

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas



**“Síntesis y caracterización de estructuras 3D híbridas
a base de seda y sistemas lipídicos para ingeniería de
tejido óseo”**

Tesina de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular

Emiliano Bertoli

Director: Dra. Valeria E. Bosio

Año 2017

Agradecimientos

La finalización de mi carrera de grado con este Trabajo Final no hubiese sido posible sin una sucesión de hechos, instituciones y sobre todo personas que se cruzaron en mi camino.

En primera instancia me gustaría resaltar la fortuna de haber estudiado en una institución como la UNLP, pública, gratuita y de calidad, que es un símbolo de nuestro país, entre tantas otras. Además, agradecer a los distintos laboratorios del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales Dr. Rodolfo Ertola (CINDEFI), que me brindaron su ayuda cuando lo necesité y, sobre todo, a los integrantes del Laboratorio de Nanobiomateriales, quienes me abrieron las puertas y me ayudaron y enseñaron siempre que lo necesité. Además, al Centro de Tecnología de Recursos Minerales y Cerámica (CETMIC) y varias personas que allí se encuentran, quienes me hicieron sentir como en mi casa en cada oportunidad que fui.

Por otro lado, un gran agradecimiento y, sobre todo, reconocimiento a mi directora, la Dra. Valeria E. Bosio, una persona con una incansable vocación y dedicación a la ciencia y profesionalismo pocas veces visto, que también sabe transmitirlo y contagiarlo a quienes estamos a su alrededor, sin dejar de ser la gran persona que es. Quién, además de todo, depositó la confianza en mí y muchas horas de su trabajo para que el presente trabajo logre concretarse, al tiempo que aprendí tanto o más que durante todos mis años de estudio.

Además, ese gran grupo de personas que llamo amigos, que no son de un solo grupo, pero para mí son uno solo. Por un lado, los de siempre, los/as del pueblo, esos que siempre, pero siempre, están para lo que haga falta, sin dudarlo un segundo y aunque la distancia nos separe, con algunas menciones especiales de entre ellos que he tenido la suerte de compartir este viaje llamado vida desde los inicios y hasta hoy. Por otro lado a las personas que la Facultad me dio la oportunidad de conocer, quienes entendemos mejor que nadie lo del trabajo en equipo para poder concluir nuestros estudios, pero que terminan siendo mucho más que eso y que uno nunca olvidará. Y por último a todas las demás personas que, por uno u otro motivo, tuve la oportunidad de conocer, tanto en Ayacucho como en La Plata, pero que han dejado una huella en mí y soy también un poquito de cada uno de ellos.

Por último, y ni por asomo menos importante, la GRAN familia que me ha tocado, que ni con la oportunidad de elegirlos hubiera sido mejor. Esas persona que entran en la categoría de “no me alcanzaría la vida entera para agradecerles y devolverles algo de lo que hicieron por mí” y que básicamente constituyen todo lo que soy y he logrado hasta ahora. Son una fuente de inspiración, educación y ejemplo a seguir para nunca darse por vencido, incluso cuando haya que cruzar océanos, literalmente hablando.

A todas y cada una de las personas, gracias por tanto y perdón por tan poco, soy el más afortunado y agradecido.

ÍNDICE

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN	7
I.1. El tejido óseo	8
I.1.a. Su estructura y composición	8
I.1.b. Las células y su función	9
I.1.c. Remodelado óseo	10
I.1.d. Principales enfermedades óseas y tipos de fractura	11
I.2. Las lesiones óseas complejas. ¿Cómo las abordamos?	13
I.2.a. Bioingeniería de tejidos para lesiones óseas	13
I.2.b. Biomateriales para ingeniería de tejido óseo	13
I.2.b.i. Matrices híbridas a base de seda de origen natural	14
I.2.b.ii. Liberación controlada de moléculas desde matrices 3D	15
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
I.5. Generales	16
I.6. Específicos	16
CAPÍTULO II – MATERIALES Y MÉTODOS	17
II.1. Materiales. Obtención de fibroína de seda y preparación de soluciones	18
II.1.a. Materiales	18
II.1.b. Obtención de fibroína de seda	18
II.2. Obtención de estructuras 3D –<i>scaffolds</i>- híbridas porosas	19
II.2.a. Gelificación por <i>salt-leaching</i>	19
II.2.b. Gelificación por ciclos de congelado-descongelado	20
II.3. Agregado de moléculas oteogénicas y anti-resortivas	20
II.3.a. Método por deposición	20
II.3.b. Método por inclusión”	20
II.4. Caracterización fisicoquímica de los sistemas híbridos	20
II.4.a. Análisis estructural y mecánico (SEM y ensayos de compresión)	20
II.4.b. Análisis de las interacciones fisicoquímicas (FT-IR, TGA y DSC)	21
II.5. Obtención de sistemas lipídicos para transporte de principios activos	21
II.5.a. Método de obtención de sistemas liposomales deformables por sonicación	21
II.5.b. Carga de los sistemas liposomales con una molécula modelo: fluoresceína	21
II.6. Caracterización de los sistemas lipídicos	22
II.6.a. Estabilidad: Tamaño y carga superficial en el tiempo (DLS y Pot-Z)	22
II.6.b. Eficiencia de carga liposomal y perfiles de liberación de fluoresceína	22
II.7. Incorporación de sistemas lipídicos a <i>scaffolds</i> híbridos	22
II.7.a. Eficiencia de carga y perfiles de liberación del principio activo modelo (fluoresceína) desde la matriz cargada con los sistemas lipídicos	22

CAPÍTULO III – RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
III.1. Observación macroscópica de los <i>scaffolds</i> híbridos sintetizados	25
III.2. Análisis de SEM	26
III.3. Análisis de resistencia a la compresión mecánica	28
III.4. Análisis FT-IR	29
III.5. Análisis TGA y DSC	30
III.6. Estudios cinéticos de liberación de fluoresceína desde liposomas deformables incorporados a la matriz de los <i>scaffolds</i> híbridos sintetizados	32
CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES	37
Resultados principales	38
Conclusión	38
Perspectivas futuras	38
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXO I	43
ANEXO II	44
ANEXO III	45
ANEXO IV	46

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I – INTRODUCCIÓN

I.1. El tejido óseo

El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo, involucrado en la protección de órganos, en la provisión de estructura, soporte y movimiento del cuerpo, en el almacenamiento y regulación homeostática de minerales y en la producción de células rojas y blancas. Representa la parte principal del esqueleto (gr. *skeleton*) que significa materia seca. Sin embargo, los tejidos esqueléticos (tejido conectivo denso, tejido cartilaginoso y tejido óseo) poseen vida, y el conocimiento de su estructura y su función conforma la base para comprender, diagnosticar y tratar tanto las enfermedades del esqueleto como las que influyen sobre éste. ^[Brüel et al., 2014]

I.1.a. Su estructura y composición

Al igual que otros tejidos y órganos el hueso es un tejido vivo que se está renovando constantemente en favor de mantener una buena arquitectura capaz de conseguir la resistencia adecuada para soportar las cargas a las que se encuentra afectado. De allí que su estructura cuente con distintos niveles de organización. La capa externa es llamada **hueso cortical (o compacto)**, es dura y sólida, sin espacios visibles, y cuenta con un recubrimiento delgado de tejido conectivo denso llamado **periostio**. Por dentro, se encuentra una estructura de soporte que se caracteriza por presentar poros interconectados y es llamada **hueso trabecular o esponjoso** por su parecido a una esponja, compuesto por finos listones o trabéculas que forman el reticulado y en cuyas cavidades (de algunos tipos de huesos) se encuentra la **médula ósea**. Finalmente, una delgada membrana interior de tejido conectivo, el **endostio**, recubre todas las superficies óseas internas (espacio medular y trabéculas).

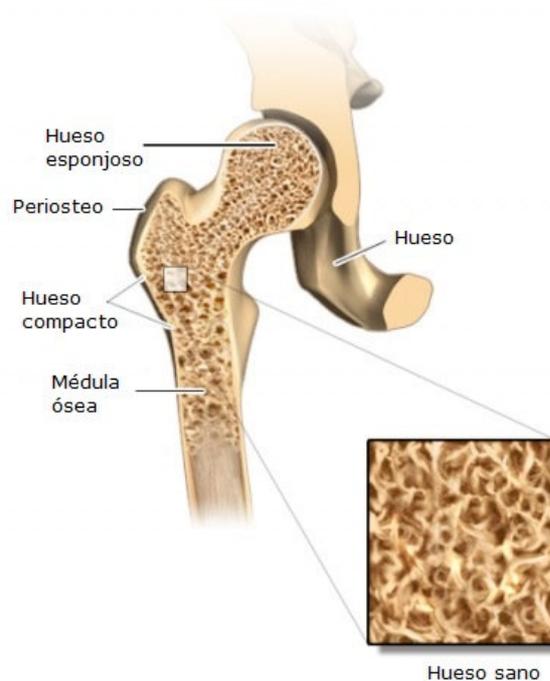


Figura 1. Estructura del hueso sano.

(Crédito de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0072377/)

El hueso óseo cortical contiene **sistemas de Havers** (u **osteonas corticales**) que son arreglos cilíndricos longitudinales en cuya parte central se encuentra el conducto de Havers (con capilares, fibras nerviosas y tejido conectivo) envuelto por la matriz ósea dispuesta en **laminillas** concéntricas compuestas principalmente por colágeno de tipo I. Estos sistemas se encuentran delimitados por líneas de cemento que contienen escasas fibras colágenas y se encuentran muy mineralizadas. Las células óseas u **osteocitos** se ubican en pequeñas lagunas alargadas de las laminillas, que por medio de canales estrechos o **canalículos** (ramificaciones de los osteocitos) y los conductos óseos pueden recibir y secretar sustancias por difusión a través de la escasa cantidad de líquido tisular que los rodea y la matriz extracelular calcificada. [Brüel et al., 2014]

El tejido óseo trabecular también está compuesto por **laminillas**, pero no dispuestas como en los sistemas de Havers, sino en discos planos u **osteonas trabeculares** constituidas por laminillas dispuestas paralelamente a la superficie del disco. En los tejidos óseos de huesos que soportan mucho peso como es el caso de las vértebras, las trabéculas son más gruesas en la dirección de carga (vertical en posición erguida para las vértebras) para conferir mayor resistencia en esa dirección, e interceptadas por trabéculas transversales a modo de apoyo. Al no poseer conductos de Havers ni de otro tipo, este tejido no posee vasos sanguíneos, por lo que la nutrición de los **osteocitos** se produce por difusión desde la superficie del endostio a través de los canalículos comunicantes. [Brüel et al., 2014]

La **matriz ósea extracelular** (MEC) se compone de una matriz **orgánica** y una **inorgánica**. La primera está compuesta por **fibras colágenas** (fundamentalmente de colágeno tipo I) incluidas en una sustancia fundamental, mientras que la matriz inorgánica se compone principalmente de **sales de calcio** (fosfato de calcio cristalino en la forma de **cristales de hidroxiapatita**, con fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, en forma de varas o placas finas de unos 3nm de espesor y hasta 60nm de largo). La resistencia a la compresión del tejido óseo se debe a contenido de sales inorgánicas, mientras que sus propiedades elásticas y resistencia a la tracción dependen en particular del contenido de colágeno. [Brüel et al., 2014]

Si bien el **proceso de mineralización** (calcificación) no está completamente dilucidado, se sabe que implica el depósito de iones de calcio y fosfato en la matriz orgánica del cartílago y el tejido óseo, que luego se transforman en cristales de hidroxiapatita.

I.1.b. Las células y su función

Los tipos de células que van a componer al tejido óseo son cinco: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos, células de revestimiento óseo y osteoclastos.

En la etapa fetal, después del parto y durante la vida posnatal, es decir, durante la etapa de crecimiento, se lleva a cabo el siguiente proceso de diferenciación celular:

Células mesenquimáticas pluripotentes -> **Células osteoprogenitoras** -> Osteoblastos

Además, en la edad adulta, la diferenciación de células osteoprogenitoras a osteoblastos se observará en relación a la curación de fracturas, el modelado y el remodelado óseo.

Los **osteoblastos** son células formadoras de hueso (poseen grandes cantidades de **fosfatasa alcalina**, enzima involucrada en el proceso de mineralización) que sintetizan y secretan matriz ósea orgánica no mineralizada (**osteóide**) en las zonas de formación de hueso, donde forman una capa de células cúbicas sobre la superficie y se transforman en osteocitos (en un 10%). El resto de los osteoblastos se transforman en **células de revestimiento óseo**

durante la etapa de formación de hueso, que forman una capa simple de células planas sobre todas las superficies óseas internas y externas en las que no hay actividad de osteoblastos u osteoclastos, impidiendo la resorción ósea hasta que actúe una **colagenasa** para destruir a la delgada capa de matriz orgánica secretada por este mismo tipo celular. Cuando la etapa de formación de hueso finaliza los osteoblastos sufren apoptosis. [Brüel et al., 2014]

Como ya se mencionó, el **osteocito** es la célula ósea madura, es la verdadera célula ósea. Estos se diferencian a partir de los osteoblastos que quedan atrapados en la matriz ósea recién formada, en procesos de degradación paulatina del aparato de Golgi. El osteocito tiene la capacidad de censar estímulos mecánicos a través de sus canalículos: por deformación mecánica del hueso, varían las condiciones de las corrientes del líquido intersticial, lo que este tipo de célula detecta y envía en consecuencia señales a través de sus prolongaciones a las células de la superficie del hueso para activar los mecanismos de remodelado óseo. Además participan en la homeostasis del calcio debido a la posible capacidad para degradar tejido óseo (osteólisis osteocítica). [Brüel et al., 2014]

Finalmente, los osteoclastos se encargan de la degradación del hueso. Son células gigantes multinucleadas diferenciadas a partir de las células progenitoras de osteoclastos:

Células madre de granulocitos-macrófagos (médula ósea) -> Células progenitoras de osteoclastos -> Pre-osteoclastos -> **Osteoclastos**

Este tipo celular contiene grandes cantidades de **catepsina K**, enzima lisosómica responsable principal del proceso de resorción degrada la matriz ósea orgánica, mientras que una disminución del pH en el espacio subosteoclástico disuelve la matriz ósea inorgánica.

I.1.c. Remodelado óseo

Como se mencionó anteriormente, el tejido óseo, como los demás tejidos, está en constante reconstrucción a lo largo de la vida.

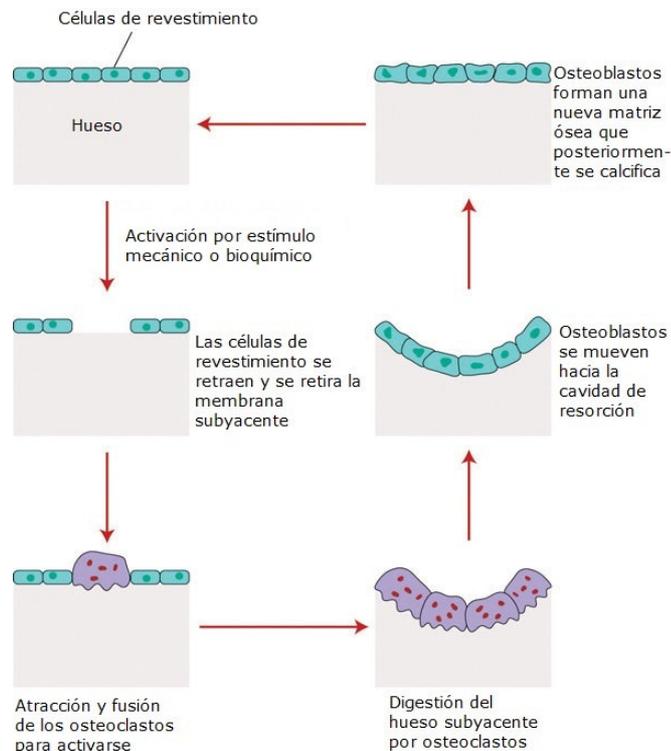


Figura 2. Proceso de remodelado del hueso.

(Crédito de: https://catalog.flatworldknowledge.com/bookhub/reader/3728?e=zimmerman_1.0-ch09_s01)

El proceso de recapitulación ósea o remodelado tiene lugar ya en las primeras etapas de la vida posnatal. Luego de la infancia y la primera juventud, es decir, luego del período de modelado o crecimiento óseo, es el único proceso que dará lugar al mantenimiento de la estructura ósea y renovación de su matriz extracelular con los procesos de mineralización con el reemplazo de tejido óseo ya formado por tejido óseo nuevo. En esta etapa, la actividad de los **osteoblastos** y la de los **osteoclastos** están acopladas y en equilibrio, a diferencia de las etapas de formación de hueso en donde predominan los procesos de **osteogénesis** y son independientes del grado de **resorción**.

En particular, a partir de la adultez y asociado a un cambio en el perfil hormonal, el balance de este equilibrio se ve comprometido y comienzan a preponderar los procesos resortivos por sobre los de osteogénesis, situación inversa al período de crecimiento, lo que da lugar a que una alta proporción de esa población etárea padezca de osteopenia, parámetro que se basa en la evaluación de la **densidad mineral ósea (DMO)**. En Argentina, dos de cada cuatro mujeres padecen osteopenia, una presenta osteoporosis y solo una de cuatro presenta DMO normal. El valor de DMO que un paciente presente está directamente relacionado al riesgo que presenta de sufrir lesiones óseas y fracturas, las cuales pueden incluso comenzar a acaecer y pasar inadvertidas por un tiempo prolongado en lo que se conoce como una enfermedad silenciosa que podrá derivar en fracturas múltiples. ^[OSG, 2014b,c]

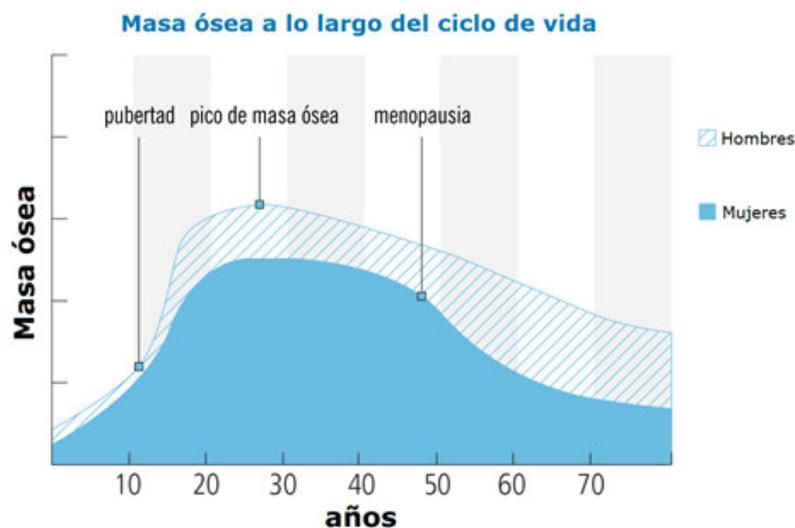


Figura 3. Masa ósea a lo largo del ciclo de vida. (Crédito de: www.iofbonehealth.org/news/bone-healthy-lifestyle-teenage-years-pays)

I.1.d. Principales enfermedades óseas y tipos de fractura

La presencia de ciertas patologías de base, asociadas directamente o no al metabolismo óseo, pueden favorecer el evento de fractura. A continuación mencionaremos algunas de las enfermedades óseas más comunes y el tipo de fractura que más comúnmente se ocasionan a partir de ellas, así como de por accidentes.

Osteoporosis. Es una enfermedad asociada a un desbalance en el equilibrio de actividad osteoblástica frente a la osteoclástica, donde los procesos resortivos se encuentran exacerbados. El cuadro clínico del paciente estará fuertemente marcado por la reducción de la resistencia ósea, lo que lleva a un incremento del riesgo de micro y macro fracturas. Esta resistencia ósea estará no sólo referida a la masa ósea (cantidad), sino a su calidad. Es

prevalente en ancianos y mujeres postmenopáusicas, siendo la mayor causa de fracturas en huesos de la cadera, vértebra y muñeca, que en muchos casos conforman el primer síntoma visible de la enfermedad si el paciente no venía siendo monitoreado. Una mala dieta en calcio y vitamina D, un estilo de vida sedentario, y deficiencias de hormonas sexuales son las principales causas. Los tratamientos apuntan a la prevención de fracturas, a través de la dieta, ejercicio y agentes antiresortivos para disminuir la pérdida de hueso, o a favorecer la osteogénesis ^[NIH Health Report 2015c].

Enfermedad de Paget. Su causa aún no se ha terminado de dilucidar. Esto hace que las terapias convencionales apunten a reducir el dolor óseo y a detener o enlentecer el progreso de la enfermedad asociado a la alteración focal esquelética con remodelado óseo acelerado que ésta causa, pero aún se desconoce cuál es la alteración metabólica que existe detrás. El resultado es una osteítis deformante, que a través de los procesos inflamatorios del tejido óseo genera huesos grandes y débiles, sobre todo los de la columna vertebral, pelvis, cráneo y pierna, llevando inevitablemente a un mayor riesgo de fractura. Se desarrolla con mayor frecuencia en personas mayores y en hombres más que en mujeres. ^[NIH Health Report 2015b]

Osteogénesis imperfecta. Es una enfermedad que obedece a un desorden genético, involucrando a genes que juegan un rol esencial en la producción de colágeno. Se caracteriza por huesos que se fracturan fácilmente, a menudo con poca o ninguna causa aparente. Los tratamientos están dirigidos a prevenir o controlar los síntomas, maximizando la independencia de movimiento, y desarrollando una masa ósea óptima y resistencia muscular, para disminuir los riesgos de fractura. ^[NIH Health Report 2015a]

Tumores óseos. Éstos pueden originarse en el hueso (tumores primarios) o ser el resultado de un tumor ajeno al hueso (metástasis), el cual es mucho más común, sobre todo, en cáncer de mama, próstata, pulmón, tiroides y renal. Dentro de los primarios encontramos los benignos (por ej, osteocondroma) y los malignos (osteosarcoma y sarcoma de Ewing). Para la mayoría la causa es desconocida, y el síntoma más común es el dolor, aunque varían dependiendo del lugar y tamaño del mismo. Si bien la cirugía es el principal tratamiento, también se suele amputar el miembro comprometido, y hacer quimio y radioterapia para asegurar su remisión. ^[OSG, 2014a]

Así mismo, encontramos que las fracturas se pueden clasificar de acuerdo a su etiología como **fracturas por fragilidad**, que pueden ser espontáneas o por caídas y son típicas en personas con osteoporosis u osteopenia, **fracturas patológicas**, las que pueden ocurrir espontáneamente o con traumas mínimos y ocurren en huesos estructuralmente anormales, producto de enfermedades como Paget, osteomalacia/ricket, metástasis en hueso, cáncer, entre otras y las conocidas como **fractura de alta energía**, que están asociadas a un gran trauma y pueden afectar a huesos normales, o desencadenadas por un entrenamiento excesivo que lleva a una repetición de traumas menores.

Las mismas podrán clasificarse, a su vez, de acuerdo al tipo de daño que se generó en el tejido óseo. Las **fracturas simples** son aquellas fracturas que no comprometan la funcionalidad del hueso una vez recuperado, las **fracturas complejas** comprenden un daño crítico en el hueso que el organismo es incapaz de regenerar o la necesidad de fijar al hueso con la intervención quirúrgica para lograr recomponer la posición normal y asegurar un soldado adecuado, y, por último, las conocidas como **fracturas conminutas** que comprenderán a aquellas fracturas que presenten al hueso dividido en más de dos fragmentos, en general en múltiples y pequeños fragmentos.

I.2. Las lesiones óseas complejas. ¿Cómo las abordamos?

Las lesiones óseas complejas, producto de fracturas complejas o conminutas por trauma de alto impacto, o las lesiones secundarias a tumores óseos, presentan una alta complejidad técnica para su resolución quirúrgica, un tiempo prolongado de inmovilización y muchas veces una reparación ósea aberrante que lleva al deterioro de la matriz ósea o al déficit funcional de la zona afectada. A su vez, representan una seria problemática socio-económica ligada a un enorme costo material y social para el sistema de salud a nivel mundial.

I.2.a. Bioingeniería de tejidos para lesiones óseas

Los tratamientos para este tipo de lesiones se enfocan muchas veces en transplantar tejido de un sitio a otro, sea éste del mismo paciente, **autoinjerto**, de otro individuo: **aloinjerto** o de otra especie animal: **xenoinjerto**. Pero, si bien han sido enfoques revolucionarios en su momento, los injertos de hueso siguen trayendo aparejados muchos problemas, como muerte del sitio donador y dolor (en autoinjertos), hasta riesgos de respuesta inmunológica y rechazo (en los aloinjertos y xenoinjertos). La **bioingeniería de tejidos**, por el contrario, apunta a regenerar el tejido dañado en lugar de reemplazarlo, mediante biomateriales que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos. ^[O' Brien et al., 2011] Este campo, acuñado en 1988, se basa ampliamente en el uso de andamios o **scaffolds** porosos 3D de manera de proporcionar el entorno adecuado para la regeneración de tejidos y órganos y ha ido avanzando sólidamente en el estudio de este tipo de patologías de pérdida de tejido óseo, ya sea por traumatismos o por enfermedades crónicas. ^[Gong et al., 2015] En nuestro país, el Ministerio de Ciencia y Tecnología, que definió entre sus “Temas estratégicos” la temática “Bioingeniería aplicada a la medicina regenerativa”, hace especial hincapié en los procesos ligados al “desarrollo de nuevos Biomateriales para el desarrollo de tejidos y órganos” en el Sector Salud de dicho plan.

En particular, y como se detallara en la sección anterior, la regeneración de hueso es un proceso activo que recapitula el desarrollo esquelético y su pérdida en lesiones complejas causada por enfermedades óseas o fracturas representa un desafío en el campo en la medicina regeneradora y reparadora, dado que el proceso de generación de nuevo tejido óseo depende de varios factores, incluyendo interacciones de tipo matriz-célula (que dependerán del material elegido y su biocompatibilidad, la geometría, arquitectura, porosidad y propiedades mecánicas, así como de la velocidad de degradación), la presencia de sustratos inorgánicos que aporten a los procesos de mineralización, o la presencia de moléculas solubles como citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, iones y vitaminas para estimular las funciones que regulen la producción osteogénica. ^[Lanza et al., 2009; Henckel et al., 2013]

I.2.b. Biomateriales para ingeniería de tejido óseo

El advenimiento de **biomateriales** y **materiales híbridos** basados en **biopolímeros**, **sales inorgánicas**, y otros productos avizora un futuro distinto para la regeneración de tejido óseo, donde estructuras 3D cada vez más adaptadas a la fisiología natural del hueso son propuestas para ayudar a que los osteoblastos vayan a poblar los espacios del tejido dañado inmediatamente después de la lesión o remoción del hueso, para promover la producción de células de recubrimiento óseo, y con esto la regeneración de nuevo tejido, para una reparación del hueso más eficiente, es decir, que en un corto período de tiempo luego de la lesión se reconstituya un hueso sano y no aberrante. ^[Henckel et al., 2013; Gong et al., 2015]

Para esto, el biomaterial que constituya el *scaffold* junto a otros agregados buscará conformar un sistema que asegure la osteoproducción, osteoinducción, osteoconducción, resistencia mecánica y vascularización. El desempeño de estos sistemas puede mejorarse a través de la incorporación de moléculas bioactivas las cuales se liberen de una manera controlada a medida que el andamio se degrada y el tejido nativo lo reemplaza. De esta manera, son diseñados para la reparación y regeneración *in situ* mediante una cirugía mínima invasiva. Para asegurar una rápida curación, los *scaffolds* podrían funcionar como bioreactores que mimeticen a la estructura y composición de la MEC del tejido óseo nativo impulsando la migración de pre-osteoblastos dentro de ellos, soportando y promoviendo su diferenciación y la deposición de nueva MEC en procesos de mineralización.

Este es un enfoque en donde la matriz 3D a implantar es un “*smart scaffold*” que contiene moléculas activas que se pueden ir siendo liberadas controladamente en el tiempo para autoalimentar a la matriz y transformarla en un sistema que evoluciona hacia tejido óseo nuevo, y que a la vez promueve a células vecinas a generarlo.

I.2.b.i. Matrices híbridas a base de Seda de origen natural

Como se mencionara anteriormente, un paso crítico en este tipo de estrategias es poder mimetizar la estructura de la matriz extracelular (MEC) del tejido óseo y sus propiedades fisicoquímicas, proveyendo así de la estabilidad mecánica y el ambiente apropiados para que las células migren, se diferencien, crezcan y puedan restaurar el hueso. [Gong *et al.*, 2015] La combinación de polímeros naturales y sólidos inorgánicos se ha convertido en un grupo emergente de materiales híbridos, llamados *bionanocompositos*. [Dang *et al.*, 2010]

Dentro de los biopolímeros naturales empleados en ingeniería de tejidos se encuentra la seda de origen natural. La seda proveniente de gusanos o arañas, es una proteína que permite el agregado de otros compuestos para la obtención de un material híbrido que cumpla con varios de los requisitos para este tipo de terapias. En particular es un material con una gran versatilidad, de bajo costo y características amigables con el medio ambiente. El capullo de seda de la especie *Bombix mori* contiene una proteína fibrosa conocida como fibroína de seda, y una proteína de unión llamada sericina que rodea las fibras para cementarlas entre sí. [Gong *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2017; Dang *et al.*, 2010] La seda de allí extraída en forma de solución acuosa presenta una interesante combinación de propiedades deseables para la entrega controlada de moléculas, incluyendo métodos de purificación y procesamiento a base de agua que evitan la presencia de entre-cruzadores químicos para la obtención de formas gelificadas o sólidas, compatibilidad con métodos comunes de esterilización, biodegradación controlable y mediada por superficie en subproductos no inflamatorios, biocompatibilidad, capacidad de estabilización de drogas y robustas propiedades mecánicas. [Yucel *et al.*, 2014] Entre las variedades de posibles estructuras a formar a partir de seda, las esponjas tienen una excelente interconectividad entre sus poros, pudiendo ser de importancia para el agregado de moléculas bioactivas en su matriz durante el procesado. [Rockwood *et al.*, 2011] Sin embargo, para la generación de cualquier de este tipo de estructuras 3D que desde ella se pueden generar (**films, fibras, espumas, bloques sólidos**, o en este caso **esponjas**) es necesario disolver y regenerar la seda natural, proceso por el cual termina exhibiendo propiedades mecánicas empobrecidas respecto a la forma original y mayor fragilidad.

Así, para obtener materiales flexibles pero a la vez con alta resistencia, algunos rellenos de refuerzo han sido estudiados e incorporados a estructuras a base de seda. [Dang *et al.*, 2010] Los polivinil alcoholes, por ejemplo, son interesantes como biopolímeros a incorporar en mezclas biopoliméricas por su capacidad para gelificar en procesos acuosos, generar estructuras porosas y aumentar la flexibilidad del material sin ir en detrimento de su resistencia mecánica.

[Correia *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2016] Por otro lado, es sabido que algunos compuestos inorgánicos (como sales de CaCO₃, hidroxiapatitas o los conocidos como biovidrios) facilitan los procesos de mineralización y/o mejoran las propiedades mecánicas del material híbrido. Este es el caso de ciertas arcillas como la **montmorillonita** (MMT) que se ha demostrado presenta capacidad de promover la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de células madres (hMSC), manteniendo una alta viabilidad celular, aumentando los marcadores osteogénicos y produciendo MEC, [Mieszawska *et al.*, 2011] pero que por sí mismas no poseen las propiedades mecánicas necesarias para la construcción de estructuras 3D porosas adecuadas para el sostén, desarrollo y diferenciación de las líneas celulares del tejido óseo, así como para que dichas estructuras soporten carga. De aquí que sea una alternativa interesante la fabricación de materiales híbridos. En este último caso las nanoarcillas naturales argentinas, de acuerdo a estudios reportados y a pruebas de concepto llevadas a cabo por este equipo, han sido incluidas en las matrices biopoliméricas de seda/PVA para conferir mejoras en sus propiedades mecánicas en la búsqueda de agregar funcionalidad específica según el tejido a emular. [Botana *et al.*, 2010; Dan *et al.*, 2011; Lombardi *et al.*, 2013]

I.2.b.ii Liberación controlada de moléculas desde matrices 3D

Dentro de las propiedades y capacidades buscadas en la matriz híbrida del *scaffold* puede tenerse en cuenta la posibilidad de ser cargada por moléculas activas pequeñas para su posterior liberación, o la incorporación en su estructura de moléculas que al irse degradando el biomaterial se expongan y cumplan con una función determinada. Como se detallaba previamente, la promoción de osteogénesis o la inhibición de los procesos resorptivos son dos de los bancos para acelerar el modelado del hueso que debe volverse a generar luego de una lesión. Entre las moléculas con actividad anti-resorptiva, se encuentran los bisfosfonatos, moléculas usadas en terapias para la osteoporosis (como el **alendronato** (ALEN) por ejemplo) con alta afinidad por la hidroxiapatita que inhiben la formación de nuevos osteoclastos, llevan a la muerte a osteoclastos diferenciados y, en menor medida, a los osteoblastos. [Fazil *et al.*, 2015] A su vez, moléculas como los factores promotores de osteogénesis en el seno de cualquier material híbrido que se desee desarrollar, aumentará además su eficiencia a la hora de emular la mineralización en el proceso de recapitulación ósea, o bien favorecerá los procesos de diferenciación celular, dependiendo del origen de la molécula en cuestión. La **incorporación de un principio activo** en este tipo de matrices puede mejorar sus propiedades funcionales y a la vez proteger al organismo de grandes dosis circulantes de principios activos que puedan tener efectos secundarios, como es el caso de los bifosfonatos, que en forma oral requieren ser administrados en grandes dosis por su baja biodisponibilidad, lo que ocasiona efectos adversos. [Hirabayashi *et al.*, 2003; dos Santos Ferreira *et al.*, 2015]

La incorporación de pequeñas moléculas a liberar desde el seno de un *scaffold* puede llevarse a cabo directamente en su forma libre durante la síntesis del material híbrido o por absorción/adsorción de la molécula cargo una vez finalizado el proceso de síntesis, o bien, incorporarlo encapsulado en un transportador que retrase su liberación en el tiempo desde la matriz híbrida. Una opción como **carrier** para el encapsulado de principios activos son los sistemas liposomales, y en particular las estructuras esféricas de capa lipídica con solución acuosa en su interior, que presentan la posibilidad de cargar moléculas tanto de naturaleza hidrofílica, afines al centro hidrofílico del liposoma, como de naturaleza hidrofóbica, por su interacción con la membrana de naturaleza lipídica. [Laouini *et al.*, 2012] A su vez, estas vesículas lipídicas se ven estabilizadas en presencia de sales como hidroxiapatita, carbonato de calcio o sílice, que se depositan como sólidos inorgánicos en las membranas que las conforman. [Xu *et al.*, 2007; Bellino *et al.*, 2009]

Hipótesis y objetivos

La seda de origen natural, una proteína generada por la especie de gusano *Bombix mori*, mecánicamente robusta y flexible, versátil en términos de estructura y morfología, y capaz de integrarse con el crecimiento celular del tejido óseo en una estructura de tipo esponja con porosidad, tamaño de poro e interconexión entre poros para emular la MEC natural del mismo, es un excelente ejemplo como base para la generación de un material híbrido de osteogénesis [Wang Y *et al.*, 2006; Vepari C *et al.*, 2007; Kaplan D, 2004-2017, Mandal BB *et al.*, 2012] En este contexto, el desarrollo de matrices híbridas a base de seda y sales inorgánicas, así como la presencia de moléculas específicas promotoras de procesos de osteosíntesis o de inhibidores de procesos de resorción ósea encapsuladas en el seno de la estructura soporte, permitiría favorecer la recapitulación del proceso de formación de tejido óseo tanto en las etapas de diferenciación celular como en las que involucren los mecanismos naturales de mineralización.

Objetivo general

De acuerdo a estudios preliminares y en la búsqueda de recrear la estructura 3D del tejido óseo trabecular en terapias de reemplazo de tejido óseo, se estudiará la posibilidad de generar un material híbrido a partir de seda de origen natural proveniente de la especie *Bombix mori* y arcillas nacionales (Montmorillonitas) con el agregado de polivinil alcoholes y sistemas lipídicos para la posible liberación controlada de moléculas promotoras de procesos de recapitulación ósea.

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar estructuras híbridas 3D basadas en estudios previos realizados a base de seda, y PVA con el agregado de un agente osteogénico (la arcilla Montmorillonita) y un agente anti-resortivo (el bifosfonato Alendronato).

- Sintetizar y cargar sistemas liposomales con una molécula modelo (Fluoresceína) para ser incorporados a la/las matrices híbridas seleccionadas y estudiar la carga y el perfil de liberación desde los sistemas híbridos.

La realización de este trabajo plantea desarrollar un entrenamiento basado en técnicas generales de obtención, manipulación y caracterización de sistemas biopoliméricos, análisis de estudios fisicoquímicos en los materiales desarrollados (espectroscopía visible-UV, FTIR, fluorescencia, SEM, TGA, DSC, DLS etc.) y liberación controlada de moléculas (ensayos de carga y liberación de moléculas desde nanotransportadores, rendimientos de incorporación de la molécula cargo a los sistemas 3D desarrollados y perfiles cinéticos de entrega).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Materiales. Obtención de fibroína de seda y preparación de soluciones

II.1.a. Materiales

La fuente de seda de gusano empleada en este trabajo fue de la especie *Bombix mori* cultivado en Japón, cuyos capullos secos fueron donados por el Instituto de Ingeniería de Tejidos de la Tufts University (Boston, USA). El polivinilalcohol seleccionado para este trabajo fue donado por la Dra. Silvia Goyanes de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Buenos Aires. Las arcillas nacionales fueron provistas por la Minera Castiglione (MMT), bentonita comercial ampliamente estudiada en Argentina; o extraídas de una cantera de nacional de Zona Sur y molidas en Benito Juárez, provistas por la minera no metalífera argentina Minera Cema (MMTA y MMTB), inexploradas por otros grupos de trabajo. El bifosfonato empleado fue donado por el Laboratorio Farmacéutico del Estado Mayor Conjunto Argentino. Los restantes reactivos fueron de grado analítico o superior de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.) o Merk (Darmstadt, Alemania).

II.1.b. Obtención de fibroína de seda

La obtención de seda se lleva a cabo siguiendo el protocolo previamente descrito (Diab *et al.*, 2012) con algunas modificaciones.

Para tal fin se llevó a ebullición en un vaso de precipitados 2 L de agua de calidad MiliQ con 4,24 g de Na_2CO_3 (0,02M Na_2CO_3 final) y 5 g de seda a proveniente de capullos de *Bombyx mori* cortados. Así, se lo dejó digiriendo durante 20 o 40 minutos para obtener seda 20 o 40 MB (minutes boiling) respectivamente. Luego se sometió a ciclos de lavado (3 lavados de 20 minutos en recipientes con 2,5 L de agua MiliQ y bajo suave agitación). Una vez concluidos los lavados, se lo deja overnight en flujo laminar vertical (ESCO Class II BSC).

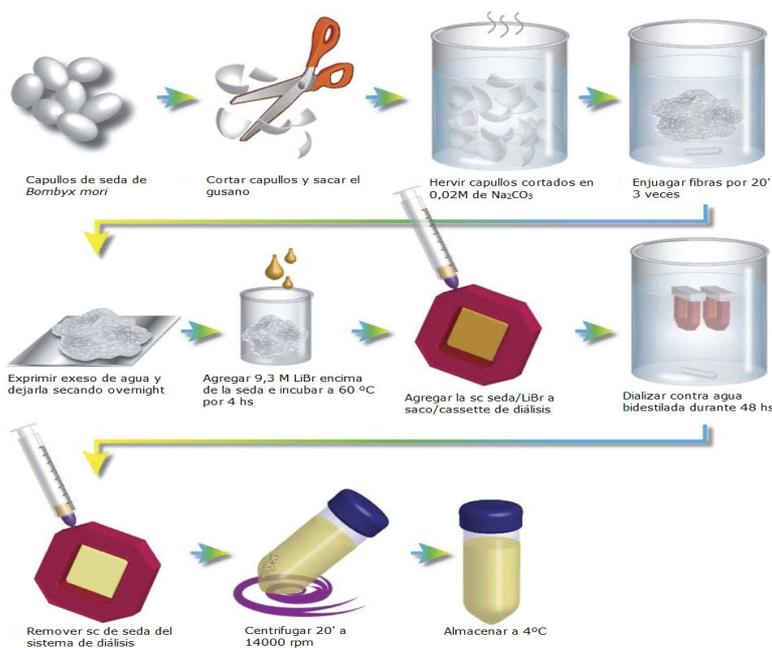


Figura 1. Obtención de solución de fibroína de seda (seda) a partir de la especie *Bombix mori*. Los diferentes tiempos de la digestión dan como resultado cadenas de seda de diferentes pesos moleculares. En este trabajo se usaron dos tipos: Seda 20 MB y seda 40 MB (muestra de seda natural que sufrió una digestión por temperatura durante 20 minutos o 40 minutos respectivamente)

Adaptado de (Rockwood, 2011)

Al siguiente día se procede a digerir la seda en LiBr según protocolo y se procede a la diálisis de la solución obtenida en bolsas de diálisis (Fisher Band MWCO: 3500 Da) en un recipiente con 3 L de agua bidestilada y agitación suave de acuerdo a los ciclos reportados. Finalizado el último, se centrifuga con centrífuga (Du Pont RC5C y rotor SS-34) durante 20 minutos a 14.000 rpm y se filtra con filtro tambor de 40 μm (FALCON QTY1). Se determina la concentración de la solución de seda obtenida, por secado overnight a 60 $^{\circ}\text{C}$.

II.2. Obtención de estructuras 3D -*scaffolds*- híbridas porosas

II.2.a. Gelificación por *salt-leaching*

La elección del conjunto de sistemas híbridos 3D (*scaffolds*) a sintetizar y caracterizar se basó en resultados previos del grupo de trabajo para estudios realizados entre diferentes tipos de PVA y diferentes tipos de arcillas en colaboración con una minera argentina no metalífera de Benito Juárez, Minera Cema, así como en estudios de colegas reportados en la bibliografía sobre las interacciones existentes entre seda proveniente del gusano *Bombix mori* y arcillas del tipo de las Montmorillonitas, o entre seda y polivinilalcoholes. Para la síntesis de los *scaffolds* se usó un solo tipo de PVA (PM=61kDa y grado de hidrólisis 98%) debido a su capacidad de integrarse con la seda y a la vez interaccionar con las Montmorillonitas, y tres tipos de Montmorillonitas: MMT, MMTA y MMTB.

Para la síntesis se siguió el protocolo para *scaffolds* porosos reportado previamente (Correia *et al.*, 2012) con algunas modificaciones. En este caso se utilizaron tubos de 3ml y se sintetizaron *scaffolds* con mezclas de reacción de 1 ml.

Las masas totales de los distintos reactivos agregados (PVA Alendronato y arcillas) siempre fueron constantes e iguala 6,2 mg finales. Para el proceso de *salt-leaching* se utilizó NaCl tamizado en un rango de 500 a 590 μm . Luego de dejar en reposo over-night se procedió al lavado con agua de calidad MiliQ y bajo agitación a temperatura por 24hs.

Finalizado el lavado, se procede a retirar los *scaffolds* porosos de los moldes y se almacenan en agua calidad MiliQ a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

En los casos de *scaffolds* con MMT agregadas por el método de deposición, una vez retirados de los tubos, se los dejó secar 30 minutos antes de proceder al proceso de deposición. El agregado de la solución con cada arcilla se hizo con la cantidad total de masa a agregar disuelta en 100 μl y dejó secar al sistema por 2hs a temperatura ambiente sin agitación antes de su almacenaje.



Figura 2. Proceso de síntesis de *scaffolds* porosos de seda por *salt-leaching* con NaCl. Adaptado de (Rockwood, 2011)

II.2.b. Gelificación por ciclos de congelado-descongelado

Los *scaffolds* con PVA fueron sometidos, o no, a ciclos de tipo *Freeze & Thawing* siguieron un protocolo previamente reportado (Tamada, 2005) con modificaciones. Se realizaron 4 ciclos de congelamiento de 20 hs con períodos de descongelamiento de 8 hs.

II.3. Agregado de moléculas osteogénicas y anti-resortivas

II.3.a. Método por deposición

Este método se consigue al agregar la/las molécula/s osteogénicas y anti-resortivas antes del agregado de NaCl durante el proceso de gelificación por *salt-leaching*. La masa final siempre fue de 6,2 mg para cada molécula agregada a la solución de seda.

II.3.b. Método por inclusión

Luego del proceso de gelificación por *salt-Leaching* mencionado más arriba, y una vez retirados los *scaffolds* de los moldes, se los deja secar alrededor de 30 minutos, se les agrega la/s molécula/s deseada/s en una cantidad final de 6,2 mg y se las deja decantar durante 2 hs.

II.4. Caracterización fisicoquímica de los sistemas híbridos

II.4.a. Análisis estructural y mecánico (SEM y ensayos de compresión)

II.4.a.i Análisis estructural: SEM

Las imágenes obtenidas por la técnica de microscopía electrónica de barrido se recolectaron del relevamiento de un equipo JEOL GCM-6000 de 15 kV en condiciones de alto vacío. A las muestras previamente se las metalizó con oro en una metalizadora Dentom vacuum – Desk V durante 1 minuto 30 segundos a un vacío de 5×10^{-2} mm Hg para lograr un sputtering de 30 nm de espesor promedio.

II.4.a.ii Análisis mecánico: Ensayos de compresión

Para testear la resistencia mecánica se midió (por duplicado) la diferencia de altura del scaffold, antes o durante el ejercicio de una diferencia de presión sobre su superficie superior de un peso de 10 gr. Se normalizaron los datos respecto a la diferencia de altura medida en el scaffold de seda 100%. Para la evaluación de la deformación del material se sacaron fotos antes y después del esfuerzo aplicado y las imágenes se analizaron con el software Image J.

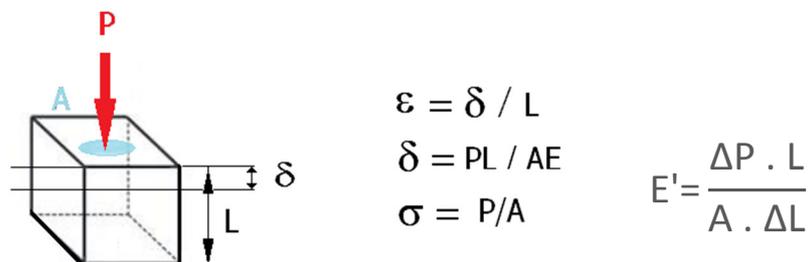


Figura 3. Modelo de perturbación para evaluar respuesta mecánica de un material frente a un esfuerzo de compresión axial. ϵ = Deformación unitaria δ = Deformación del material σ = Esfuerzo axial. E' =pseudomódulo de elasticidad.

III.4.b. Análisis de las interacciones fisicoquímicas (FT-IR, TGA y DSC)

III.4.b.i Espectrofotometría infra-roja por Transformadas de Föurier

En nuestro caso se utilizó un Espectrómetro Infrarrojo por Transformadas de Fourier Nicolet 6700 Thermo Scientific. (beam splitter de KBr y detector de tipo DTGS KBr) Las formulaciones fueron analizadas luego de deshidratadas y preparadas en pastillas por la mezclas de cada muestra al 5,0 % (p/p) con bromuro de potasio (KBr, Pike technologies) y barridas con una corrección de fondo para 256 barridos, contra una fuente de alta energía de cerámica y un detector. Los espectros correspondientes a los análisis de FT-IR fueron realizados para el intervalo de $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ con 4 cm^{-1} de resolución.

III.4.b.ii Análisis térmicos

Los ensayos termogravimétricos se llevaron a cabo con un Analizador Termogravimétrico Shimadzu TGA-50 en cápsulas de platino con rampas de calentamiento de $10.00 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde 30 hasta $600.00 \text{ }^\circ\text{C}$ y balance de gas de N_2 a $40 \text{ mL}/\text{min}$ y N_2 $30 \text{ mL}/\text{min}$ para la muestra.

Los análisis térmicos diferenciales se llevaron a cabo en un Calorímetro diferencial dinámico Perkin-Elmer Pyris 1 con un detector DSC-50. Se utilizaron cápsulas de aluminio para iguales rampas de temperatura ($10^\circ\text{C}/\text{min}$) y bajo atmosfera de nitrógeno.

II.5. Obtención de sistemas lipídicos para transporte de principios activos

II.5.a. Método de obtención de sistemas liposomales deformables por sonicación

Se realizó a través del método de hidratación de un film delgado reportado previamente (Wu *et al.*, 2010) con modificaciones. Se utilizaron 50 mg de β -sitoesterol se agitó la mezcla en shaker durante 1 hora a 30°C luego del agregado de los detergentes. Para la evaporación del solvente se utilizó un rotavapor TE-211 (TECNAL) a 56°C y se hidrató con PBS de pH: 6,8 durante al menos 1 hora a 30°C con agitación y se lo almacena a 4°C overnight.

Una vez concluída la hidratación, se realizó la sonicación con un Ultrasonic Processor Cole Parmer (Fuente: 130 MW y 20 Khz –Cole Parmer-) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

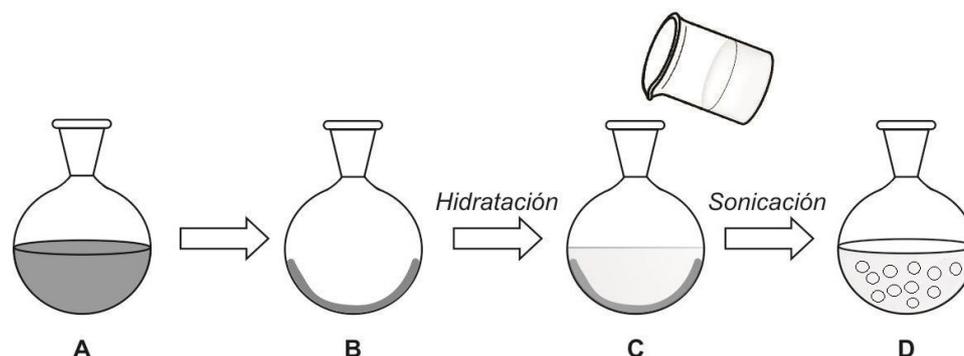


Figura 4. Esquema de una síntesis clásica de liposomas por sonicación. Adaptado de (Bellino, 2009)

II.5.b. Carga de los sistemas liposomales con una molécula modelo: fluoresceína

Se procede del mismo modo que el método de obtención por sonicación mencionado antes, pero con la diferencia que la hidratación se hace con PBS y 12,5 mg de fluoresceína disuelta, para llegar a una concentración final de 0,025% p/v.

II.6. Caracterización de los sistemas lipídicos

II.6.a. Estabilidad: Tamaño y carga superficial en el tiempo (DLS y Pot-Z)

Para estas medidas se utilizó un Particle Size Analyser 90 Plus/Bi-MAS Multi Angle Particle Sizing (Brookhaven Instruments Corporation) a una fuerza iónica constante: 10^{-3} M KCl.

II.6.a.i Medidas del tamaño de los liposomas por dispersión de luz

Las muestras de LP almacenadas a 4°C fueron diluidas 10 veces el mismo día de la medida y se utilizaron 2 ó 3 mL en una cubeta de plástico transparente para realizar la medida.

II.6.a.ii Estudios de carga superficial

Las muestras de LP almacenadas a 4°C fueron tratadas igual que en II.6.a.i.

II.6.b Eficiencia de carga liposomal y perfiles de liberación de fluoresceína

Para evaluar la carga total de fluoresceína se centrifugaron pequeñas columnas de Sephadex 50 (G50; SIGMA BIORED) con los liposomas cargados de fluoresceína, según protocolo del fabricante y en reportes previos (Ortiz López *et al.*, 1987). Para esto se centrifugó en centrífuga Minispin (Eppendorf) durante 4 minutos a 4300 rpm para eluir la solución de almacenamiento. Luego se usaron liposomas cargados con fluoresceína sonicados el mismo día, adicionando una cantidad de 100 μ L (volumen máximo permitido por esta columna) y se volvió a centrifugar con los mismos parámetros, para eluir los liposomas y retener a la fluoresceína (Ortiz López *et al.*, 1987). Al volumen obtenido se le agregó Triton X-100 al 1% en una relación 2:1 (Triton:LP) y se lo dejó durante 45 minutos. Pasado este tiempo se procedió a medir la fluorescencia con los mismo parámetros de la curva de calibración y usando como blanco LP vacíos tratados de igual manera.

El ensayo de liberación se lleva a cabo con un frasco de 250 mL con solución fisiológica y liposomas en bolsa de diálisis (Fisher brand MWCO: 3500 Da). La relación de LP tratados a solución fisiológica fue de 1:7 en volumen. Las primeras muestras se tomaron cada hora durante 6 hs y luego 1 por día.

II.7. Incorporación de sistemas lipídicos a *scaffolds* híbridos

II.7.a. Eficiencia de carga y perfiles de liberación de fluoresceína desde la matriz cargada con los sistemas lipídicos

La eficiencia de carga de fluoresceína en los diferentes *scaffolds* se determinó luego de lavar a los sistemas por 24 hs bajo agitación en una relación de volúmenes de 1:500 para los *scaffolds* y 1:2500 para el volumen de LP incluidos en las matrices. Se trabajó a temperatura ambiente y contra agua de calidad MiliQ.

Los perfiles de liberación analizaron a partir de liberaciones de fluoresceína libre o encapsulada en liposomas desde los diferentes tipos de *scaffolds* estudiados. Para esto se trabajó a 37 °C y contra solución fisiológica en frascos tipo Falcon de 15 ml. La relación de volúmenes respecto del *scaffold* fue de 1:5 mientras que respecto del volumen incluido de liposomas en cada *scaffold* (200 μ L) fue de 1:20 1 [solución fisiológica:liposomas] y las muestras se tomaron durante las primeras 6 hs, a las 24 hs 1 día durante 3 semanas.

Todos los análisis fueron realizados como experimentos individuales por duplicado. Las medidas se expresaron como el promedio de los valores obtenidos \pm la desviación estándar correspondiente. Además, se analizaron muestras de a pares con Test-t de Student para detectar si había diferencias: $p < 0,5$ fue considerado como diferencia significativa.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO III – RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Observación macroscópica de los *scaffolds* híbridos sintetizados

La preparación de sistemas híbridos 3D (*scaffolds*) a base de seda de la especie de gusano *Bombix mori* (Tabla 1) se llevó a cabo por el método de *salt-leaching* según se especificó en la sección correspondiente del Capítulo II. El PVA seleccionado previamente se incorporó en diferentes relaciones a la seda (datos no presentados en este trabajo) y bajo métodos de gelificación del *scaffold* de *salt-leaching* o acompañado también de ciclos de congelado-descongelado con el objetivo de reforzar la matriz de seda. Las arcillas con potencial actividad osteogénica seleccionadas se agregaron a la matriz durante la síntesis de los *scaffolds* por el método de inclusión o, una vez ya sintetizados, por el método de deposición en la búsqueda de ser incorporadas de la manera más eficiente y acompañar las posibles mejoras mecánicas del PVA. A su vez, el bifosfonato Alendronato, con capacidades anti-resortivas demostradas, fue incorporado en todos los sistemas por el método de inclusión descrito anteriormente.

Los sistemas fueron observados a ojo desnudo en cuanto a su apariencia y consistencia. Se observó el grado de homogeneidad e integridad de su estructura externa luego de los lavados, la presencia de poros visibles y homogéneos a simple vista y su grado de resistencia a la manipulación una vez deshidratados y en solución acuosa. También se evaluó la posibilidad de integrar en sus estructuras a las MMT ensayadas haciendo uso de SEM, así como la distribución y tamaño de poros. (Véase para esto la siguiente sección)

Luego de una comparación cualitativa en base a estas propiedades y a la observación por la técnica de SEM, el relevamiento general de las combinaciones propuestas para estos materiales permitió reducir el conjunto de sistemas a estudiar. De entre todos los sistemas desarrollados se seleccionaron aquellos *scaffolds* que presentaban mayor resistencia al manipuleo, con una estructura homogénea y reproducible a nivel de poros interconectados en su interior. Estos *scaffolds* fueron los compuestos por seda digerida por 20 minutos (20 MB), sintetizados por *salt-leaching* sin ciclos de congelado-descongelado y los que incluían MMT y MMTB. (Tabla 2) Luego, fueron estos *scaffolds* los que se caracterizaron y estudiaron para evaluar la posibilidad de ser utilizados como estructuras de andamiaje y liberación de moléculas pequeñas para bioingeniería de tejido óseo, para lo que se utilizó a una molécula modelo trazable: la fluoresceína. (Fig. 1 y Fig. 2)

<i>Scaffolds</i> sintetizados	Seda utilizada	Método de gelificación	Tipo de MMT	Método de incorporación de MMT
Seda	20 MB ó 40 MB	<i>salt-leaching</i>	-	-
Seda-PVA		<i>salt-leaching</i> y congelado - descongelado		
Seda-Alen		<i>salt-leaching</i>		
Seda -PVA- Alen			MMT, MMTA ó MMTB	deposición ó inclusión
Seda-PVA-MMT				
Seda-PVA-MMT-Alen				

Tabla 1. *Scaffolds* sintetizados para su relevamiento cualitativo en cuanto a estructura y consistencia

En general se pudo observar que la presencia de las Montmorillonitas ejerció una contracción en el volumen final de los *scaffolds* y un aumento en el grado de dureza de la estructura que las contenía. Sin embargo este cambio no fue tan evidente en el caso de la MMTA. Por otro lado el Alendronato y el PVA también permitieron cambios notables entre las estructuras de seda y sus respectivos híbridos, siendo más importante el cambio observado en el caso de la mezcla Seda-Alen-PVA (Fig. 1.c). Por otra parte, los sistemas que fueron sintetizados por una incorporación de las MMT por deposición (Fig. 1.f y Fig. 1.g) conservaron más su estructura que en el caso de su incorporación por el método de inclusión (Fig. 1d y Fig. 1.e) A su vez, todos los sistemas formulados a partir de seda 40MB, si bien conservaron una estructura homogénea, fueron más débiles al tacto y con poros más abiertos a simple vista.

<i>Scaffolds</i> seleccionados	Seda	Método de gelificación	Método de incorporación de MMT
Seda	20 MB	<i>salt-leaching</i>	-
Seda-PVA			
Seda-Alen			
Seda -PVA- Alen			
Seda-PVA-MMT			deposición ó inclusión
Seda-PVA-MMTB			
Seda-PVA-MMT-Alen			
Seda-PVA-MMTB-Alen			

Tabla 2. *Scaffolds* seleccionados para futuros análisis. Observación cualitativa de la homogeneidad en estructura, firmeza en la consistencia y presencia de poros uniformes.

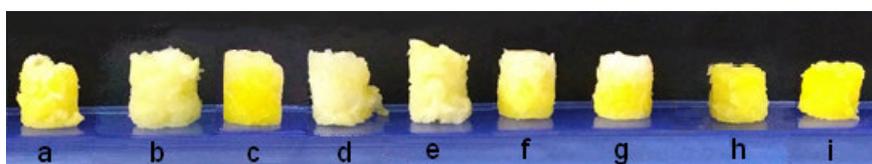


Figura 1. *Scaffolds* seleccionados para ensayos posteriores de liberación de moléculas. Cargados con liposomas transportadores de fluoresceína (a-h) o con fluoresceína libre (i). a. Seda-PVA; b. Seda-Alen c. Seda-PVA-Alen d. Seda-PVA-MMT-Alen(i) e. Seda-PVA-MMTB-Alen(i); f. Seda-PVA-MMT-Alen(d); g. Seda-PVA-MMTB-Alen(d); h. Seda; i. Seda-Fluoresceína libre.

III.2. Análisis de SEM

Todos los *scaffolds* seleccionados para el relevamiento (Tabla 1) fueron analizados por SEM. Si bien se pudieron llevar a cabo todas las medidas, las muestras obtenidas de cortes transversales de los sistemas híbridos fueron muy diferentes entre sí a simple vista. Como se mencionaba en la sección anterior, la presencia y distribución de los poros fue uno de los factores de selección propuestos. En alguno de los casos, las muestras presentaron inestabilidad estructural debido a la presencia de poros de diámetros incompatibles con las dimensiones totales de la estructura de la matriz, debilitándola. Luego de deshidratar los *scaffolds* y someterlos a un corte transversal para llevar adelante la observación por SEM, en algunos de los casos se encontraron “poros únicos”, lo que permitió descartar al sistema. (No se muestran estos resultados)

Para el conjunto de sistemas que se decidió estudiar se presentan las imágenes de SEM en la Figura 2. En todas las muestras se observaron poros interconectados y de diámetro regular.

Al comparar los sistemas híbridos con el de seda, puede observarse, excepto para el caso del sistema Seda-PVA, que los compuestos inorgánicos presentes (el bifosfonato o las arcillas) actúan de núcleo de precipitación para los polímeros (la seda o, eventualmente PVA).

Esto se evidencia en la formación de micropartículas de seda durante el proceso de *salt-leaching* desde la solución sobre las láminas de seda de algunos cientos de nanómetros de espesor que forman las cavidades de los microporos interconectados en su matriz, proceso característico de muestras envejecidas de *scaffolds* de seda conservados en medios acuosos.

Por otro lado, se observaron dos tendencias de cambio de macro y micro-estructura frente a la presencia de Alendronato y frente a los métodos de incorporación de MMT. Cuando el bifosfonato formaba parte de los sistemas híbridos se observó una mayor regularidad en la formación de los poros en cuanto a los límites de éstos, formados por láminas más lisas y continuas. Por otro lado, los procesos de deposición de MMT permitieron una menor desestructuración de la disposición de los mismos en el seno de cada *scaffold*. (Fig. 2g vs Fig. 2h y Fig. 2i vs Fig. 2gj)

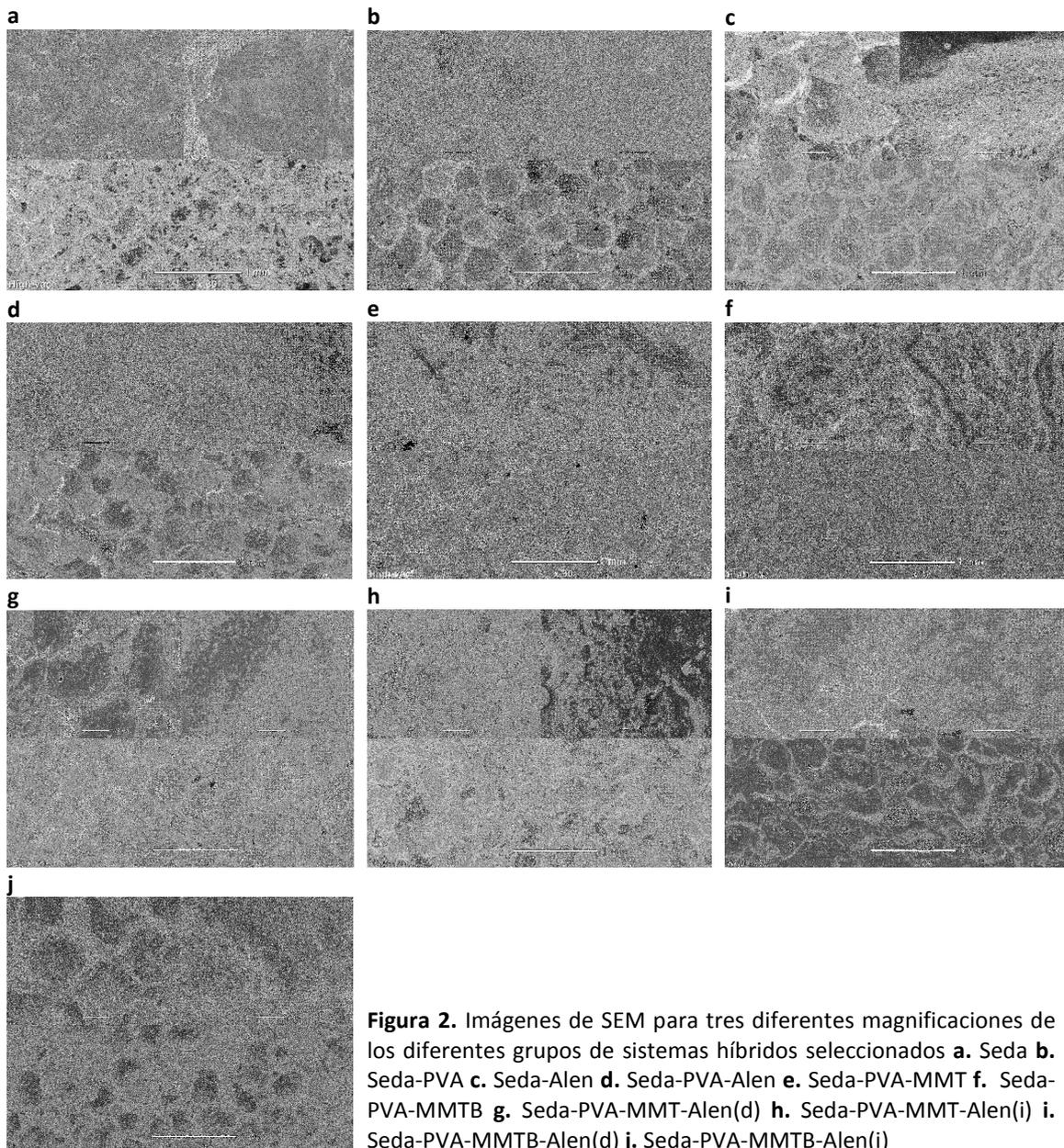


Figura 2. Imágenes de SEM para tres diferentes magnificaciones de los diferentes grupos de sistemas híbridos seleccionados **a.** Seda **b.** Seda-PVA **c.** Seda-Alen **d.** Seda-PVA-Alen **e.** Seda-PVA-MMT **f.** Seda-PVA-MMTB **g.** Seda-PVA-MMT-Alen(d) **h.** Seda-PVA-MMT-Alen(i) **i.** Seda-PVA-MMTB-Alen(d) **j.** Seda-PVA-MMTB-Alen(i)

Por otra parte, los *scaffolds* formulados a partir de seda de menor peso molecular (40MB) mostraron ser mucho más abiertos y con poros formados por láminas de seda aún más discontinuas en todos los casos, es decir en presencia o no de PVA, Alendronato o cualquiera de las arcillas, en concordancia con la debilidad que presentaban en la observación cualitativa.

III.3. Análisis de resistencia a la compresión mecánica

Para evaluar el efecto en las propiedades mecánicas de los *scaffolds* seleccionados relacionado a la presencia de un polímero orgánico, como el PVA, y los dos compuestos inorgánicos utilizados en la formulación de los sistemas híbridos, se procedió a someter a los materiales a una fuerza de compresión y evaluar su respuesta en comparación con la respuesta del sistema de seda puro. A partir de los valores de desplazamiento del material como consecuencia de una misma fuerza de compresión para todos ellos, se normalizaron los valores en función de la respuesta observada para el sistema puro de seda. (Tabla 3) A su vez, se procedió a calcular el Módulo de Young como se detallara en la sección de Materiales & Métodos correspondiente y cuyos cálculos se detallan en el ANEXO II. (Fig. 3)

<i>Scaffolds</i>	Resistencia relativa a la compresión
Seda	1
Seda-PVA	1,7
Seda-Alen	1,9
Seda -PVA- Alen	2,6
Seda-PVA-MMT(i)	1,7
Seda-PVA-MMTB(i)	1,7
Seda-PVA-MMT-Alen(i)	1,6
Seda-PVA-MMTB-Alen(i)	1,6
Seda-PVA-MMT (d)	2,0
Seda-PVA-MMTB(d)	3,0
Seda-PVA-MMT-Alen (d)	3,4
Seda-PVA-MMTB-Alen (d)	3,0

Tabla 3. Estudio mecánico de resistencia a la compresión. Valores relativos a las propiedades mecánicas del sistema de Seda puro.

Como puede observarse en la Tabla 3 y la Figura 3 los resultados son muy variados en cuanto a al menos grupos de sistemas con propiedades diferentes. En primer lugar se observa un aumento de la resistencia, significativa en todos los casos. El agregado de PVA, un poli-alcohol podría ser explicado por la presencia de interacciones de tipo intermolecular con la seda teniendo en cuenta su naturaleza proteica, con grupos carboxílicos y grupos aminos disponibles. A su vez, el agregado de Alendronato también le confirió al sistema una mejora en sus propiedades, que con la presencia conjunta del PVA resultó en un efecto sinérgico.

Por otra parte todas las muestras que contenían alguna MMT vieron aumentada esta capacidad mecánica. Las muestras de Seda-MMT y Seda-MMTB (no mostradas en la tabla) superaron incluso a las reportadas. Sin embargo fueron descartadas por no mantener la estructura homogénea del material. Con respecto a las MMT fueron a partir de estos resultados se pudo concluir sobre el debilitamiento de la estructura cuando las arcillas son incorporadas durante la síntesis del *scaffold* respecto al método de deposición, que resguarda el proceso de ordenamiento y cristalización de la seda durante el intercambio de sus moléculas de agua con los iones Na⁺ y Cl⁻ durante el proceso de salt-leaching. Las observaciones a simple vista fueron

consistentes. Sin embargo, estos resultados hablarían de una incorporación “efectiva” de las arcillas a los sistemas en cuanto a propiedades mecánicas generadas, que no necesariamente depende de la cantidad que se pueda observar adherida a las paredes de los poros. Las imágenes de SEM llevarían a concluir que los procesos por inclusión son más efectivos en términos de cuánta arcilla queda adherida en comparación a los de deposición, pero no estaría brindando información sobre las propiedades mecánicas conferidas.

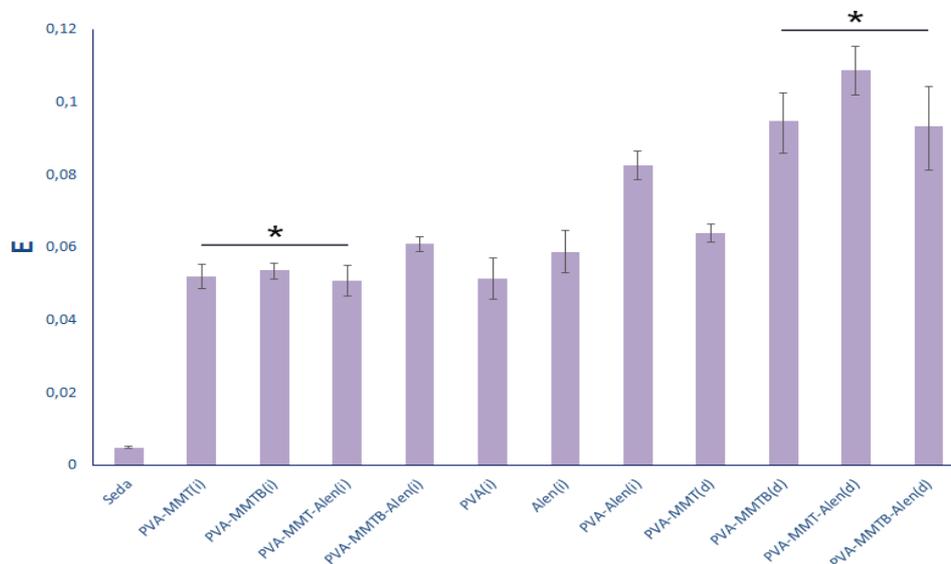


Figura 3. Estudio de resistencia a la compresión. Módulo de Young para los *scaffolds* estudiados. (*) Grupos de sistemas relacionados que no presentaron diferencias significativas entre sí ($p < 0,5$).

III.4. Análisis FT-IR

Para comenzar a explorar alguna de las posibles interacciones presentes en las matrices estudiadas se estudió una dupla de moléculas de la cual en bibliografía se conoce bastante acerca de sus interacciones y se comparó con nuestro material de estudio. La posibilidad de interacción entre el PVA y la MMT nacional (MMTB) se debe a la presunta presencia de formación de puentes de hidrógeno, que se testeó por espectroscopía FT-IR. De acuerdo a la bibliografía según lo reportado por Arredondo *et al.* en 2011, los picos característicos del PVA son a 3280 cm^{-1} (O-H estiramiento), a 2908 cm^{-1} (C-H2 estiramiento) y 1142 cm^{-1} (C=O estiramiento). Al observar el espectro obtenido en este caso podemos encontrar en $3265,89 \text{ cm}^{-1}$ el pico correspondiente al enlace O-H que se encuentra formando puentes de hidrógeno por autoasociación, en $2913,3 \text{ cm}^{-1}$ el correspondiente a la vibración simétrica del enlace C-H2 y a $1141,98 \text{ cm}^{-1}$ se visualiza el pico que corresponde al grado de cristalinidad de este polímero. (Fig. 4 inf.)

Para el espectro de la mezcla PVA-MMTB se puede visualizar el pico característico de la MMTB a 1042 cm^{-1} que corresponde a los enlaces de vibración Si-O y Si-O-Si reportados por Bukka *et al.*, 1992 en 1040 cm^{-1} . (Fig. 4 sup) En referencia a los picos de PVA antes mencionados, vemos que, por un lado, la banda que corresponde al enlace O-H se corre hacia menores números de onda con un delta de 8 cm^{-1} debido a una menor fuerza del enlace dentro del polímero, lo que indica que hay puentes de hidrógeno formándose con otra molécula, en este caso, al interactuar con la MMTB como se sugiere en el trabajo de Luo *et al.*, 2013. Por otro lado, la cristalinidad del PVA no se ve comprometida ni por un corrimiento ni por un cambio significativo en la intensidad de la banda asociada al grado de cristalinidad.

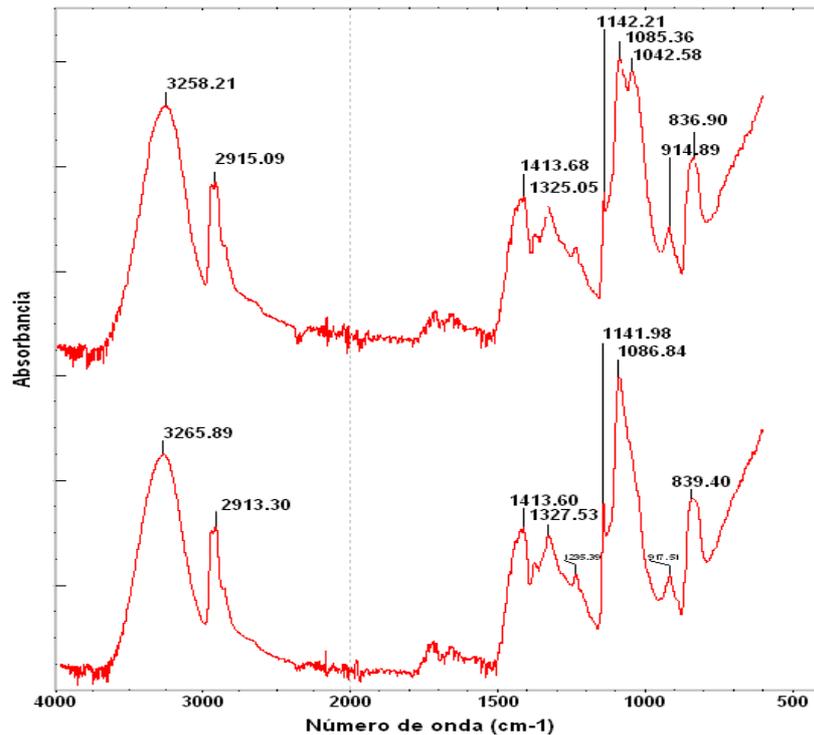


Figura 4. Análisis espectroscópico FT-IR para PVA (inferior) y PVA-MMTB (superior)

III.5. Análisis TGA y DSC

Con el objetivo de entender cómo puede influenciar la presencia de mezcla PVA-MMTB en un *scaffold* de seda, que de por sí se conoce que sus componentes suelen interactuar con la seda incrementando sus propiedades mecánicas al hacerla más resistente y elástica como se ha reportado en Kharlampieva *et al.* en 2010 para el caso de las MMT y Li *et al.* en 2001 para el caso de PVA, se procedió a evaluar el comportamiento térmico del material híbrido Seda-PVA-MMTB en función de análisis de TGA y de DSC.

En la Figura 5 se observan los termogramas y sus derivadas para el PVA puro y la mezcla PVA-MMTB. Es sabido que las moléculas de PVA de acuerdo a su PM y su grado de hidratación presentan perfiles característicos cuando se las analiza con este tipo de técnicas. En especial, el PVA 61kDa y 98% de hidratación reportado en bibliografía presenta un perfil que se condice con el hallado en este trabajo. [Barrera *et al.* 2007] La primera región se corresponde a la pérdida de agua por evaporación, seguida de otra región que comienza luego de los 200 °C debida a la pérdida de moléculas de agua internas a la molécula, lo que implica el comienzo de su degradación. Finalmente se encontró una región que inicia aproximadamente a los 400°C y que se debe al rompimiento de la cadena principal de PVA.

Al observar esta curva perteneciente al PVA, se pueden apreciar bien estas distintas regiones, en dónde en la primera se pierde un 7,3% del peso debido a la evaporación del agua, luego un 77,5% debido a la degradación de las cadenas laterales y sus subproductos en 321,7°C (según DTG) y, por último, a 443,65°C (según DTG) un 12,2% debido a la ruptura de la cadena principal de PVA.

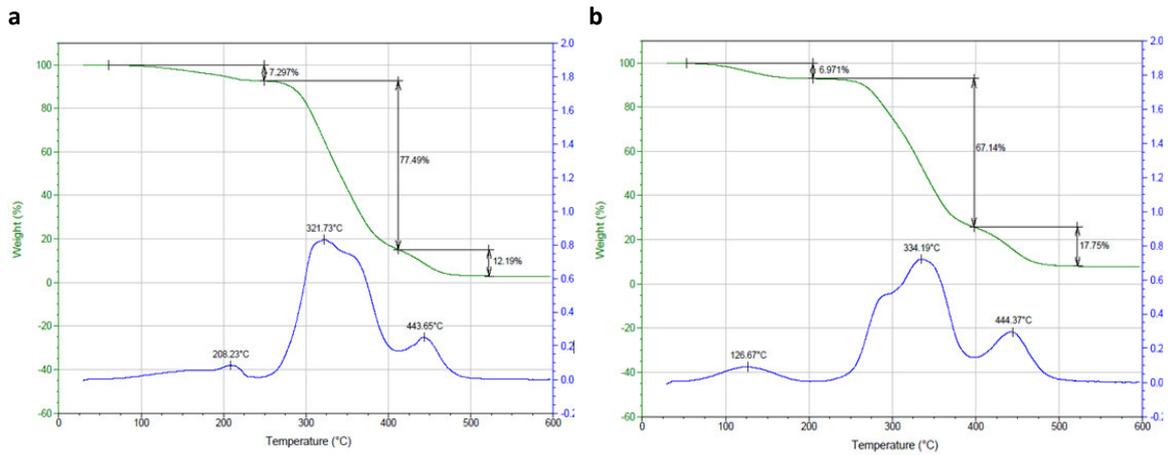


Figura 5. Análisis de TGA (verde) y DTA (azul) para a. PVA y b. PVA-MMTB.

Si analizamos el segundo espectro se pueden observar datos similares a los reportados en el mismo trabajo citado, pero para un compuesto de PVA y otra Montmorillonita. Una primera región entre 80-100°C correspondiente a la evaporación del agua, una segunda región entre 350-390°C en donde se produce la degradación de las cadenas laterales del polímero PVA-MMTB, y una tercera región debida a la escisión de la cadena principal del mismo. Aquí se observa un incremento en el pico de la región de los 300°C, que de 321°C para el PVA puro se incrementó en 13°C para la mezcla, indicando un aumento en la cristalinidad del PVA por interacción con la MMT que le permitiría un ordenamiento durante el proceso de nucleación. Además se puede observar que el principal evento de degradación genera una pérdida de masa alrededor de un 10% menos del compuesto frente al PVA puro, y se da a una temperatura sensiblemente mayor, dejando en claro así la mayor estabilidad térmica del compuesto, en consonancia con los resultados de FTIR que se discutieron previamente (consultar también para más detalle de los espectros el ANEXO IV) y los análisis de DSC (Figura 6 a y b), que presentan corrimientos de la temperatura máxima y la de transición (Figura 6 a y b curvas derivadas), debido a las interacciones formadas entre ambos compuestos.

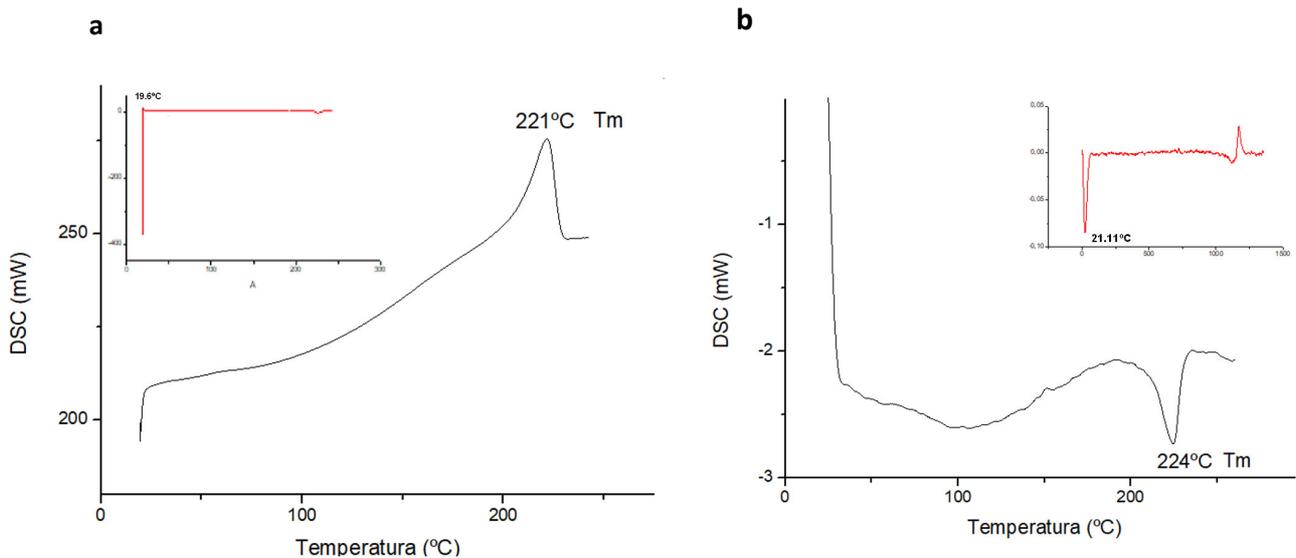


Figura 6. Análisis de DSC para a. PVA y b. Silk-PVA-MMTB (curvas negras) y su derivada (curvas rojas)

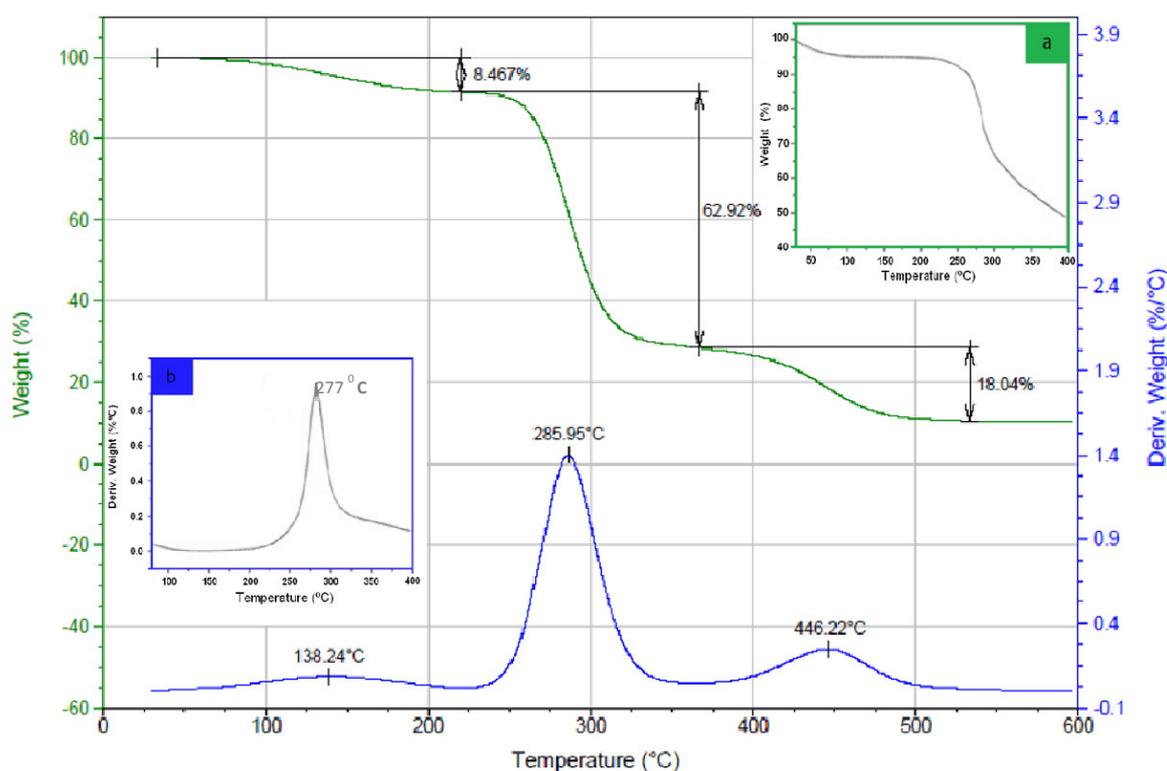


Figura 7. Análisis de TGA (verde) y DTA (azul) para **inset**. Seda pura y **b**. Seda-PVA-MMTB.

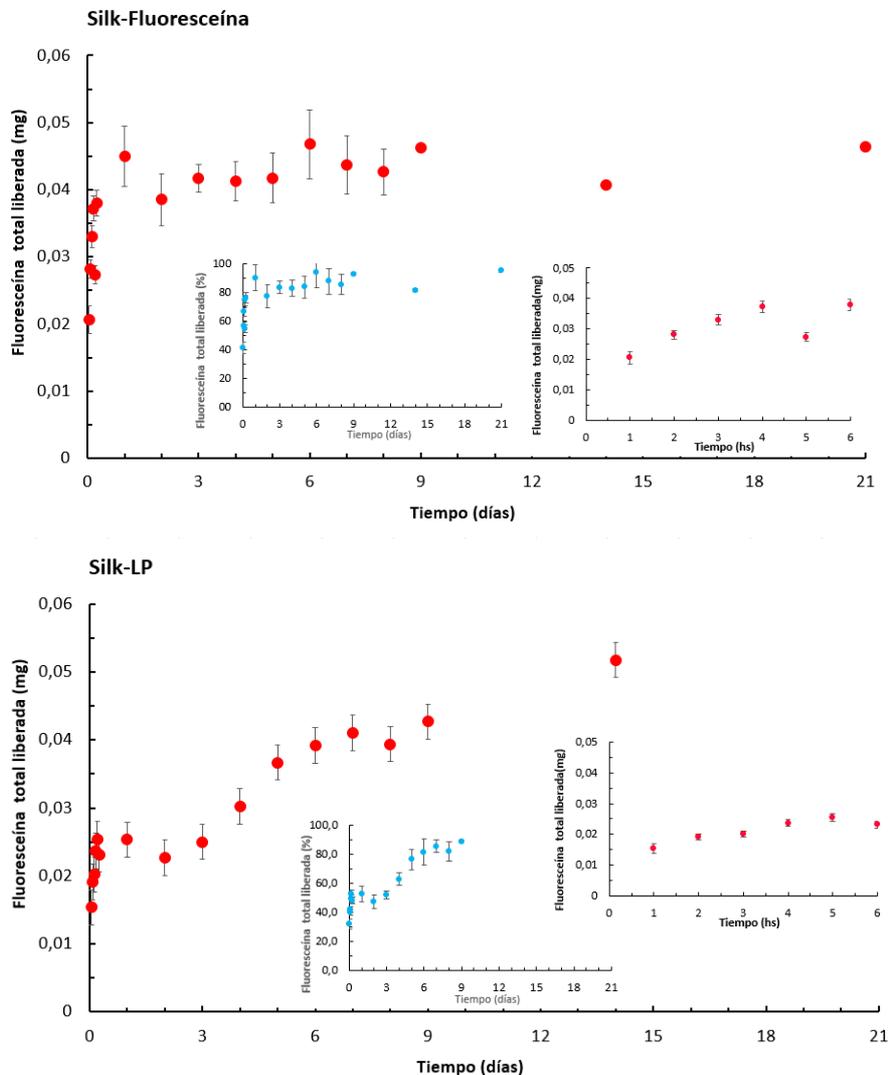
Por último, el análisis termogravimétrico del *scaffold* híbrido Seda-PVA-MMTB mostró un corrimiento en el pico máximo de la seda cuando se encuentra en presencia de la mezcla. (Figura 7) La descomposición de la seda sola luego del tratamiento de digestión para su obtención (seda 20MB) se da a 277 °C, mientras que en la muestra al ser mayoritaria en masa se ve claramente su corrimiento hasta casi 286°C con un delta de 9°C, aunque la temperatura de degradación del PVA haya disminuido, su presencia junto a la MMTB permitió el aumento en la estabilidad del *scaffold* híbrido.

III.6. Estudios cinéticos de liberación de fluoresceína desde liposomas deformables incorporados a la matriz de los *scaffolds* híbridos sintetizados

Finalmente se hizo un relevamiento de todos los sistemas seleccionados para evaluar la capacidad de cargar y liberar con diferentes perfiles cinéticos pequeñas moléculas que puedan servir luego para el desarrollo de un *scaffold* activo con funciones de regeneración ósea, en donde la molécula cargo pueda ejercer su efecto para el propio *scaffold* y para su entorno en los procesos de reclutado, adhesión, diferenciación, crecimiento y migración celular de los linajes asociados al crecimiento de hueso, así como en los procesos de mineralización y remodelado óseo. En este sentido se procedió a estudiar la cinética de carga de una molécula modelo que se pueda trazar fácilmente: la fluoresceína. (Ver ANEXO I) A su vez se ensayaron sistemas lipídicos (LP) de carga que sean capaces o bien de ir liberando al principio activo, o bien presentar la capacidad de deformarse para difundir a través de la matriz híbrida del

scaffold. Para esto se cargaron los LP con fluoresceína y luego se incorporaron a los *scaffolds* durante su síntesis. (Véase M&M y ANEXO III para ensayos de carga y estabilidad de los transportadores liposomales). Las liberaciones se hicieron en tubos falcons contra solución fisiológica, a 37°C, y bajo agitación circular tomando muestras a distintos tiempos hasta un tiempo final de 3 semanas y calculando las masas acumuladas y los porcentajes liberados en el tiempo. (Figuras 8 y 9)

Comenzando por los sistemas más simples (Fig. 8) se pudo observar que respecto de la carga con fluoresceína libre, la seda con liposomas cargados con la fluoresceína presentaron un perfil totalmente distinto si se comparan las curvas de liberación durante las primeras horas, en donde el sistema liposomal retarda claramente la salida de la molécula cargo. Sin embargo, los valores finales liberados no difieren mucho a partir de los 7 días aproximadamente: 95% liberado desde el sistema liposoma frente a un 100% de la fluoresceína no encapsulada.



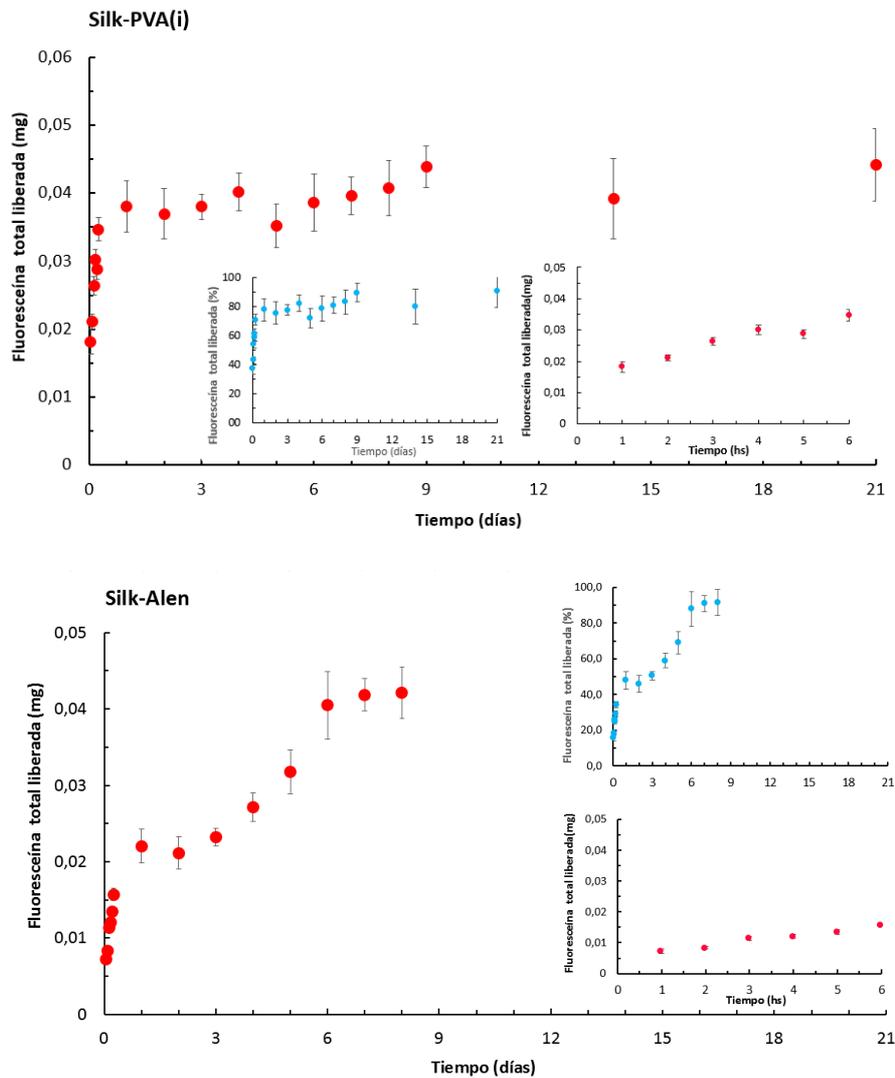
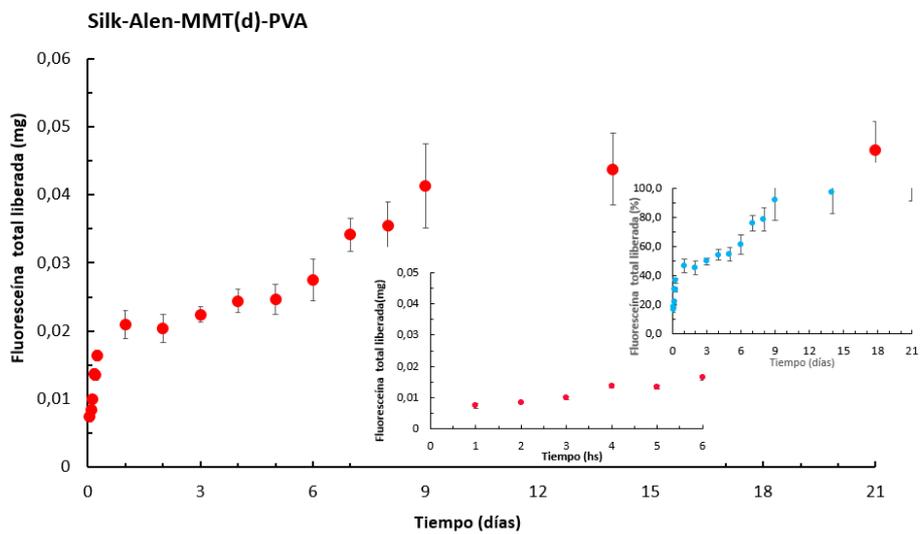
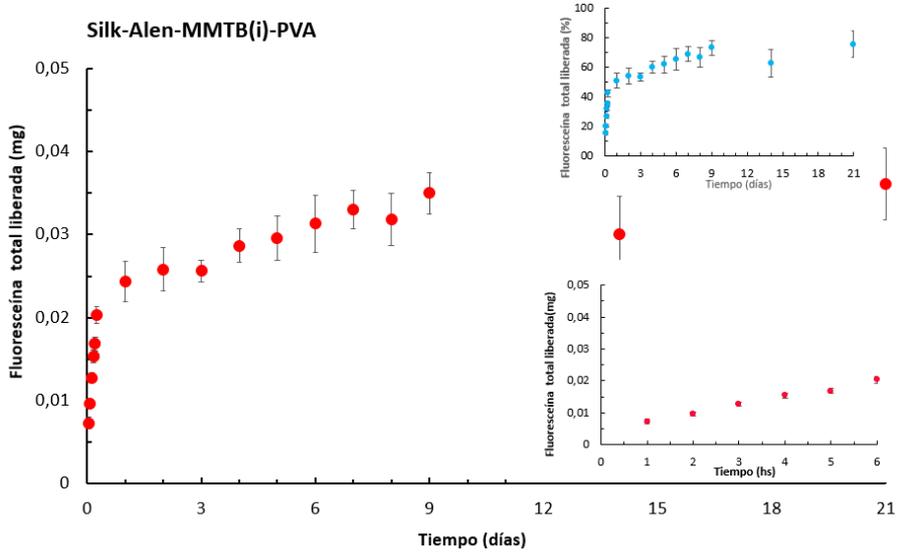
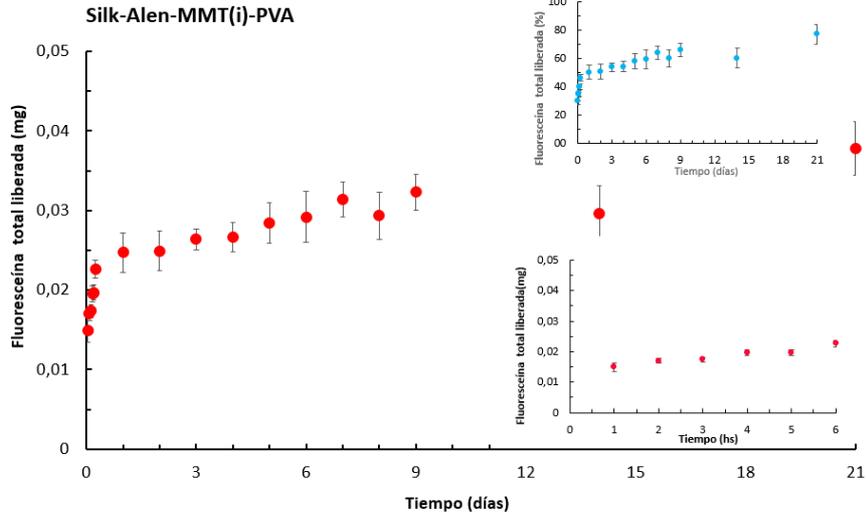


Figura 8 . Sistemas de liberación para fluoresceína. De arriba hacia abajo: fluoresceína libre desde un *scaffold* de seda; o encapsulada en liposomas incorporados a *scaffolds* de: Seda; Seda-PVA; y Seda-PVA-Alen.

A su vez, el agregado de PVA al sistema liposomal permitió un enlentecimiento en la liberación: libera 5% menos a los 7 días y recordemos además un aumento en las propiedades mecánicas. En comparación con el PVA, el Alendronato que también se observó que modificaba las propiedades mecánicas del *scaffold*, acertó los tiempos aún más. Finalmente, en este primer grupo de sistemas observamos que la presencia sinérgica en el caso de evaluar propiedades mecánicas de la PVA-Alen con la seda no se relaciona con los perfiles de liberación. En el sistema Seda-PVA-Alen, la liberación total es casi como la de fluoresceína libre de los sistemas puros, y la carga inicial es significativamente menor (52% frente a casi el 80% en el caso del PVA solo).



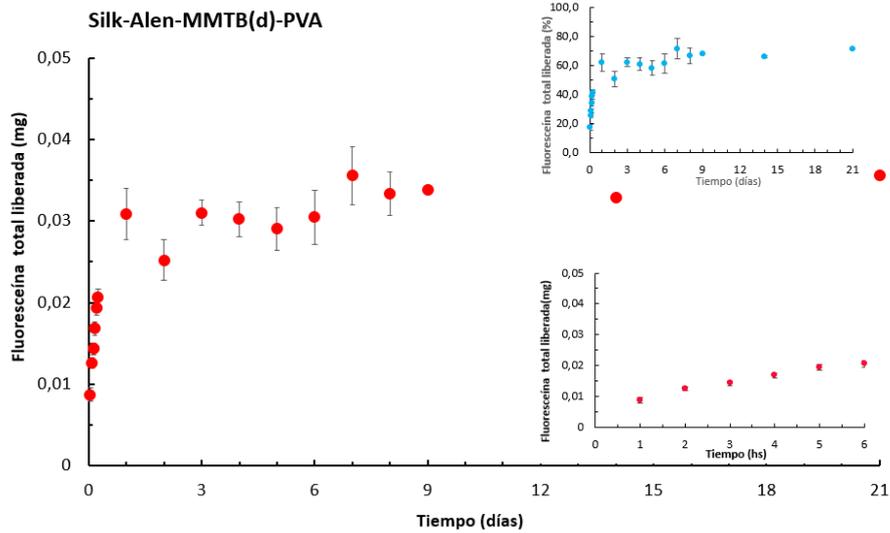


Figura 9. Sistemas de liberación para fluoresceína encapsulada en liposomas incorporados a *scaffolds*. De arriba hacia abajo, *scaffolds* de: Seda-PVA-MMT-Alen(i); Seda-PVA-MMTB-Alen(i); Seda-PVA-MMT-Alen(d); y Seda-PVA-MMTB-Alen(d).

En el segundo grupo de muestras, por el agregado del antiresortivo Alendronato a las mezclas de Seda-PVA-MMT, es decir en los sistemas que podrían tener función anti-resortiva y osteogénica, a la vez que alta resistencia por la presencia de las MMT y PVA, se pudo observar que los perfiles de liberación varían entre ellos para los 2 tipos de MMT (Fig. 9) Por otro lado, los porcentajes totales de liberación al día 7 fueron menores que para la seda pura en todos los casos: 64 y 69 % para la MMT y MMTB respectivamente, por lo que estos sistemas podrían resultar interesantes para ensayar con moléculas de actividad específica para la regeneración de tejido óseo.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO IV – CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

En este trabajo exploratorio se pudieron evaluar algunas características de sistemas híbridos a base de seda por el agregado de moléculas con funciones específicas en la regeneración de tejido óseo y, a la vez de interés para el refuerzo mecánico del material de base.

En particular se observó que una montmorillonita nacional confiere propiedades de resistencia mecánica a la vez que retarda los perfiles de liberación de una molécula modelo desde el seno de las matrices híbridas. Por otro lado, gracias a técnicas analíticas se pudo inferir sobre qué tipo de interacciones se puedan estar dando entre el polivinilalcohol y la Montmorillonita nacional que sean responsables de los resultados cinéticos y mecánicos observados. Por último, todos los sistemas ensayados mostraron sistemas híbridos con un comportamiento optimizado en cuanto a las propiedades mecánicas de la seda pura, así como en los perfiles de liberación. Las diferencias encontradas en los estudios cinéticos sugiere una potencial herramienta que la formulación de diferentes combinaciones del híbrido implica: el posible manipuleo de los perfiles de liberación de acuerdo a la composición de la matriz.

Así, mediante una primera exploración sobre la posibilidad de utilizar un recurso natural y nacional para la ingeniería de tejido óseo como son las arcillas del tipo de las Montmorillonitas, se obtuvo un relevamiento de diferentes combinaciones en relación a otras moléculas interesantes para trabajar con la seda en este campo, como es el polivinilalcohol en cuanto a sus propiedades mecánicas y reológicas y el bifosfonato Alendronato en relación a su función en la regeneración ósea. A partir de estos estudios surgieron varios interrogantes que proponen ser estudiados a medida que se vayan evaluando distintas características del material, al ensayar nuevas formulaciones y entender más acerca de las interacciones químicas entre los componentes. Se plantea además necesaria e interesante la exploración de estas matrices con principios activos definidos, relacionados a la reparación del tejido óseo, y su respuesta en modelos *in vitro* e *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

Bellino M. G., Regazzoni A. E. Coating liposomes with yttrium basic carbonate: Making hybrid nanocapsules. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009, 333 (2), 812-815.

Bosio V. E., Brown J., Rodriguez M. J., Kaplan D. L. Biodegradable porous silk microtubes for tissue vascularization. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5, 1227-1235.

Botana A., Mollo M., Eisenberg P., Torres Sanchez R. M. Effect of modified montmorillonite on biodegradable PHB nanocomposites. *Applied Clay Science*, 2010, 47 (3-4), 263 – 270.

Brown C. P., Rosei F., Traversa E., Licocchia S. Spider silk as a load bearing biomaterial: tailoring mechanical properties via structural modifications. *Nanoscale*, 2011, 3, 870-876.

Brüel A., Chistensen E.I., Tranum-Jensen J., Qvortrup K., Geneser F. *Histología*. 4ta Edición. Editorial Panamericana 2014.

Costa-Júnior E. S., Pereira, M. M., Mansur, H. S. Propertis and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2009, 20 (2), 553-561.

Correia C., Bhumiratana S., Yan L. P., Oliveira A. L., Gimble J. M., Rockwood D., Kaplan D. L., Sousa R. A., Reis R. L., Vunjak-Novakovic G. Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomaterialia*, 2012, 8 (7), 2483-2492.

Dang Q., Lu S., Yu S., Sun P., Yhuan Z. Silk Fibroin/Montmorillonite Nanocomposites: Effect of pH on the Conformational Transition and Clay Dispersion. *Biomacromolecules* 2010, 11 (7), 1796–1801

Diab T., Pritchard E. M., Uhrig B. A., Boerckel J. D., Kaplan D. L., Guldberg R. E. A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012, 11, 123-131.

Ding Z. Z., Ma J., He W., Ge Z. L., Lu Q., Kaplan D. L. Simulation of ECM with Silk and Chitosan Nanocomposite Materials. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5 (24), 4789-4796.

dos Santos Ferreira D., Alves Boratto F., Nascimento Cardoso V., Serakides R., Odília Fernandes S., Miranda Ferreira L. A., Oliveira M. C. Alendronate-coated long-circulating liposomes containing technetium-ceftizoxime used to identify osteomyelitis. *International Journal of Medicine*, 2015, 10, 2441-2450.

Fazil M., Baboota S., Sahni J. K., Ameeruzzafar, Ali J. Bisphosphonates: therapeutics potential and recent advances in drug delivery. *Drug Delivery*, 2015, 22 (1), 1-9.

Gong T., Xie J., Liao J., Zhang T., Lin S., Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Research*, 2015, 3 (15029), 1-7.

Henkel J., Woodruff M. A., Epari D. R., Steck R., Glatt V., Dickinson I. C., Choong P. F. M., Schuetz M. A., Hutmacher D. W. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – A 21st Century Perspective. *Bone Research*, 2013, 1 (3), 216-248.

Hirabayashi H., Fujisaki J. Bone-Specific Drug Delivery Systems. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003, 42 (15), 1319-1330.

Lanza R, Langer R, Vacanti J.P. *Principles of tissue engineering*. 4th ed.. San Diego: Elsevier Academic Press; 2013.

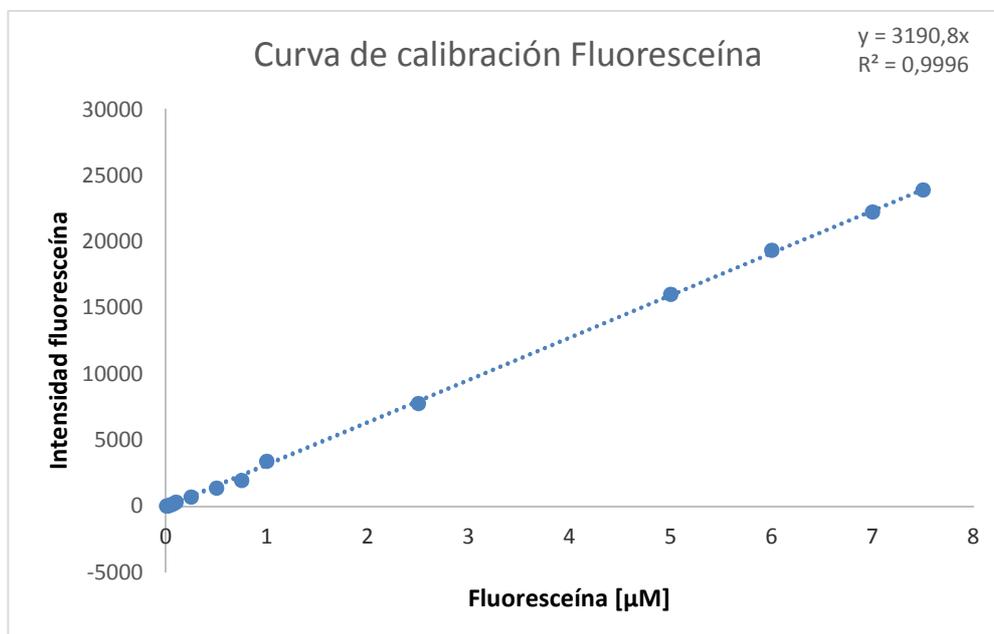
Lombardi B., Baschini M., Torres Sánchez R. M. Bentonite deposits of Northern Patagonia. *Applied Clay Science*, 2013, 22, 309-312.

Mandal B. B., Grinberg A., Gil E. S., Panilaitis B., Kaplan D. L. High strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (20), 7699-7704.

- Martinez, Y.N., Piñuel, L., Castro, G.R., Breccia, J.D. Polyvinyl alcohol-pectin cryogel films for controlled release of enrofloxacin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012, 167 (5), 1421-9.
- Mieszawska A. J., Gallego Llamas J., Vaiana C. A., Kadakia M. P., Naik R. R., Kaplan D. L. Clay enriched silk biomaterials for bone formation. *Acta Biomaterialia*, 2011, 7 (8), 3036–3041.
- NHI. National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center. Publication No. 15–7920, Mayo 2015a.
- NHI. National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center. Publication No. 15–AR–8004, Mayo 2015b.
- NHI. National Institutes of Health Osteoporosis and Related Bone Diseases National Resource Center. Publication No. 15–AR–8004, Junio 2015c.
- O'Brien F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials today*, 2011, 14 (3), 88-95.
- OSG. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Diseases of Bone Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004a.
- OSG. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. The Frequency of Bone Disease Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004b.
- OSG. Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. The Burden of Bone Disease Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004c.
- Ortiz López A., Gómez Fernández J. C. Separación de solutos no encapsulados en liposomas. Comparación de la filtración en gel con la centrifugación en minicolumnas de gel. *Anales de Veterinaria (Murcia)*, 1987, 2, 27-32.
- Rockwood D. N., Preda R. C., Yucel T., Wang X., Lovett M. L., Kaplan D. L. Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols*, 2011, 6, 1612–1631.
- Tamada Y. New process to form a Silk Fibroin Porous 3-D Structure. *Biomacromolecules*, 2005, 6 (6), 3100-3106.
- Vepari C., Kaplan D.L. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, 2007, 32 (8-9), 991–1007.
- Wang Y., Kim H. J., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D. L. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*, 2006, 27 (36), 6064-6082.
- Wu J., Chen D. Controlled drug release from encapsulated nanometer liposomes using high intensity focused ultrasound. *Proceedings of 20th International Congress on Acoustics, ICA 2010*.
- Xu Q., Tanaka Y., Czernuszka J. T. Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes. *Biomaterials*, 2007, 28 (16), 2687-2694.
- Yin Z., Kuang D., Wang S., Zheng Z., Yadavalli V. K., Lu S. Swellable silk fibroin microneedles for transdermal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, versión online: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.178>.
- Yucel T., Lovett M. L., Kaplan D. L. Silk-Based Biomaterials for Sustained Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 2014, 190, 381-397.

ANEXO I

Curva de calibración, carga y liberación de fluoresceína



El límite de detección encontrado fue dentro del rango: 0,0075 – 7,5 μM

Como se menciona en materiales y métodos, se toman 0,1 ml de la solución de LP con fluoresceína para centrifugarlos con una columna con Sephadex 50 y a lo obtenido se lo trata con Triton X-100 de manera de disolver las membranas y obtener la fluoresceína encapsulada en estos. Así, midiendo la fluorescencia de esta muestra y usando la curva de calibración, se puede obtener la masa de fluoresceína dentro de los LP en el volumen de 0,1 mL.

Se encontró una eficiencia de encapsulamiento (EE) para la Fluoresceína en los sistemas liposomales del 26,3% de la masa inicial.

ANEXO II

Ensayos de compresión mecánica. Cálculo del Módulo de Young

Con el objetivo de caracterizar de una manera sencilla alguna de las propiedades mecánicas de los scaffolds obtenidos y observar comparativamente sus respuestas frente a la seda pura, se procedió a analizar un aspecto del comportamiento viscoelástico de la seda como polímero proteico. Para esto se caracterizó a los sistemas de acuerdo a su resistencia a la compresión mediante el módulo de pseudoelasticidad (pseudo módulo de Young). Este parámetro fue calculado al ejercer esfuerzos de compresión bajos sobre el material para obtener deformaciones menores al 10%, región en la cual se pudo analizar su comportamiento según las ecuaciones clásicas de elasticidad. Para esto se realizaron las siguientes suposiciones.^[Brown et al. 2014; Bosio et al. 2017; Yin et al. 2017]

- Las deformaciones son pequeñas
- Los módulos son constantes
- Las deformaciones son independientes de la velocidad de carga o historia y son inmediatamente reversibles.
- El material es isotrópico
- El material se comporta del mismo modo en tensión y compresión.

Scaffold	L inicial (mm)	ΔL prom (mm)	A = ($\pi \cdot r^2$) (mm ²)	ΔP (N)	E	DESVEST
Seda	7,780	7,780	19,635	0,098	0,00499109	0,0001
PVA-MMT(i)	6,932	0,665	19,635	0,098	0,05206654	0,0033
PVA-MMTB(i)	7,897	0,738	19,635	0,098	0,05340734	0,0021
PVA-MMT-PVA(i)	6,672	0,653	19,635	0,098	0,05095721	0,0042
PVA-MMTB-PVA(i)	8,154	0,668	19,635	0,098	0,06096978	0,0020
PVA(i)	9,225	0,894	19,635	0,098	0,05153081	0,0057
Alen(i)	9,241	0,784	19,635	0,098	0,05886744	0,0059
PVA-Alen(i)	9,521	0,575	19,635	0,098	0,08264373	0,0039
PVA-MMT(d)	9,333	0,729	19,635	0,098	0,06389824	0,0025
PVA-MMTB(d)	9,316	0,503	19,635	0,098	0,0924393	0,0081
PVA-MMT-PVA(d)	8,718	0,403	19,635	0,098	0,10797097	0,0034
PVA-MMTB-PVA(d)	8,136	0,438	19,635	0,098	0,09271116	0,0114

E' : Módulo de Young' (módulo de pseudo-elasticidad)

ΔP : Diferencia de fuerza aplicada al scaffold

L: Altura inicial del scaffold

ΔL : Diferencia de alturas del scaffold (entre deformaciones)

A: Área transversal a la aplicación de la P

$$E' = \frac{\Delta P \cdot L}{A \cdot \Delta L}$$

ANEXO III

Ensayos de estabilidad de los sistemas transportadores de fluoresceína:

Caracterización y estabilidad de liposomas con fluoresceína por DLS y Potencial Z

Dinamic Light Scattering (Dispersión dinámica de luz) es una técnica para medir el tamaño de partículas sumergidas en un líquido en la región del sub micrón. Se basa en un láser que provee una fuente de luz para iluminar la muestra contenida en una celda, un atenuador para ajustar la cantidad de luz que llegue a esta y un detector que medirá la luz dispersada por la muestra, la cual se procesará y nos dará información sobre el tamaño medio de partículas, como así también la polidispersión, dando una idea de la homogeneidad de la muestra y su estabilidad en el tiempo.

A su vez, el análisis de Potencial Z determina la carga de nanopartículas en solución (coloides). Estas tienen una carga superficial que atrae iones de carga opuesta a su superficie, formando una fina capa. Esta doble capa de iones viaja con la partícula mientras difunde a través de la solución. El potencial eléctrico en el límite de la doble capa es conocido como potencial Z, y su magnitud es predictiva de la estabilidad coloidal.

Mediciones de diámetro aparente (D_{app}) y carga superficial como Potencial Z de los sistemas liposomales:

Días	0	5	13	21
D_{app}	$176,6 \pm 1,5$	$179,1 \pm 1,6$	$179,8 \pm 2,2$	$178,5 \pm 2,3$
Polidisp	$0,267 \pm 0,009$	$0,262 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,005$	$0,281 \pm 0,007$

LP con fluoresceína

Días	0	5	13	21
D_{app}	$200,2 \pm 2,3$	$206,8 \pm 2,1$	$212 \pm 3,4$	$208,3 \pm 2,4$
Polidisp	$0,294 \pm 0,006$	$0,316 \pm 0,005$	$0,291 \pm 0,006$	$0,323 \pm 0,007$

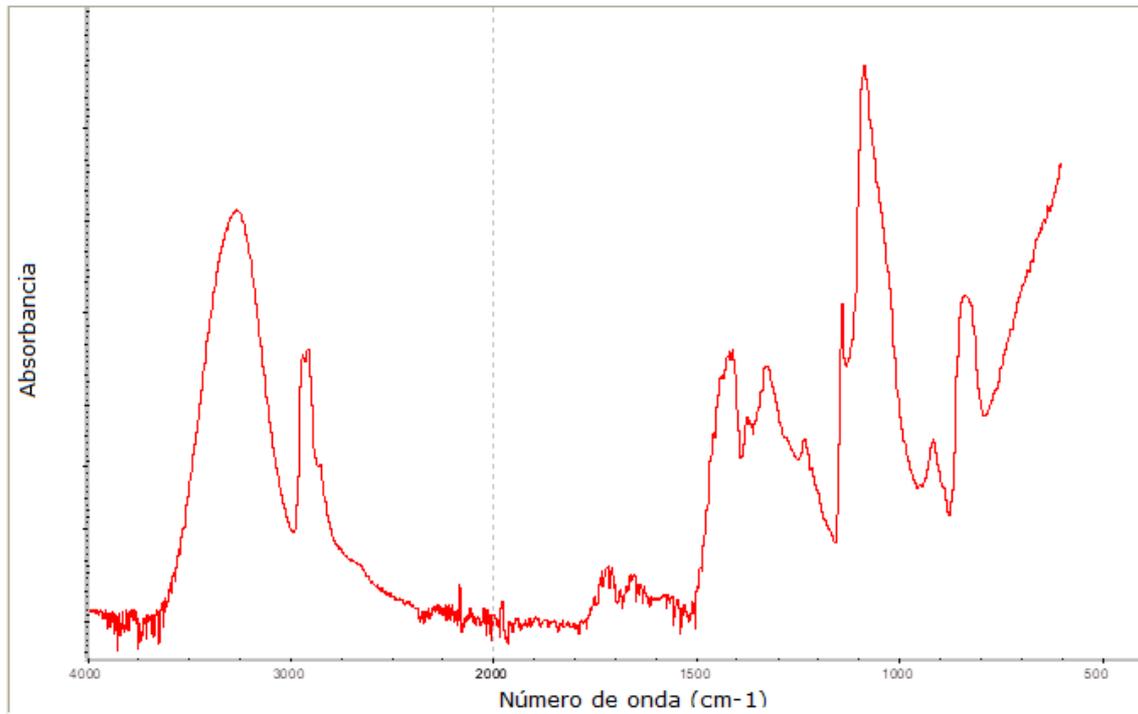
LP vacíos

A partir de los valores de diámetro aparente (D_{app}) y carga superficial (Pot Z) medios sobre las muestras de liposomas a través del tiempo con la molécula cargo (fluoresceína) y sin cargar se puede observar que no se produjeron cambios significativos ni en las cargas superficiales ni en el tamaño de los mismos, lo que habla de su estabilidad frente a procesos de almacenado de al menos hasta tres semanas.

ANEXO IV

Espectros FTIR de PVA (a) y PVA-MMT (b)

a.



b.

