debido a la aplicación buscada también se realizó el ensayo a la temperatura corporal) para las membranas obtenidas a partir de Poli(FDO-co-NIPAM). A intervalos regulares de tiempo, se retiraron las películas, se secaron superficialmente con papel tisú y se pesaron nuevamente en estado húmedo (w_s). El contenido de agua absorbida

por la película se calculó como la diferencia entre w_s y w_0 , mientras que el porcentaje de hinchamiento (*swelling*, S_w) se definió como sigue (Ecuación 2.9.4.a).

$$\%S_w = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (2.9.4.a)$$

El mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de transporte de agua a través de la película se estimó analizando los datos experimentales mediante el empleo del modelo de Ritger-Peppas [Ritger & Peppas, 1987] utilizando la Ecuación 2.9.4.b.

$$\frac{W_t}{W_\infty} = k t^n \quad (2.9.4.b)$$

donde W_t y W_∞ representan la cantidad de agua absorbida en el tiempo t y en el tiempo de equilibrio, respectivamente; k es una constante particular del sistema, que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el solvente y n es el exponente cuyo valor es indicativo del tipo de mecanismo mediante el cual se desarrolla el transporte del medio hacia la matriz polimérica. Para el análisis de los datos experimentales, se aplica el logaritmo a ambos lados de la Ecuación 2.9.4.b, obteniéndose la siguiente expresión:

$$\log \left(\frac{W_t}{W_\infty} \right) = \log k + n \log t \quad (2.9.4.c)$$

Así es posible obtener n como la pendiente de la recta $\log (W_t/W_\infty)$ vs $\log t$, mientras que k se obtiene a partir de la ordenada al origen, intersección del gráfico. Esta ecuación se aplica hasta el 60 % del hinchamiento máximo.

En la Ecuación 2.9.4.c el valor numérico de n proporciona información sobre el mecanismo de transporte de un soluto. Para la geometría plana, un valor de $n = 0,5$ se

corresponde con la cinética de Fick, donde la velocidad de difusión del soluto es el proceso limitante, mientras que un valor de $0,5 < n < 1$ indica un proceso de difusión no Fickiano en el que la relajación de las cadenas poliméricas determina la velocidad de absorción del soluto. El caso límite (denominado transporte de Caso II en el que $n = 1$) corresponde a condiciones en las que la velocidad de difusión del soluto es superior a la velocidad de relajación de la cadena del polímero; en esta condición, la tasa de captación de masa es directamente proporcional al tiempo.

2.9.5 ÁNGULO DE CONTACTO

Con el fin de conocer la hidrofobicidad de las distintas membranas poliméricas preparadas, se realizaron medidas de ángulo de contacto sobre las matrices. Para ello, se dejó caer una gota de agua destilada sobre las películas y se utilizó una cámara Nikon para capturar las imágenes de la misma. El ángulo de contacto se calculó por análisis de las imágenes a través del uso de un complemento perteneciente al programa Image J, llamado *Drop analysis*. El ángulo de contacto estático medio se determinó, realizando el promedio de 4 medidas, tomado al menos 6 imágenes distintas por cada muestra. Las gotas sobre las membranas fueron fotografiadas manteniendo dicha membrana a 25 °C y, en algunos casos a 50 °C (membrana DFN, por lo explicado en la sección previa).

2.9.6 PRUEBAS MECÁNICAS

Con el objetivo de analizar las propiedades mecánicas de las películas, se realizaron pruebas de tracción sobre las membranas. Para tal fin se empleó una máquina de ensayo universal (DigimesstC500), utilizando una celda de carga ('Interface' de Arizona, EE.UU.), capacidad de 50 N a temperatura ambiente. Previo a la medida, las membranas se sumergieron en PBS (0,01 M, pH=7,4) durante 5 h (equilibrio máximo de hidratación de las membranas) [La Gatta et al., 2009]. Las muestras se cortaron en probetas rectangulares de un tamaño aproximado de 35 mm de longitud, 13 mm de ancho y espesor de 0,25 mm. Las medidas se realizaron a una velocidad de 5 mm/min hasta el punto de rotura. La máxima resistencia tensil, el módulo elástico (Módulo de Young) y

la elongación al quiebre se calcularon sobre la base de las curvas de tensión vs deformación generadas con el programa del equipo.

2.10 ENSAYOS DE BIOCOMPATIBILIDAD Y CITOTOXICIDAD IN VITRO

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

2.10.1 CULTIVOS CELULARES

2.10.1.1 CÉLULAS PROGENITORAS DE MÉDULA ÓSEA

Las células progenitoras de médula ósea (CPMO) se obtuvieron a partir de la extracción de las mismas del canal medular de fémures de ratas Sprague-Dawley machos de 3 meses de edad. Para ello, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical bajo anestesia, se disecaron los fémures y se lavaron en alcohol 70°. Luego, en el flujo laminar se cortaron las epífisis en condiciones de esterilidad a fin de exponer el canal medular, al cual, mediante el uso de una jeringa, se hizo fluir medio de cultivo esencial modificado por Dubelcco (DMEM) suplementado con 10 % de SFB, penicilina (100 UI/l) y estreptomicina (100 mg/l) (medio basal). La suspensión obtenida se recogió en tubos estériles y se plaqueó en frascos de cultivo celular de 25 cm² manteniéndose en estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37 °C, en una atmósfera humidificada conteniendo 5 % CO₂ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las células no

adheridas fueron removidas aspirando el medio de cultivo, y adicionando medio nuevo, el cual fue renovado tres veces por semana hasta que las células llegaron a confluencia (aproximadamente 10 días). A continuación, la monocapa celular se despegó usando 0,025 %p/v de tripsina en PBS/EDTA (1 mM) y las células transferidas a frascos de 75 cm² [Molinuevo et al., 2010]. Una vez que las células llegaron a confluencia en estos frascos, se plaquearon sobre las películas, previamente esterilizadas por exposición a UV y colocadas en platos de cultivo multipocillos, para realizar los diferentes experimentos, y se colocaron en la estufa de cultivo.

2.10.1.2 CÉLULAS RAW 264.7

Las células RAW 264.7 (ATCC TIB-71) son una línea celular establecida de morfología monocítica, derivada de macrófagos murinos (*Mus musculus*) obtenidos a partir de un tumor inducido por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon [Raschke et al., 1978]. Se utilizó esta línea celular de monocitos dado que responden a diversos agentes tóxicos expresando distintos marcadores de citotoxicidad, tales como la síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) y son capaces de diferenciarse hacia macrófagos con alta capacidad fagocítica [Denlinger et al., 1996]. Esta línea celular constituye un excelente modelo biológico para estudios *in vitro* de citotoxicidad y degradación de distintas sustancias, por lo que han sido ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio para tales fines. Para su uso, las células RAW 264.7 se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm² a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂, en DMEM suplementado con 10 % de SFB, penicilina (100 UI/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Para realizar los subcultivos, las células se despegaron del frasco en el cual crecieron, usando PBS-EDTA (1 mM) y se resuspendieron en DMEM con 10 % SFB.

2.10.2 VIABILIDAD CELULAR

Para estudiar la viabilidad sobre las películas obtenidas se realizaron ensayos de adhesión y proliferación con las células CPMO y RAW 264.7. La viabilidad celular se

evaluó mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol) a diferentes tiempos. El MTT es un compuesto amarillo soluble en agua que, en las células viables se reduce metabólicamente por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a un formazán azul-violeta, insoluble en agua. A fin de cuantificarlo se lo solubiliza en dimetilsulfóxido (DMSO). La actividad mitocondrial de las células tratadas correlaciona con la intensidad de color determinada por medidas espectrofotométricas del formazán eluido y es directamente proporcional al número de células viables [Grillo et al., 2010]. Para este ensayo las diferentes membranas se cortaron con un sacabocado de 0,8 mm de diámetro, se depositaron sobre platos de 48 pocillos y se esterilizaron con UV durante 15 minutos de cada lado. A continuación, se plaquearon las células sobre las matrices, 1 ml por pocillo de las células resuspendidas en DMEM con o sin rojo fenol 1 % SFB en el caso de las células RAW y 10 % SFB para las CPMO a 37 °C, 5 % de CO₂ y atmósfera húmeda, durante 2 h para estudiar la adhesión celular y durante 24 y 48 h para evaluar la proliferación celular. Al final de cada periodo de cultivo se retiró el medio y se reemplazó en cada pocillo por 1 ml de medio conteniendo MTT (0,1 mg/ml), incubando las células durante 2 h adicionales. Luego se descartó el sobrenadante, se lavó con PBS y, por último, se agregaron 200 µl de DMSO a cada pocillo para la lisis celular y la disolución del formazán, dejando en agitación durante 10 min. A continuación, 100 µl del extracto se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector automático de placa de ELISA (Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland). Los datos para este ensayo son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie luego de transcurridas 2 horas desde el inicio del ensayo.

También, se determinó la viabilidad celular de los macrófagos mediante conteo de células a través del programa Image J de fotos tomadas con el microscopio Eclipse T100 (Nikon), al cual se le adaptó una cámara CCD con lente Nikon 0,7x DMX. El procedimiento consistió en cultivar células RAW sobre las membranas en una placa de 24 pocillos durante 24 h, pasado este período las células se lavaron con PBS, se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa [Cortizo et al., 2012]. Por último, se realizó la observación al microscopio (Nikon Eclipse TS100).

2.10.3 MORFOLOGIA CELULAR

El estudio de la morfología celular y su interacción con los distintos *scaffolds* se realizó a través del uso de diferentes microscopías. Para ello, en el caso de los macrófagos crecidos sobre las membranas FO y FN se realizó tinción con Giemsa a través del procedimiento descrito en la sección anterior durante 24 h de cultivo y se observó la morfología de los mismos en un microscopio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100).

Por otro lado, se analizó la interacción de las células con las membranas a través de microscopía SEM. Para ello, las células RAW y CPMO se cultivaron durante 24 h, se lavaron con PBS, se fijaron con p-formaldehído 10 % durante 10 min, se deshidrataron con etanol o metanol, se secaron con calor e inmediatamente después se metalizaron con oro para su observación en un equipo Phillips 505 (The Netherlands).

La morfología de las CPMO y su interacción con los *scaffolds* se investigó mediante microscopía de fluorescencia. Para tal fin, se realizó la tinción de F-actina: luego de 2 y 24 horas de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con p-formaldehído al 4 %/PBS a temperatura ambiente durante 10 min y se permeabilizaron con etanol al 100 % durante 4 minutos a -20°C . La solución stock en metanol de Alexa Fluor 488 Faloidina (495/518 nm Life Technology) se diluyó en PBS (1:100) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, para la tinción de las fibras de F-actina. Los núcleos fueron visualizados por Hoechst 33,258 mediante contratinción durante 5 minutos (338/505 nm, Sigma Aldrich). Las muestras se examinaron mediante microscopía de fluorescencia en microscopio invertido equipado con conjuntos de filtros apropiados, conectados a una cámara digital en color (Olympus, Tokio, Japón). Las fotografías se tomaron con un objetivo de 40X y se analizaron con el software Image J. También se obtuvieron fotografías de las fibras de F-actina en microscopio confocal (Leica TCS SP5).

2.10.4 CITOTOXICIDAD

La citotoxicidad de las películas se evaluó utilizando células RAW264.7 que fueron plaqueadas en platos de 48 pocillos con y sin membrana (control de células sobre el

plástico, TCP, *Tissue Culture Plastic*), junto a un control positivo de citotoxicidad que se basa en agregar 10 µl de lipopolisacárido (LPS, polímero proveniente de la pared bacteriana) en medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con 5-10 % de SFB, penicilina (100 UI/ml), estreptomina (100 µg/ml). La placa se incubó a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % CO₂. El medio condicionado se retiró a diferentes tiempos (24 y 48 h) para analizar la producción de óxido nítrico (NO) y los niveles de citoquinas. El procedimiento de agregado de las membranas en la placa es el mismo descrito para viabilidad celular (sección 2.10.2).

2.10.4.1 PRODUCCIÓN DE NO

El óxido nítrico (NO) es un efector de la respuesta inmune innata, producido por la enzima NO sintasa inducible (iNOS) de los macrófagos en respuesta a la presencia de diversos patógenos [Lowenstein & Padalko, 2004]. Para medir la liberación de NO hacia el medio de cultivo por los macrófagos RAW264.7, se empleó el método de Griess [Fernández et al., 2014]. Para ello, se incubaron dichas células sobre las películas en medio de cultivo DMEM sin rojo de fenol en los platos de 48 pocillos durante 24 y 48 horas. Este método utilizó como agente de diazotación ácido sulfanílico (1 %p/v en ácido Fosfórico al 5 %, Reactivo A) y como agente de acoplamiento el N-1-naftilendiamina (0,1 %p/v en agua destilada, Reactivo B). La reacción se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de reactivo A y reactivo B; luego esta mezcla se adicionó en relación 1:1 al medio condicionado y se midió la absorbancia a 550 nm en el un espectrofotómetro UV-Vis (PG Instruments T60). Para este ensayo se utilizó una curva de calibración empleando como patrón nitrito de sodio (NaNO₂, Biopack, Bs. As., Argentina).

2.10.4.2 PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS

La liberación de interleuquina 1β (IL1β) hacia al medio de cultivo por las células RAW 264.7 se evaluó mediante la técnica de ELISA. Para la medida de esta citoquina se utilizó el kit comercial: Mouse IL-1β ELISA kit para IL1β (BD Biosciences OptEIA™) utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (kits TMB substrate Reagent Set, BD Biosciences

OptEIA™) como sustrato cromógeno de la reacción de ELISA. La liberación de citoquinas se midió en los medios de cultivo luego de 24 y 48 h, de acuerdo a las instrucciones del kit. Los resultados se midieron empleando un lector de placas de ELISA automático (Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland).

2.10.5 ESTUDIOS DE DEGRADACIÓN

Para el estudio de la degradación de las películas por acción de macrófagos, se tomaron membranas previamente pesadas y secas, y se sumergieron en placas de 6 pocillos en medio de cultivo DMEM. Luego de su hidratación, se plaquearon los macrófagos RAW 264.7 y se cultivaron en DMEM suplementado con 1 % de suero fetal bovino en estufa de cultivo (Incubator HF 151 UV Heal Force®) a 37 °C, en una atmósfera humidificada conteniendo 5 % CO₂ durante de 7 y 14 días. Transcurrido este tiempo se realizó la lisis celular con Tritón x100 al 0,1 %v/v en agua destilada. Las muestras se lavaron reiteradas veces con agua destilada y se secaron en tambor de vacío hasta peso constante. Para evaluar la degradación se comparó el peso inicial seco (W_0), con el peso final seco (W_d), utilizando la Ecuación 2.10.5:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{(w_0 - w_d)}{w_0} \times 100 \quad (2.10.5)$$

Se realizó el mismo procedimiento con membranas que fueron incubadas en ausencia de células en medio DMEM-1 %SFB, con la finalidad de comparar esta degradación con la observada por acción de la capacidad fagocítica de los macrófagos en la degradación del material.

2.10.6 INDUCCION OSTEOGÉNICA

2.10.6.1 DIFERENCIACIÓN HACIA EL FENOTIPO OSTEOBLÁSTICO

Para los estudios de diferenciación se utilizó medio basal suplementado con 25 mg/ml de ácido ascórbico y 5 mM de β -glicerofosfato de sodio (medio osteogénico), de modo de inducir la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico. El β -glicerofosfato actúa como sustrato de la fosfatasa alcalina para producir depósitos de mineral, y funciona de forma sinérgica con el ácido ascórbico, un cofactor necesario para la síntesis de colágeno, promoviendo la expresión del fenotipo osteoblástico [Quarles et al., 1992].

Para ello, las células CPMO en medio basal (10 % SFB-DMEM) se plaquearon en platos de 24 pocillos estériles con una densidad de 5×10^4 células por pocillo en medio basal y se cultivaron a 37 °C en 5 % de CO₂ en atmósfera húmeda. Una vez que alcanzaron un 70-80 % de confluencia se reemplazó el medio basal por medio osteogénico, el cual se renovó 3 veces por semana.

La capacidad osteogénica de las células CPMO creciendo sobre las películas se evaluó a través de la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y la producción de nódulos de mineralización mediante métodos colorimétricos.

2.10.6.1.1 ACTIVIDAD DE FOSFATASA ALCALINA

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL), se evaluó a partir del extracto celular obtenido de las células CPMO diferenciadas sobre las películas durante 15 días en medio osteogénico. Al final de este período de cultivo, se descartó el medio, se lavó con PBS y se lisaron las células con 300 μ l Triton x100 (Sigma-Aldrich) 0,1 %v/v en agua destilada. Aproximadamente 250 μ l del extracto celular obtenido se utilizó para evaluar la actividad de la FAL por un método colorimétrico cinético utilizando como sustrato p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma-Aldrich). El producto de hidrólisis, p-nitrofenol, se determinó por absorbancia a 405 nm luego de incubar la mezcla de reacción a 37 °C en buffer glicina (glicina 55 mM, MgCl₂ 0,55 mM, pH=10,5) durante un período de tiempo predeterminado [Fernández et al., 2014]. Por otro lado, los 50 μ l restantes del extracto

se utilizaron para determinar la concentración de proteínas celulares totales por el método colorimétrico de Bradford, determinando la absorbancia a 595 nm (PG Instruments T60 UV/VIS Spectrophotometer), [Bradford, 1976]. Los resultados se expresaron como la actividad específica de FA, nmol p-NP/min/mg proteína.

2.10.6.1.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE NÓDULOS DE MINERALIZACIÓN

Los depósitos de calcio extracelular (nódulos de mineralización) se evaluaron luego de 21 días de cultivo de las células CPMO en un medio de diferenciación osteogénico utilizando la coloración con Rojo de Alizarina S [Ueno et al., 2001]. La monocapa de células se fijó con p-formaldehído al 10 % en PBS durante 10 minutos, se lavó con agua destilada y se coloreó con una solución de Rojo de Alizarina S 2 %p/v en agua destilada (pH = 4,2) durante 10 min. El exceso de colorante se retiró con varios lavados de agua destilada, se tomaron fotos de los nódulos de mineralización sobre las películas en el microscopio Eclipse T100 (Nikon) y, por último, se extrajo el colorante con 0,1 N de NaOH, midiéndose la absorbancia a 548 nm.

2.10.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las comparaciones entre los grupos control y experimental se realizaron mediante Oneway ANOVA empleando el test de Tukey post hoc, usando el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.05 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ para todos los análisis estadísticos. Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM y representan al menos dos experimentos diferentes realizados por triplicado.

CAPITULO III



Resultados & discusión

CAPITULO III



Parte I

Caracterización fisicoquímica
y biológica de matrices basadas
en copolímeros estadísticos con
diferente arquitectura

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DE MATRICES BASADAS EN COPOLÍMEROS ESTADÍSTICOS CON DIFERENTE ARQUITECTURA

En la primera etapa del trabajo, se estudió la síntesis de nuevas familias de copolímeros fumáricos y el efecto de las diferencias estructurales en su comportamiento fisicoquímico y biológico. Para la preparación de los copolímeros se utilizó el método de polimerización radical controlada por adición fragmentación y transferencia de cadena reversible, RAFT. Esta técnica es muy versátil y permite la síntesis de macromoléculas con diferentes arquitecturas, logradas mediante el empleo de diversos tipos de agentes de transferencia de cadena (CTA) que han sido previamente sintetizados. En este caso, se empleó un CTA tetrafuncional (CTA₁) con la finalidad de obtener polímeros con arquitectura ramificada o estrella. Además, se sintetizaron copolímeros con arquitectura lineal utilizando la técnica de polimerización radicalaria convencional. Tanto el CTA como los copolímeros sintetizados fueron caracterizados estructuralmente por técnicas espectroscópicas y térmicas. Posteriormente, a partir de la selección de copolímeros con diferente arquitectura (lineal y estrella) se prepararon matrices que fueron caracterizadas mediante técnicas fisicoquímicas y ensayos biológicos.

3.1.1 PENTAERITRITOL (3-(S-BENCILTRITIOCARBONIL) PROPIONATO): SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis del pentaeritritol (3-(s-benciltritiocarbonil) propionato se realizó bajo las condiciones descritas en la sección 2.3.1. El rendimiento de la síntesis del CTA₁ ramificado fue del 50%.

En la Figura 3.1.1.a se muestran los espectros FT-IR del pentaeritritol(3-mercaptopropionato) (color azul), producto del primer paso de síntesis para obtener CTA₁, cuyo espectro se muestra a continuación (color gris).

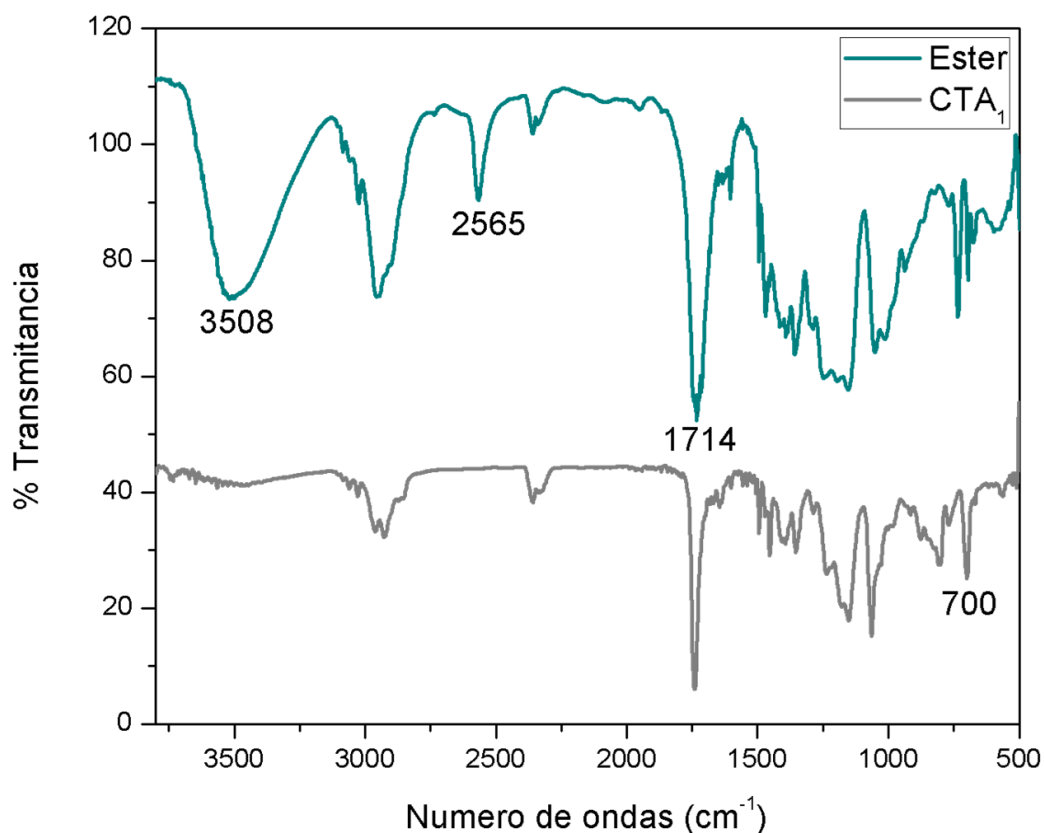


Figura 3.1.1.a. FT-IR del pentaeritritol(3-mercaptopropionato) (color azul) y del CTA₁ sintetizado (color gris).

La caracterización del producto del primer paso de síntesis del CTA₁ se realizó mediante las siguientes señales: 1714 cm⁻¹ correspondiente a la función éster carboxílico, 3508 cm⁻¹ evidencia la presencia de OH⁻, lo que puede deberse a la presencia de reactivo que no haya reaccionado, o a alguna forma incompleta del producto de la primer reacción, 2565 cm⁻¹ correspondiente a la frecuencia de estiramiento S-H perteneciente al grupo tiol, el cual también podría ser un indicativo de que se encuentra presente el producto de interés o exceso de ácido 3-mercaptopropanoico sin reaccionar. En el espectro del CTA₁ puro (etapa 2 de reacción) se observa claramente que no hay presencia de OH⁻ libres y tampoco el grupo -SH, por lo cual la muestra ha sido purificada; por otra parte, se visualiza una señal a una longitud de onda de 700 cm⁻¹, el cual hace

referencia a la frecuencia de estiramiento del grupo C=C del anillo aromático, propio del CTA₁ sintetizado, no observándose en el producto de la primera etapa de reacción.

La identificación del agente de transferencia, pentaeritritol (3-(s-benciltritiocarbonil) propionato, sintetizado se realizó mediante ¹H-RMN, el espectro correspondiente y las asignaciones de las señales sobre la estructura del mismo se presenta en la siguiente figura:

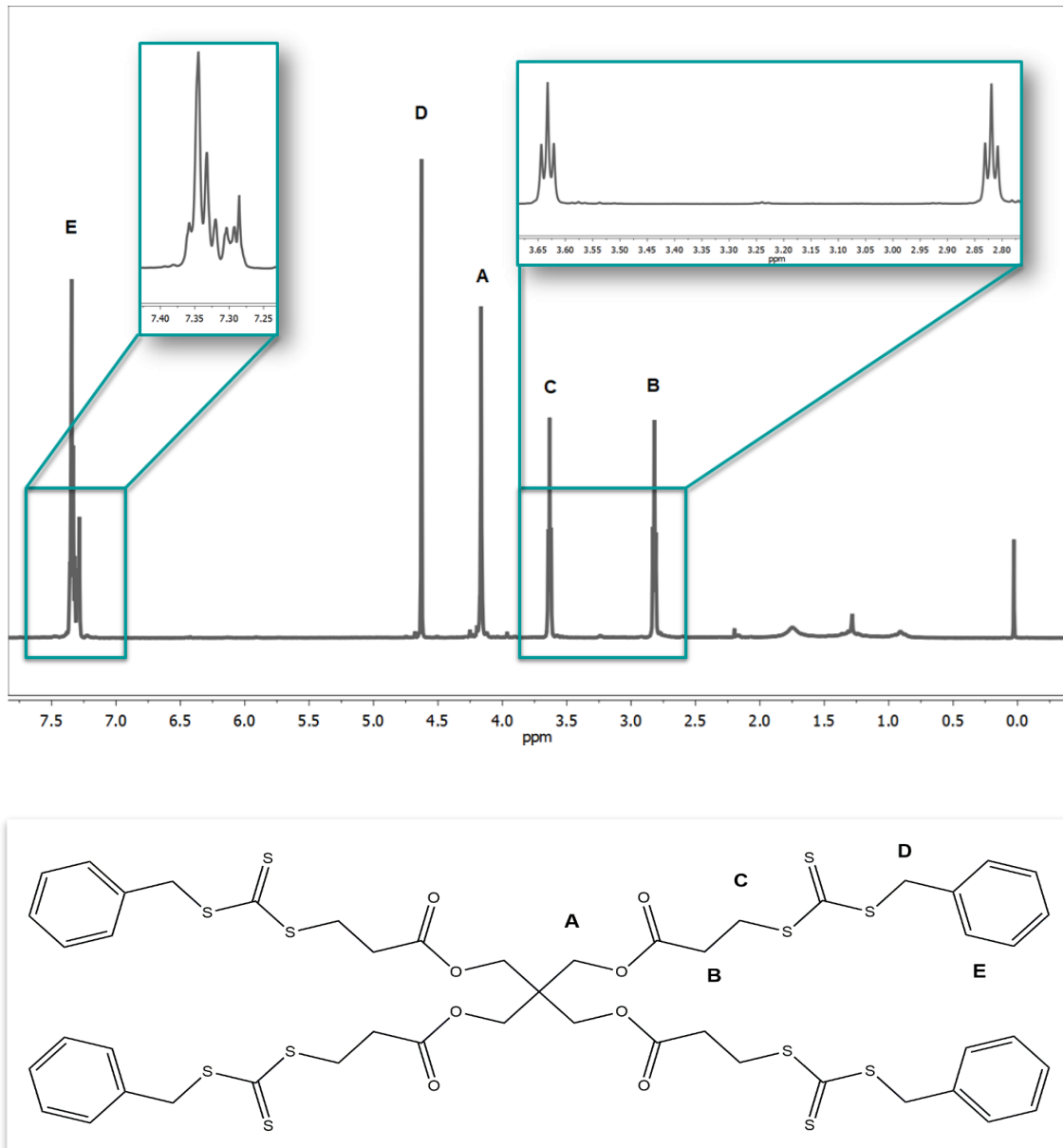


Figura 3.1.1.b. ¹H-RMN y estructura del CTA₁ sintetizado.

En la Figura 3.3.1.b se observa que el CTA₁ ha sido caracterizado, según se detalla en la misma, encontrándose las siguientes señales características de los protones del CTA₁ sintetizado (CDCl₃, δ_H, ppm): 4,19 (-CH₂-COO-, **A**) singlete; 2,81 (-CO-CH₂-, **B**) triplete; 3,63 (-CH₂-S-, **C**) triplete; 4,63 (-S-CH₂-C₆H₆, **D**) singlete; 7,33 (CH anillo aromático, **E**) multiplete.

La caracterización del producto final también se realizó mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-MS). En la Figura 3.1.1.c se muestra el cromatograma correspondiente a la muestra pura.

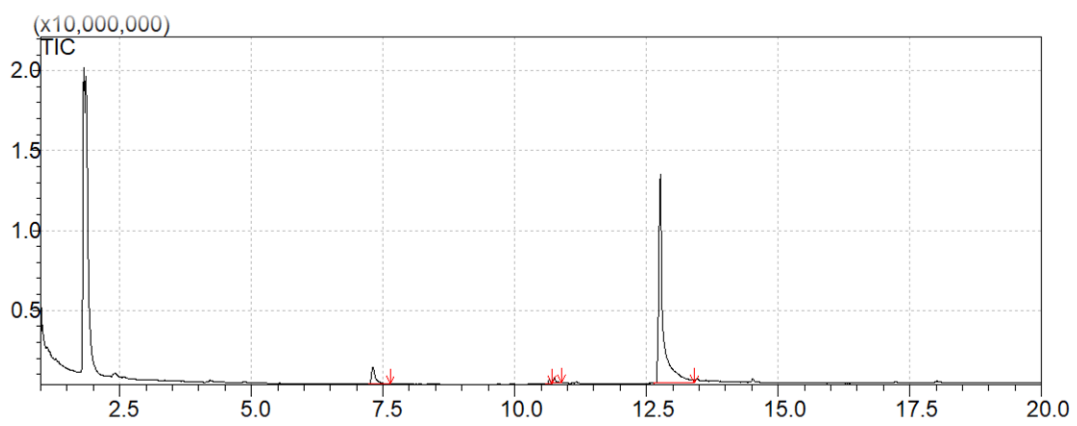


Figura 3.1.1.c. Cromatograma CG-MS.

En la figura 3.1.1.c se observa una señal a un tiempo de retención de 13,4 minutos cuyo espectro de masa se muestra en la figura 3.1.1.d.

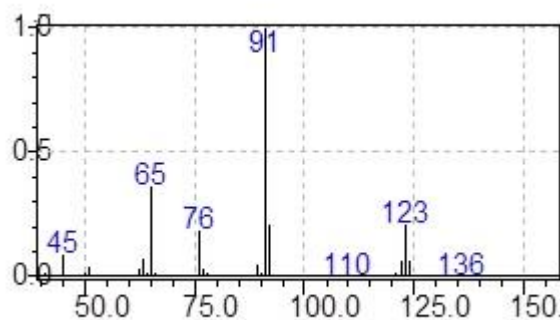
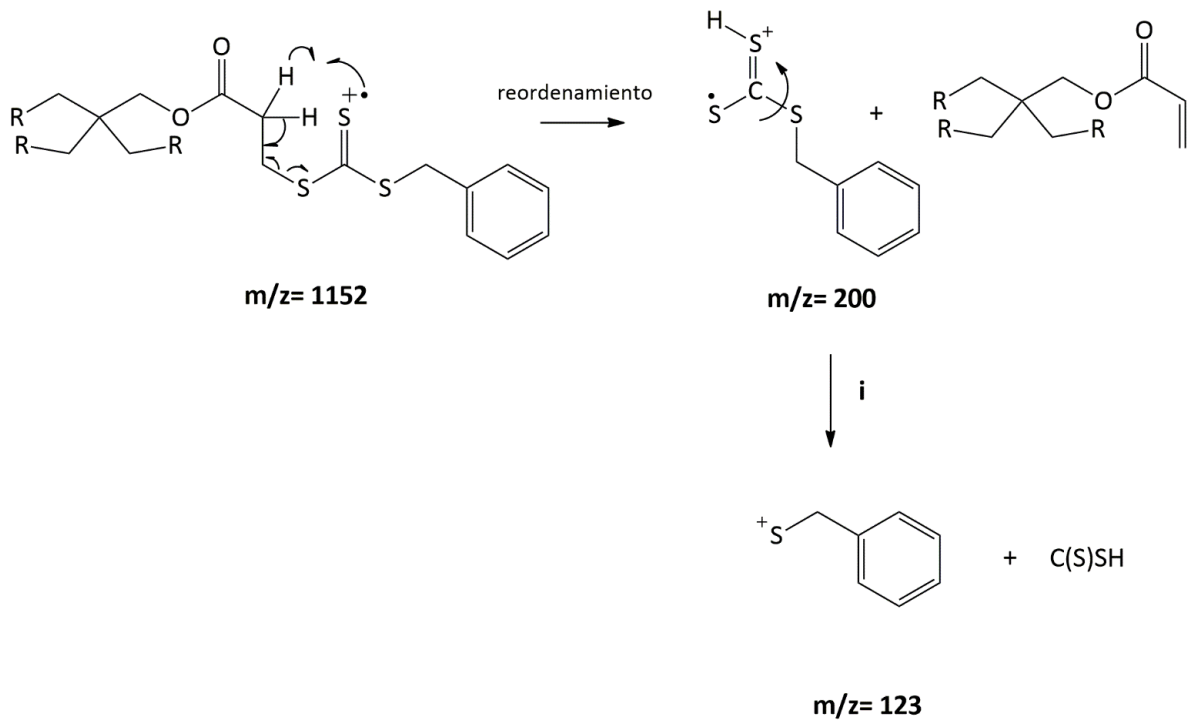
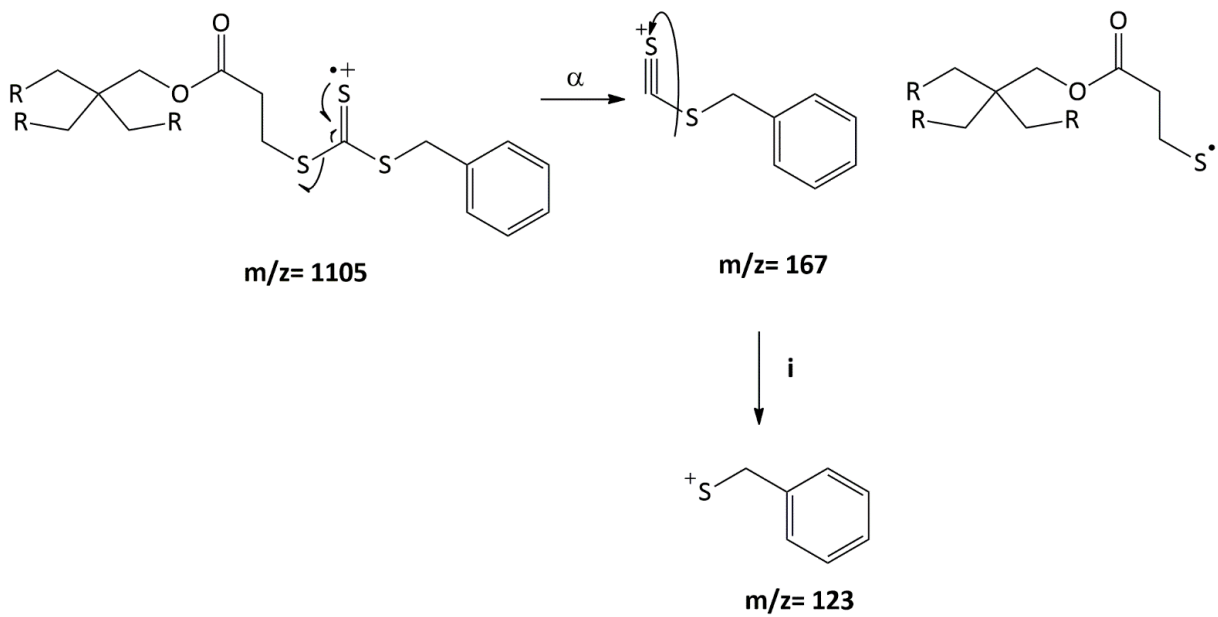


Figura 3.1.1.d. Espectro de Masa correspondiente al tr:13,4 min.

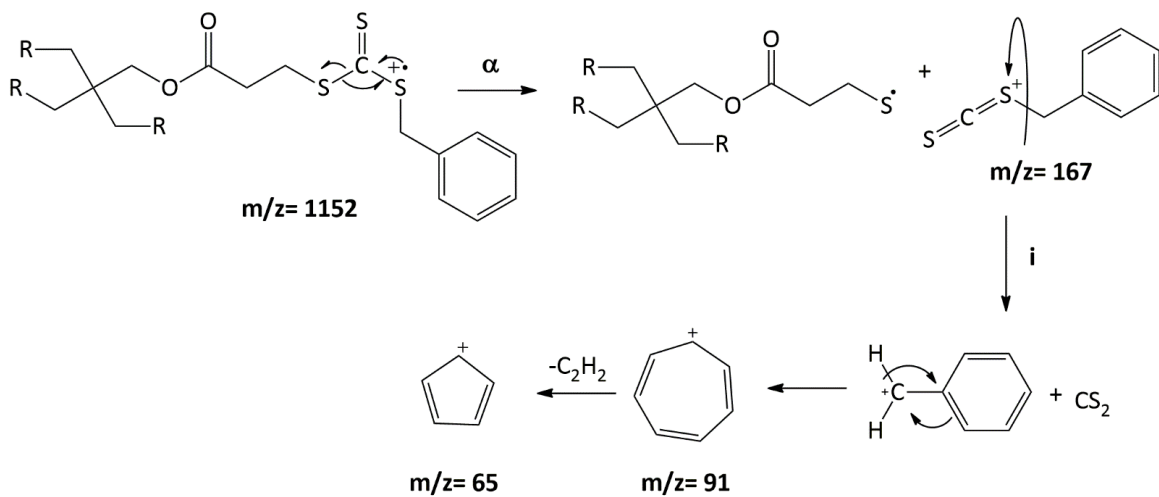
El espectro de masa anterior correspondiente al CTA₁ sintetizado, presenta las señales características de la fragmentación de la molécula, las cuales se muestran en el esquema 3.1.1.a.



Esquema 3.1.1.a Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA₁ sintetizado



Esquema 3.1.1.b. Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA₁ sintetizado.



Esquema 3.1.1.c. Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA₁ sintetizado

3.1.2 POLIMETACRILATO DE BENCILO, ESTRELLA

- Síntesis y Caracterización

Con el fin de corroborar la reactividad del CTA₁ sintetizado, se realizaron ensayos de polimerización empleando un monómero comercial, metacrilato de bencilo (MB). Este monómero fue seleccionado en base a que anteriormente se ha utilizado este tipo de agente de transferencia con otros monómeros metacrílicos obteniéndose buenos resultados [Favier et al., 2006; Mayadunne et al., 2000], por lo que en principio podría resultar efectivo para este estudio. En la Tabla 3.1.2 se muestran, las variables experimentales estudiadas, el porcentaje de conversión de reacción (%C, ecuación 2.4.1.a.), peso molecular promedio en peso (M_w) e índice de polidispersidad (IP=M_w/M_n, ecuación 2.4.1.b.) obtenidos por SEC para los polímeros sintetizados, donde M_n es el peso molecular promedio en número.

Nº de reacción	[MB]/[CTA ₁]	[CTA ₁]/[I]	[MB]/[I]	Potencia (W)	Tiempo (min)	% C	M _w (g/mol)	IP
1	1300	2,5	3000	140	5	6,0	260000	1,9
2	1300	0,4	500	140	10	33,7	223000	2,3
3	1300	2,5	3000	140	10	8,5	270000	2,0
4	1300	2,5	3000	210	10	10,0	303000	2,0

Tabla. 3.1.2. Pesos moleculares, IP y conversiones de Polimetacrilato de bencilo estrella.

En todos los casos se mantuvieron constantes las relaciones de concentración, monómero [MB], agente de transferencia de cadena [CTA₁] e iniciador [I] (excepto en la reacción 2). En la tabla 3.1.2 se observa que a mayor tiempo de reacción se obtuvo mayor masa de polímeros (mayor %C, reacción 1 y 3), este mismo efecto se observó al aumentar la potencia de reacción (3 y 4). Por otro lado, el índice de polidispersidad es una medida del ancho de la distribución de pesos moleculares del polímero sintetizado, en todos los casos se observaron polidispersidades cercanas a 2. Como se mencionó

anteriormente, en la metodología RAFT se obtienen polidispersidades bajas, siendo una característica fundamental de este tipo de técnica [Gregory & Stenzel, 2012; Favier & Charreyre, 2006].

Los pesos moleculares obtenidos en todos los casos fueron elevados, observándose un pequeño incremento al aumentar el tiempo de reacción (1 y 3) tal como es de esperar en este tipo de polimerización. Comparativamente, en la polimerización radicalaria convencional de MB, se observan valores para IP mucho mayores, así como efecto de reacciones de transferencia de cadena o de aceleración de la velocidad (efecto Trommsdorff) [Medina, 2009].

El homopolímero obtenido se caracterizó mediante espectroscopia FT-IR (Figura 3.1.2), a través de las siguientes señales (cm^{-1}): 2981 y 2908 (C-H alifáticos); 1727 (C=O esteres); 1453 (C=C aromático) 1256 (C=S) y 1138 (C-O, esteres); 750 y 694 (C-H, aromático monosustituido).

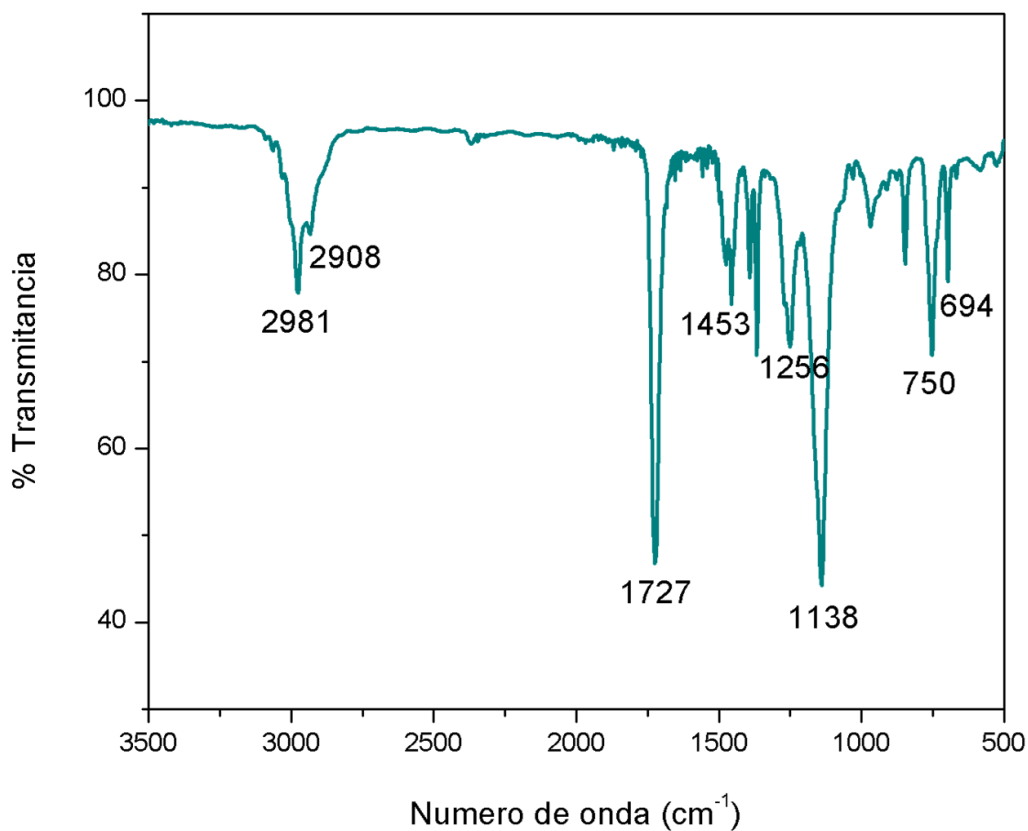


Figura 3.1.2. Espectro FT-IR del Polimetacrilato de bencilo, estrella.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el sistema CTA₁/iniciador utilizado fue apto para obtener homopolímeros de metacrilato de bencilo. De esta manera se puso en evidencia que el CTA₁ sintetizado posee las características adecuadas para ser empleado en la síntesis de polímeros bajo un mecanismo radical controlado como RAFT. Por lo anterior el mismo será utilizado en este tipo de síntesis con monómeros fumáricos, dado que es uno de los objetivos del presente trabajo.

3.1.3 COPOLÍMEROS ESTADÍSTICOS

Los copolímeros fumáricos han sido extensamente estudiados por nuestro grupo y otros [Lastra et al., 2017; Oberti et al., 2010; Otsu et al., 1992] dado que se obtienen a partir de un subproducto de la industria petrolera, y, que sus propiedades son muy similares a las de los ésteres metacrílicos, por lo que estos materiales pueden considerarse competitivos en el mercado local. Las propiedades de los copolímeros dependen fuertemente de la composición de comonómeros, su peso molecular promedio en peso (M_w) y distribución de pesos moleculares, evaluada a partir del índice de polidispersidad (IP), así como de su arquitectura. El efecto de esta última característica macromolecular ha sido estudiado en algunos casos sobre la morfología de membranas o matrices diseñadas para aplicación en ingeniería de tejido, analizando la citotoxicidad y biocompatibilidad, así como también se ha evaluado este efecto en función de las propiedades mecánicas del material [Zuo et al., 2011; Puskas et al., 2003; Cortizo et al., 2012]. En el presente trabajo se sintetizaron dos familias de copolímeros que difieren en su arquitectura (lineal y estrella) y peso molecular promedio con el objetivo de analizar el efecto de estas modificaciones estructurales sobre sus propiedades fisicoquímicas, así como también sobre las propiedades morfológicas, mecánicas, de citotoxicidad y biocompatibilidad de las matrices elaboradas a partir de estos copolímeros.

3.1.3.1 POLI (FUMARATO de DIISOPROPILO-co-METACRILATO DE POLIETILENGLICOL METIL ÉTER), LINEAL Y ESTRELLA, (FO_L Y FO_S)

- Síntesis y Caracterización

Como se mencionó anteriormente los copolímeros anfífilicos son muy utilizados para aplicaciones biomédicas debido a que se conoce que los biomateriales empleados como soporte para la regeneración de tejido con un buen balance hidrofílico/hidrofóbico estimulan una mejor respuesta celular [Fernández, 2011]. Es por ello que para la síntesis de los copolímeros se seleccionaron los monómeros fumarato de diisopropilo (FIP) y metacrilato de polietilenglicol metil éter (OEGMA). Los monómeros se eligieron con el objetivo de elaborar un material que presente una fracción hidrófoba proporcionada por el monómero fumárico y otra más hidrofílica o más polar, aportada por OEGMA.

Los copolímeros de FIP y OEGMA (FO) se prepararon mediante polimerización radicalaria convencional y RAFT con el fin obtener polímeros con arquitectura lineal (FO_L) y estrella (FO_S), respectivamente (sección 2.5.1). En el caso de los copolímeros denominados FO_L, se ensayaron diferentes composiciones de comonómeros presentando las características de los mismos en la Tabla 3.1.3.1.a (donde las siguientes abreviaciones indican: % C: porcentaje de conversión de la reacción, M_w: peso molecular promedio en peso, IP: índice de polidispersidad y ND: no determinado). Los mismos se obtuvieron empleando: AIBN como iniciador (40 mM), energía de microondas (140 W) durante un tiempo de reacción de 15 minutos, atmósfera de nitrógeno y la síntesis se llevó a cabo en solución, empleando tolueno como solvente.

POLÍMERO	[FIP]:[OEGMA]	% C	M _w (g/mol)	IP	OBSERVACIÓN
FO _L - 1	15:85	ND*	ND*	ND*	Entrecruzado
FO _L - 2	25:75	ND*	ND*	ND*	Entrecruzado
FO _L - 3	50:50	ND*	ND*	ND*	Entrecruzado
FO _L - 4	75:25	39,0	113550	7,9	
FO _L - 5	85:15	9,4	24460	3,0	

Tabla 3.1.3.1.a Características de los polímeros sintetizados de FIP-co-OEGMA lineal.

*ND: no determinado, % C (% Conversión)

En estudios previos se ha demostrado que la homopolimerización y copolimerización de FIP bajo energía de microondas presenta un aumento significativo de la velocidad de reacción en comparación con las condiciones de polimerización térmica convencional [Oberti et al., 2010; Cortizo, 2007; Oberti et al., 2012]. Es por ello que se empleó este modo de calentamiento para la síntesis de los copolímeros, ya que fue posible su obtención en un lapso de tiempo muy corto (15 minutos).

La Tabla 3.1.3.1.a muestra que para las composiciones con mayor concentración del monómero OEGMA, se obtuvieron copolímeros entrecruzados. Dado que el objetivo del presente trabajo de tesis es la elaboración de membranas a partir del método de *solvent-casting* y *electrospinning* y ambas técnicas implican la solubilización del material a emplear, por lo tanto, los polímeros entrecruzados no resultan ser de utilidad. Por lo anterior, se seleccionó la muestra FO_L– 4 para continuar con los estudios. Además, para dicha síntesis, al emplear una composición de comonómeros en la mezcla inicial de 75:25 [FIP]:[OEGMA], se obtuvo buena conversión de reacción y un polímero de mayor peso molecular (de aquí en adelante será designado FO_L).

Posteriormente, en las mismas condiciones de reacción se obtuvo el copolímero con arquitectura estrella (FO_S) con las siguientes características (Tabla 3.1.3.1.b).

POLÍMERO	[FIP]:[OEGMA]	[M]/[CTA]	[I]/[CTA]	[M]/[I]	% C	M _w (g/mol)	IP
FO _s	75:25	1300	2,34	3041	14,0	154500	4,2

Tabla 3.1.3.1.b. Características del polímero sintetizados de FIP-co-OEGMA estrella.

Si bien el índice de polidispersidad obtenido al sintetizar FO_s es mayor al esperado al aplicar un mecanismo de polimerización RAFT, el mismo fue menor que el obtenido en la síntesis de FO_L, los cuales se sintetizaron bajo un mecanismo de polimerización radicalario convencional. Por otro lado, los altos valores de IP obtenidos podrían deberse a varios motivos: reacciones de transferencia de cadena al monómero o al polímero, competitivas al CTA, acoplamientos del tipo estrella-estrella, y sobre todo al efecto de las condiciones de microondas que no garantizan un estricto control térmico.

Tanto FO_L como FO_s obtenidos fueron caracterizados por espectroscopia FT-IR, como se muestra en la Figura 3.1.3.1.a.

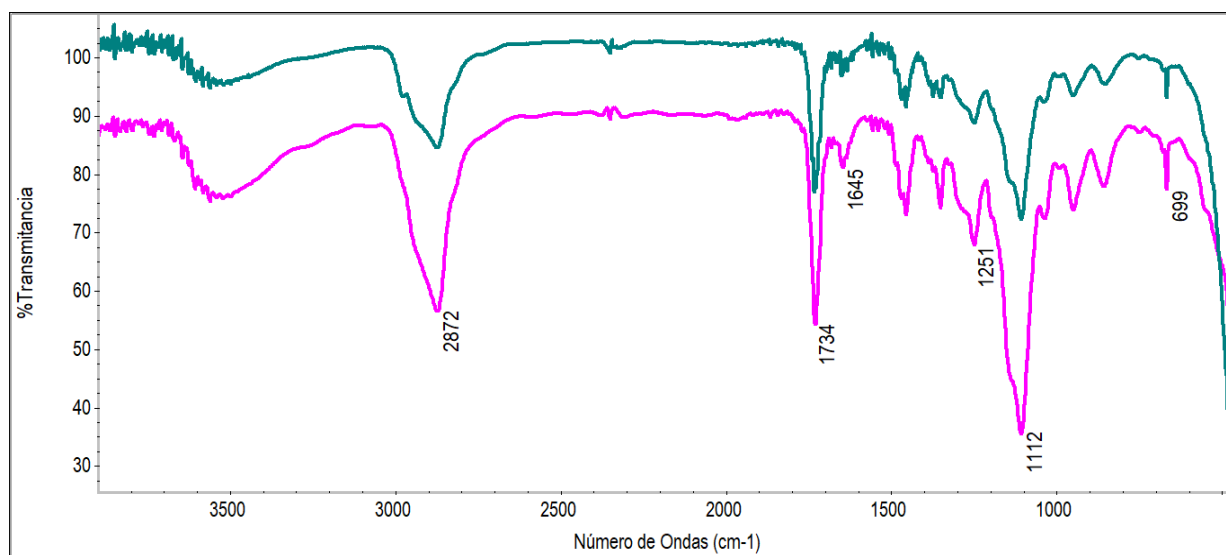


Figura 3.1.3.1.a Espectro FT-IR de los polímeros FO_L (color verde) y FO_S (color violeta).

Las señales características correspondientes a FO_L y FO_S son (cm⁻¹): 2872 (C-H), 1734 (C=O), 1251, 1112 (CO-OR), 1112 (C-O). FO_S presenta además las señales características del CTA estrella: 1645 (C=C, Ar), 699 (C-H, Ar). Sin embargo, las diferencias estructurales por FT-IR no son tan claras, por lo que la confirmación de la estructura polimérica se realizó mediante el análisis de los espectros ¹HRMN, como se muestra en las siguientes figuras:

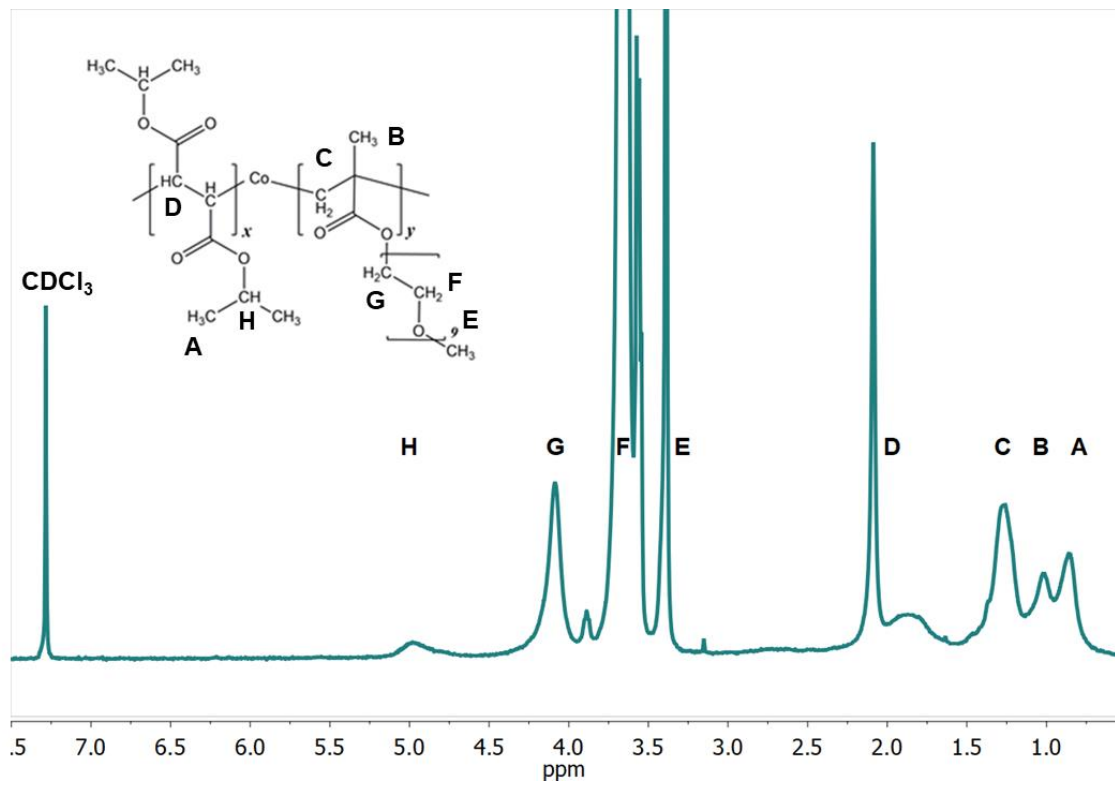


Figura 3.1.3.1.b. Identificación estructural mediante espectroscopia ¹H-RMN de FO_L.

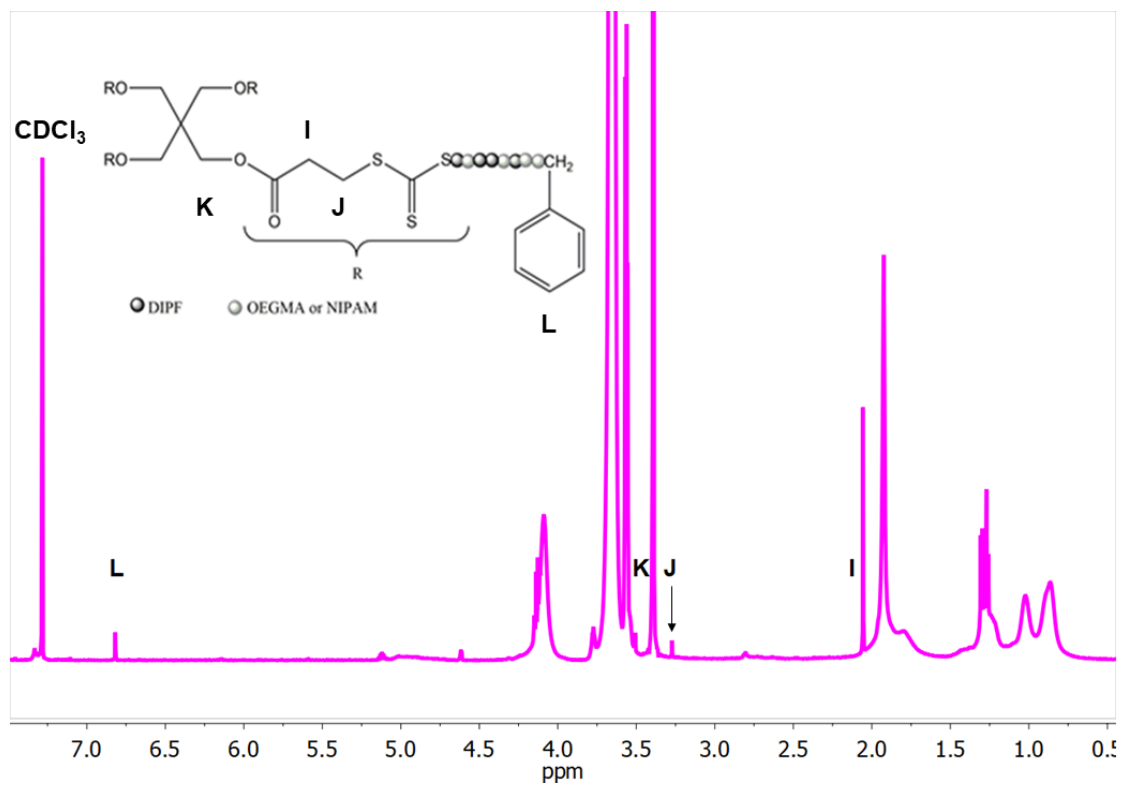


Figura 3.1.3.1.c. Identificación estructural mediante espectroscopia ¹H-RMN de FO_s.

Los espectros anteriores (Figura 3.1.3.1.b y c) muestran las señales características de los protones de los copolímeros ($\text{CDCl}_3, \delta_{\text{H}}$, ppm): 0,86 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, **A**); 1,03 ($-\text{C}-\text{CH}_3$, **B**); 1,27 ($-\text{CH}_2-$ cadena principal, **C**); 1,88 ($-\text{CH}<$ cadena principal, **D**); 3,39 ($-\text{O}-\text{CH}_3$, **E**); 3,50-3,65 ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}$, **F**); 4,09 ($-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2-$, **G**); 4,97 ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, **H**), confirmando la correspondiente estructura. Así como también en el espectro de FO_5 se detectan las señales anteriores junto a las señales de los protones pertenecientes a la molécula de CTA_1 : 2,08 ($-\text{CO}-\text{CH}_2-$, **I**); 3,28 ($-\text{CH}_2-\text{S}-$, **J**); 3,40 ($\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-$, **K**); 6,80 (**CH** anillo aromático, **L**), lo que deja en evidencia que la estructura del copolímero FO estrella se encuentra unida a la molécula de CTA_1 , lo cual era de esperarse para un mecanismo de polimerización RAFT.

Además, la composición de los copolímeros se estimó a través de la integración de los picos correspondientes a ($-\text{OCH}<$) del monómero FIP y ($-\text{OCH}_3$) de OEGMA a 4,97 y 3,39 ppm, respectivamente, utilizando la ecuación 3.1.3.1.

$$F_1 = \frac{3I(\text{OCH})}{3I(\text{OCH})+2I(\text{OCH}_3)} \quad (3.1.3.1)$$

En los copolímeros preparados se encontró la siguiente composición del comonómero fumárico:

POLÍMEROS	f_1	F_1
FO_L	75	13
FO_5	75	6

Tabla 3.1.3.1.c. Composición del comonómero fumárico en el copolímero (F_1) y en la mezcla inicial de reacción (f_1) de los copolímeros FO .

- Propiedades Térmicas

El estudio de las propiedades térmicas de los polímeros obtenidos, para ser utilizados en el diseño de biomateriales empleados en aplicaciones médicas, es importante porque deben ser capaces de soportar el procesamiento y la esterilización. Las técnicas de esterilización utilizadas comúnmente, están relacionadas con el calor o la humedad [Odelius et al., 2008].

El estudio de estabilidad térmica de copolímeros con diferente arquitectura se realizó mediante análisis termogravimétrico (TGA), en atmósfera de nitrógeno, y la curva de descomposición obtenida, para cada caso se representa en la figura 3.1.3.1.d.

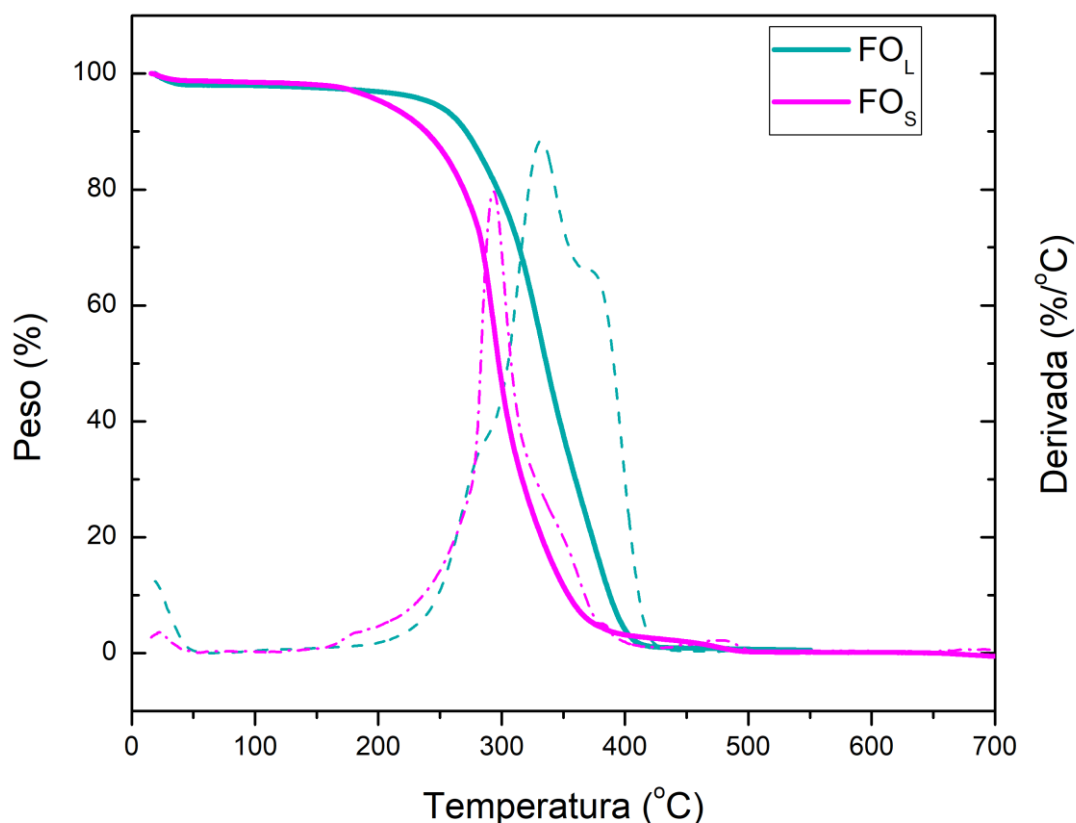


Figura 3.1.3.1.d. Curvas de TGA (—) y DTG (---) de FO_L (color verde) y FO_S (color violeta).

Como se observa en la figura, los copolímeros de FO muestran un proceso de descomposición en dos etapas, FO_L presentó una temperatura de descomposición inicial más alta (IDT, Tabla 3.1.3.1.d) que las de los correspondientes homopolímeros de PFIP y POEGMA, mientras que FO_S presenta una IDT intermedia con respecto a los mismos. Previamente se informó que la temperatura de degradación inicial era de 250 y 210 °C para PFIP y POEGMA, respectivamente [Oberti et al., 2012; Wang et al., 2001].

POLÍMEROS	IDT (°C)	T _{max1} * (°C)	T _{max2} * (°C)
FO _L	271	332 (13)	373 (34)
FO _S	238	293 (22)	338 (74)

Tabla 3.1.3.1.d. Temperatura de descomposición obtenidas del TGA de FO_L y FO_S.

*Valores entre paréntesis indican el porcentaje total de pérdida de masa (%) a la temperatura indicada.

La primera etapa de descomposición podría atribuirse a la pérdida de las cadenas laterales de polietilenglicol (PEG), como se demostró en otros copolímeros estructuralmente relacionados [Luzon & Corrales, 2014]. La segunda etapa de descomposición presenta una mayor pérdida de masa experimental, a un valor de temperatura máxima de 373 °C para polímeros lineales (FO_L) y 338 °C para polímeros ramificados (FO_S), lo que podría atribuirse a la escisión aleatoria de la cadena principal. El valor para IDT más bajo y las temperaturas máximas de descomposición (T_{max1} y T_{max2}) de FO_S en comparación con FO_L podrían atribuirse a la debilidad de los enlaces tioéster que están presentes en la estructura ramificada del copolímero FO_S. Estos resultados sugieren que el copolímero estrella ramificado es térmicamente menos estable que el copolímero lineal de la misma naturaleza química. Sin embargo, ambos copolímeros presentan una elevada temperatura de descomposición inicial por lo que podrían soportar procesos de esterilización por calor sin sufrir degradación.

- Obtención y Caracterización de las Membranas

Las membranas se prepararon a partir de soluciones de los copolímeros por el método de *solvent-casting* (sección 2.8.1). La caracterización superficial de las membranas se realizó a través de microscopía SEM (Figura 3.1.3.1.e).

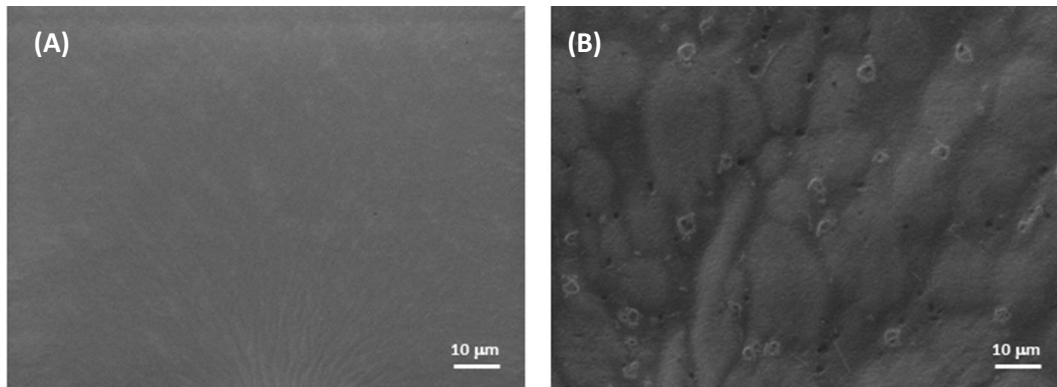


Figura 3.1.3.1.e. Imágenes de SEM de (A) FO_L y (B) FO_S, aumento 700x.

En las imágenes de microscopía SEM se observa que ambas matrices de FO presentan una superficie irregular y rugosa, siendo este aspecto más notorio en las membranas de FO_S.

- Propiedades Mecánicas

El comportamiento mecánico de las películas se investigó mediante el ensayo de tracción teniendo en cuenta las curvas de tensión vs. deformación generadas con el equipo. Este ensayo mide la resistencia de un material a una fuerza estática o aplicada lentamente. Los resultados se muestran en la Figura 3.1.3.1.f. A partir de estos estudios se determinó el módulo elástico (ME), el cual se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal inicial (región elástica) de la curva. Los datos en base a los cálculos realizados para las matrices son presentados en la Tabla 3.1.3.1.e, como la media \pm SEM considerando los valores medios de muestras independientes ($n = 6$).

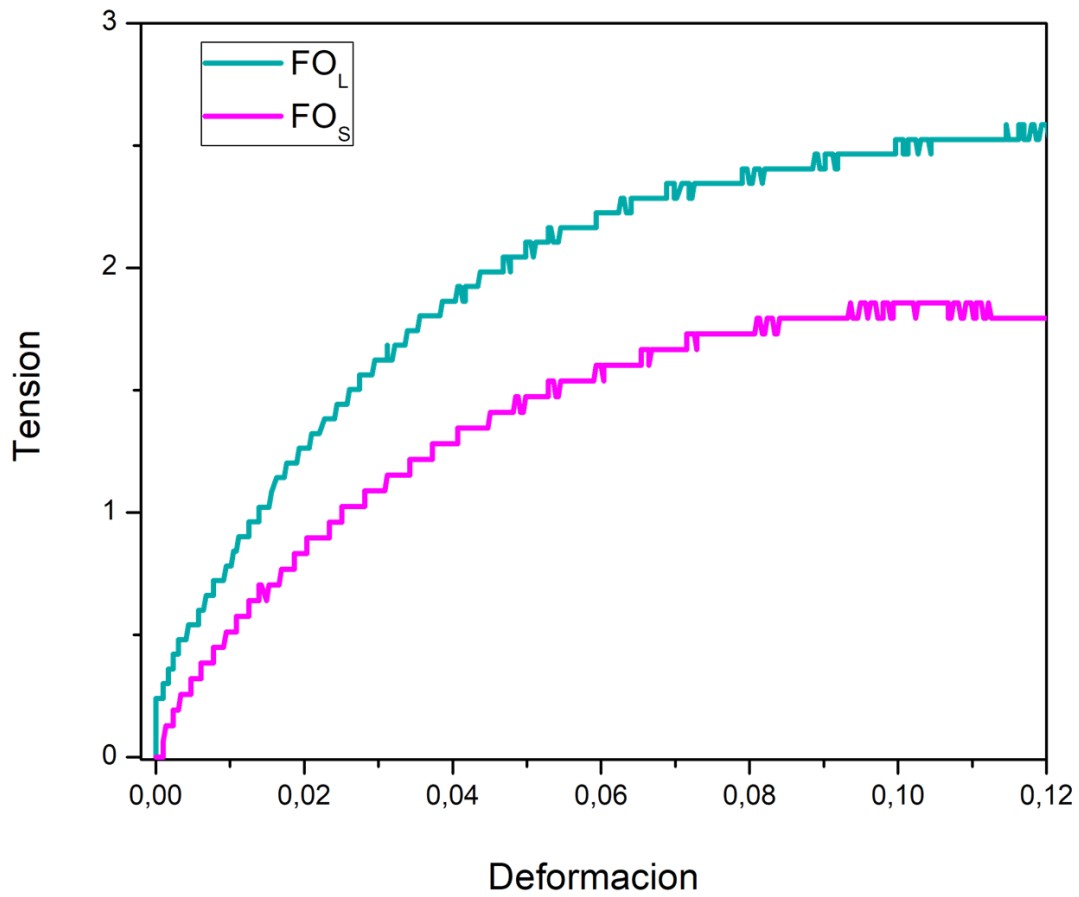


Figura 3.1.3.1.f. Curvas de tensión vs. Deformación de FO_L y FO_S.

Películas	Módulo Elástico (MPa)
FO _L	58,9 ± 5,1
FO _S	36,2 ± 3,1

Tabla 3.1.3.1.e. Módulo Elástico de FO_L y FO_S. (n= 6).

Se encontraron diferencias significativas en el módulo elástico de las películas de FO_L y FO_S ($p < 0,0002$), por lo que podría considerarse que las propiedades mecánicas se ven afectadas en función de la arquitectura y la composición (F_1 : 13 y 6 para FO_L y FO_S,

respectivamente), aunque esta diferencia también podría atribuirse a la diferencia en los valores de M_w obtenidos.

Luego de la obtención y caracterización de las películas de FO, se realizó la búsqueda de otra familia de copolímeros fumáricos anfifílicos con el objetivo de comparar el efecto de la naturaleza química de los comonómeros sobre las características de los *scaffolds* obtenidos, como potenciales biomateriales. Para ello, se ensayó la síntesis de diversos copolímeros de FIP con diferentes comonómeros polares.

3.1.3.2 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-METACRILATO DE HIDROXIETILO), LINEAL, (FH)

Las síntesis de estos copolímeros se realizaron vía radicalaria convencional con iniciador AIBN (40 mM), térmicamente a 60°C y en atmósfera de nitrógeno (sección 2.5.2). Las diferentes condiciones ensayadas se muestran en la Tabla 3.1.3.2.

POLÍMERO	[FIP]:[HEMA]	TIEMPO (hs)	VOLUMEN DE THF (ml)	OBSERVACIÓN
FH-1	50:50	3	0	Entrecruzado
FH-2	50:50	1	0	Entrecruzado
FH-3	50:50	0,5	0	Entrecruzado
FH-4	75:25	1	0	Entrecruzado
FH-5	75:25	1	0,5	Entrecruzado
FH-6	75:25	0,5	0	Entrecruzado
FH-7	75:26	0,5	1	Entrecruzado

Tabla 3.1.3.2. Características de los polímeros sintetizados de FH.

Como se observa en la tabla 3.1.3.2, las diferentes condiciones experimentales ensayadas generaron polímeros entrecruzados, no cumpliendo los requisitos del tipo de material buscado en este trabajo. Por lo que se prosiguió con la síntesis de un nuevo

copolímero fumárico anfifílico, con acrilato de tetrahidrofurfurilo (ATHF) como monómero polar.

3.1.3.3 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-ACRILATO DE TETRAHIDROFURFURILO), LINEAL, (FA)

Las reacciones de copolimerización de FIP y ATHF (FA) se detallaron en la sección 2.5.3. Luego de 4 h de reacción, no se obtuvo polímero, por lo que se realizó otro ensayo de copolimerización durante 20 h obteniéndose un polímero entrecruzado, que como se mencionó anteriormente no sería útil para los objetivos planteados en esta tesis.

Para continuar con los estudios se eligió un nuevo comonómero polar, N-Isopropilacrilamida. Trabajos previos demostraron la biocompatibilidad de la poli-N-Isopropilacrilamida, por lo que podría ser un candidato óptimo para la elaboración de *scaffolds* con posterior aplicación en ingeniería de tejido óseo.

3.1.3.4 POLI (FUMARATO DE DIISOPROPILO-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA), LINEAL Y ESTRELLA, (FN_L Y FN_S)

- Síntesis y Caracterización

Se estudiaron diferentes condiciones de reacción para copolímeros de FIP y NIPAM (FN, sección 2.5.4), empleando una relación de comonómeros 75:25, respectivamente. Las condiciones experimentales y las características de los polímeros lineal (FN_L) y estrella (FN_S) obtenidos, se muestran a continuación (donde, T: temperatura, P: potencia, %C: porcentaje de Conversión, M_w: peso molecular promedio en peso, IP: índice de polidispersidad y ND: no determinado):

POLÍMERO	TOLUENO (ml)	ATMÓSFERA	T o P	TIEMPO	% C	M _w (g/mol)	IP
FN _L -1	1,0	Nitrógeno	140 w	15 min	6,0	9750	2,8
FN _L -2	-	Nitrógeno	140 w	15 min	7,5	40610	3,7
FN _L -3	-	Nitrógeno	60 °C	48 h	20,2	429430	6,4
FN _L -4	0,5	Vacío	60 °C	96 h	30,4	486000	7,0
FN _S -1	-	Nitrógeno	140 W	15 min	2,0	ND	ND
FN _S -2	-	Nitrógeno	140 W	60 min	3,1	4500	2,0
FN _S -3	0,5	Vacío	60 °C	96 h	22,3	17200	3,0

Tabla 3.1.3.4.a. Características de los polímeros sintetizados de FN.

Se evaluó la síntesis de FN_L y FN_S a través de energía de microondas, obteniéndose porcentajes de conversión muy bajos (reacción FN_L-1, FN_L-2, FN_S-1 y FN_S-2). Por este motivo, las restantes reacciones de polimerización se llevaron a cabo térmicamente a 60 °C, lográndose las mejores condiciones de síntesis, en vacío y luego de 4 días de reacción (reacción FN_L-4 y FN_S-3 de aquí en adelante se designará a estos copolímeros simplemente FN_L y FN_S, respectivamente). FN_S presenta un menor peso molecular e índice de polidispersidad con respecto al polímero lineal, como es de esperarse en reacciones radicalarias controladas, como RAFT.

Los polímeros sintetizados se caracterizaron e identificaron mediante FT-IR, los espectros se muestra en la siguiente figura:

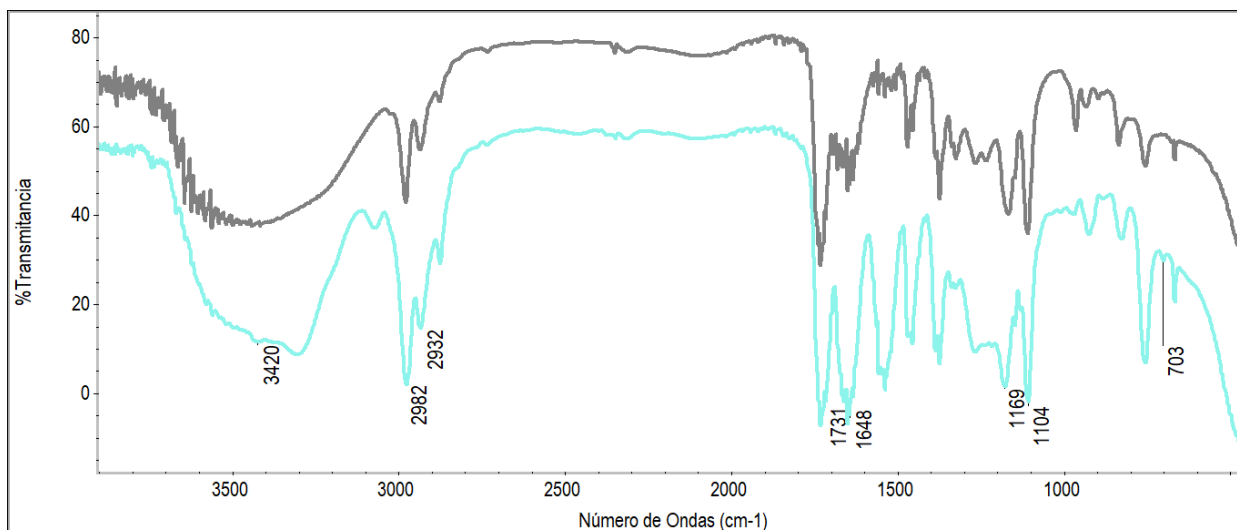


Figura 3.1.3.4.a. Espectro FT-IR de FN_L (color gris) y FN_S (color celeste).

El espectro del copolímero FN_L muestra las siguientes señales características (cm⁻¹): 3420 (N-H), 2982, 2932 (C-H), 1731 (C=O éster), 1648 (C=O amida), 1169 (CO-OR), 1104 (C-O). Se observan pequeñas diferencias con el espectro de FN_S que podrían atribuirse a la diferencia estructural, 703 (C-H, anillo aromático) pero como las mismas no son tan claras, se realizó un espectro de ¹H-RMN para confirmar las diferentes estructuras (Figura 3.1.3.4.b y c).

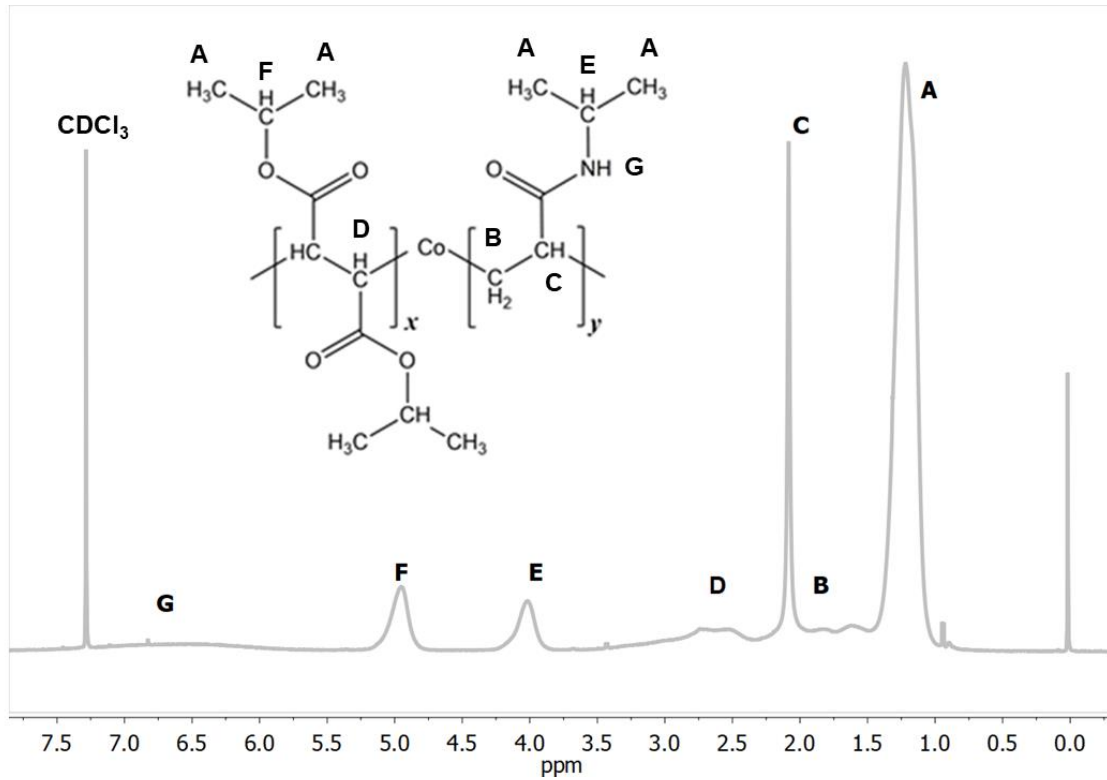


Figura 3.1.3.4.b. Identificación estructural mediante espectroscopia ¹H-RMN de FN₄.

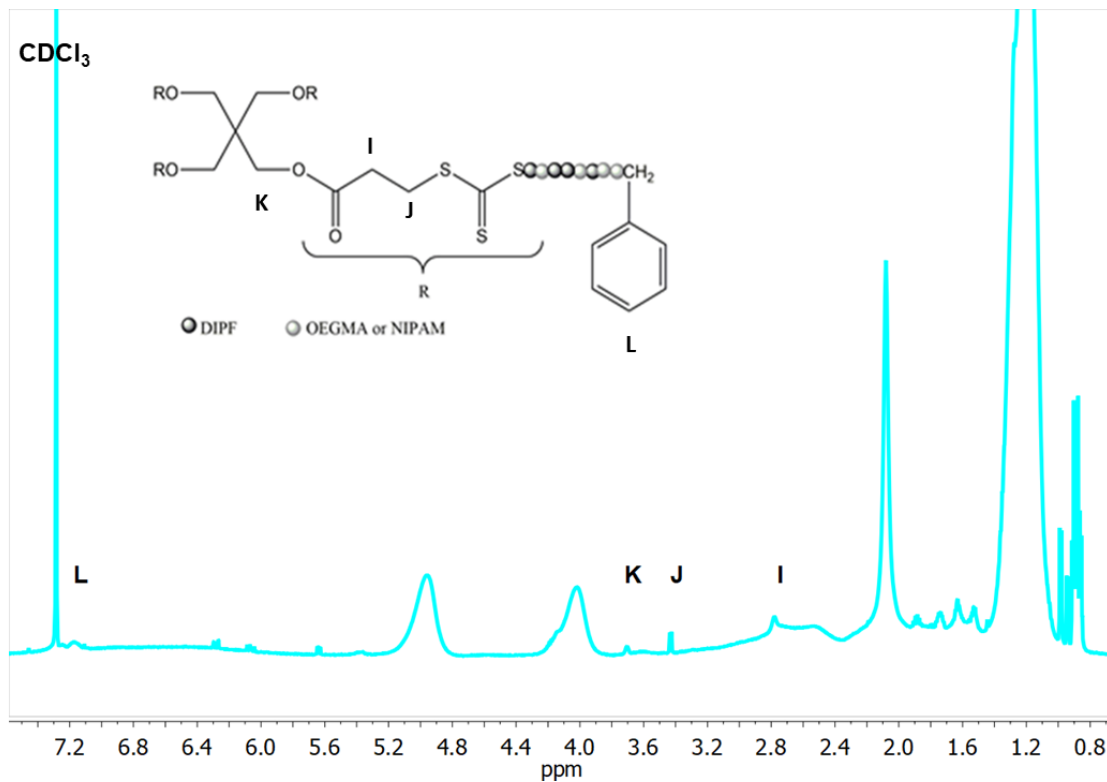


Figura 3.1.3.4.c. Identificación estructural mediante espectroscopia ¹H-RMN de FN₅.

El espectro de ¹H-RMN de FN_L (Figura 3.1.3.4.b), presenta las siguientes señales características: (CDCl₃ δ_H, ppm): 1,22 ((CH₃)₂, **A**); 1,81 (-CH₂- cadena principal, **B**); 2,08 (-CH< cadena principal, **C**); 2,65 (-CH-COO- cadena principal, **D**); 4,01 (-NCH<, **E**); 4,96 (-CH-(CH₃)₂, **F**); 6,72 (NH, **G**), confirmando la correspondiente estructura (figura 3.1.3.4.b). El espectro de FN_S (figura 3.1.3.4.c) presenta además de las señales anteriores, otras señales menos relevantes correspondientes a la estructura del CTA₁: 2,77 (-CO-CH₂-, **I**); 3,42 (-CH₂-S-, **J**); 3,69 (C-CH₂-O-, **K**); 7,05 (CH anillo aromático, **L**). En base a estos resultados, podemos afirmar que se obtuvieron copolímeros con diferentes arquitecturas.

En este caso, también se estudió la composición de los comonómeros a través del espectro de ¹H-RMN, la cual se estimó a través de la integración de los picos 4,96 y 4,02 correspondiente a (-OCH<) del monómero FIP y (-NCH<) de NIPAM, respectivamente, usando la ecuación 3.1.3.4.

$$F_1 = \frac{I(\text{OCH})}{I(\text{OCH}) + 2I(\text{NCH})} \quad (3.1.3.4)$$

Se encontró la siguiente composición del comonómero fumárico en los copolímeros sintetizados:

POLÍMEROS	f ₁	F ₁
FN _L	75	39
FN _S	75	36

Tabla 3.1.3.4.b. Composición del comonómero fumárico en el copolímero (F₁) y en la mezcla inicial de reacción (f₁) de los copolímeros FN.

- Propiedades Térmicas

Como se mencionó anteriormente, es importante el estudio de las propiedades térmicas de los polímeros obtenidos, ya que los mismos serán utilizados para diseñar biomateriales que deberán soportar procesos de esterilización por calor. Por lo tanto, el estudio térmico de los copolímeros se realizó mediante TGA. Las curvas de descomposición se muestran a continuación:

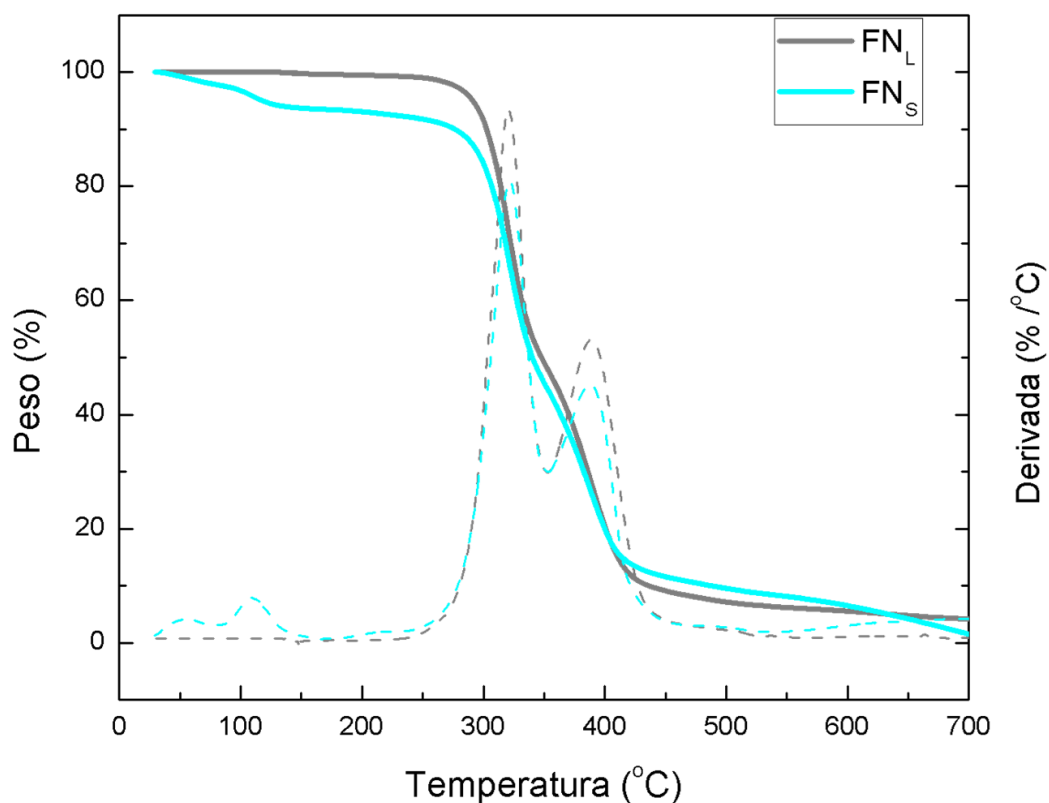


Figura 3.1.3.4.d. Curvas de TGA (—) y DTG (---) de FN_L (color gris) y FN_S (color celeste).

POLÍMEROS	IDT (° C)	T _{max1} * (° C)	T _{max2} * (° C)
FN _L	267	320 (27)	388 (71,5)
FN _S	244	321,5 (34)	388,5 (73,5)

Tabla 3.1.3.4.c. Temperaturas de descomposición obtenidas del TGA de FN_L y FN_S.

*Valores entre paréntesis indican el porcentaje total de pérdida de masa (%) en la temperatura indicada.

Los resultados mostraron que ambos copolímeros exhibieron un proceso de descomposición térmica en 2 etapas, presentando una temperatura inicial de descomposición (IDT) intermedia (Tabla 3.1.3.4.c) a la de los homopolímeros, 250 °C y 350 °C para PFIP y PNIPAM, respectivamente [Silva et al., 2000]. El termograma de FN_S muestra un primer evento de degradación a 150 °C, que podría deberse a solventes residuales o agua adsorbida. No se observaron diferencias significativas entre las temperaturas máximas de descomposición (T_{max1} y T_{max2}) de ambos copolímeros. El primer evento de descomposición podría atribuirse a la pérdida del grupo lateral por escisión del grupo pendiente, como se demostró previamente para otros copolímeros fumáricos relacionados estructuralmente [Oberti et al., 2012]. Estudios previos sobre poli(acrilamida) y sus copolímeros con metacrilato de metilo demostraron que, por debajo de 340 °C, los principales productos de degradación son amoníaco y metanol, los cuales evolucionan a partir de la formación de imida cíclica [Grassie et al., 1978]. De hecho, en este trabajo de tesis se debe considerar un mecanismo de degradación similar, ya que se ha informado que las poli (N-alkyl acrilamida) siguen un mecanismo de degradación similar donde los productos de degradación en estos casos son derivados de amoníaco [Silva et al., 2000].

- Obtención y Caracterización de las membranas

La obtención de las membranas se describió en la sección 2.8.2. La caracterización de las películas se realizó a través de microscopía SEM (Figura 3.1.3.4.e).

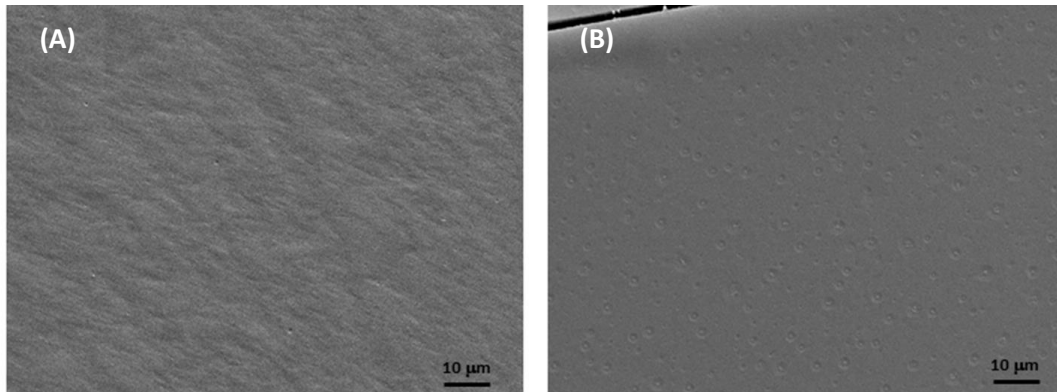


Figura 3.1.3.4.e. Imágenes de SEM de (A) FN_L y (B) FN_S, aumento 700x.

En las imágenes de SEM se observa que las matrices presentan una superficie más lisa respecto a las membranas de FO. Sin embargo, no se observan grandes diferencias en función de la arquitectura de las mismas, si bien FN_L es un poco más rugosa.

- Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas mediante ensayo de tracción de las películas no pudieron determinarse debido a que el material obtenido es quebradizo y vítreo.

3.1.4 ENSAYOS IN VITRO

Anteriormente, se ha demostrado que los macrófagos son un modelo de cultivo muy sensible para evaluar posibles respuestas inflamatorias in vitro de un material con potenciales aplicaciones en ingeniería de tejidos [Cortizo et al., 2012; Bixby et al., 2005; Delinger et al., 1996]. Por lo tanto, en el presente trabajo, se evaluó el crecimiento celular y la posible citotoxicidad de las películas a través de la producción de NO, ensayo de MTT, recuento del número de células y morfología celular empleando un modelo de macrófagos murinos RAW 264.7 tal como se describió en la sección 2.10. Para ello, las células fueron sembradas sobre las distintas películas (FO_L, FO_S, FN_L y FN_S) o sobre placa

de cultivo celular estándar (TCP) como condición control, con el objetivo de estudiar los posibles efectos de las diferentes estructuras de las dos familias de copolímeros sintetizados.

3.1.4.1 VIABILIDAD CELULAR

- Ensayo de MTT

Se estudió el efecto de los materiales sobre la viabilidad celular mediante ensayo de MTT luego de 48 h de cultivo. Los resultados se muestran en la figura 3.1.4.1

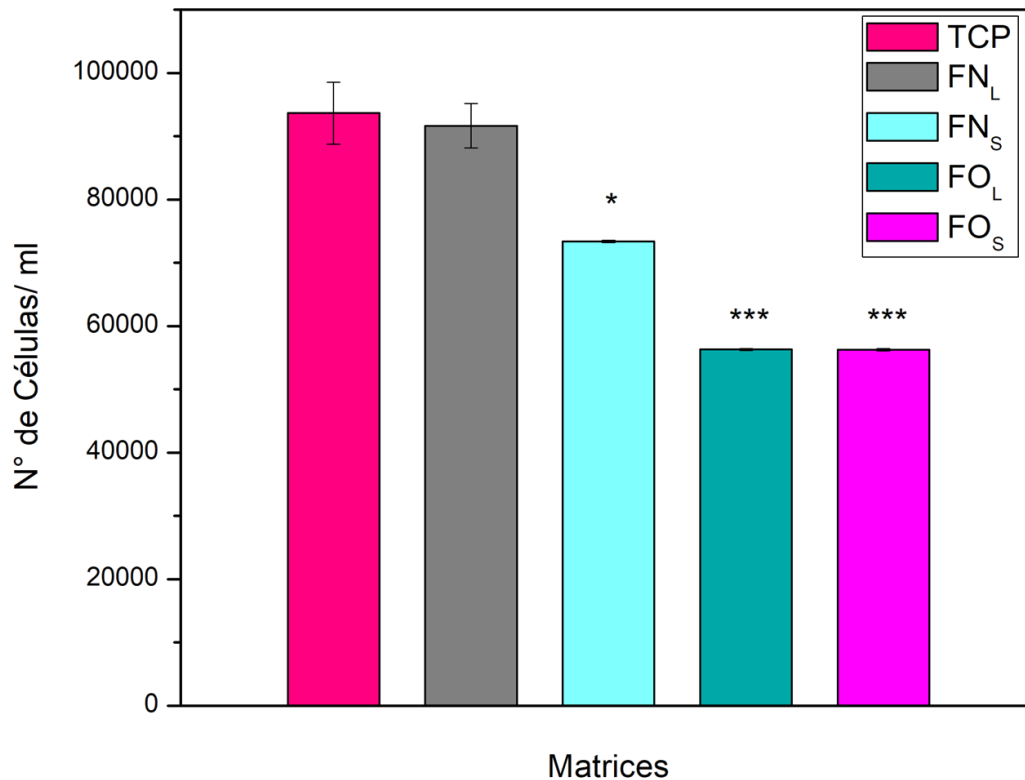


Figura 3.1.4.1. Viabilidad de células RAW sobre las películas y el control TCP. Diferencias vs. TCP: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos mostraron que no existen diferencias significativas de viabilidad celular entre el *scaffold* FN_L y la condición control (TCP). Cuando las células

crecieron sobre el film de FN₅ se observó una pequeña disminución estadísticamente significativa con respecto a la condición control ($p < 0,05$), esta diferencia podría atribuirse a la diferente estructura de los copolímeros. Por otro lado, la viabilidad de los macrófagos crecidos sobre las películas de FO_L y FO_S es significativamente menor con respecto al control ($p < 0,001$), lo que podría atribuirse a que estas membranas presentan una textura “pegajosa”, que posiblemente impida la división y proliferación celular.

- Recuento de Células

La influencia de los diferentes materiales en el crecimiento celular también se evaluó utilizando el recuento de células RAW por campo después de 24 h de cultivo en las diferentes películas. Para este propósito, después del período de cultivo los macrófagos se tiñeron con Giemsa y se obtuvieron imágenes por microscopía óptica a partir de las cuales se hizo el recuento de células. Este ensayo, también fue realizado con el objetivo de estudiar la morfología celular sobre las diferentes matrices, para lo cual se agregó en la placa de cultivo, además de las condiciones estudiadas anteriormente, lipopolisacárido (LPS), el cual es un control positivo de citotoxicidad, de esta forma se podrá evaluar y comparar el crecimiento y morfología celular en las distintas variables estudiadas. A continuación, se muestran los resultados del número de células por campo sobre los diferentes materiales:

PELÍCULAS	N° CÉLULAS/ CAMPO
TCP	123 ± 21
TCP + LPS***	22 ± 3
FN _L	142 ± 11
FN _S	120 ± 9
FO _L ***	26 ± 3
FO _S ***	30 ± 7

Tabla 3.1.4.1. Número de células por campo en las películas (media ± SEM) n = 6. Diferencias vs. TCP: *** p<0,01.

En la Tabla 3.1.4.1 se observa un comportamiento similar al obtenido con el ensayo de viabilidad, donde el número de células por campo de las películas de FN es similar al control (TCP). En cambio, en los films de FO_L y FO_S el número de células fue significativamente menor. También se encontró un menor número de células por campo cuando se agregó LPS al medio de cultivo. En ambos casos, no se aprecian cambios en función de la arquitectura de los polímeros.

3.1.4.2 PRODUCCIÓN DE NO

Debido a que los materiales fueron diseñados para su aplicación en ingeniería de tejido óseo es muy importante estudiar la citotoxicidad de los mismos, para ello como se mencionó anteriormente, se empleó el modelo de macrófagos murinos, ya que es un excelente modelo para este estudio debido a que los macrófagos son células pertenecientes al sistema inmune. Por lo tanto, la citotoxicidad de los materiales se evaluó a través de la expresión de marcadores de citotoxicidad como la producción de óxido nítrico (NO) por el método de Griess (sección 2.10.4.1), obteniéndose los siguientes valores luego de 24 h de cultivo:

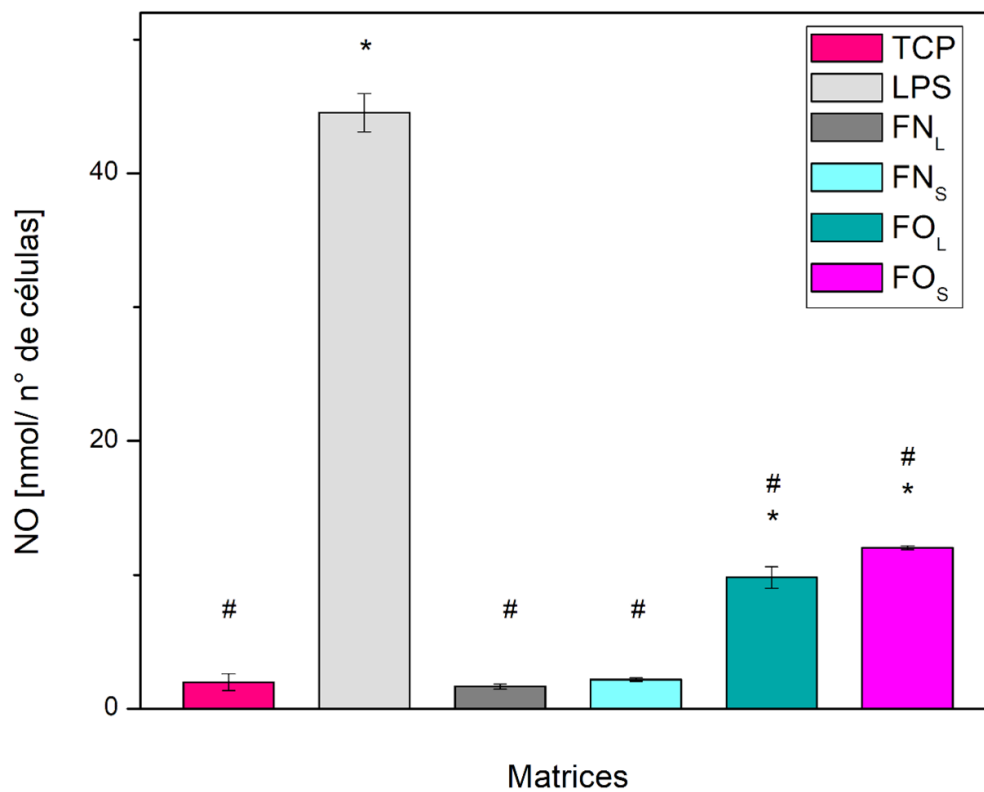


Figura 3.1.4.2. Niveles de NO (nmol/n° de células).
Diferencias vs. TCP: * $p < 0,001$; vs. LPS: # $p < 0,001$

En la Figura 3.1.4.2 se observa que la producción de NO de los copolímeros FN es similar a la condición control, mientras que los polímeros de la familia de FO presentan diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto a los niveles de NO en TCP, debido a que la viabilidad celular en estos *scaffolds* es menor, ya que la producción de NO se encuentra normalizada por el número de células (evaluadas por MTT) que crecieron durante el tiempo del ensayo (24 h). Sin embargo, todas las matrices son significativamente diferentes al control positivo de citotoxicidad (TCP + LPS), lo que podría sugerir que ninguno de los materiales estudiados exhibe elevada citotoxicidad, aunque las mejores condiciones se obtienen con las películas de FN, ya que los valores son similares a la condición control (TCP), por lo que podríamos afirmar que estos materiales no inducen efectos citotóxicos.

3.1.4.3 MORFOLOGÍA CELULAR

Con el fin de corroborar el crecimiento celular y observar la interacción de las células sobre las diferentes superficies obtenidas, luego del ensayo de citotoxicidad, se analizó la morfología de los macrófagos RAW a través de un microscopio óptico invertido y SEM (Figura 3.1.4.3.a y b, respectivamente).

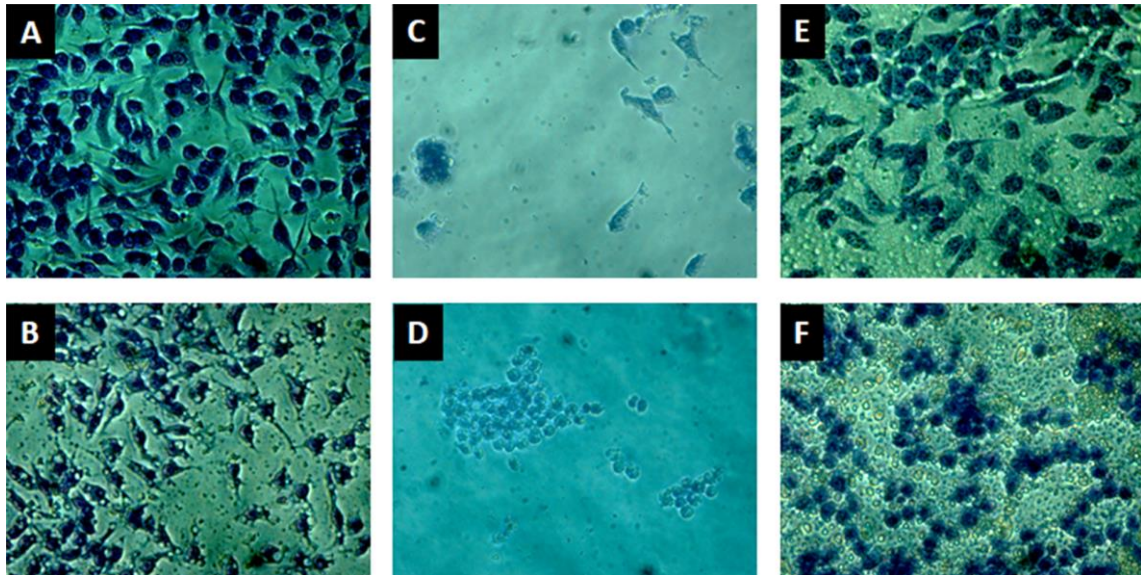


Figura 3.1.4.3.a. Imágenes de Microscopía Óptica. (A) Macrófagos RAW cultivados en DMEM sin rojo fenol - 1% SFB sobre TCP (control), (B) control + 1 µg/ml LPS, (C) FO_L, (D) FO_S, (E) FN_L y (F) FN_S film durante 24 hs. Tinción con Giemsa.

En la figura 3.1.4.3.a se puede observar que las células que crecieron sobre la placa de cultivo (A) muestran un aspecto redondeado con pocas extensiones y con un núcleo central bien definido. Como ha sido previamente reportado, cuando estas células se exponen al lipopolisacárido (LPS), como un control positivo de la citotoxicidad, muestran un citoplasma con varias extensiones, lo que sugiere la activación de los macrófagos [Fernández et al., 2014]. En este caso, en presencia de LPS, se observó un claro efecto citotóxico, las células mostraron un aspecto estrellado, disminución de tamaño y varias extensiones de citoplasma, así como restos celulares indicativos de muerte celular (B). Las células que crecieron en las películas de FO muestran una forma redondeada o fibroblástica con una o dos extensiones, aunque un pequeño número de células parece

proliferar sobre este tipo de matriz. No se observaron muchas diferencias entre las películas FO_L (C) y FO_S (D), solo que en este último las células crecieron principalmente en forma agrupada, en lugar de encontrarse aisladas. Por otro lado, las células en la película FN_L (E) mostraron un aspecto redondeado similar a la monocapa del control, con poca extensión y sin signos de citotoxicidad. Los macrófagos en la película FN_S (F) también muestran un aspecto normal, aunque parecen estar más redondeados en ausencia de procesos celulares.

Además, el recuento de células que proliferaron en las películas después de 24 h de cultivo coincide con la observación de las células mediante microscopía. Pocas células proliferan en las películas de FO, lo que sugiere una interacción pobre con estas matrices. Por otro lado, cuando las células se sembraron en los films de FN, las mismas se adhieren y proliferan adecuadamente, mostrando una buena interacción con los andamios.

Posteriormente, se tomaron fotos por microscopía SEM de las matrices de FO y FN de arquitectura estrella, luego de 24 h de cultivo con células RAW, obteniéndose las siguientes imágenes:

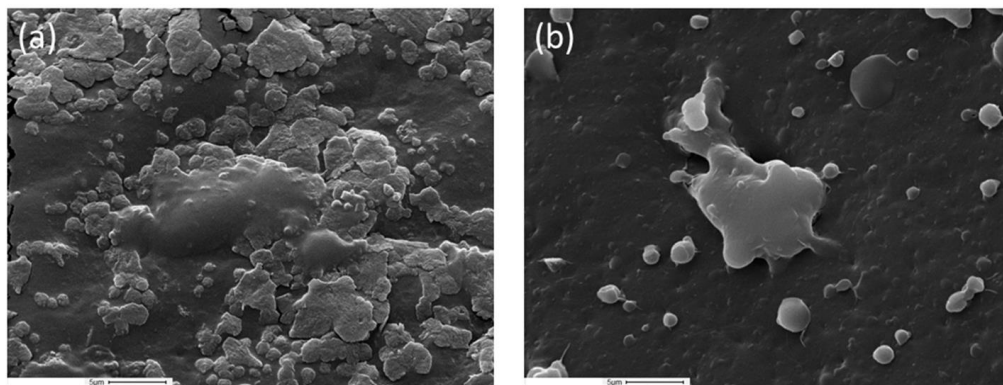


Figura 3.1.4.3.b. Imágenes de SEM de (a) FO_S y (b) FN_S, Aumento 1000x

Se puede ver que en ambas películas las células crecen sobre la matriz e interactúan con ella, aunque una mayor cantidad de células aparecen sobre los films de FN_S.

En conjunto, los resultados obtenidos con los macrófagos sugieren que la biocompatibilidad de las diferentes películas podría atribuirse a la naturaleza química del copolímero, pero no a su arquitectura macromolecular, obteniéndose una condición

favorable para las matrices sintetizadas a partir del copolímero FN_L. Sin embargo, estas películas son muy rígidas, por lo que no reúne todos los requisitos necesarios que debe presentar un *scaffold* para ser aplicado en ingeniería de tejido óseo. Para continuar con los estudios se decidió preparar copolímeros similares a FN_L, cambiando el monómero fumarato de diisopropilo por fumarato de di-2-octilo (FDO), dado que su homopolímero posee una temperatura de transición vítrea menor a la del homopolímero de fumarato de diisopropilo (65 °C y -14 °C, para PDIPF y PFDO, respectivamente). Por lo tanto, a partir de FDO y NIPAM se procedió a la realización de distintas reacciones de copolimerización con el objetivo de obtener un material adecuado para el fin proyectado.

CAPITULO III



Parte II

Copolímeros en bloque

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.2 COPOLÍMEROS EN BLOQUE

Los copolímeros en bloque exhiben propiedades que los diferencian de los copolímeros aleatorios y permiten obtener materiales con diversas arquitecturas. Además, este tipo de copolímeros también pueden ser utilizados como modelos para comprender mejor las interacciones célula-biomaterial, así como el rol de su morfología sobre la adhesión de proteínas y su implicancia en la adhesión celular. En base al peso molecular promedio y la configuración de los bloques de comonómeros en el copolímero es posible crear superficies con la misma composición, pero diferente nanomorfología. Es por ello que en este trabajo de tesis doctoral se realizaron diferentes ensayos con el fin de obtener copolímeros en bloque.

3.2.1 HOMOPOLÍMERO ESTRELLA: POLI FUMARATO DE DIISOPROPILO

En el capítulo III, parte I, se detalló la preparación y la caracterización de copolímeros aleatorios entre Fumarato de Diisopropilo (FIP) y Metacrilato de Polietilenglicol metil éter (OEGMA). Con la finalidad de estudiar otro tipo de distribución de monómeros en la cadena polimérica, se ensayaron copolimerizaciones en bloque de los monómeros mencionados. Los resultados obtenidos se muestran en el presente capítulo. Para tal fin, se empleó el mecanismo de polimerización RAFT utilizando el agente de transferencia de cadena tipo estrella sintetizado en nuestro grupo (denominado CTA₁).

Primeramente, se sintetizó un homopolímero de fumarato de diisopropilo, como precursor de un copolímero en bloque. La reacción se llevó a cabo a 70 °C con la siguiente relación molar en la mezcla de reacción, [M]/[I]/[CTA₁]: 250/0,35/1, siendo M, el monómero FIP e I, el iniciador AIBN empleando condiciones de vacío, como se describió previamente (sección 2.4.2). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

HOMOPOLÍMERO	TIEMPO (Días)	% C	M _w (g/mol)	IP
PF _S -1	7	2	3000	1,0
PF _S -2	14	3	3700	1,1
PF _S -3	30	6	4555	1,2
PF _S -4	70	8	31130	2,1

Tabla 3.2.1. Características del Polifumarato de diisopropilo Estrella (PFS).

Los resultados presentados en la Tabla 3.2.1 muestran que se obtienen valores muy bajos de conversión luego de tiempos largos de reacción, ya que los dialquil fumaratos como etilenos 1,2-disustituídos exhiben características únicas de cinética de polimerización radical debido a su importante impedimento estérico en los procesos de propagación y terminación del macroradical [Matsumoto & Otsu, 1995]. Esta información explicaría el resultado obtenido en este trabajo de tesis.

Además, como se demostró previamente, el equilibrio de fragmentación y reiniciación (Esquema 1.1.5.a) es importante para la polimerización controlada de los ésteres fumáricos, como fue propuesto por Takada y Matsumoto [Takada & Matsumoto, 2017]. En estos casos, las tasas de fragmentación y reiniciación de los agentes de transferencia de cadena varían significativamente dependiendo de la estructura del grupo alquílico del CTA (grupo R) (Esquema 1.1.5.b) de manera opuesta a las reacciones RAFT con monómeros como los ésteres metacrílicos o estireno, en donde los radicales que incluyen grupos R terciarios sufren fragmentación a una tasa mayor que la de los grupos R secundarios y, además, la introducción de grupos R conjugados como los grupos fenilo y éster en la posición alfa de los radicales también aceleran la fragmentación. En el caso del FIP la introducción de sustituyentes voluminosos y conjugados aceleró la fragmentación, pero retrasó el inicio de la homopolimerización de FIP, debido al impedimento estérico presente en los monómeros fumáricos [Takada & Matsumoto, 2017]. Además, como se describió en el capítulo I de esta tesis, es importante para el control de las reacciones durante la polimerización, el diseño de los sustituyentes R y Z del agente de transferencia a utilizar, ya que el grupo Z debe ser

capaz de estabilizar los radicales intermedios que se formen mientras que el grupo R, es un grupo saliente que debe reiniciar eficazmente la polimerización (Esquema 1.1.5.b). Si bien fue posible obtener homopolímeros de FIP, las conversiones de reacción no fueron mayores al 10%, lo cual también puede deberse, probablemente a la estabilidad del radical bencilo y su dificultad para reiniciar la polimerización; de todos modos, los materiales obtenidos podrían ser precursores (macro-CTA) para futuras copolimerizaciones.

Con el fin de evidenciar la presencia del agente de transferencia como parte de la estructura del polifumarato de diisopropilo, se analizó la presencia de anillos aromáticos provenientes del agente de transferencia de cadena (CTA₁) mediante cromatografía de exclusión molecular. Las señales de los grupos carbonilos mediante detección IR es general tanto para el CTA como para el PF_s analizado ya que ambos muestran absorción a la frecuencia de estiramiento de los grupos C=O. Mientras que la detección UV solo será observada en el caso de los PF_s sintetizados mediante RAFT ya que parte del CTA utilizados para la síntesis quedarán en la estructura final del polímero sintetizado (Esquema 1.5.1.a). La siguiente figura muestra el cromatograma obtenido mediante SEC con doble detección para la muestra de PF_s-4 (Tabla 3.2.1):

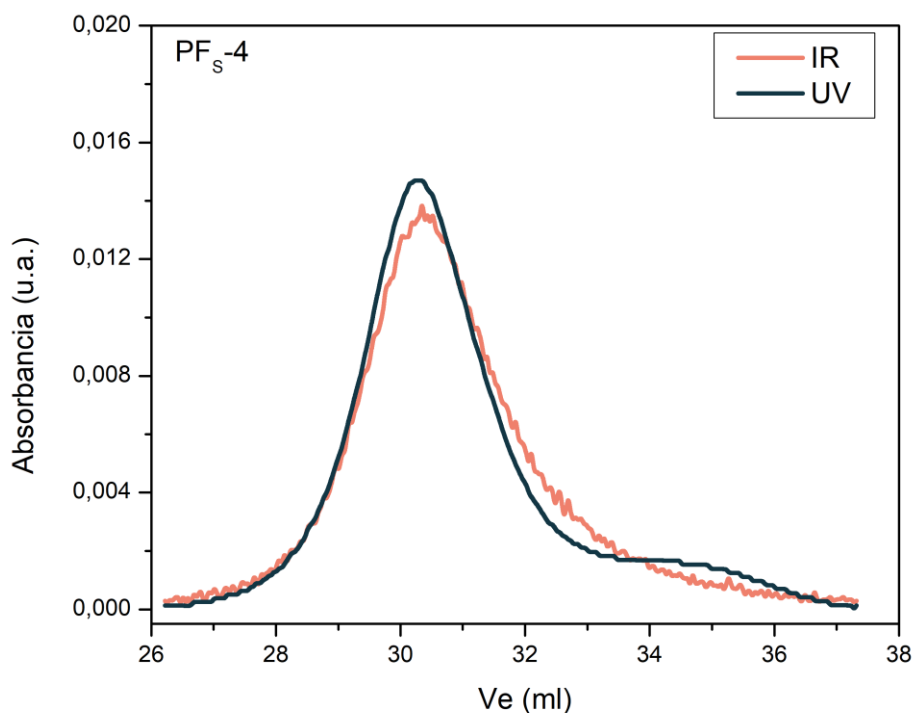


Figura 3.2.1. Elugramas normalizados de PF₅-4. Doble detección: línea azul, detección UV (254 nm) y línea rosa, detección IR (5,75 μ m).

Se observa que para el mismo tiempo de retención (proporcional al peso molecular) hay dos señales presentes en el cromatograma. Una señal en rojo correspondiente a la detección IR (C=O), proveniente de la estructura del CTA₁ y de la unidad repetitiva del monómero y otra en azul perteneciente al UV ($\lambda = 254$ nm, correspondiente a los anillos aromáticos) provenientes de los mencionados grupos del agente de transferencia. De esta manera se confirmó la síntesis de los PF₅ mediante polimerización RAFT.

3.2.2 HOMOPOLÍMEROS LINEALES: POLI FUMARATO de DI-2-OCTILO y POLI-N-ISOPROPILACILAMIDA

Posteriormente, se realizó la polimerización vía RAFT con fumarato de di-2-octilo, utilizando un agente de transferencia de cadena lineal, DDMAT (por sus siglas en inglés *2-(Dodecylthiocarbonothioylthio)-2-methylpropionic acid*), y MAIB como iniciador, obteniéndose los siguientes resultados:

HOMOPOLÍMERO	[M]/[CTA ₂]	[I]/[CTA ₂]	[M]/[I]	T (°C)	TIEMPO (h)	%C	M _w (g/mol)	IP
PFD _L -1	500	0,20	2500	60	42	ND	ND	ND
PFD _L -2	250	0,35	740	80	24	6	6400	1,6
PFD _L -3	250	0,35	740	80	24	6	6750	1,7

Tabla 3.2.2. Condiciones experimentales y características de los polímeros PFD_L.
 ND*: No Determinado.

Luego de 42 horas de reacción no fue posible aislar el polímero PFD_L-1 debido a la baja conversión obtenida. Posteriormente, se realizó la síntesis modificando la relación molar de [M]/[I]/[CTA₂]:250/0,35/1 y se obtuvieron homopolímeros vía polimerización RAFT, pero la conversión siguió siendo muy baja para los objetivos buscados. Sin embargo, en este caso, en tiempos menores de reacción se obtiene mayor conversión con respecto a los homopolímeros PF_S, lo que podría atribuirse al empleo del MAIB como iniciador radicalario. Ha sido previamente demostrado que este iniciador aumenta la tasa de polimerización de los monómeros fumáricos, debido a la diferente reactividad de los iniciadores primarios formados con respecto al AIBN [Yoshioka & Otsu, 1992].

Con el fin de obtener uno de los dos bloques del copolímero, se sintetizó un homopolímero de NIPAM (PN_L) empleando el CTA lineal, DDMAT, iniciador AIBN y una relación molar [M]/[I]/[CTA₂]:250/0,35/1, obteniéndose un polímero con una conversión del 95 % luego de 24 h de reacción a 80 °C. La caracterización se realizó por ¹H-RMN, a través de las siguientes señales características de PN_L (CDCl₃, δ_H, ppm): 1,14 ((CH₃)₂); 1,5–2,0 (-CH₂CH-); 4,01 (-NCH<); 6,29 (-NH-), identificándose el polímero

correspondiente. Posteriormente, se procedió a la copolimerización en bloque a partir de los precursores sintetizados.

3.2.3 COPOLÍMERO EN BLOQUE: POLIFUMARATO DE DI-2-OCTILO- b-POLIN-ISOPROPILACRILAMIDA LINEAL

La síntesis del copolímero en bloque se realizó mediante 2 rutas. La primera, consistió en utilizar como macro-CTA el poli fumarato de di-2-octilo lineal sintetizado previamente y en la segunda, se partió del macro-CTA obtenido a partir de poli N-isopropilacrilamida lineal como agente RAFT. En ambos casos luego de 24 h de reacción no se logró aislar el posible polímero obtenido lo cual indicaría que la conversión de reacción pudo haber sido muy baja. Previamente, se ha demostrado que solo se han obtenido copolímeros en bloque utilizando el monómero fumárico como macro-CTA y adicionando como segundo monómero, un compuesto más reactivo; pero no se ha logrado la síntesis de copolímeros en bloque por la vía inversa, probablemente debido a la baja reactividad de los monómeros fumáricos [Takada & Matsumoto, 2018].

En general, estos resultados indican que en las condiciones estudiadas no es posible obtener el material deseado. Por lo tanto, se decidió continuar con la búsqueda de un *scaffold* que presente características adecuadas para ser aplicado en regeneración tisular, empleando copolímeros estadísticos.

CAPITULO III



Parte III

Matrices basadas en
copolímeros de FDO-NIPAM:
diseño, propiedades y estudios
de biocompatibilidad

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3 MATRICES BASADAS EN COPOLÍMEROS DE FDO-NIPAM: DISEÑO, PROPIEDADES Y ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos de la síntesis y caracterización de copolímeros aleatorios de fumarato de di-2-octilo (FDO) y N-isopropilacrilamida (NIPAM). La selección de esos monómeros se basó en los resultados previos del presente trabajo de tesis; ya que al obtener biomateriales a partir de fumarato de diisopropilo (FIP) y NIPAM (Capítulo III Parte I) los mismos resultaron ser quebradizos presentando malas propiedades mecánicas. Por lo anterior, para la síntesis llevada a cabo en el presente capítulo de tesis, se seleccionó como monómero fumárico a FDO ya que presenta una cadena lateral más larga que el monómero FIP lo cual podría conferir al copolímero a sintetizar menor temperatura de transición vítrea (T_g) y, como comonómero se mantuvo la NIPAM, dado que los materiales no presentaron citotoxicidad y se observó una buena viabilidad celular con macrófagos. Además, este monómero ha sido utilizado en numerosas aplicaciones biomédicas, y presenta características particulares como la respuesta a estímulos térmicos.

En esta parte del trabajo, se presentan los ensayos llevados a cabo con los copolímeros obtenidos para diseñar un biomaterial con el fin de ser utilizado en regeneración de tejido óseo. Debido a la aplicación buscada, se realizaron ensayos de biocompatibilidad sobre el material obtenido cuyos resultados serán detallados en el presente capítulo. El mismo finaliza con un estudio detallado de la respuesta al estímulo térmico de los biomateriales obtenidos.

3.3.1 POLI (FUMARATO de DI-2-OCTILO-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA), (DFN)

- Síntesis y Caracterización

Se sintetizaron nuevos copolímeros fumáricos anfífilos (a los que llamaremos DFN), a partir de los monómeros fumarato de di-2-octilo y N-Isopropilacrilamida, mediante polimerización radical, utilizando 2 iniciadores diferentes (AIBN y MAIB) con el fin de evaluar su influencia en las características macromoleculares (sección 2.5.5) de los copolímeros obtenidos. Para ello se ensayaron diferentes relaciones molares de los comonómeros en la mezcla de reacción, como se muestra en la Tabla 3.3.1.a, donde las condiciones de polimerización empleadas fueron: [Iniciador] = 40 mM, 25 %v/v solución de tolueno, 60 °C durante 96 h de reacción.

POLÍMEROS DFN	INICIADOR	[FDO]:[NIPAM]
1	AIBN	30:70
2		50:50
3		60:40
4		70:30
5	MAIB	40:60
6		45:55
7		50:50
8		60:40

Tabla 3.3.1.a. Diferentes composiciones de comonómeros en la mezcla de reacción estudiadas en la síntesis de DFN.

La estructura de los copolímeros obtenidos se investigó por métodos espectroscópicos. En la siguiente figura se muestran los espectros de FT-IR para el copolímero denominado DFN-2 en la Tabla 3.3.1.a a modo representativo de los obtenidos empleando como iniciador AIBN en color verde y de manera similar se muestra un espectro de FT-IR del copolímero DFN-6 representativo de los obtenidos al emplear MAIB como iniciador:

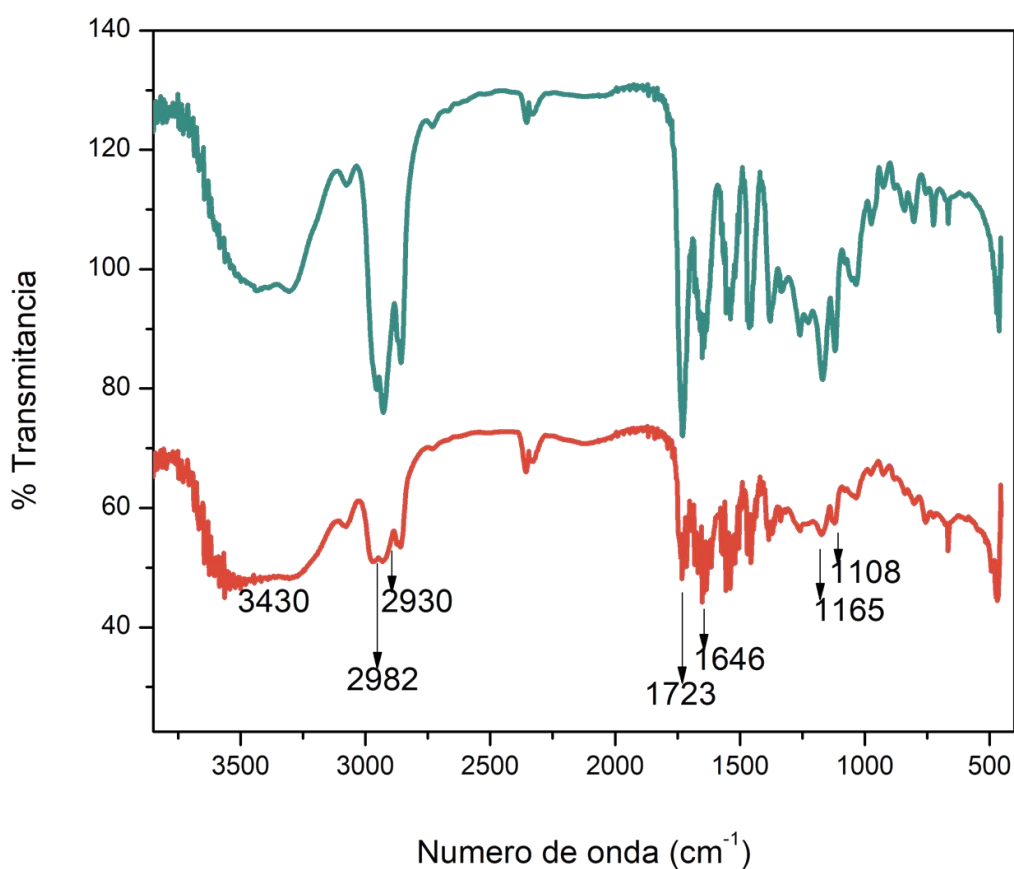


Figura 3.3.1.a. Espectro FT-IR de los Copolímeros DFN sintetizados a partir del iniciador AIBN (color verde) y MAIB (color rojo).

Pueden observarse, para ambos casos las siguientes señales características (cm⁻¹) de los copolímeros obtenidos: 3430 (N-H), 2982, 2930 (C-H), 1723 (C=O éster), 1646 (C=O amida), 1165 (CO-OR), 1108 (C-O).

Posteriormente, la estructura de los polímeros sintetizados se confirmó mediante espectroscopía $^1\text{H-RMN}$; en este caso y al igual que en la caracterización por FT-IR se muestran los espectros representativos para uno de los copolímeros sintetizados empleando AIBN como iniciador, denominado DFN-2 (color verde) ó MAIB, DFN-6 (color rojo):

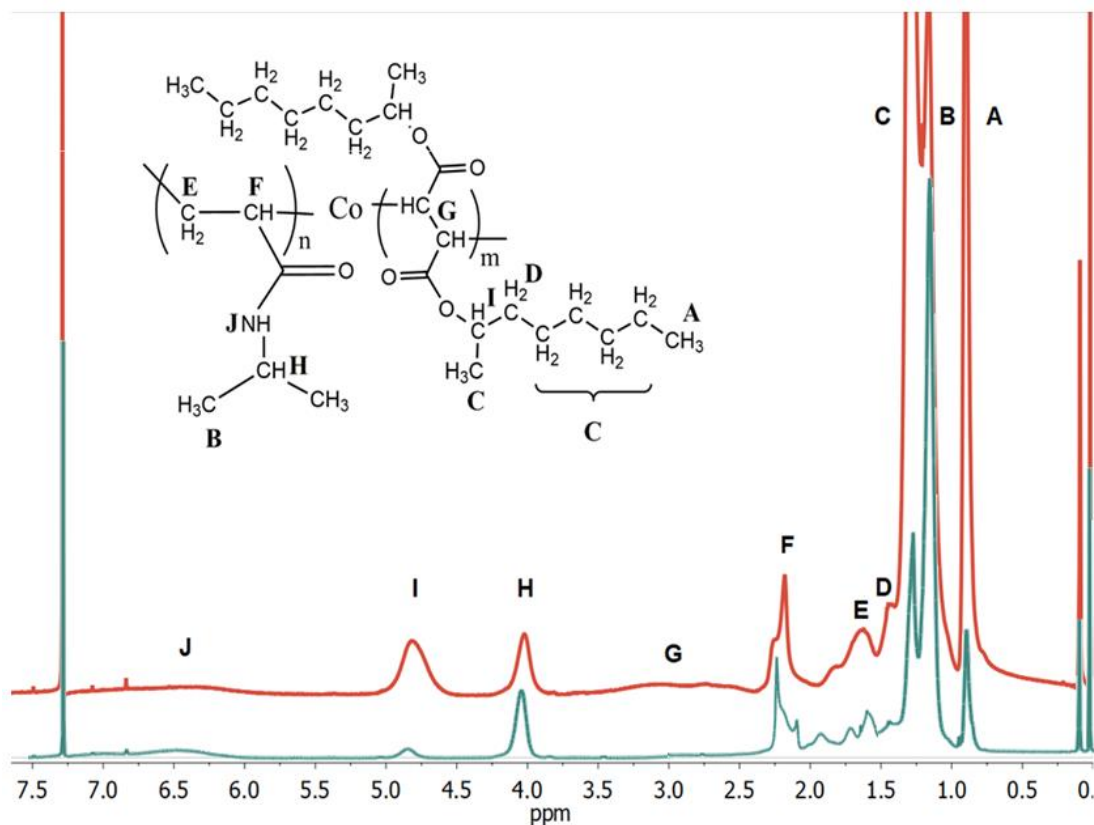


Figura 3.3.1.b. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ de los copolímeros DFN-2 (verde), DFN-6 (rojo).

Las señales características para los polímeros DFN, (CDCl_3 , δ_{H} , ppm) son: 0,90 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$, A); 1,16 ($\text{CH}_3\text{-CH}<$, B); 1,29 ($\text{-(CH}_2\text{)}_4$, C); 1,45 ($\text{-CH}_2\text{-CH-O-}$, D); 1,64 ($\text{-CH}_2\text{-}$ cadena principal, E); 2,18 (-CH-CON- cadena principal, F); 2,06-3,10 (-CH-COO- cadena principal, G); 4,03 ($\text{NCH}<$, H); 4,84 ($\text{-OCH}<$, I) y 6,35 (NH , J).

La composición de los comonómeros en el copolímero se estimó a partir de la integración de los picos a 4,84 y 4,03 correspondientes al ($\text{-OCH}<$) del FDO y a ($\text{NCH}<$) del NIPAM, respectivamente, utilizando la siguiente ecuación:

$$F_1 = \frac{I(\text{OCH})}{I(\text{OCH}) + 2I(\text{NCH})} \quad (3.3.1.a)$$

donde F_1 , es la fracción molar de FDO en el copolímero, $I(\text{OCH})$ y $I(\text{NCH})$ representan las áreas correspondientes a la integración de las señales de $^1\text{H-RMN}$ a 4,84 y 4,03 ppm, respectivamente. Los resultados obtenidos y la caracterización de cada copolímero sintetizado, así como la fracción molar del comonomero FDO en la mezcla de reacción (f_1), la fracción molar del comonomero FDO en el copolímero (F_1), el porcentaje de conversión (%C), el peso molecular promedio en peso (M_w) y el índice de polidispersidad (IP), se muestran en la siguiente tabla:

POLÍMEROS DFN	INICIADOR	f_1^*	F_1^*	C (%)	M_w (g/mol)	IP
1	AIBN	0,30	0,10	26	-	-
2		0,50	0,10	14	11620	2,4
3		0,60	0,59	13	17082	2,8
4		0,70	0,71	10	15041	2,8
5	MAIB	0,40	0,15	33	119728	2,3
6		0,45	0,28	38	64462	7,5
7		0,50	0,62	28	60770	9,4
8		0,60	0,76	26	24953	4,2

Tabla 3.3.1.b. Características de los copolímeros DFN sintetizados.

* f_1 : fracción molar del comonomero FDO en la mezcla de reacción y F_1 : fracción molar del comonomero FDO en el copolímero obtenida por $^1\text{H-RMN}$.

Como se observa en la tabla 3.3.1.b, a la misma concentración de iniciador, se percibe un comportamiento diferente al emplear AIBN o MAIB como iniciadores. En el primer caso, la conversión disminuyó al aumentar f_1 , mientras que el %C no fue afectado significativamente cuando se empleó MAIB como iniciador. Como se mencionó en capítulos anteriores, estas observaciones podrían atribuirse a una mayor velocidad de

polimerización (R_p) del monómero fumárico en presencia de MAIB, a diferencia de lo observado para otros monómeros vinílicos o acrílicos, donde la velocidad de polimerización es independiente de la naturaleza del iniciador [Yoshioka & Otsu, 1992]. También se observaron algunas diferencias en el peso molecular promedio, cuando se utilizaron los distintos iniciadores. Es posible ver que al utilizar AIBN como iniciador, cuando f_1 aumenta, el M_w e índice de polidispersidad prácticamente no cambian; mientras que si se observó un aumento de M_w e IP al emplear MAIB como iniciador con respecto a las polimerizaciones llevadas a cabo con AIBN bajo iguales condiciones experimentales. Este comportamiento podría atribuirse a la menor reactividad del FDO con respecto a NIPAM, la cual es modificada e incrementada en presencia de MAIB. Lo anterior, se pone en evidencia al observar las reacciones llevadas a cabo con el mismo valor f_1 , donde se encuentra un aumento en el contenido del comonómero FDO en el copolímero (F_1) al emplear MAIB como iniciador (Tabla 3.3.3.1.b polímeros 2 y 7). Por otro lado, el alto IP observado podría ser consecuencia de reacciones de transferencia de cadena, como se informó anteriormente para sistemas similares [Pasqualone et al., 2013]. Para verificar esta hipótesis, se realizó la cinética de reacción iniciada por MAIB ($f_1 = 0,5$) y se analizó la distribución de peso molecular hasta 4 días de reacción; en la Figura 3.3.1.c se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por SEC (volumen de elución (V_e) vs. absorbancia) de los copolímeros sintetizados a los 2, 3 y 4 días de reacción:

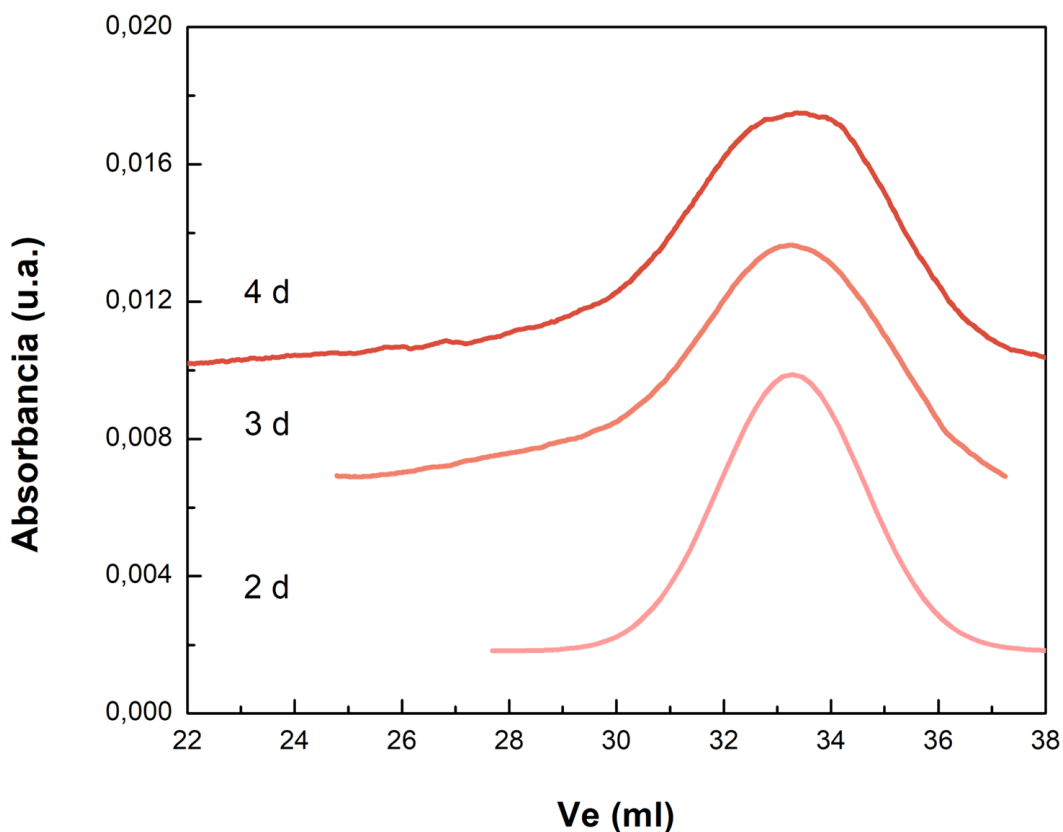


Figura 3.3.1.c. Perfil Cromatográfico de DFN-7 (muestra 7, en Tabla 3.3.1.b) en función del tiempo de reacción.

Los valores de pesos moleculares promedio en peso (M_w), los índices de polidispersidad (IP) y los porcentajes de conversión (%C) obtenidos para los distintos tiempos de reacción se muestran en la siguiente tabla:

Tiempo (d)	% C	M_w (kg/mol)	IP
2	17	24,05	2,70
3	21	52,54	6,40
4	28	60,77	9,40

Tabla 3.3.1.c. Características de los polímeros DFN-7 en función del tiempo.

Tanto en la Figura como en la Tabla 3.3.1.c; es posible observar un aumento de los valores para IP cuando aumenta la conversión a medida que incrementa el tiempo de reacción. Este comportamiento podría deberse a un aumento en las reacciones de transferencia de cadena.

Además, a fin de comparar el comportamiento de copolimerización empleando los dos iniciadores azo, se analizaron las correspondientes curvas de copolimerización. La Figura 3.3.1.d muestra el gráfico de las fracciones molares de FDO en la mezcla de reacción (f_1) con respecto a las fracciones molares de FDO en los copolímeros sintetizados (F_1), utilizando los dos iniciadores (AIBN y MAIB).

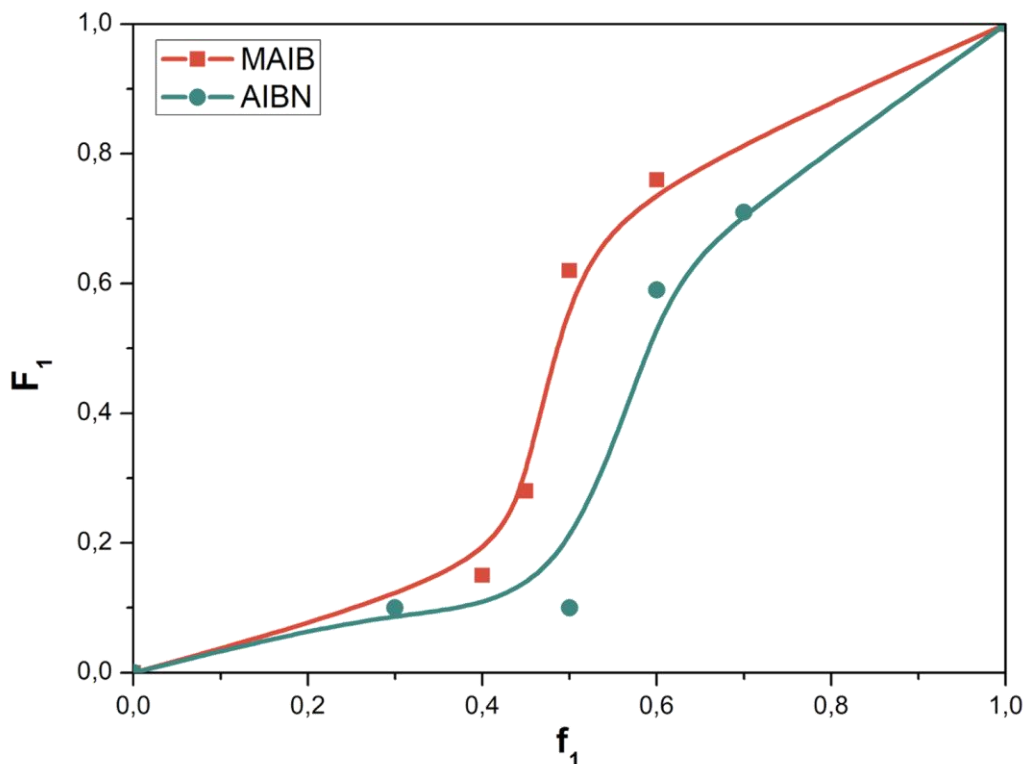


Figura 3.3.1.d. Composición de los copolímeros FDO-NIPAM, empleando distintos iniciadores azo: MAIB (curva roja) y AIBN (curva verde). [Iniciador] = 40 mM, 60 °C, 96 h de reacción.

En ambos casos, el sistema muestra la misma tendencia con mayores variaciones en F_1 cuando $f_1 > 0,5$, lo que evidencia la preferencia del macroradical en crecimiento para incorporar el monómero FDO a partir de esa composición en la mezcla inicial. Además, estos resultados sugieren una mayor reactividad del monómero N-Isopropilacrilamida, similar a lo encontrado para otras copolimerizaciones de ésteres fumáricos con monómeros acrílicos [Otsu et al., 1992; Oberti et al., 2012; Matsumoto & Sumihara, 2017]. El diferente comportamiento observado, relacionado con el tipo de iniciador utilizado podría atribuirse a que el radical primario generado a partir de AIBN tiene una reactividad de iniciación menor que la de MAIB, como se demostró previamente para las homopolimerizaciones de otros dialquilfumarato [Yoshioka & Otsu, 1992]

- Propiedades térmicas

Algunos de los copolímeros sintetizados en este trabajo de tesis, se utilizarán como materia prima para diseñar *scaffolds* para regeneración de tejido óseo. Como se mencionó previamente, debido a que los biomateriales dirigidos a estas aplicaciones deben esterilizarse antes de realizar ensayos biológicos, es importante conocer su comportamiento térmico para evitar su descomposición o alteración por calor durante su procesamiento. En este sentido, se realizó el ensayo por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los copolímeros sintetizados y se analizaron los resultados con el fin de obtener el valor de temperatura de transición vítrea (T_g). La Figura 3.3.1.e presenta los correspondientes termogramas junto con los valores experimentales de T_g para cada muestra (color verde para los copolímeros sintetizados empleando AIBN como iniciador (A) y en rojo para aquellos obtenidos al emplear MAIB (B). Los números a la derecha corresponden a la designación de las muestras en la Tabla 3.3.1.a).

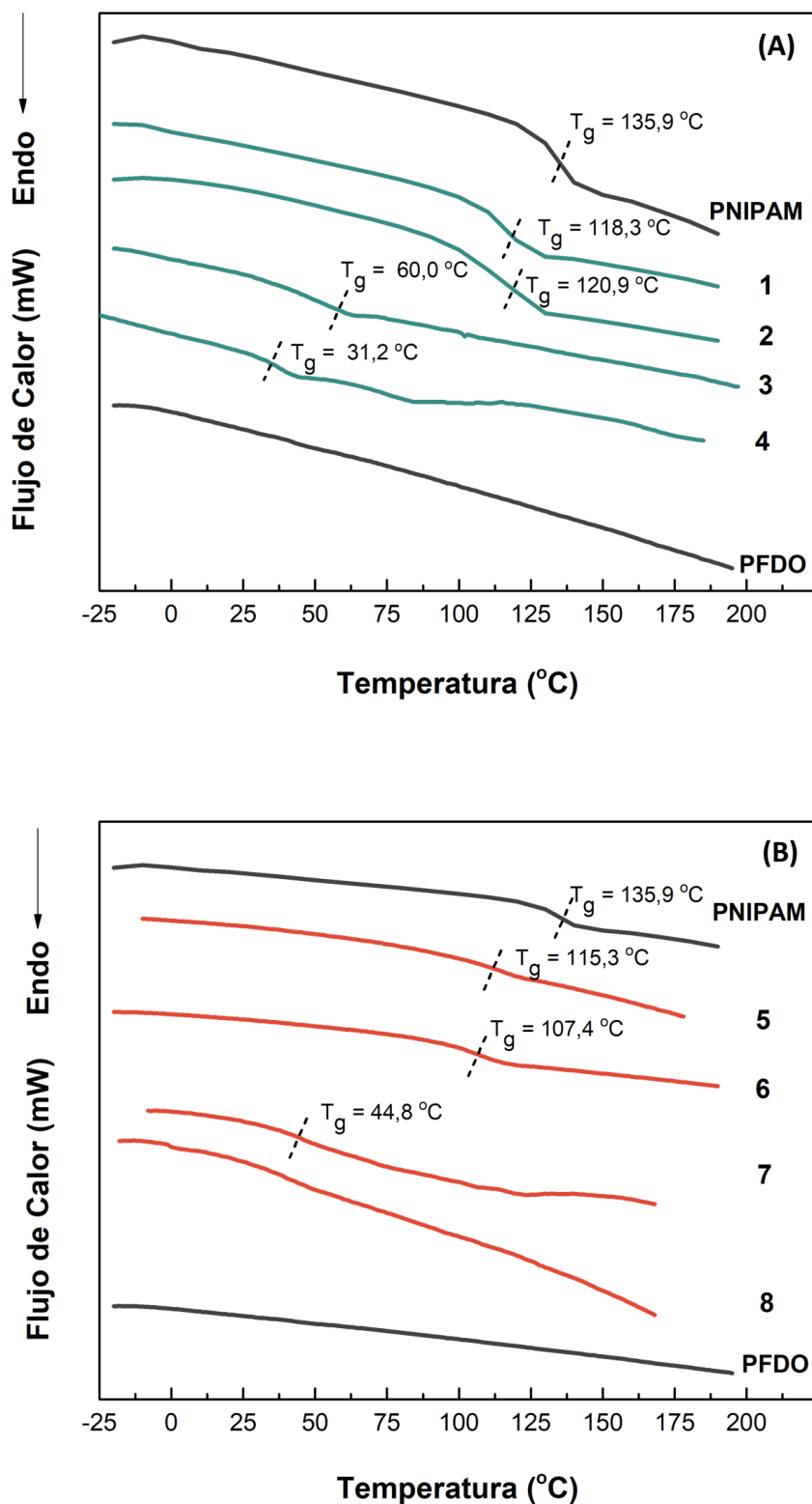


Figura 3.3.1.e. Termogramas observados por DSC de los homopolímeros PFDO y PNIPAM y de los copolímeros sintetizados a partir del iniciador AIBN (color verde, A) y MAIB (color rojo, B) correspondientes a las muestras de la Tabla 3.3.1.a.

Todos los copolímeros muestran una T_g única, que depende del contenido molar de los comonómeros y presentan un valor de T_g intermedio entre los de los respectivos homopolímeros, como es de esperarse para los copolímeros aleatorios. Los valores de T_g informados en la literatura para PNIPAM y PFDO son $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente [Silva et al., 2000; Pasqualone et al., 2013]. Como se puede ver en la Figura 3.3.1.e, a medida que aumenta el contenido del monómero FDO en el copolímero, el valor de T_g disminuye, utilizando ambos iniciadores AIBN ó MAIB. Los valores de T_g para PFDO y para el copolímero con el mayor contenido de FDO no fueron evidentes en los termogramas, similar a lo observado previamente por otros investigadores [Otsu et al., 1988; Cochin et al., 2000].

Por otro lado, en base a las propiedades previamente determinadas, las muestras 2 y 6 de la Tabla 3.3.1.a (designadas como DFN-10 y DFN-30, respectivamente; donde el número indica la composición molar de FDO en el copolímero (F_1) determinado por $^1\text{H-NMR}$) se seleccionaron para analizar el efecto de la composición del copolímero en la estabilidad térmica mediante análisis termogravimétrico. La selección de los polímeros analizados se basó en algunas de sus características, tales como F_1 (composición de comonómero en el copolímero), M_w (peso molecular promedio en peso), %C (porcentaje de Conversión) y valor de T_g , con el fin de diseñar un buen *scaffold* según sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Las curvas de descomposición térmica se presentan en la Figura 3.3.1.f, a partir de la cual se obtuvieron los siguientes parámetros: temperaturas de descomposición inicial (IDT) y temperaturas máximas de descomposición ($T_{\text{max}1}$ y $T_{\text{max}2}$), tabulados en la Tabla 3.3.1.d.

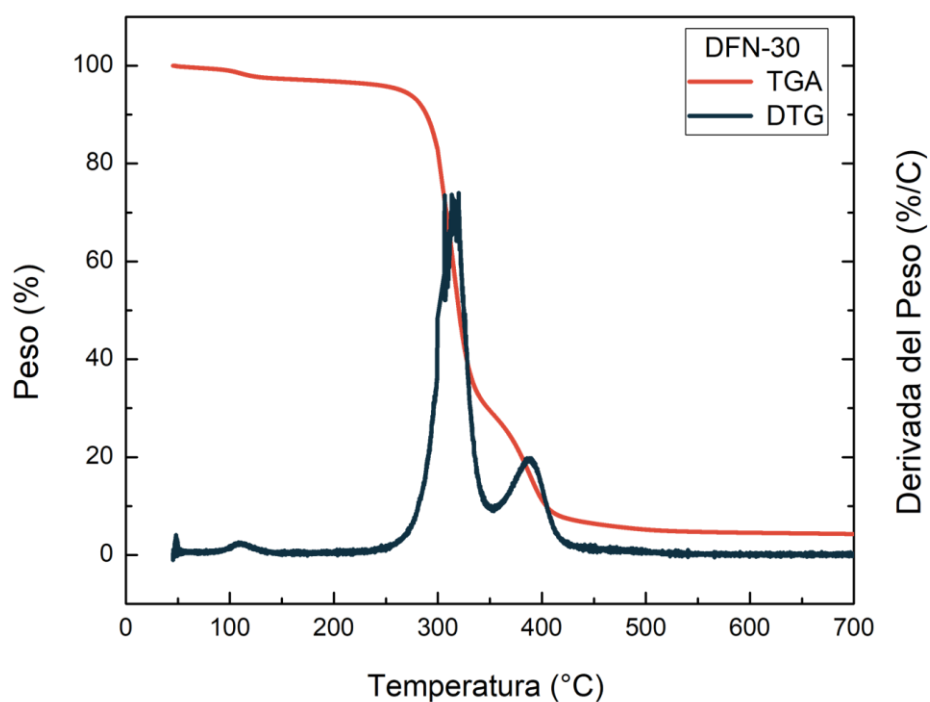
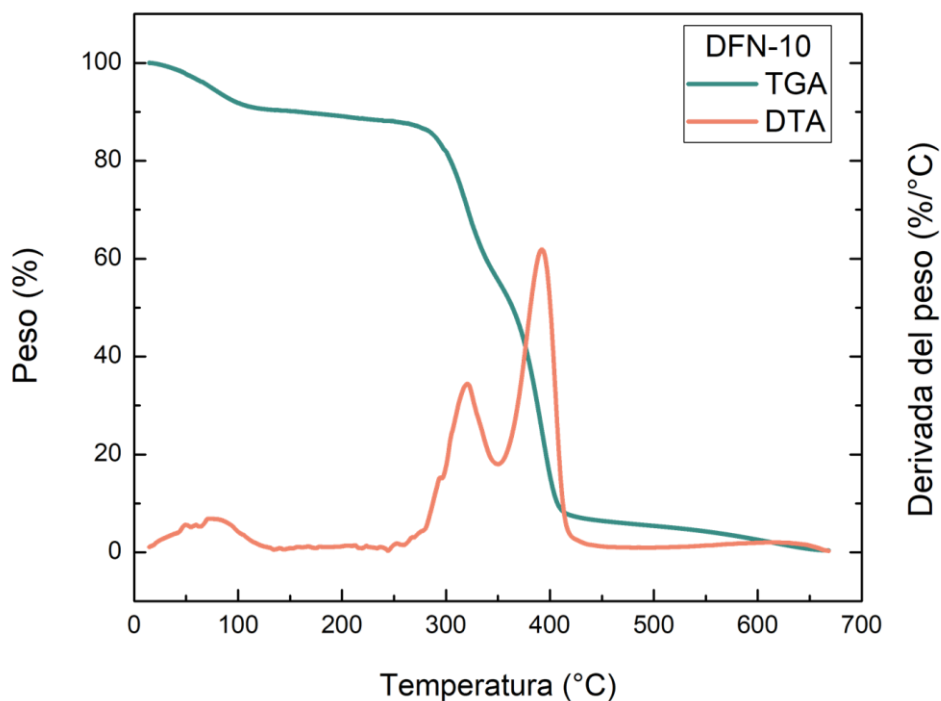


Figura 3.3.1.f. Curvas de TGA y DTG bajo atmósfera de Nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min para DFN-10 y DFN-30.

Polímeros	F ₁	T _g (°C)	IDT	T _{max1} *	T _{max2} *
DFN-10	0,10	120,7	268	320 (33)	392(49)
DFN-30	0,28	107,4	254	315 (67)	382(21)

Tabla 3.3.1.d. Datos obtenidos a partir del DSC y TGA de los copolímeros DFN.

#Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de masa perdido hasta la temperatura indicada.

Los eventos térmicos observados en los termogramas hasta 200 °C podrían atribuirse a la eliminación de los solventes residuales o al agua ambiental absorbida. Ambos copolímeros parecen descomponerse en un proceso de dos etapas y mostraron temperaturas de descomposición iniciales más bajas que el homopolímero PNIPAM (350 °C). Silva y colaboradores informaron que la degradación térmica de PNIPAM se produce en una sola etapa, cerca de 420 °C [Silva et al., 2000]. Anteriormente se demostró que los copolímeros fumáricos pueden descomponerse en una o dos etapas, dependiendo del par de comonómeros, en donde el primer evento de descomposición puede atribuirse a la pérdida del grupo lateral por la reacción de escisión del grupo pendiente [Baruah et al., 2011; Oberti et al., 2012]. En el presente caso, los dos eventos térmicos observados pueden atribuirse a la pérdida del grupo dioctil lateral del monómero fumárico y a la escisión final de la cadena principal, respectivamente.

Estos resultados muestran que los copolímeros sintetizados exhibieron una alta estabilidad térmica, lo que sugiere que podrían someterse a un proceso de esterilización térmica sin sufrir descomposición.

3.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS SCAFFOLDS

- Apariencia y Morfología

Varios estudios han demostrado que la química de la superficie y las características topográficas (rugosidad, porosidad y nanoestructura) desempeñan un papel importante no solo en la adhesión celular inicial, sino también en la proliferación y diferenciación de muchos tipos de células [Lastra et al., 2015; Park & Im, 2015; Seal et al., 2001]. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis, examinamos las características morfológicas de los *scaffolds* obtenidos a partir de los copolímeros DFN-10 y DFN-30 (muestras 2 y 6 de la Tabla 3.3.1.a), preparados por el método de *casting* y *electrospinning*, con el fin de analizar el efecto de la composición de los comonómeros en el copolímero ($F_1 = 10$ y 30 , respectivamente) y el diseño de los mismos (*casting* y *electrospinning*) sobre la respuesta celular. De aquí en adelante se le adicionará en la nomenclatura una letra **c**, a aquellos *scaffolds* obtenidos a partir del método de *casting*, por lo tanto, los mismos serán llamados, DFN-10c y DFN-30c y una letra **e**, en el caso de las matrices elaboradas por *electrospinning*, DFN-10e y DFN-30e. Se ha determinado el espesor de los *scaffolds* preparados mediante la técnica de *casting*, obteniéndose un valor de $206 \pm 6 \mu\text{m}$ y $230 \pm 5 \mu\text{m}$ para DFN-10c y DFN-30c, respectivamente; mientras que para los *scaffolds* obtenidos por *electrospinning* fue de $72 \pm 7 \mu\text{m}$ y $78 \pm 2 \mu\text{m}$, para DFN-10e y DFN-30e, respectivamente. La topografía de los *scaffolds* obtenidos fue observada a través de imágenes SEM (Figura 3.3.2.a).

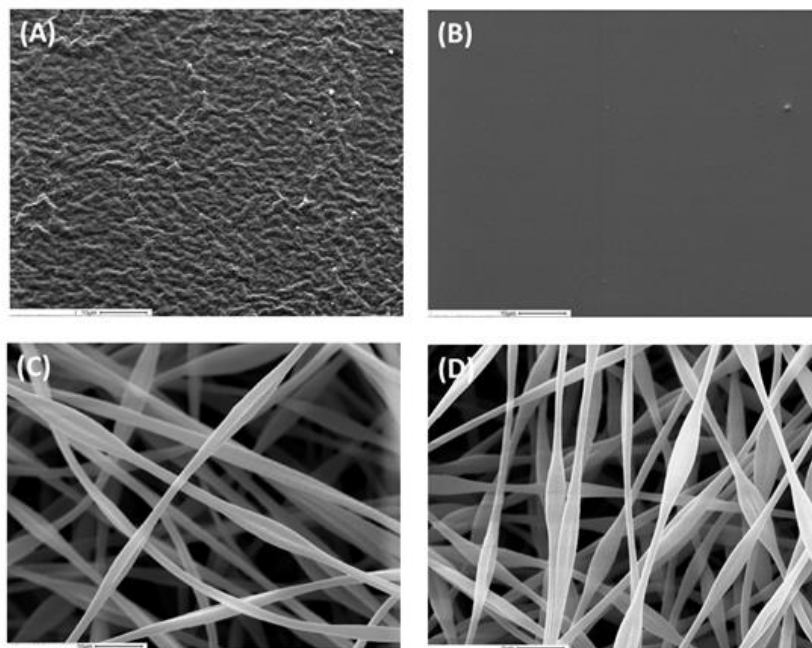


Figura 3.3.2.a. Imágenes SEM de los scaffolds. (A) DFN-10c, (B) DFN-30c, (C) DFN-10e y (D) DFN-30e. Aumento 1000x.

En la Figura 3.3.2.a (A) y (B) se muestran las imágenes correspondientes a la morfología de la superficie de las películas elaboradas por el método de *casting* de DFN-10c y DFN-30c, respectivamente. Las imágenes revelan superficies lisas y homogéneas sin poros y algo rugosas en el caso de DFN-10c. Por otro lado, la técnica de *electrospinning* nos permite obtener *scaffolds* fibrosos como se puede observar en las imágenes SEM de la Figura 3.3.2.a (C) y (D). En estos casos, las micrografías muestran una matriz altamente porosa que consiste en fibras aleatorias con diámetros de $3,15 \mu\text{m} \pm 0,30 \mu\text{m}$ y $2,92 \mu\text{m} \pm 0,30 \mu\text{m}$ para DFN-10e y DFN-30e, respectivamente.

- Ángulo de contacto

La interacción inicial de las células con la superficie, depende también de la hidrofiliidad de los materiales [Ramirez et al., 2011; Simon et al., 2007], debido a que las interacciones entre los biomateriales y las células pueden estar relacionadas con las propiedades de humectación del *scaffold*, influyendo en el comportamiento celular. Con

la finalidad de evaluar este aspecto, se realizaron medidas de ángulo de contacto (AC) con agua sobre las diferentes matrices, los resultados se muestran en la siguiente figura:

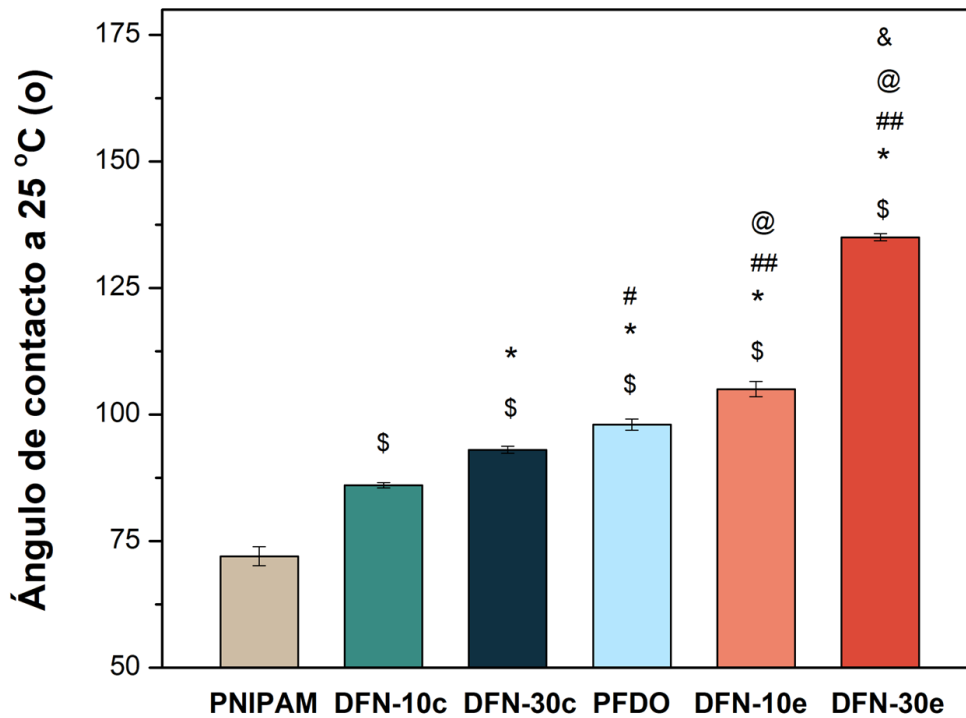


Figura 3.3.2.b. Ángulo de Contacto a 25 °C para los distintos *scaffolds* DFN. Los datos se expresaron como la media \pm SEM, n = 6. Diferencias significativas: \$ p<0,001 vs PNIPAM; *p<0,001 vs DFN-10c; # p< 0,05, ## p<0,001 vs DFN-30c; @ p<0,001 vs PFDO; & p<0,001 vs DFN-10e.

La Figura 3.3.2.b muestra el ángulo de contacto de los diferentes *scaffolds* previamente mencionados, incluyendo los valores correspondientes de las membranas preparadas por *casting* a partir de los homopolímeros (PNIPAM y PFDO). Es posible ver un aumento del ángulo de contacto con el aumento del porcentaje del monómero más hidrófobo en el copolímero (DFN-10 vs. DFN-30), siendo más significativo en el caso de los *scaffolds* con morfología fibrosa. Este resultado concuerda con lo esperado, basado no solo en la composición de los copolímeros sino también en su morfología, como puede apreciarse por el aumento significativo de esta propiedad en el caso de las fibras

(DFN-10e y DFN-30e) en comparación con los *scaffolds* obtenidos por *casting* (DFN-10c y DFN-30c). Este comportamiento podría explicarse en base a diferentes modelos que consideran el efecto de la humectación de sólidos con arquitectura porosa o texturizada [Cassie & Baxter, 1944; Wenzel, 1936]. En nuestras muestras, preparadas por *electrospinning*, debido a que existen bolsas de aire debajo de la gota de agua, la superficie sigue el modelo de estado Cassie-Baxter, lo que conduce a un aumento en el ángulo de contacto. Resultados similares se han descrito para otros sistemas de materiales análogos, pero con topografía superficial diferente [Lastra et al., 2015; Pavlov et al., 2004; Szewczyk et al., 2019].

- Propiedades Mecánicas

En el campo de los sustitutos óseos son de especial importancia las propiedades mecánicas de los mismos, las cuales deben ser lo más cercanas posibles a las del tejido que se desea reemplazar (compatibilidad mecánica) para evitar la pérdida de masa ósea que se asocia al uso de implantes óseos. El comportamiento mecánico de las películas desarrolladas en el presente trabajo, se estudió mediante el ensayo de tracción teniendo en cuenta las curvas de tensión vs. deformación generadas por el equipo (sección 2.9.6). A partir de estos ensayos se determinó el módulo elástico (ME), el cual se calculó a partir de la pendiente de la porción lineal inicial (región elástica) de la curva, la máxima resistencia tensil definida como la tensión máxima soportada por la muestra durante la prueba de tracción y el porcentaje de elongación al quiebre calculado como el porcentaje máximo de desplazamiento alcanzado antes del quiebre de la muestra durante la prueba (Figura 3.3.2.c). Los datos en base a los cálculos realizados para las matrices se presentan en la Tabla 3.3.2.a, como la media \pm SEM considerando los valores medios de muestras independientes ($n = 8$). En este caso se determinaron las propiedades mecánicas solamente para los *scaffolds* obtenidos por el método de

casting, debido a que las matrices fibrosas presentan un espesor muy pequeño que dificultó el manejo de la muestra para realizar el ensayo de tracción.

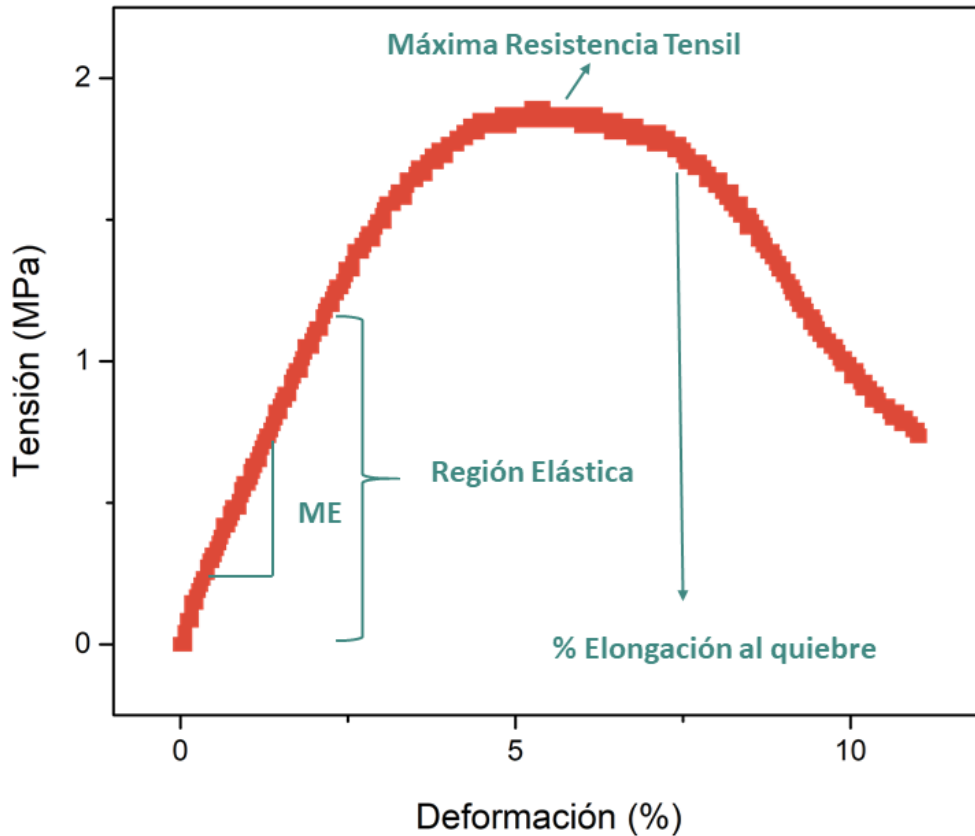


Figura 3.3.2.c. Curva de Tensión vs. Deformación

Matrices	Módulo Elástico (MPa)	Máxima Resistencia Tensil (MPa)	Elongación al quiebre (%)
DFN-10c	63,3 ± 3,1	1,4 ± 0,2	6,6 ± 0,4
DFN-30c	66,7 ± 5,5	1,7 ± 0,1	10,1 ± 0,6

Tabla 3.3.2.a. Propiedades mecánicas de las matrices DFN-10c y DFN-30c (n = 8).

No se encontraron diferencias significativas con respecto al módulo elástico de los *scaffolds* obtenidos por el método de *casting*, siendo el módulo elástico independiente de la composición de los monómeros en el copolímero, ya que los valores de ME

encontrados fueron similares. En vista de la aplicación buscada, se conoce que las propiedades mecánicas del hueso varían ampliamente entre el hueso trabecular y el hueso cortical; así como también dependen de la ubicación anatómica del hueso, encontrando valores en el módulo elástico que van desde 100 a 500 MPa para el hueso trabecular y entre 12000 y 18000 MPa para el hueso cortical [Rezwan et al., 2006]. Esta alta resistencia a la tracción y la resistencia a la fractura del hueso se atribuyen a las fibras de colágeno resistentes y flexibles reforzadas por los cristales de hidroxapatita. Sin embargo, se han encontrado valores más pequeños del módulo elástico de aproximadamente 40 MPa para el hueso trabecular del esternón [Furusu et al., 2001]. Además, es conocido que las propiedades mecánicas del hueso trabecular varían mucho según su localización anatómica y función [Goldstein, 1987]. En este caso, el módulo elástico determinado para las matrices estudiadas en esta tesis es cercano a algunos tipos del hueso trabecular. Así como también, estos valores también son cercanos a los encontrados para el cartílago articular (cartílago que se encuentra en los extremos de los huesos, Esquema 1.1.1), en este caso, los valores del módulo elástico varían entre 5 a 25 MPa, dependiendo de la ubicación de la articulación y de la profundidad en el tejido [Athanasίου et al., 2009]. Este módulo elástico corresponde esencialmente a una medida de la matriz sólida de colágeno y varía también por la orientación de las fibras de colágeno en el tejido [Roth & Mow, 1980].

3.3.3 ENSAYOS IN VITRO

3.3.3.1 DEGRADACIÓN POR ACCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS

Otra característica relevante que deben reunir los materiales para ser utilizados en ingeniería de tejido óseo es que los mismos deben poseer una velocidad de degradación lo más cercana posible a las tasas de formación del tejido que se pretende regenerar. Esto constituye un reto a la biocompatibilidad debido a que los productos de la degradación no deben ser tóxicos.

Se conoce que los polifumaratos poseen un esqueleto compuesto por una estructura lineal C-C que los hace tener una biodegradabilidad menor con respecto a otros polímeros sintéticos. Sin embargo, en trabajos previos del grupo de investigación se ha demostrado que podrían ser biodegradables por mecanismos celulares oxidativos [Cortizo et al., 2008]. Por lo tanto, la posible degradación de los *scaffolds* se evaluó bajo condiciones celulares utilizando macrófagos RAW 264.7 a 37 °C y determinando la pérdida de peso después de 7 y 14 días de cultivo (Figura 3.3.3.1).

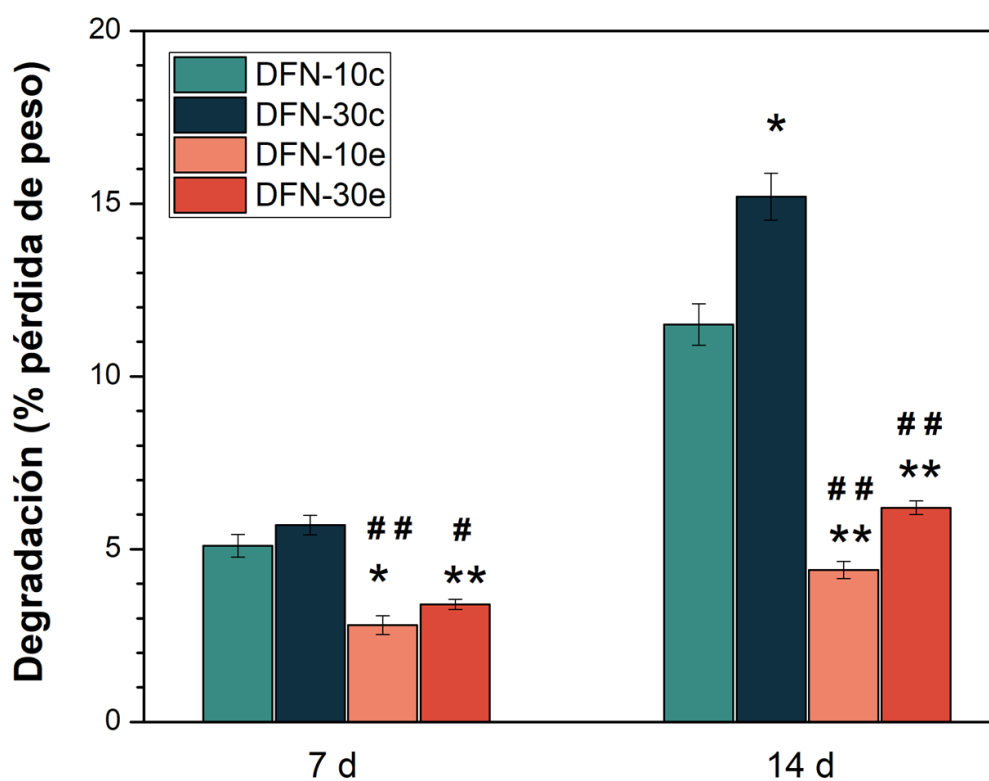


Figura 3.3.3.1. Degradación por acción de Macrófagos RAW 264.7 luego de 7 y 14 días. Evaluación por porcentaje de pérdida de peso. Datos expresados como la media \pm SEM, n = 3. Diferencias significativas: * p<0,01; ** p < 0,001 vs DFN-10c y # p<0,01; ## p<0,001 vs DFN-30c.

Como puede observarse en la Figura 3.3.3.1, se encontró un aumento en la pérdida de peso para todos los *scaffolds* en función del tiempo, con un máximo de aproximadamente 11 % y 15 % en pérdida de peso después de 14 días de incubación

para DFN-10c y DFN-30c, respectivamente. Por el contrario, para DFN-10e y DFN-30e, los valores correspondientes fueron aproximadamente 4 % y 6 %. Por lo tanto, la degradación inducida por los macrófagos fue significativamente menor ($p < 0,001$) para las matrices preparadas por *electrospinning* que para los obtenidos por *casting*.

Bajo estas condiciones de degradación, se podría hacer una proyección de la degradación de los *scaffolds* a largo plazo y se podría predecir que las matrices obtenidas por el método de *casting* podrían ser degradadas completamente después de 3-4 meses, mientras que las obtenidas por *electrospinning* podrían ser degradadas completamente luego de 8-12 meses. Estos tiempos serían adecuados para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo ya que según trabajos previos la regeneración ósea en casos como fractura de hueso largo se produciría en tiempos de 3–9 meses y en aplicaciones craneomaxilofaciales los tiempos de regeneración ósea corresponden a 6–9 meses [Bose et al., 2012; Wang et al., 2019]. Con estos resultados en mente, podría ser posible desarrollar un *scaffold* con determinada composición y morfología de modo que su tiempo de degradación sea similar a la regeneración del tejido huésped a tratar.

3.3.3.2 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Una propiedad fundamental de los biomateriales es que los mismos no deben generar efectos citotóxicos, genotóxicos o respuesta inmune al integrarse con el organismo huésped. Por lo anterior, en el presente trabajo de tesis, se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre los diferentes *scaffolds* empleando células macrofágicas RAW 264.7, evaluándose la producción de Óxido Nítrico (NO), producción de citoquinas y la morfología celular por SEM.

- Producción de Óxido Nítrico

Se evaluó la posible citotoxicidad de los *scaffolds* mediante producción de óxido nítrico (NO) por el método de Griess, obteniéndose los siguientes resultados:

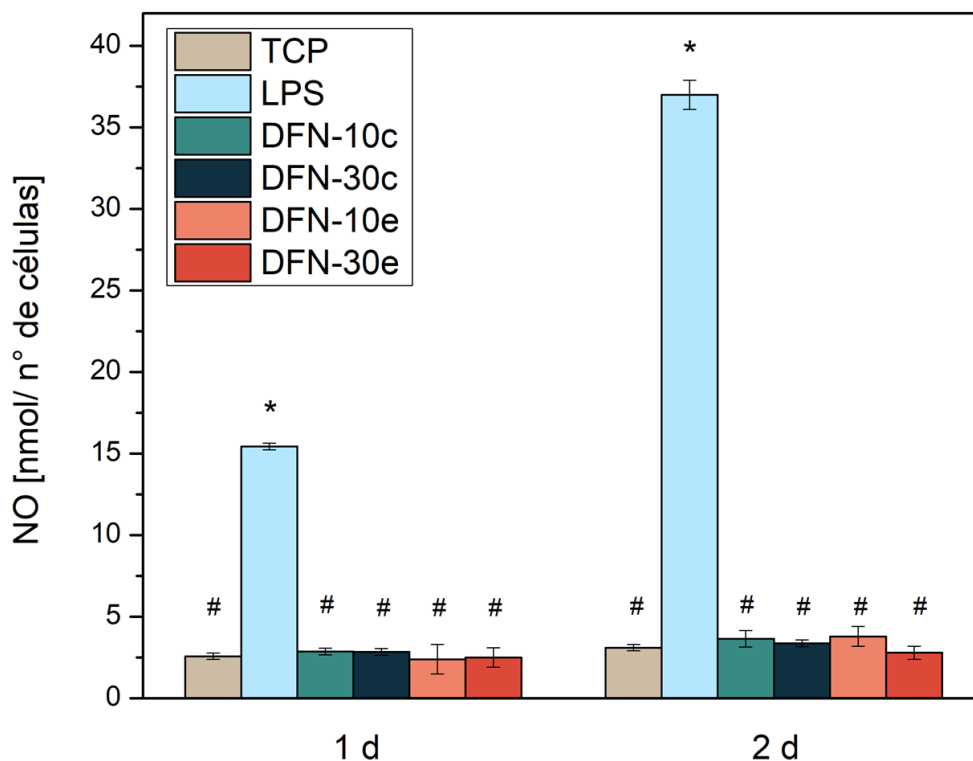


Figura 3.3.3.2.a. Niveles de NO (nmol/n°células) luego de 1 y 2 días de cultivo. Datos expresados como la media \pm SEM, n=12. Diferencias significativas: * $p < 0,001$ vs TCPS; # $p < 0,001$ vs TCPS + LPS.

Los estudios de producción de NO en macrófagos demostraron que ninguno de los *scaffolds* preparados presenta efectos citotóxicos, dado que la generación de NO cuando las células crecieron sobre las membranas fue similar a la encontrada para el caso en el que las células fueron crecidas sobre la placa de cultivo control (TCP), no encontrándose diferencias significativas. En cambio, sí se encontraron diferencias significativas con respecto al control positivo de citotoxicidad (LPS). Estos resultados fueron similares a los reportados para las películas de FIP y NIPAM presentadas en el Capítulo III Parte I, lo que sugiere que ni la composición ni la topografía indujeron efectos tóxicos en las células RAW 264.7.

- Producción de Citoquinas

Otro método utilizado para evaluar citotoxicidad es a través de la producción de citoquinas. Se utilizó un kit de Elisa para evaluar los niveles de Interleuquina (IL-1 β , sección 2.10.4.2) liberados al medio por las RAW que crecieron sobre los materiales luego de 1 y 2 días de cultivo, arrojando los siguientes resultados:

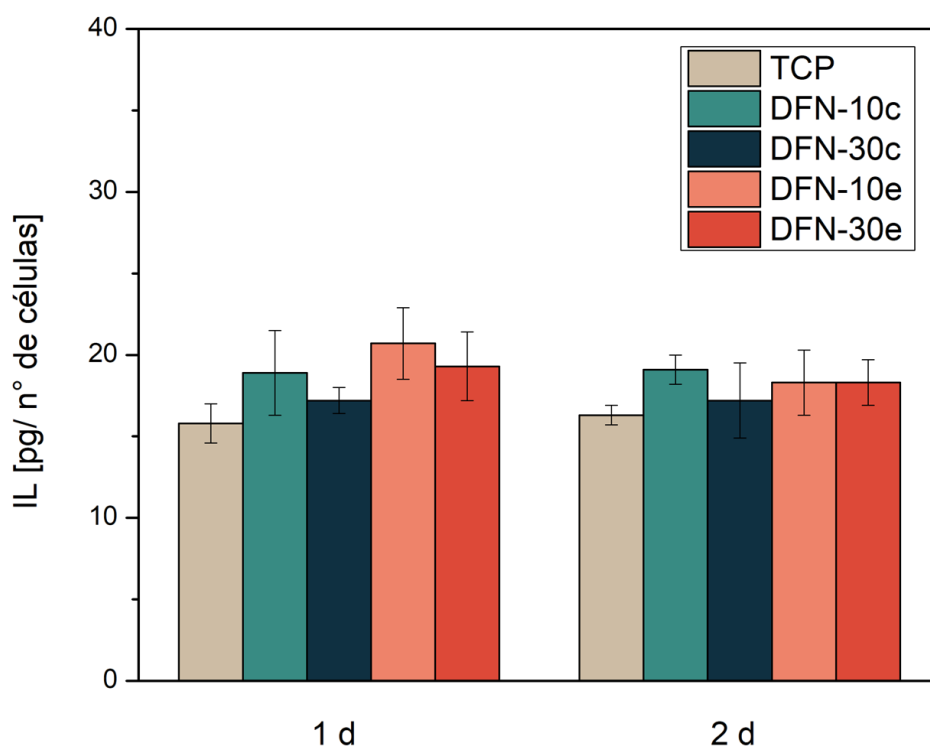


Figura 3.3.3.2.b Niveles de IL (pg/n° células) luego de 1 y 2 días de cultivo. Datos expresados como la media \pm SEM, n = 12

En la figura 3.3.3.2.b no se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-1 β con respecto al control (TCP, $p > 0,05$). Por lo que podría decirse que los *scaffolds* obtenidos no inducen efectos citotóxicos, reafirmando de esta manera los resultados obtenidos hasta el momento con la producción de NO.

- Morfología Celular

El análisis morfológico de las células permite estudiar la interacción de las mismas con las diferentes superficies de los biomateriales. Por lo tanto, se observó la morfología de las células RAW sobre la superficie de los *scaffolds* luego de 24 h de cultivo por microscopía SEM. A modo representativo se muestran las imágenes de DFN-30c y DFN-30e:

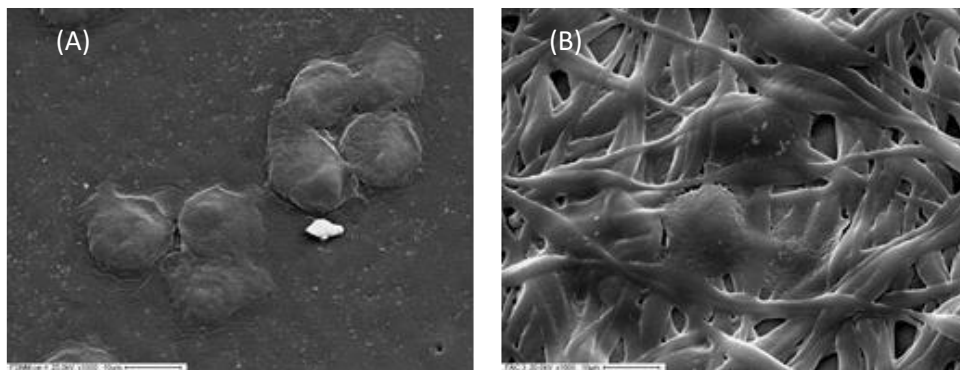


Figura 3.3.3.2.c. Imágenes SEM de los scaffolds + células RAW 264.7, luego de 24 h de cultivo. (A) DFN-30c, (B) DFN-30e. Aumento 1000x.

Como se observa en la Figura 3.3.3.2.c la morfología de las células RAW que crecieron sobre los *scaffolds* presentan un aspecto redondeado y sin extensiones del citoplasma, siendo el aspecto normal de este tipo de células, como ha sido previamente reportado [Fernández et al., 2014]. Estos resultados aportan una evidencia más de que los materiales elaborados en este trabajo no presentan efectos citotóxicos. Además, no se observan diferencias en la morfología celular entre los diferentes *scaffolds*.

3.3.3.3 ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD

Como se indicó en la introducción de la presente tesis, una de las propiedades más importante de un biomaterial para ser empleado como *scaffold* en ingeniería de tejidos es su biocompatibilidad; es decir, que soporte la actividad celular normal sin inducir una

respuesta inflamatoria o inmune inadecuada [Williams, 2008]. Además, un biomaterial debe garantizar la adhesión, proliferación y diferenciación celular, manteniendo el fenotipo y la función celular deseada [Thompson et al., 2015]. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la biocompatibilidad de los diferentes *scaffolds* a través de la interacción de los mismos con células progenitoras de médula ósea (CPMO), estudiando la viabilidad celular, el desarrollo del citoesqueleto de actina y la morfología celular por SEM. Además, se evaluó la capacidad de diferenciación de estas células hacia un fenotipo osteoblástico, mediante producción de fosfatasa alcalina y nódulos de mineral.

- Viabilidad Celular

Se estudió la viabilidad de células progenitoras de médula ósea sobre los distintos *scaffolds* mediante ensayo de MTT. Se investigó la adhesión de las CPMO luego de 2 h de cultivo, y la proliferación celular, luego de 24 y 48 h (Figura 3.3.3.3.a). Los resultados se muestran a continuación:

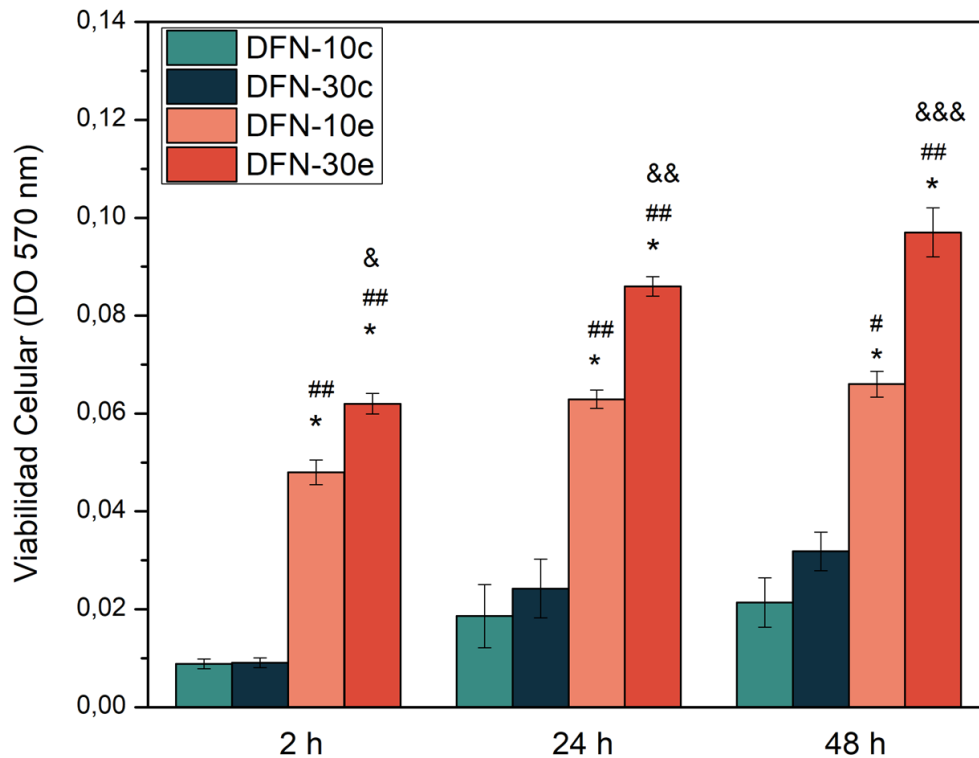


Figura 3.3.3.3.a Adhesión (2 h) y Proliferación (24 y 48 h) de CPMO sobre los *scaffolds*. Los resultados representan la viabilidad celular evaluada por MTT y se presentan como Media \pm SEM, n = 12. Diferencias Significativas: * p<0,001 vs DFN-10c; # p<0,05, ## p<0,001 vs DFN-30c y & p<0,05, && p<0,01, &&& p<0,001 vs DFN-10e, para cada período de cultivo.

Se puede observar en la figura 3.3.3.3.a que las células se unen y crecen progresivamente hasta las 48 h (p<0,001 vs. 2 h para cada matriz). Sin embargo, en los *scaffolds* obtenidos por *electrospinning* (DFN-10e y DFN-30e) se encuentra una mayor viabilidad celular, en comparación con la matriz obtenida por el método de *casting* (DFN-10c y DFN-30c) en todos los tiempos estudiados. Además, se puede visualizar que las células se adhieren y crecen casi por igual en los *scaffolds* DFN-10c y -30c. Sin embargo, el efecto de la composición del copolímero fue más evidente en los *scaffolds* fibrosos, con un incremento significativo de adhesión y proliferación cuando las células fueron cultivadas en el andamio DFN-30e. Por lo tanto, los resultados sugieren que tanto la topografía de la superficie como la composición del copolímero pueden modular el crecimiento de las células.

Además, se estudiaron las células cultivadas sobre los diferentes *scaffolds* durante 2 y 24 h por microscopía de fluorescencia y confocal (Figura 3.3.3.3.b y c, respectivamente).

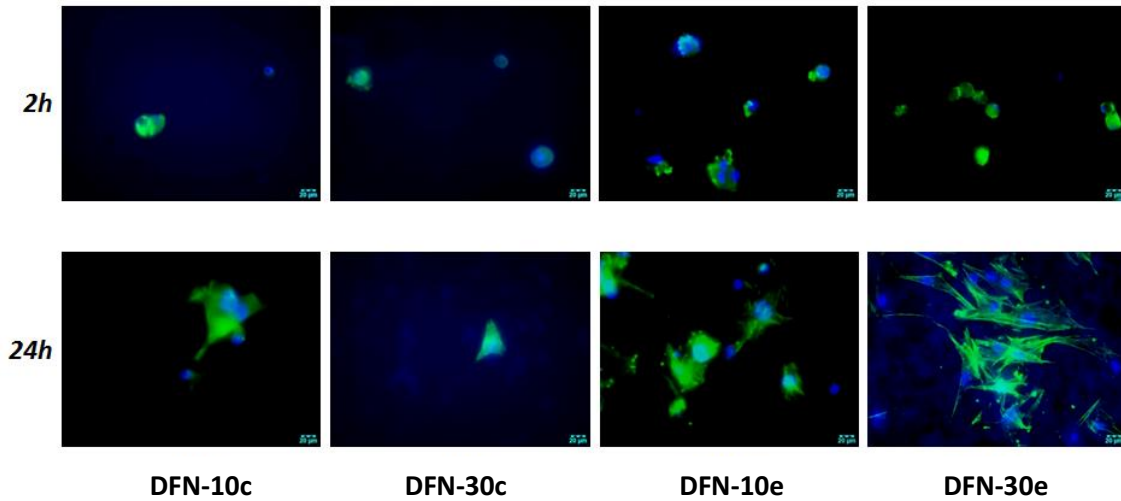


Figura 3.3.3.3.b. Células cultivadas en los diferentes *scaffolds* luego de 2 y 24 h, respectivamente. Las fibras de actina fueron teñidas con Alexa Fluor 488 faloidina (color verde) y los núcleos con Hoechst (color azul). Objetivo 40x, microscopio de Fluorescencia.

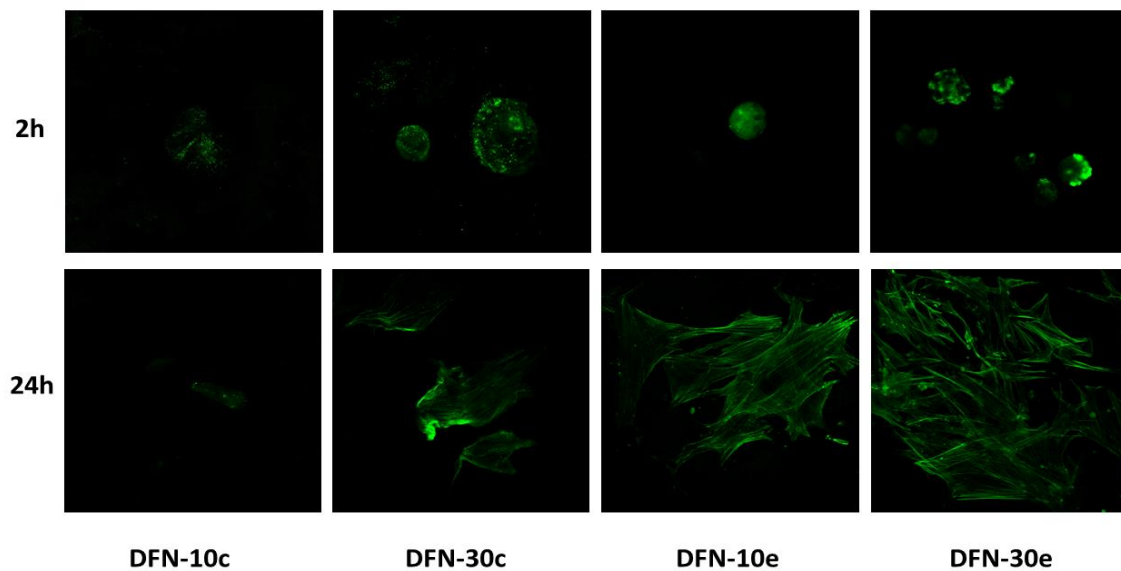


Figura 3.3.3.3.c. Células CPMO cultivadas sobre los diferentes *scaffolds* luego de 2 y 24 h. Las fibras de actina fueron teñidas con Alexa Fluor 488 Faloidina y fueron observadas en microscopio confocal. Objetivo 63x.

En las Figuras 3.3.3.3.b y c puede observarse que inicialmente las células mantienen la forma redondeada con pocas extensiones que interactúan con las matrices luego de 2 h de cultivo. Además, se observaron menos células en la matriz DFN-10c y -30c, en comparación con las células adheridas a los andamios fibrosos. Después de 24 h de cultivo, las células desarrollaron extensiones, se observaron células más aplanadas y alargadas, con fibras de estrés (microfilamentos de actina que indican procesos celulares tales como, movilidad celular, proliferación, etc) prominentes del citoesqueleto de actina, sobre todo en las imágenes correspondientes a los *scaffolds* obtenidos por *electrospinning* (DFN-10e y DFN-30e). Por el contrario, en los *scaffolds* obtenidos por el método de *casting*, se visualizaron pocas células con un citoesqueleto de actina menos desarrollado y en forma estrellada, siendo un indicativo de que el crecimiento celular en estas matrices es más lento luego de 24 h de cultivo con respecto a las matrices fibrosas. Por otra parte, en el caso de la matriz DFN-30c se observó una mayor extensión de las fibras de actina y el número de células también fue un poco mayor con respecto a DFN-10c, como puede observarse por microscopía confocal.

Por último, se observó la morfología de las CPMO sobre los *scaffolds* por microscopía SEM luego de 24 h de cultivo:

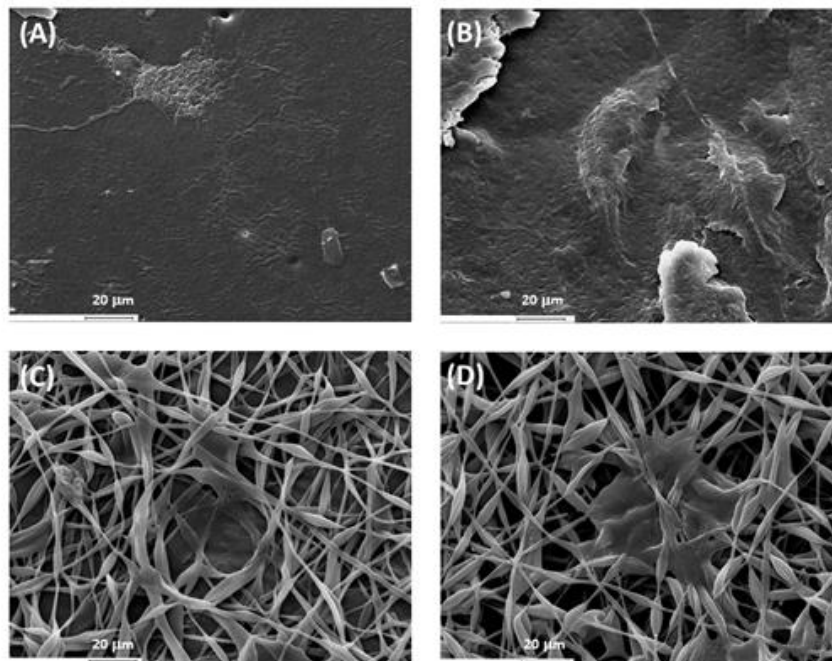


Figura 3.3.3.3.d. Imágenes de SEM de CPMO que crecieron sobre la superficie de las matrices luego de 24 h de cultivo. (A) DFN-10c, (B) DFN-30c, (C) DFN-10e, (D) DFN-10e.

Se puede observar que las células se unen y proliferan bien tanto en las matrices elaboradas por *casting* como en las fibrosas luego de 24 h. Además, es posible observar que los *scaffolds* mantienen la morfología inalterada durante el tiempo de ensayo. No se encontraron diferencias entre DFN-10 y DFN-30, sin embargo, observamos un mayor crecimiento de las CMPO en las matrices fibrosas. Este resultado sugiere que la topografía o las características de la superficie más la naturaleza química del biomaterial pueden afectar el desarrollo de estas células. Nosotros y otros grupos hemos demostrado previamente que este podría ser el caso, ya que la adhesión y la proliferación, se modula por señales que la superficie probablemente esté enviando a las células [Cortizo et al., 2016; Lasta et al., 2018; Park & Im, 2015; Tsimbouri et al., 2014]. Por ejemplo, la interacción de receptores integrinas en las membranas celulares con la matriz extracelular podría inducir señales bioquímicas que, a su vez, modulan el crecimiento y la diferenciación celular [Dalby et al., 2014].

- Diferenciación Celular

Debido a que estos biomateriales se utilizarán para la regeneración del tejido óseo, se evaluó la diferenciación osteoblástica en los diferentes *scaffolds*. Para ello, se analizó la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y la presencia de nódulos de mineralización (Figura 3.3.3.3.e y f, respectivamente).

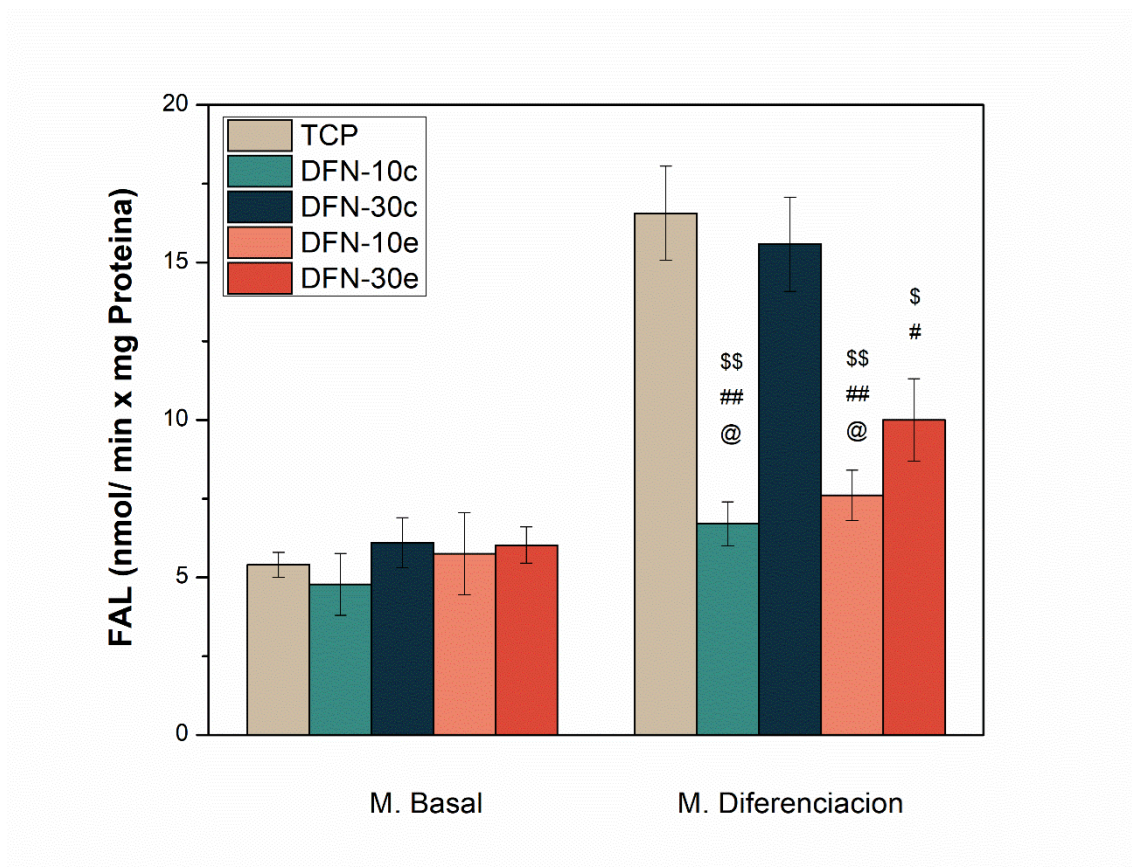


Figura 3.3.3.3.e. Expresión de FAL de las CMPO creciendo sobre los *scaffolds* en medio basal y de diferenciación durante 15 días de cultivo. Los resultados se expresan como media \pm SEM, n = 10. Diferencias significativas: \$ p<0,01; \$\$ p<0,001 vs TCP, # p<0,05; ## p<0,001 vs DFN-30c, @ p<0,05 vs DFN-30e.

La Figura 3.3.3.3.e muestra que la fosfatasa alcalina se expresó en niveles bajos y comparables con la condición control (TCP) cuando las células crecieron sobre los *scaffolds* estudiados en una condición basal, lo que sugiere que estos materiales o su topografía no inducen ninguna diferenciación específica por sí mismos. Cuando se indujo a las células a diferenciarse en un medio osteogénico, se observaron claras diferencias. Si bien en todas las matrices se encontraron diferencias significativas respecto a su condición basal, se observó una mayor diferencia en la actividad de FAL para las células que crecieron sobre los *scaffolds* preparados con la proporción más alta de FDO (DFN-30) ($p < 0,001$ para DFN-30c; $p < 0,01$ para DFN-30e). Además, esta estimulación fue mayor en la matriz elaborada por el método de *casting* (DFN-30c) en comparación con las matrices fibrosas (DFN-30e). También se determinó la capacidad de las CPMO para mineralizar la matriz luego de 21 días de cultivo en condiciones basales y de diferenciación (Figura 3.3.3.3.f).

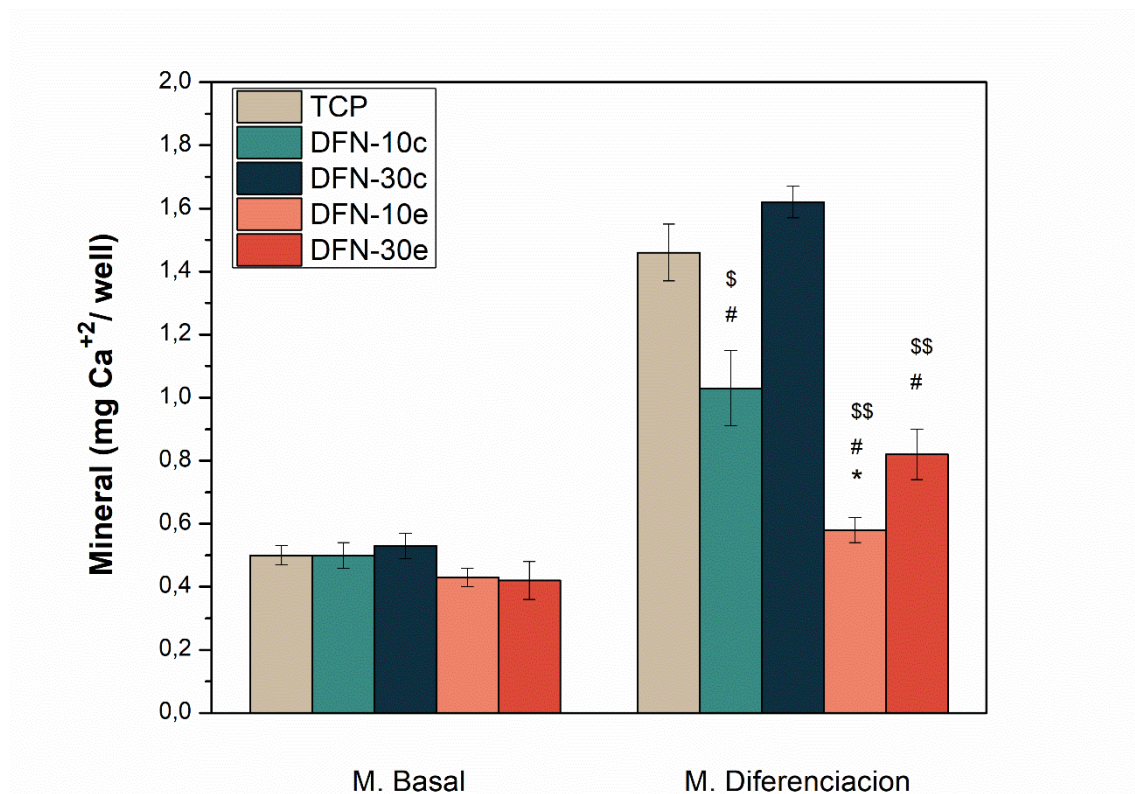


Figura 3.3.3.3.f. Producción de nódulos de mineralización por CPMO que crecieron sobre los diferentes *scaffolds* en medio basal y de diferenciación durante 21 días. Los resultados se presentan como la media \pm SEM, $n = 12$. Diferencias significativas: \$ $p < 0,01$; \$\$ $p < 0,001$ vs TCP, # $p < 0,001$ vs DFN-30c, * $p < 0,001$ vs DFN-10c.

La Figura 3.3.3.3.f muestra que las células expresaron bajo nivel de producción de nódulos de mineral en la condición basal, y no se observaron diferencias entre las células crecidas sobre el plato de cultivo y las cuatro matrices, estos resultados están de acuerdo con lo observado en el ensayo previo donde se determinó la expresión de FAL. Sin embargo, en presencia de un medio osteogénico, la mineralización de las matrices se estimuló significativamente en todos los casos, siendo mayor cuando las células crecieron sobre los *scaffolds* DFN-10c, DFN-30c o DFN-30e ($p < 0,001$ frente a la condición basal), observándose una mayor producción de nódulos de mineralización cuando las células se diferenciaron sobre la matriz DFN-30c. La mineralización de la matriz inducida por medios osteogénicos parece ser similar a la respuesta de FAL (Figura 3.3.3.3.e). Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas sobre la matriz denominada DFN-10c, si bien la formación de nódulos de mineralización fue elevada, la producción de FAL no fue mucho mayor a la obtenida en condición basal. Estas observaciones sugieren que existen otros factores que se encuentran involucrados en el proceso de mineralización de la matriz.

A modo representativo se muestran los nódulos de mineralización observados mediante microscopio óptico de la matriz DFN-30c después de la tinción con rojo de alizarina S (Figura 3.3.3.3.g):

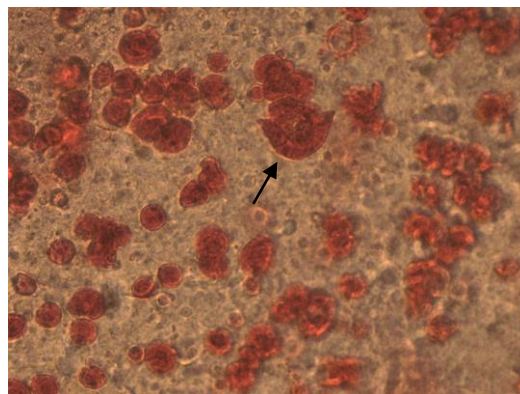


Figura 3.3.3.3.g. Nódulos de mineral en la matriz DFN-30c luego de tinción con Rojo de Alizarina (21 d). Objetivo 40x.

En la imagen pueden observarse los nódulos de mineralización (señalizados con flecha negra sobre la imagen) distribuidos sobre toda la superficie del *scaffold*.

En conjunto, los estudios de biocompatibilidad sugieren que todos los *scaffolds* obtenidos exhiben una adecuada capacidad para promover el crecimiento y la diferenciación de CPMO, aunque algunas diferencias fueron evidentes. Comparativamente, la diferenciación de las células es mayor cuando crecen en las matrices que presentan una mayor proporción del monómero fumárico (DFN-30). Los resultados podrían ser consecuencia de las interacciones célula-biomaterial basadas en la naturaleza química del material indicando un incremento de estas interacciones cuando el *scaffold* contiene mayor proporción del monómero más hidrofóbico. El grupo de investigación ha informado previamente resultados similares a los presentados en esta sección [Lastra et al., 2015].

En base a los resultados obtenidos se puede inferir que todos los biomateriales elaborados a partir de DFN presentan buenas características para ser aplicados en la regeneración de tejido óseo, observándose una mejor condición para el *scaffold* que tiene un mayor contenido del monómero fumárico y una superficie más homogénea, obtenido por método de *casting* (DFN-30c).

3.3.4 PROPIEDADES TERMO-RESPONSIVAS DE LOS *SCAFFOLDS*

Debido a que los copolímeros sintetizados y estudiados en el presente trabajo contienen NIPAM en su composición y que se conoce que el mismo posee la propiedad de responder a estímulos térmicos es importante estudiar las propiedades termo-responsivas de los *scaffolds* preparados en vista de las aplicaciones biomédicas buscadas. Es conocido que homo y copolímeros termo-responsivos sufren una transición debido al cambio de solubilidad a una temperatura de solución crítica (CST). Como se mencionó previamente, esta temperatura puede ser la mínima de una curva bimodal de un diagrama de fases, llamada temperatura de solución crítica inferior (LCST) o, máxima, denominada temperatura de solución crítica superior (UCST) [Zhang et al., 2017]. Varios homo y copolímeros, derivados de NIPAM, han sido ampliamente estudiados y se han orientado hacia diversas aplicaciones [Lutz, 2008; Lanzalaco & Armelin, 2017]. Sin embargo, la mayoría de ellos exhiben una alta solubilidad en agua que podría ser inconveniente para algunas aplicaciones, como para sistemas de

administración de medicamentos y otras aplicaciones biomédicas [Zhang & Yarin, 2009; Nagase et al., 2018]. Por esta razón, hidrogeles o membranas *termo-sensibles* han sido desarrollados en base a polímeros que no se solubilizan en agua. En estos casos, la temperatura de transición de fase crítica inferior (LCT) corresponde a la temperatura por encima de la cual las cadenas de polímeros experimentan una contracción volumétrica, expulsan el agua retenida en su estructura y entran en un estado hidrofóbico [Paris & Quijada-Garrido, 2010; Zhang & Yarin, 2009]. Así, hidrogeles térmicamente sensibles preparados mediante reticulación covalente o física a base de polímeros naturales o sintéticos con buen equilibrio hidrofílico-hidrofóbico en la composición molecular han sido diseñados para diversas aplicaciones biomédicas [Klouda, 2015]. Por otro lado, matrices insolubles en agua con superficies termosensibles pueden prepararse mediante una selección adecuada de comonomero durante las reacciones de copolimerización [Nagase, 2018; Zhang y Yarin, 2009]. Además, la temperatura de solución crítica inferior correspondiente al homopolímero de NIPAM (32°C) puede ser regulada por la inclusión de un comonomero en la estructura macromolecular, lo que amplía su rango de aplicaciones. Es por ello que en el presente trabajo se pretende conocer la temperatura de transición crítica inferior de los *scaffolds* sintetizados, ya que, debido a la aplicación deseada, los materiales se encontrarán a la temperatura corporal de 37 °C y es muy importante conocer su estado hidrofílico-hidrofóbico ya que esta condición podría afectar la adhesión y proliferación celular.

Por lo anterior, se determinó la temperatura crítica (T_c) por DSC y transmitancia utilizando un espectrofotómetro UV-Visible (sección 2.9.2 y 2.9.3, respectivamente), de los *scaffolds* DFN-10c y -30c preparados por el método de *casting*, dado que como se mencionó previamente, las matrices fibrosas presentan dificultades para su manipulación debido a su bajo espesor. Además, las matrices preparadas por *casting* son transparentes y permiten visualizar fácilmente dicha transición. Así mismo, la caracterización de las mismas se realizó mediante ensayos de ángulo de contacto y *swelling*. Considerando la temperatura de transición crítica de los materiales estudiados, dichos ensayos se realizaron a una temperatura por debajo y otra por encima de sus respectivas T_c . Con el fin de conocer mejor el comportamiento del material según la aplicación buscada, se estudió el hinchamiento de los biomateriales obtenidos por *casting* también a 37 °C (temperatura corporal).

3.3.4.1 EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA CRÍTICA

- Determinación de la T_c por DSC

Las medidas por DSC se han utilizado ampliamente para analizar la transición térmica de polímeros y geles de N-isopropilacrilamida y otros copolímeros [Otake et al., 1990; Laukkanen et al., 2004; Cao et al., 2005; Zhang et al., 2017]. La T_c se evidencia a través de un evento endotérmico observado en el termograma obtenido por DSC, la medida experimental se realiza a baja velocidad y temperaturas de calentamiento como fue descrito en la sección 2.9.2. En el siguiente gráfico puede verse la T_c determinada por DSC de las matrices estudiadas:

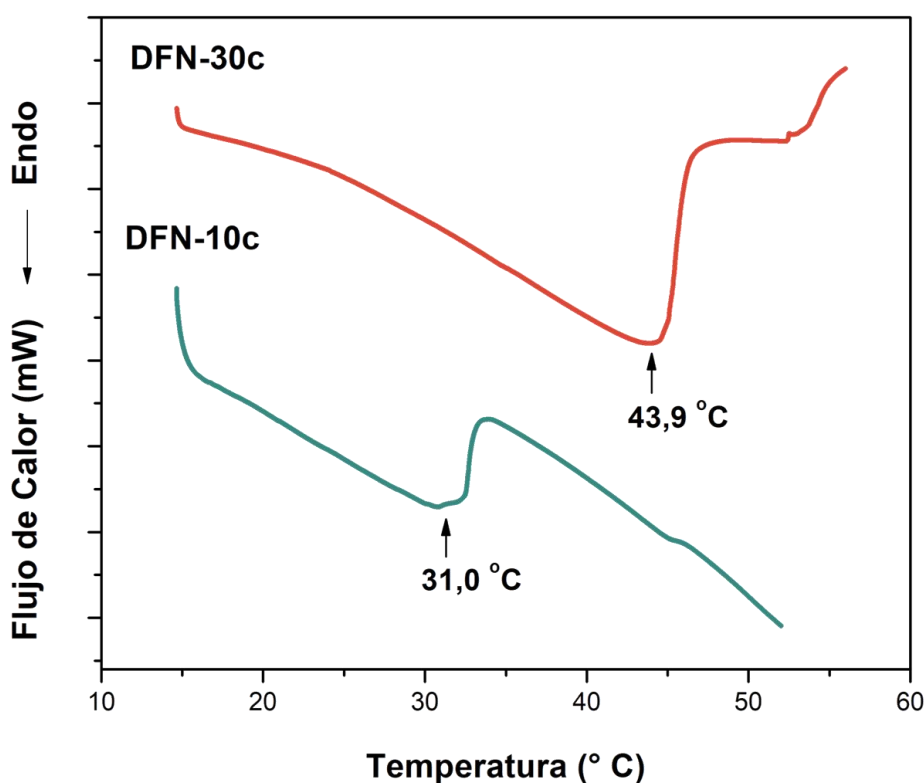


Figura 3.3.4.1.a Termogramas y T_c de DFN-10c y DFN-30c.

En la Figura 3.3.4.1.a se pueden observar los termogramas correspondientes a las matrices estudiadas donde se visualiza que las mismas presentan una temperatura crítica de transición inferior (LCT) de 31 °C para DFN-10c y de 44 °C para DFN-30c. DFN-10c presentan una LCT cercana a la del homopolímero de NIPAM, mientras que al aumentar el contenido de monómero fumárico en el copolímero (F_1) se incrementa la LCT. Para confirmar esta tendencia, es decir el aumento de T_c al aumentar F_1 , se preparó un *scaffold* con el copolímero DFN-76 (correspondiente a la muestra 8 de la tabla 3.3.1.b), el cual posee mayor proporción de monómero fumárico que los casos anteriores y se realizó la determinación de la T_c por DSC; en la siguiente figura se muestra el termograma obtenido:

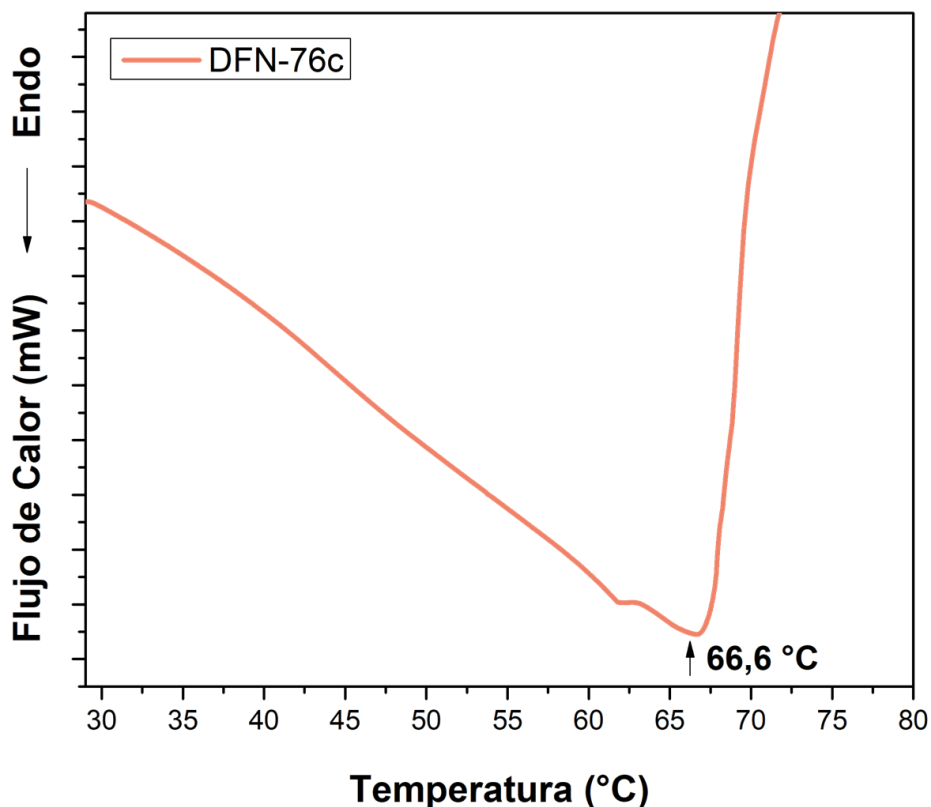


Figura 3.3.4.1.b. Termograma y T_c del *scaffold* DFN-76c.

En la figura 3.3.4.1.b puede observarse el termograma del *scaffold* DFN-76c con una temperatura crítica inferior de 66,6 °C confirmando que al aumentar la proporción de FDO en el copolímero aumenta la LCT. Un resultado similar fue encontrado cuando se realizó este estudio para DFN-60, en donde la LCT fue de aproximadamente 47 °C. En este caso, la LCT coincide con el valor de Tg del copolímero, por lo cual luego del DSC fue corroborado este punto por turbidimetría visual, en donde la transición consistió en el rango de 45-53 °C. En general cuando se combina el monómero NIPAM con otros monómeros hidrofílicos la temperatura crítica inferior de solubilidad tiende a aumentar y, a disminuir cuando se agregan monómeros hidrofóbicos [Maeda et al., 2006; Cao et al., 2005; Shen et al., 2006], aunque se han reportado algunos casos en los cuales no se cumple dicho comportamiento. Este último hecho podría deberse a que varios factores se encuentran involucrados durante el proceso de la mencionada transición, entre los cuales pueden mencionarse las interacciones puente hidrógeno entre el monómero NIPAM y el agua, las interacciones hidrofílicas-hidrofóbicas presentes en el copolímero y la rigidez de la cadena del comonómero utilizado; dependiendo cuál de estos factores predomine sobre los otros, será el efecto que se observe sobre la temperatura de transición [Liu et al., 2013]. En este caso se considera que la rigidez de las unidades repetitivas del monómero FDO podría influir en el aumento de la temperatura crítica cuando aumenta el contenido del mismo en el copolímero, recordando que se trata de un monómero etilénico 1,2-disustituido. Además, en el análisis de dicho efecto debe considerarse que las matrices diseñadas no son solubles en medio acuoso lo cual puede influir en la interacción entre el copolímero que compone la matriz y el agua y consecuentemente influir en el parámetro analizado. Sin embargo, para profundizar en este concepto serán necesarios más estudios, los que escapan al objetivo del presente trabajo de tesis.

- Determinación de la T_C por Transmitancia

Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos por DSC se analizó el cambio en la transmitancia de las películas DFN-10c y DFN-30c con el aumento en la temperatura como se muestra en la siguiente figura:

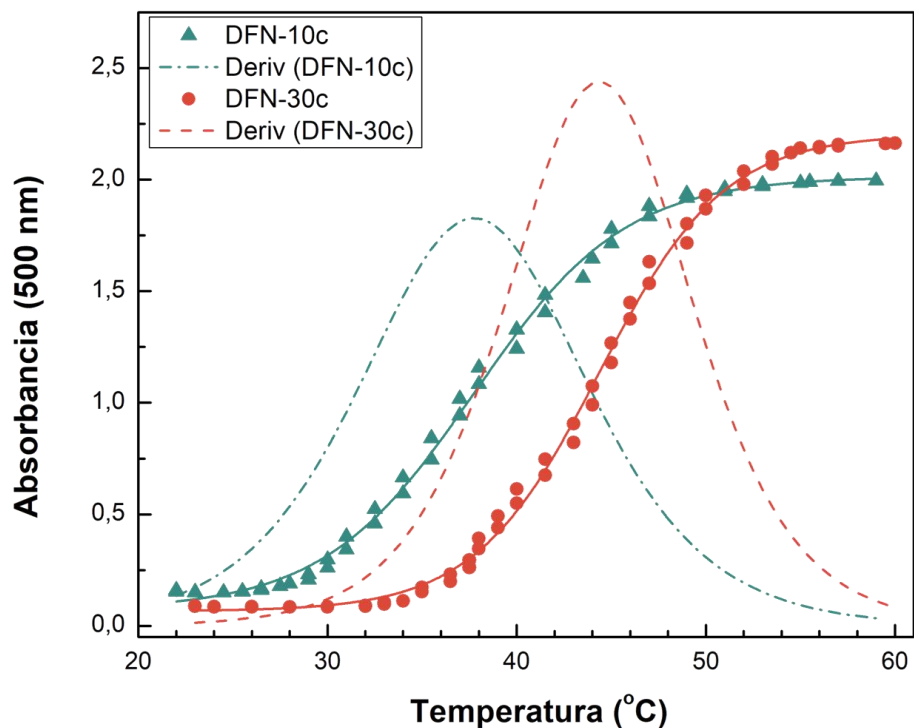


Figura 3.3.4.1.c. Absorbancia a 500 nm en función de la temperatura de DFN-10c y DFN-30c. La línea punteada corresponde a la derivada de cada curva de absorbancia.

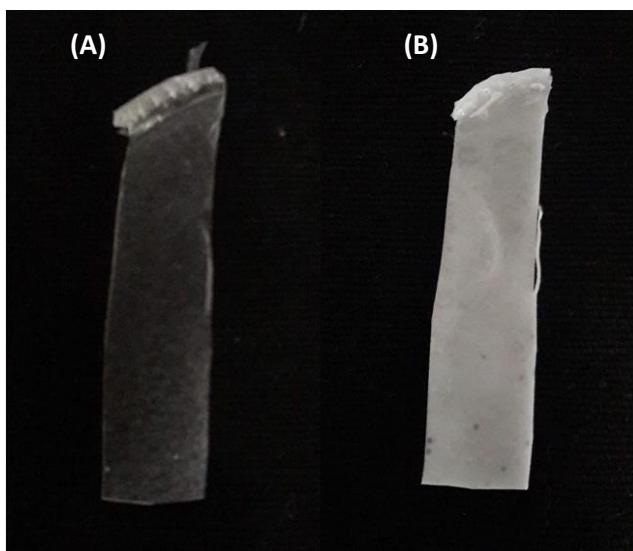


Imagen 3.3.4.1. Scaffolds (A) antes y (B) después del ensayo de transmitancia.

La Figura 3.3.4.1.c muestra las curvas de absorbancia en función de la temperatura para DFN-10c y DFN-30c, junto con las correspondientes derivadas, que evidencian claramente las transiciones correspondientes. Las temperaturas determinadas para los copolímeros DFN-10c y DFN-30c son 37,5 °C y 44,3 °C, respectivamente. El presente ensayo permitió corroborar la misma tendencia observada por DSC, donde se observa un aumento en la temperatura de la transición con el incremento en el contenido de FDO en el copolímero. Estos estudios demuestran que es posible regular la hidrofobicidad de las matrices y de esta manera su temperatura crítica mediante la selección apropiada de la composición de comonómeros en la reacción de copolimerización.

En la Imagen 3.3.4.1. se muestra a modo representativo la apariencia de las membranas antes y luego del ensayo de transmitancia por espectroscopia UV. Se puede apreciar una clara diferencia en el aspecto de las mismas donde antes del ensayo las membranas son translucidas y luego del mismo se tornan opacas y blancas debido a la transición experimentada.

3.3.4.2 ANÁLISIS DEL ANGULO DE CONTACTO

Se midió el ángulo de contacto (AC) de una gota de agua sobre los *scaffolds* a 25 °C, como se detalló previamente en este capítulo y a 50 °C para analizar el comportamiento superficial de las matrices por debajo y encima de la LCT, respectivamente. En la siguiente tabla se muestran los resultados a modo comparativo:

Matrices	AC (25 °C)	AC (50 °C)
PNIPAM	72 ± 1,9	74 ± 0,8
DFN-10c	86 ± 0,5	89 ± 0,6
DFN-30c	93 ± 0,7	103 ± 0,5
PFDO	98 ± 1,1	-

Tabla 3.3.4.2. Valores del ángulo de contacto a 25 °C (reportados previamente en este capítulo) y a 50 °C para DFN-10c y DFN-30c.

A 25 °C se observa un incremento en el ángulo de contacto debido a la disminución en la polaridad de los polímeros analizados, al pasar de PNIPAM a PFDO. Además, se encontraron diferencias significativas en el ángulo de contacto medido a 25 y 50 °C para los *scaffolds* derivados de los copolímeros, obteniéndose valores mayores del mismo a 50 °C. Este resultado indica que bajo estas condiciones las membranas se encuentran en un estado hidrofóbico por encima de la temperatura crítica. Otros autores han utilizado la medida del ángulo de contacto como metodología para analizar la relación hidrofílica-hidrofóbica de matrices termo-responsivas. Zhang & Yarin analizaron la superficie de films termo-responsivos a base de copolímeros NIPAM empleando como comonomero metacrilato de metilo (MMA), mediante el ensayo de ángulo de contacto y encontraron un aumento entre 3 y 20° en el parámetro analizado con el incremento de la temperatura, dependiendo de la composición del copolímero [Zhang & Yarin, 2009].

3.3.4.3 ESTUDIOS DE HINCHAMIENTO

El estudio de hinchamiento se realizó a 25 °C (temperatura inferior a LCT de los *scaffolds*), 37 °C (temperatura corporal, debido a la aplicación buscada) y a 50 °C (temperatura por encima de la LCT de los *scaffolds*) en solución de buffer fosfato (PBS) a pH = 7,4. Tanto la metodología empleada para llevar cabo el presente ensayo como las ecuaciones utilizadas se describieron en la sección 2.9.4. Los resultados se muestran en la siguiente figura:

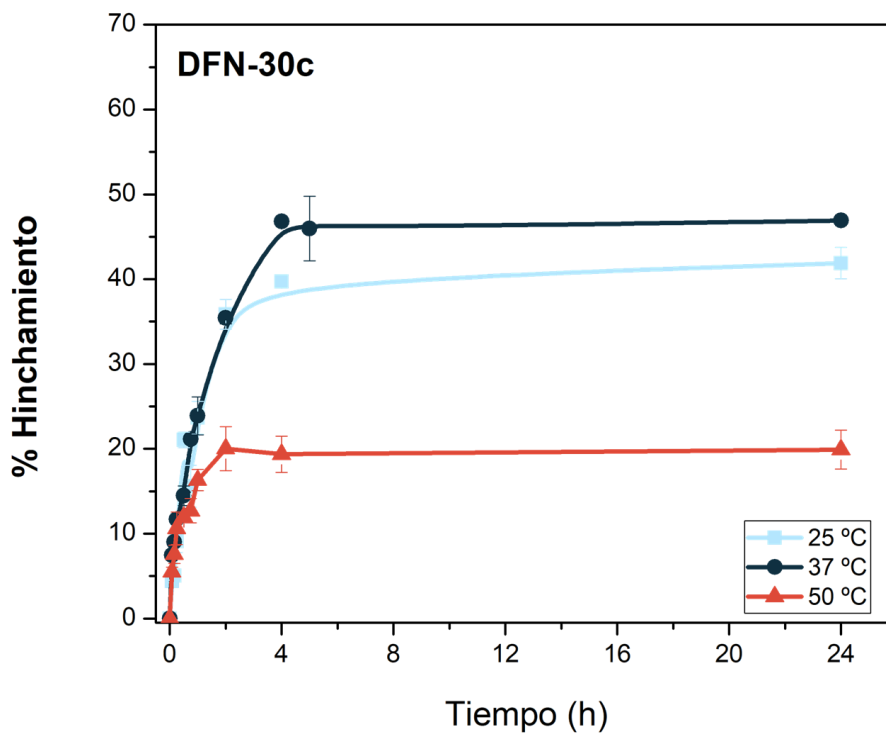
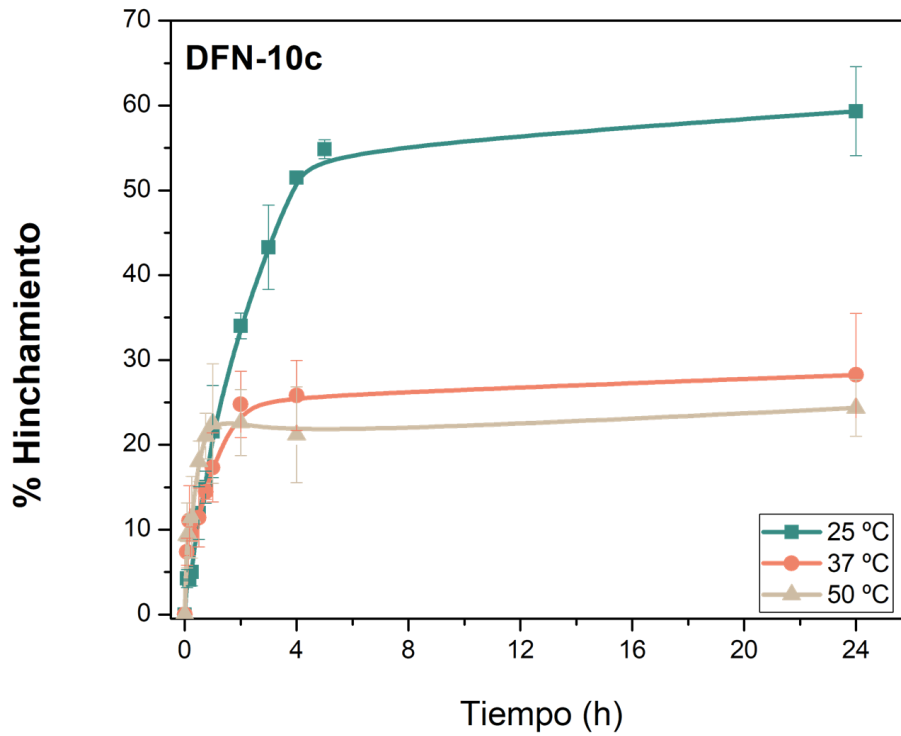


Figura 3.3.4.3. % Hinchamiento vs. Tiempo a diferentes temperaturas para los *scaffolds* DFN-10c y DFN-30c, respectivamente

La Figura 3.3.4.3 presenta la cinética de *swelling* de las matrices DFN-10c y DFN-30c, en solución de buffer fosfato (pH = 7,4) a las tres temperaturas estudiadas. Las curvas muestran que el grado de hinchamiento aumenta con el tiempo, hasta cierto valor donde se vuelve constante, alcanzando el equilibrio dentro de 2-3 h en todos los casos. El porcentaje de hinchamiento máximo (% S_w (max)) varía según la temperatura ensayada, dependiendo si la misma se encuentra por encima o por debajo de la LCT de cada muestra, como se puede ver en la Tabla 3.3.4.3. Cuando los *scaffolds* se encuentran hinchados en su estado hidrofílico (debajo su LCT), las cadenas macromoleculares exhiben una alta movilidad y capacidad de absorción del buffer; por lo tanto, alcanzan altos valores de hinchamiento. Por otro lado, si el hinchamiento se realiza a una temperatura superior a su LCT, las cadenas colapsan, cambiando a un estado hidrofóbico y el *scaffolds* presenta una baja capacidad de absorción del buffer. Esto puede explicarse ya que en estado hinchado y en una temperatura por debajo de la transición crítica de las matrices, las interacciones por puente de hidrógeno entre la unidad repetitiva de NIPAM y las moléculas de agua se ven favorecidas mientras que a temperaturas mayores a la LCT de los respectivos biomateriales, los mismos se encuentran en un estado hidrofóbico donde las interacciones polímero-polímero se ven favorecidas generando consecuentemente una contracción de volumen del material [París & Quijada-Garrido, 2010]. Por lo tanto, el *scaffold* DFN-10c muestra un mayor valor de hinchamiento a 25 °C que a 37 °C o 50 °C; mientras que la matriz DFN-30c muestra valores de hinchamiento más altos a 25 °C y 37 °C que a 50 °C.

El análisis de la cinética de *swelling* nos permite comprender el mecanismo de absorción de agua a través de la membrana. La Tabla 3.3.4.3 presenta los valores del parámetro n evaluados empleando la ecuación detallada en la sección 2.9.4.

Temperatura (°C)	DFN-10c		DFN-30c	
	%S _w (max)	n	%S _w (max)	n
25	59	0,74 ± 0,07	42	0,69 ± 0,06
37	28	0,30 ± 0,06	47	0,55 ± 0,03
50	24	0,42 ± 0,06	20	0,40 ± 0,05

Tabla 3.3.4.3. Valores del % máximo de *swelling* y el parámetro n (ecuación 2.9.4.c) para los *scaffolds* DFN-10c y DFN-30c a las tres temperaturas analizadas

Como puede observarse en la tabla anterior, para ambos *scaffolds*, los valores de n a 25 °C son cercanos a 0,7, lo que indica que la cinética de hinchamiento se rige por la relajación de las cadenas de polímero; mientras que n toma valores cercanos a 0,5 a 50 °C, lo que sugiere una cinética Fickiana, donde la difusión del agua es el proceso limitante durante el hinchamiento de los *scaffolds*. La principal diferencia entre el comportamiento de las matrices DFN-10c y DFN-30c se observa a 37 °C, debido a que el primero de ellos está por encima de su temperatura crítica mientras que el segundo está por debajo de la misma, mostrando la temperatura a la cual la cinética de hinchamiento comienza a ser distinta para cada membrana.

Por último, se obtuvieron imágenes de una porción de matriz hinchada a 25 °C durante 4 h, a la cual posteriormente, se le realizó un proceso de calentamiento hasta 50 °C, observándose lo siguiente:

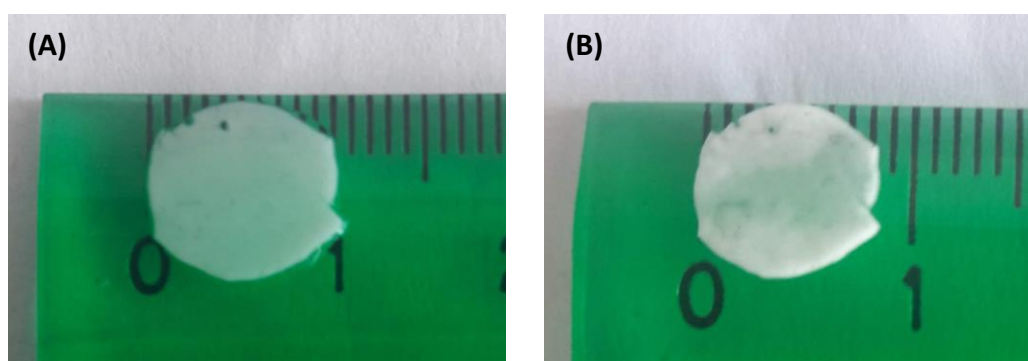


Imagen 3.3.4.3. Fragmento de *scaffold* obtenido mediante sacabocado de 0,8 mm de diámetro luego de hinchamiento a 25 °C (A) y 50 °C (B), respectivamente

En la Imagen 3.3.4.3 se puede observar a modo ilustrativo la contracción volumétrica que experimentan los *scaffolds* luego de ser hinchados y calentados a 50 °C, se ve claramente como la membrana se contrae luego de este proceso, debido a que, a la mayor temperatura ensayada, la membrana se encuentra por encima de la temperatura de colapso.

En conjunto estos resultados demuestran que efectivamente las membranas investigadas presentan un comportamiento termo-responsivo, y que el mismo es diferente a otros sistemas estudiados, ya que en este caso la LCT aumenta cuando se incorpora en el copolímero una mayor cantidad del monómero hidrofóbico. Estos resultados también contribuyen a explicar los resultados de biocompatibilidad. Si bien no se encontraron muchas diferencias en la respuesta celular en función de la composición, si se observó en algunos casos que tanto la viabilidad como la diferenciación celular fue mayor en los *scaffolds* con mayor contenido fumárico lo que podría deberse no solo a la diferencia en polaridad, sino también a la topografía superficial y al estado hidrofílico-hidrofóbico en el que se encuentren los materiales. Además, esta propiedad podría proporcionar nuevas ventajas a estos nuevos materiales, tales como la incorporación de drogas, proteínas o factores de crecimiento que luego, mediante un cambio en la temperatura puedan ser liberados al medio, así como también en ingeniería de tejidos para fabricar monocapas celulares con propiedades únicas para la reconstrucción de tejidos y terapias celulares, en donde la monocapa celular formada es despegada de la superficie por el cambio térmico [Nagase et al., 2018]. A su vez este sistema también permite mediante la selección apropiada de la composición de los comonómeros, regular la temperatura de transición.

En base a todas las características estudiadas se puede inferir que los *scaffolds* sintetizados en esta sección reúnen varias de las características necesarias para aplicación en ingeniería de tejido óseo como la ausencia de respuesta citotóxica, biodegradabilidad y buena biocompatibilidad. Además, de presentar esta nueva característica del comportamiento termo-responsivo que podría permitir nuevas aplicaciones y ventajas en el futuro.

CAPITULO IV



Conclusiones

4. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis, se desarrollaron nuevos biomateriales con el fin de ser empleados en ingeniería de tejido óseo. En primera instancia, se sintetizaron dos familias de copolímeros fumáricos mediante polimerización radicalaria convencional y RAFT para obtener arquitectura lineal y estrella, respectivamente. Estos copolímeros se identificaron y caracterizaron mediante métodos espectroscópicos y cromatográficos que revelaron sus diferencias estructurales. El análisis de TGA demostró que el copolímero ramificado (FO_S) es térmicamente menos estable que el copolímero lineal (FO_L); mientras que no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas máximas de descomposición de FN_S y FN_L. Las características morfológicas superficiales de los *scaffolds* preparados a partir de copolímeros de FO fueron más irregulares y rugosas que las de los copolímeros de FN, sin diferencias significativas en relación con la arquitectura del copolímero. Las propiedades mecánicas de los *scaffolds* de FO mostraron diferencias significativas en el módulo elástico en relación a la arquitectura, encontrándose un menor valor para FO_S. En las matrices de FN las propiedades mecánicas no pudieron ser determinadas, debido a la rigidez del material. Finalmente, el estudio de biocompatibilidad y citotoxicidad revela que ninguno de los materiales obtenidos muestra citotoxicidad, aunque los macrófagos RAW crecieron mejor en las matrices preparadas por la metodología de *casting* de los copolímeros FN, lo que indica una mejor interacción de estas células con la superficie del material.

Posteriormente, se estudió la síntesis de copolímeros en bloque derivados de monómeros fumáricos. Para ello, fueron sintetizados y caracterizados homopolímeros de FIP y FDO para ser empleados como macro-CTAs vía polimerización radical controlada RAFT. Sin embargo, se obtuvieron conversiones menores al 8 %, debido a la baja reactividad frente a la homopolimerización de estos monómeros, por lo que no fue posible obtener copolímeros en bloque fumáricos.

Por último, dado que las membranas de FIP y NIPAM no presentaron buenas propiedades mecánicas, pero sí cumplieron con algunos de los requisitos para ser utilizados como *scaffolds*, como la ausencia de respuesta citotóxica y biocompatibilidad, se cambió el monómero fumárico FIP por FDO, cuyo homopolímero

presenta una menor temperatura de transición vítrea. De esta manera, se sintetizaron nuevos copolímeros fumáricos empleando fumarato de di-2-octilo y N-isopropilacrilamida utilizando dos azoiniciadores (AIBN y MAIB), que mostraron una eficacia de iniciación diferente. Bajo las mismas condiciones experimentales, se observaron diferencias en la composición y características macromoleculares, dependiendo del iniciador empleado. Todos los copolímeros presentaron una alta estabilidad térmica, lo que los hace adecuados para soportar el procesamiento térmico a temperaturas de hasta 200 °C. Se seleccionaron dos copolímeros en función de sus propiedades para el diseño de los *scaffolds* a través de las metodologías de *casting* y *electrospinning*. En el primer caso, se observó una superficie lisa y homogénea, mientras que, en el segundo caso, se obtuvieron estructuras de microfibras. Ambos tipos de andamios muestran diferencias en el ángulo de contacto del agua y la tasa de degradación en condiciones celulares (macrófagos RAW 264.7), lo que demuestra el efecto de las características estructurales y la topografía superficial sobre sus propiedades. Ninguno de ellos muestra efecto citotóxico en los tiempos estudiados.

También, se realizaron estudios de adhesión, proliferación y diferenciación osteoblástica con células CPMO. Se encontró mayor viabilidad celular en los materiales obtenidos por la técnica de *electrospinning*. Las CPMO en presencia de medio osteogénico mostraron la capacidad de producir nódulos de mineralización y actividad de FAL (marcadores osteogénicos) cuando crecieron sobre todos los materiales estudiados. El incremento de estos marcadores fue más significativo para los *scaffolds* que tienen mayor contenido del monómero fumárico y una superficie más homogénea (por técnica de *casting*, DFN-30c), lo que indica su mejor biocompatibilidad celular

Además, se estudió la respuesta termo-responsiva de estos *scaffolds* obteniéndose un aumento de la LCT con respecto a PNIPAM cuando incrementa el contenido del monómero menos polar en el copolímero (FDO). En este sentido, para la temperatura corporal se evidenciaron diferencias en el porcentaje máximo de hinchamiento de las matrices estudiadas. Así como también se encontraron diferencias superficiales en la hidrofiliidad de las mismas por encima y debajo de sus respectivas LCT, aportando una nueva característica a los biomateriales diseñados.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, sugieren que todos los *scaffolds* obtenidos presentan buenas características para ser aplicados

en la regeneración de tejido óseo. Si bien algunos de ellos exhiben un mejor comportamiento frente a la biocompatibilidad.



REFERENCIAS



REFERENCIAS

A

Armarego, W. L. F., & Perrin, D. D. (1996). *Purification of Laboratory Chemicals* 4th Edition Butterworth.

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

B

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

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

Bhushan B, Schricker SR. (2014). A review of block copolymer-based biomaterials that control protein and cell interactions. *J Biomed Mater Res Part A*, 102A, 2467–2480.

Billström GH, Blomb AW, Larsson S, Beswickb AD. (2013) Application of scaffolds for bone regeneration strategies: Current trends and future directions. *Injury, Int J Care Injured*, 44- S1, S28–S33.

Bixby, J., Ray, T. D., & Chan, F. K. (2005). TNF, cell death and inflammation. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, 4(6), 557-567.

Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L. G., Meunier, P. J., & Delmas, P. D. (2008). The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*, 43(3), 532-538.

Bonewald, L. (2006). Osteocytes as multifunctional cells. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 6(4), 331.

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

Bourdauducq, P. (2002). *U.S. Patent No. 6,407,219*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

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

Braunecker, W. A., & Matyjaszewski, K. (2007). Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progress in polymer science*, 32(1), 93-146.

Burr, D. B., Robling, A. G., & Turner, C. H. (2002). Effects of biomechanical stress on bones in animals. *Bone*, 30(5), 781-786.

C

Cao, Z., Liu, W., Gao, P., Yao, K., Li, H., & Wang, G. (2005). Toward an understanding of thermoresponsive transition behavior of hydrophobically modified N-isopropylacrylamide copolymer solution. *Polymer*, 46(14), 5268-5277.

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

Chiefari, J., Chong, Y. K., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P., ... & Rizzardo, E. (1998). Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules*, 31(16), 5559-5562.

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

Cochin, D., Laschewsky, A., & Pantoustier, N. (2000). New substituted polymethylenes by free radical polymerization of bulky fumarates and their properties. *Polymer*, 41(11), 3895-3903.

Constantin, M., Cristea, M., Ascenzi, P., & Fundueanu, G. (2011). Lower critical solution temperature versus volume phase transition temperature in thermoresponsive drug delivery systems. *Express Polym Lett*, 5(10), 839-848.

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

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

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

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

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

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

Coustet, M. E. (2014). Síntesis y propiedades de copolímeros en bloque constituidos por bloques hidrofílico-hidrofóbico (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).

D

Dalby, M. J., Gadegaard, N., & Oreffo, R. O. (2014). Harnessing nanotopography and integrin–matrix interactions to influence stem cell fate. *Nature materials*, 13(6), 558.

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

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

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

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

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

F

Favier, A., & Charreyre, M. T. (2006). Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process. *Macromolecular Rapid Communications*, 27(9), 653-692.

Fernández, J. M. (2011). Estudio de biocompatibilidad de polímeros sintéticos y su aplicación en ingeniería de tejido óseo (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

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

Fernandez, J. M., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., McCarthy, A. D., & Cortizo, M. S. (2010). Characterization of poly (ϵ -caprolactone)/Polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 21(10), 1297-1312.

Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.

Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Cole, J. D., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., ... & Yin, S. (2001). Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: a prospective, randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 83(Pt 2), S151.

Furusu, K., Watanabe, I., Kato, C., Miki, K., & Hasegawa, J. (2001). Fundamental study of side impact analysis using the finite element model of the human thorax. *JSAE review*, 22(2), 195-199.

G

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

Goldstein, S. A. (1987). The mechanical properties of trabecular bone: dependence on anatomic location and function.

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

Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., ... & Chiron, P. (2002). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *JBJS*, 84(12), 2123-2134.

Grassie, N., McNeill, I. C., & Samson, J. N. R. (1978). The thermal degradation of polymethacrylamide and copolymers of methacrylamide and methyl methacrylate. *European Polymer Journal*, 14(11), 931-937.

Gregory, A., & Stenzel, M. H. (2012). Complex polymer architectures via RAFT polymerization: From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 38-105.

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

H

Hatakeyama, H., Kikuchi, A., Yamato, M., & Okano, T. (2007). Patterned biofunctional designs of thermoresponsive surfaces for spatiotemporally controlled cell adhesion, growth, and thermally induced detachment. *Biomaterials*, 28(25), 3632-3643.

Heskins, M., & Guillet, J. E. (1968). Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science—Chemistry*, 2(8), 1441-1455.

Housni, A., & Narain, R. (2007). Aqueous solution behavior of p (N-isopropyl acrylamide) in the presence of water-soluble macromolecular species. *European Polymer Journal*, 43(10), 4344-4354.

Hutmacher DW. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.

K

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

Klouda, L. (2015). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications: A seven-year update. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97, 338-349.

Ko, J., Mohtaram, N. K., Ahmed, F., Montgomery, A., Carlson, M., Lee, P. C., ... & Jun, M. B. (2014). Fabrication of poly (ϵ -caprolactone) microfiber scaffolds with varying topography and mechanical properties for stem cell-based tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(1), 1-17.

L

La Gatta, A., Schiraldi, C., Esposito, A., D'Agostino, A., & De Rosa, A. (2009). Novel poly (HEMA-co-METAC)/alginate semi-interpenetrating hydrogels for biomedical applications: Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90(1), 292-302.

Lanzalaco, S., & Armelin, E. (2017). Poly (n-isopropylacrylamide) and copolymers: A review on recent progresses in biomedical applications. *Gels*, 3(4), 36.

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

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

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

Laukkanen, A., Valtola, L., Winnik, F. M., & Tenhu, H. (2004). Formation of colloiddally stable phase separated poly (N-vinylcaprolactam) in water: a study by dynamic light scattering, microcalorimetry, and pressure perturbation calorimetry. *Macromolecules*, 37(6), 2268-2274.

Li, D., & Xia, Y. (2004). Electrospinning of nanofibers: reinventing the wheel. *Advanced materials*, 16(14), 1151-1170.

Lin, W., Yang, Y., Chen, R., Wen, X., Qian, Y., Cai, C., & Zhang, L. (2014). In-situ IR Monitoring the Synthesis of Amphiphilic Copolymer P (HEMA-co-tBMA) via ARGET ATRP. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 22(9), 1046-1054.

Little, D. G., Ramachandran, M., & Schindeler, A. (2007). The anabolic and catabolic responses in bone repair. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 89(4), 425-433.

Liu, P., Tang, W., & Zhang, H. (2013). Unusual solution phase transition trend of poly (N-isopropylacrylamide-co-bis(N-hydroxyisopropyl pyrrolidone) 2-vinylterephthalate). *Polymer*, 54(18), 4902-4908.

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

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

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

Lutz, J. F. (2008). Polymerization of oligo (ethylene glycol)(meth) acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46(11), 3459-3470.

Luzon, M., & Corrales, T. (2014). Thermal studies and chromium removal efficiency of thermoresponsive hyperbranched copolymers based on PEG-methacrylates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 116(1), 401-409.

M

Maeda, T., Yamamoto, K., & Aoyagi, T. (2006). Importance of bound water in hydration–dehydration behavior of hydroxylated poly (N-isopropylacrylamide). *Journal of colloid and interface science*, 302(2), 467-474.

Matsumoto, A., & Otsu, T. (1995). Detailed mechanism of radical high polymerization of sterically hindered dialkyl fumarates. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 98, No. 1, pp. 139-152).

Matsumoto, A., & Sumihara, T. (2017). Thermal and mechanical properties of random copolymers of diisopropyl fumarate with 1-adamantyl and bornyl acrylates with high glass transition temperatures. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(2), 288-296.

Matsumoto, A., Maeo, N., & Sato, E. (2016). Living radical polymerization of diisopropyl fumarate to obtain block copolymers containing rigid poly (substituted methylene) and flexible polyacrylate segments. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 54(14), 2136-2147.

Mayadunne, R. T., Jeffery, J., Moad, G., & Rizzardo, E. (2003). Living free radical polymerization with reversible addition- fragmentation chain transfer (RAFT Polymerization): Approaches to star polymers. *Macromolecules*, 36(5), 1505-1513.

Mayadunne, R. T., Rizzardo, E., Chiefari, J., Krstina, J., Moad, G., Postma, A., & Thang, S. H. (2000). Living polymers by the use of trithiocarbonates as reversible addition- fragmentation chain transfer (RAFT) agents: ABA triblock copolymers by radical polymerization in two steps. *Macromolecules*, 33(2), 243-245.

Medina, M. (2009). Efecto de la estructura en la polimerizabilidad de ésteres metacrílicos empleando energía de microondas (Trabajo final de grado, Facultad de Ciencias Exactas).

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

Mortimer, G. A. (1965). A new high-temperature free-radical source. *The Journal of Organic Chemistry*, 30(5), 1632-1634.

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

Mukherjee, B., Mahapatra, S., Gupta, R., Patra, B., Tiwari, A., & Arora, P. (2005). A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on in vitro skin permeation. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 59(3), 475-483.

Munro, N. H., Hanton, L. R., Moratti, S. C., & Robinson, B. H. (2009). Synthesis and characterisation of chitosan-graft-poly (OEGMA) copolymers prepared by ATRP. *Carbohydrate polymers*, 77(3), 496-505.

Murphy, C. M., O'Brien, F. J., Little, D. G., & Schindeler, A. (2013). Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad.

N

Nagase, K., Yamato, M., Kanazawa, H., & Okano, T. (2018). Poly (N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials*, 153, 27-48.

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

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

O

Oberti, T. G. (2011). Efectos de la radiación de microondas en la polimerización, estructura y propiedades de polímeros acrílicos (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).

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

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

Odelius, K., Pliik, P., & Albertsson, A. C. (2008). The influence of composition of porous copolyester scaffolds on reactions induced by irradiation sterilization. *Biomaterials*, 29(2), 129-140.

Otake, K., Inomata, H., Konno, M., & Saito, S. (1990). Thermal analysis of the volume phase transition with N-isopropylacrylamide gels. *Macromolecules*, 23(1), 283-289.

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

Otsu, T., Yasuhara, T., & Matsumoto, A. (1988). Synthesis, characterization, and application of poly [substituted methylene] s. *Journal of Macromolecular Science—Chemistry*, 25(5-7), 537-554.

P

París, R., & Quijada-Garrido, I. (2010). Temperature-and pH-responsive behaviour of poly (2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate-co-N, N-dimethylaminoethyl methacrylate) hydrogels. *European polymer journal*, 46(11), 2156-2163.

Park, S. H., Kim, T. G., Kim, H. C., Yang, D. Y., & Park, T. G. (2008). Development of dual scale scaffolds via direct polymer melt deposition and electrospinning for applications in tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4(5), 1198-1207.

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

Pasqualone, M. (2016). Síntesis, caracterización y aplicaciones de copolímeros fumáricos en sistemas de liberación transdérmicos (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).

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

Pavlov, M. P., Mano, J. F., Neves, N. M., & Reis, R. L. (2004). Fibers and 3D mesh scaffolds from biodegradable starch-based blends: production and characterization. *Macromolecular bioscience*, 4(8), 776-784.

Pei, Y., Chen, J., Yang, L., Shi, L., Tao, Q., Hui, B., & Li, J. (2004). The effect of pH on the LCST of poly (N-isopropylacrylamide) and poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid). *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(5), 585-594.

Puskas, J. E., Antony, P., El Fray, M., & Altstädt, V. (2003). Effect of hard and soft segment composition on the mechanical properties of polyisobutylene-polystyrene thermoplastic elastomeric block copolymers. *Eur Polym J*, 39, 2041-2049.

Q

Qin, S., Geng, Y., Discher, D. E., & Yang, S. (2006). Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly (ethylene oxide)-block-poly (N-isopropylacrylamide). *Advanced Materials*, 18(21), 2905-2909.

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

R

Ramírez, G., Rodil, S. E., Arzate, H., Muhl, S., & Olaya, J. J. (2011). Niobium based coatings for dental implants. *Applied Surface Science*, 257(7), 2555-2559.

Ranade SV, Richard RE, Helmus MN. (2005). Styrenic block copolymers for biomaterial and drug delivery applications. *Acta Biomater* 1, 137–144.

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

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

Richter, W. (2009) Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med*, 266, 390-405.

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

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

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

S

Saltzman, W. M., & Kyriakides, T. R. (2014). Cell interactions with polymers. In *Principles of tissue engineering* (pp. 385-406). Academic Press.

Seal, B. L., Otero, T. C., & Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34(4-5), 147-230.

Shen, Z., Terao, K., Maki, Y., Dobashi, T., Ma, G., & Yamamoto, T. (2006). Synthesis and phase behavior of aqueous poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide), poly (N-isopropylacrylamide-co-N, N-dimethylacrylamide) and poly (N-isopropylacrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate). *Colloid and Polymer Science*, 284(9), 1001-1007.

Shiraishi, Y., Adachi, K., Tanaka, S., & Hirai, T. (2009). Effects of poly-N-isopropylacrylamide on fluorescence properties of CdS/Cd (OH) 2 nanoparticles in water. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 205(1), 51-56.

Silva, M. E. S., Dutra, E. R., Mano, V., & Machado, J. C. (2000). Preparation and thermal study of polymers derived from acrylamide. *Polymer degradation and stability*, 67(3), 491-495.

Simon, M., Behrens, I., Dailey, L. A., Wittmar, M., & Kissel, T. (2007). Nanosized insulin-complexes based on biodegradable amine-modified graft polyesters poly [vinyl-3-(diethylamino)-propylcarbamate-co-(vinyl acetate)-co-(vinyl alcohol)]-graft-poly (l-lactic acid): Protection against enzymatic degradation, interaction with Caco-2 cell monolayers, peptide transport and cytotoxicity. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 66(2), 165-172.

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

Szewczyk, P., Ura, D., Metwally, S., Knapczyk-Korczak, J., Gajek, M., Marzec, M., ... & Stachewicz, U. (2019). Roughness and fiber fraction dominated wetting of electrospun fiber-based porous meshes. *Polymers*, 11(1), 34.

T

Takada, K., & Matsumoto, A. (2017). Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of diisopropyl fumarate using various dithiobenzoates as chain transfer agents. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(19), 3266-3275.

Takada, K., & Matsumoto, A. (2018). Synthesis of transparent block copolymers consisting of poly (diisopropyl fumarate) and poly (2-ethylhexyl acrylate) segments by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization using trithiocarbonates as the chain transfer agents. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 56(22), 2584-2594.

Tang, T., Castelletto, V., Parras, P., Hamley, I. W., King, S. M., Roy, D., ... & Schubert, U. S. (2006). Thermo-responsive Poly (methyl methacrylate) - block-poly (N-isopropylacrylamide) Block Copolymers Synthesized by RAFT Polymerization: Micellization and Gelation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 207(19), 1718-1726.

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

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

U

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

Uhlig, K., Boerner, H., Wischerhoff, E., Lutz, J. F., Jaeger, M., Laschewsky, A., & Duschl, C. (2014). On the interaction of adherent cells with thermoresponsive polymer coatings. *Polymers*, 6(4), 1164-1177.

W

Wang, P., Tan, K. L., Kang, E. T., & Neoh, K. G. (2001). Synthesis, characterization and antifouling properties of poly (ethylene glycol) grafted poly (vinylidene fluoride) copolymer membranes. *Journal of Materials Chemistry*, 11(3), 783-789.

Wang, X., Chu, W., Zhuang, Y., Shi, D., Tao, H., Jin, C., ... & Gan, Y. (2019). Bone Mesenchymal Stem Cell-Enriched β -Tricalcium Phosphate Scaffold Processed by the Screen-Enrich-Combine Circulating System Promotes Regeneration of Diaphyseal Bone Non-Union. *Cell transplantation*, 28(2), 212-223.

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

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

Winkler, T., Sass, F. A., Duda, G. N., & Schmidt-Bleek, K. (2018). A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & joint research*, 7(3), 232-243.

X

Xing, Z., Lu, C., Miclau, T., & Marcucio, R. S. (2009). Bone marrow stromal cells fail to form bone or cartilage in vivo during fracture healing. In *55th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society* (p. P783).

Y

Yoshioka, M., & Otsu, T. (1992). Reactivity of primary radicals in the radical polymerization of dialkyl fumarates initiated with dimethyl 2, 2'-azobis (isobutyrate) and 2, 2'-azobis (isobutyronitrile). *Macromolecules*, *25*(10), 2599-2602.

Z

Zhang, C., Peng, H., Puttick, S., Reid, J., Bernardi, S., Searles, D. J., & Whittaker, A. K. (2015). Conformation of hydrophobically modified thermoresponsive poly (OEGMA-co-TFEA) across the LCST revealed by NMR and molecular dynamics studies. *Macromolecules*, *48*(10), 3310-3317.

Zhang, Q., Weber, C., Schubert, U. S., & Hoogenboom, R. (2017). Thermoresponsive polymers with lower critical solution temperature: from fundamental aspects and measuring techniques to recommended turbidimetry conditions. *Materials Horizons*, *4*(2), 109-116.

Zhang, Y., & Yarin, A. L. (2009). Stimuli-responsive copolymers of n-isopropyl acrylamide with enhanced longevity in water for micro-and nanofluidics, drug delivery and non-woven applications. *Journal of Materials Chemistry*, *19*(27), 4732-4739.

Zuo, F., Mao, Y., Li, X., Burger, C., Hsiao, B. S., Chen, H., & Marchand, G. R. (2011). Effects of block architecture on structure and mechanical properties of olefin block copolymers under uniaxial deformation. *Macromolecules*, *44*(9), 3670-3673.



INDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMAGENES Y TABLAS



ESQUEMAS

Esquema 1.1.1 Estructura del tejido óseo y células óseas	15
Esquema 1.1.4 Componentes necesarios para la regeneración tisular	20
Esquema 1.1.5.a Mecanismo de polimerización RAFT	23
Esquema 1.1.5.b Estructura de un CTA y de los radicales intermediarios en una polimerización RAFT	25
Esquema 1.1.5.c Transición del polímero termo-responsivo en una solución acuosa y diagrama de fase correspondiente a la LCST	27
Esquema 2.3.1.a Etapa 1 de reacción para obtener CTA ₁	37
Esquema 2.3.1.b Etapa 2 de reacción para obtener CTA ₁	37
Esquema 2.3.2 Estructura CTA ₂ lineal	40
Esquema 2.8.1 Obtención de las membranas de FO _L Y FO _S	51
Esquema 2.8.2 Obtención de las membranas FN _L y FN _S	52
Esquema 2.8.3.a Preparación de las membranas DFN por el método de <i>solvent casting</i>	52
Esquema 2.8.3.b Preparación de las membranas DFN por el método de <i>electrospinning</i>	53
Esquema 3.1.1.a Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA ₁ sintetizado	71
Esquema 3.1.1.b. Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA ₁ sintetizado	72
Esquema 3.1.1.c Probables rupturas que dan lugar a las señales más importantes del espectro de masa asignado al CTA ₁ sintetizado	72

FIGURAS

Figura 3.1.1.a FT-IR del pentaeritritol(3-mercaptopropionato) y del CTA ₁ sintetizado.	68
Figura 3.1.1.b ¹ H-RMN y estructura del CTA ₁ sintetizado	69
Figura 3.1.1.c Cromatograma CG-MS	70
Figura 3.1.1.d. Espectro de Masa correspondiente al tr:13,4 min.	70
Figura 3.1.2 Espectro FT-IR del polimetacrilato de bencilo, estrella	74
Figura 3.1.3.1.a Espectro FT-IR de los polímeros FO _L y FO _S	79
Figura 3.1.3.1.b Identificación estructural mediante espectroscopía ¹ H-RMN de FO _L	80
Figura 3.1.3.1.c Identificación estructural mediante espectroscopía ¹ H-RMN de FO _S	80
Figura 3.1.3.1.d Curvas de TGA (—) y DTG (---) de FO _L y FO _S	82
Figura 3.1.3.1.e Imágenes de SEM de (A) FO _L y (B) FO _S	84
Figura 3.1.3.1.f Curvas de tensión vs. Deformación de FO _L y FO _S	85
Figura 3.1.3.4.a Espectro FT-IR de FN _L y FN _S	89
Figura 3.1.3.4.b Identificación estructural mediante espectroscopía ¹ H-RMN de FN _L	90
Figura 3.1.3.4.c Identificación estructural mediante espectroscopía ¹ H-RMN de FN _S	90
Figura 3.1.3.4.d Curvas de TGA y DTG de FN _L y FN _S	92
Figura 3.1.3.4.e Imágenes de SEM de (A) FN _L y (B) FN _S	94
Figura 3.1.4.1 Viabilidad de células RAW sobre las películas y el control TCP	95
Figura 3.1.4.2 Niveles de NO (nmol/n° de células)	98

Figura 3.1.4.3.a Imágenes de Microscopía Óptica	99
Figura 3.1.4.3.b Imágenes de SEM de FO _s y FN _s	100
Figura 3.2.1 Elugramas normalizados de PF ₅ -4.	106
Figura 3.3.1.a Espectro FT-IR de los Copolímeros DFN sintetizados a partir del iniciador AIBN y MAIB	112
Figura 3.3.1.b Espectro de ¹ H-RMN de los copolímeros DFN	113
Figura 3.3.1.c Perfil Cromatográfico de DFN-7 en función del tiempo de reacción.	116
Figura 3.3.1.d Composición de los copolímeros DOF-NIPAM, empleando distintos iniciadores azo: MAIB y AIBN	118
Figura 3.3.1.e Termogramas observados por DSC de los homopolímeros PFDO y PNIPAM y de los copolímeros sintetizados a partir del iniciador AIBN y MAIB	120
Figura 3.3.1.f. Curvas de TGA y DTG de DFN-10 y DFN-30	122
Figura 3.3.2.a. Imágenes SEM de los <i>scaffolds</i> . (A) DFN-10c, (B) DFN-30c, (C) DFN-10e y (D) DFN-30e	125
Figura 3.3.2.b. Ángulo de Contacto a 25 °C para los distintos <i>scaffolds</i> DFN	126
Figura 3.3.2.c Curva de Tensión vs. Deformación	128
Figura 3.3.3.1. Degradación por acción de Macrófagos RAW 264.7	130
Figura 3.3.3.2.a. Niveles de NO (nmol/n°células)	132
Figura 3.3.3.2.b Niveles de IL (pg/n° células)	133
Figura 3.3.3.2.c. Imágenes SEM de los <i>scaffolds</i> + células RAW 264.7	134
Figura 3.3.3.3.a Adhesión (2 h) y Proliferación (24 y 48 h) de CPMO sobre los <i>scaffolds</i>	136
Figura 3.3.3.3.b. Células cultivadas en los diferentes <i>scaffolds</i> luego de 2 y 24 h	137
Figura 3.3.3.3.c Células CPMO cultivadas sobre los diferentes <i>scaffolds</i> luego de 2 y 24 h	137
Figura 3.3.3.3.d. Imágenes de SEM de CPMO sobre los <i>scaffolds</i>	139

Figura 3.3.3.3.e. Expresión de FAL de CMPO creciendo sobre los <i>scaffolds</i> en medio basal y de diferenciación durante 15 días de cultivo	140
Figura 3.3.3.3.f. Producción de nódulos de mineralización por CPMO que crecieron sobre los diferentes <i>scaffolds</i> en medio basal y de diferenciación durante 21 días	141
Figura 3.3.3.3.g Nódulos de mineral en la matriz DFN-30c	142
Figura 3.3.4.1.a Termogramas y T_c de DFN-10c y DFN-30c	145
Figura 3.3.4.1.b Termograma y T_c del <i>scaffold</i> DFN-76c	146
Figura 3.3.4.1.c Absorbancia a 500 nm en función de la temperatura de DFN-10c y DFN-30c	148
Figura 3.3.4.3 % Hinchamiento vs. Tiempo a diferentes temperaturas para los <i>scaffolds</i> DFN-10c y DFN-30c	151

IMÁGENES

Imagen 2.3.1.a Equipamiento empleado en la reacción 1 de la síntesis del CTA ₁	38
Imagen 2.3.1.b Equipamiento de la reacción 2 de la síntesis del CTA ₁	39
Imagen 2.4.2 Línea de vacío	42
Imagen 2.4.3 Línea Schlenk	43
Imagen 3.3.4.1 Scaffolds (A) antes y (B) después del ensayo de transmitancia	148
Imagen 3.3.4.3 Fragmento de scaffold obtenido mediante sacabocado de 0,8 mm de diámetro luego de hinchamiento a 25 °C (A) y 50 °C (B)	153

TABLAS

Tabla 3.1.2 Pesos moleculares, IP y conversiones de polimetacrilato de bencilo estrella	73
Tabla 3.1.3.1.a Características de los polímeros sintetizados de FIP-co-OEGMA lineal	77
Tabla 3.1.3.1.b Características del polímero sintetizados de FIP-co-OEGMA estrella	78
Tabla 3.1.3.1.c Composición del comonomero fumárico en el copolímero (F_1) y en la mezcla de reacción (f_1) de los copolímeros FO.	81
Tabla 3.1.3.1.d Temperatura de descomposición obtenidas del TGA de FO _L y FO _S	83
Tabla 3.1.3.1.e Módulo Elástico de FO _L y FO _S	85
Tabla 3.1.3.2 Características de los polímeros sintetizados de FH	86
Tabla 3.1.3.4.a Características de los polímeros FN _L y FN _S sintetizados	88
Tabla 3.1.3.4.b Composición del comonomero fumárico en el copolímero (F_1) y en la mezcla inicial de reacción (f_1) de los copolímeros FN	91
Tabla 3.1.3.4.c Temperaturas de descomposición obtenidas del TGA de FN _L y FN _S	93
Tabla 3.1.4.1 Número de células por campo en las películas	96
Tabla 3.2.1 Características del Polifumarato de diisopropilo Estrella (PFS)	104
Tabla 3.2.2. Condiciones experimentales y características de los polímeros PFD _L	107
Tabla 3.3.1.a Diferentes composiciones de comonomeros en la mezcla de reacción estudiadas en la síntesis de DFN	111
Tabla 3.3.1.b Características de los copolímeros DFN sintetizados	114
Tabla 3.3.1.c Características de los polímeros DFN-7 en función del tiempo	117
Tabla 3.3.1.d Datos obtenidos a partir del DSC y TGA de los copolímeros DFN	123
Tabla 3.3.2.a Propiedades mecánicas de las matrices DFN-10c y DFN-30c	128
Tabla 3.3.4.2 Valores de ángulo de contacto a 25 °C y 50 °C para DFN-10c y DFN-30c	149

Tabla 3.3.4.3 Valores del % máximo de *swelling* y el parámetro n para los scaffolds DFN-10c y DFN-30c a las tres temperaturas analizadas

153

ABREVIATURAS

AIBN: azobisisobutironitrilo

ATHF: acrilato de tetrahidrofurfurilo

CPMO: células progenitoras de médula ósea

CTA: agente de transferencia de cadena

CTA₁: pentaeritritol (3-(S-benciltritiocarbonil propionato)

CTA₂: ácido 2-(dodeciltritiocarbonil) dimetilpropanoico (DDMAT)

DFN: copolímeros o matrices de FDO-NIPAM

FAL: fosfatasa alcalina

FDO: fumarato de di-2-octilo

FIP: fumarato de diisopropilo

FN_L: copolímeros o matrices de FIP-NIPAM lineal

FN_S: copolímeros o matrices de FIP-NIPAM estrella

FO_L: copolímeros o matrices de FIP-OEGMA lineal

FO_S: copolímeros o matrices de FIP-OEGMA estrella

HEMA: metacrilato de 2-hidroxietilo

LCST: temperatura de solución crítica inferior

LCT: temperatura crítica inferior

MAIB: azobisisobutirato de dimetilo

MB: metacrilato de bencilo

NIPAM: N-Isopropilacrilamida

OEGMA: metacrilato de polietilenglicol metil éter

PB: peróxido de benzoílo

RAFT: Polimerización radical controlada por transferencia adición-fragmentación reversible

T_c: temperatura crítica

PUBLICACIONES

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

- ✓ Bravi Costantino, M. L., Oberti, T. G., Cortizo, A. M., & Cortizo, M. S. (2022). Thermoresponsive behavior of scaffolds based on fumarate-N-isopropylacrylamide copolymers for potential biomedical applications. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(12), 923-931.
- ✓ Bravi Costantino, M. L., Cortizo, M. S., Cortizo, A. M., & Oberti, T. G. (2020). Osteogenic scaffolds based on fumaric/N-isopropylacrylamide copolymers: Designed, properties and biocompatibility studies. *European Polymer Journal*, 122, 109348.
- ✓ Bravi Costantino, M. L., Oberti, T. G., Cortizo, A. M., & Cortizo, M. S. (2019). Matrices based on lineal and star fumarate-metha/acrylate copolymers for bone tissue engineering: Characterization and biocompatibility studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(1), 195-203.
- ✓ Pelúas, M. G., Bravi Costantino, L., & Oberti, T. G. (2018). Síntesis de poliestireno mediante RAFT empleando energía de microondas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 19(6), 271-282.



Facultad de Ciencias
EXACTAS



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**