



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**Estudios de biocompatibilidad de
polímeros sintéticos y su aplicación
en Ingeniería de tejido óseo.**

Lic. en Bioquímica Fernández Juan Manuel

Directora: Dra. Cortizo Ana María
Co-Directora: Dra. Cortizo María Susana

2011

El presente trabajo desarrollado bajo la Dirección de la Dra. Ana M. Cortizo y la Codirección de la Dra. M. Susana Cortizo, en el GIOMM (Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral) y en el Grupo Macromoléculas del INIFTA, constituye la Tesis Doctoral que elevo a consideración de las autoridades correspondientes, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

La Plata, noviembre de 2011.

Resumen de Tesis Doctoral.

El tejido óseo es el único capaz de repararse por sí mismo sin dejar cicatrices. Sin embargo, existen algunas afecciones, como las grandes fracturas o las osteonecrosis, en las que el tejido óseo no puede repararse. A lo largo de la historia de la humanidad, se han diseñado distintas estrategias para reparar el hueso dañado. Las terapias usadas en la actualidad, como los injertos o implantes, tienen varias desventajas, como la baja disponibilidad de donadores de injertos, problemas de osteointegración de implantes y los grandes costos en el sistema de salud. Para subsanar estos problemas nace *Ingeniería de Tejido Óseo (ITO)*. El objetivo de esta disciplina es obtener sustitutos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido.

Para lograr tal objetivo, la ITO utiliza principios de varias disciplinas, como la Ingeniería, la Biología y la Medicina.

El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar diversas matrices (utilizando polímeros sintéticos e hidroxiapatita) para fabricar implantes que ayuden en la reparación del tejido óseo.

Para cumplir con tales objetivos, se desarrollaron y caracterizaron membranas de los polímeros poli- ϵ -caprolactona (PCL) y poli fumarato de di-isopropilo (PFIP). Además, se preparó una membrana a partir de la mezcla de ambos polímeros. Esta mezcla de homopolímeros fue estabilizada mediante aplicación de ultrasonido, para obtener un mejor material. Dicha mezcla mostró tener una buena biocompatibilidad respecto a las membranas de ambos homopolímeros.

La hidroxiapatita (HAP) fue obtenida a partir de la incineración de hueso bovino en nuestro laboratorio. Se obtuvo una HAP con

1% de impureza en carbonato de calcio.

La incorporación de esta HAP a las membranas de los polímeros mejoró significativamente tanto las propiedades mecánicas como la biocompatibilidad, utilizando para su evaluación dos tipos de células osteoblásticas: MC3T3E1 y UMR 106.

Mediante ensayos *in vitro* utilizando células de macrófagos (RAW 264.7) se demostró que las membranas con y sin HAP no son

tóxicas durante los tiempos estudiados.

Finalmente, se prepararon membranas porosas de la mezcla compatibilizada, utilizando un equipo de *electrospray*. El material poroso ha mejorado sustancialmente la biocompatibilidad respecto de la membrana no porosa.

Todos estos resultados demuestran que los materiales obtenidos y estudiados podrían ser aplicados en la reparación de tejido óseo.

A mis padres,
por sus grandes esfuerzos en mi educación y crianza y por tanto cariño.

A Naty,
por su *incalculable* paciencia y amor
e *incondicional y constante* apoyo.

A Juan Santino Fernández,
por mostrarme otra forma de *vivir la vida*.

"Hasta mi último aliento siempre estarás en mis recuerdos..."
Rubén D Sequera

Esta Tesis Doctoral es el resultado de varios años de constante trabajo y estudio, en los cuales he encontrado gente de grandes valores que me han brindado su apoyo, compañía y conocimiento. Por esto, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todos los que, de alguna forma u otra, me han ayudado a llevar a cabo mi trabajo.

En primer lugar, a la *Dra. Ana Cortizo* y a la *Dra. Susana Cortizo* (Directora y Co-Directora de mi tesis, respectivamente) no solo por ser las guías de esta tesis, y abrirme las puertas de sus grupos de trabajo, brindandome la oportunidad de crecer, sino también por sus constantes palabras de apoyo.

Agradezco también a: *Fernando Amarilla, Carla Berghoff, Marcos Coustet, Juan Giussi, Tamara Oberti, Magali Pasqualone, Adolfo Pesce* del Grupo Macromoléculas del INIFTA y a *Verónica Arnol, Gimena Correa, Sara Chuguransky, Virginia Gangoiti, Juan Ignacio Felice, Antonio McCarthy, Silvina Molinuevo, Maria L. Sbaraglini y Maria J. Tolosa* del GIOMM de la facultad de Cs. Exactas. Todos ellos han sido grandes compañeros y de cada uno he aprendido algo.

A la *Dra. Monica Mele*, por permitirme usar el microscopio de fluorescencia.

Al *Dr. Javier Amalvi* y al *Dr. Pablo Peruzzo*, por ayudarme a realizar las pruebas de PFIP y WCA.

A la facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P, por brindarme un espacio.

A todo el personal del INIFTA.

A los compañeros de la cátedra de Bioquímica Patológica de la carrera Lic. en Bioquímica de la Facultad de Cs. Exactas, U.N.L.P.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Agencia) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por financiar mis estudios.

“Muchas veces al día me doy cuenta de la gran cantidad de mi vida interior y exterior que se construyen con base en el trabajo de mis colegas tanto de los vivos como de los muertos, y de que tan intensamente debo esforzarme para poder devolverles lo mucho que he recibido”

Albert Einstein

Índice.

<u>Capítulo 1: Introducción</u>	1
1.-Tejido Óseo	2
1.1.-Introducción	2
1.2.-Composición	2
1.2.1.-Componentes Inorgánicos	3
1.2.2.-Componentes Orgánicos	3
1.2.3.-Células Óseas	6
1.2.3.1.-Células Mesenquimáticas	6
1.2.3.2.-Osteoblastos	7
1.2.3.3.-Osteocitos	8
1.2.3.4.-Osteoclastos	8
1.3.-Organización Ósea	9
1.4.-Embriología Ósea	12
1.4.1.-Osificación Intramembranosa	12
1.4.2.-Osificación Endocondreal	12
1.5.-Remodelado Óseo	15
1.6.-Modelado Óseo	20
1.7.-Reparación ósea	20
2.-Ingeniería de Tejido Óseo	22
2.1.-Introducción	22
2.2.-Terapias actuales	23
2.2.1.-Metales y Cerámicas	23
2.2.2.-Injertos	23
2.3.-Epidemiología	25
2.4.-Ingeniería de Tejido Óseo	27
2.4.1.- Matriz tridimensional (3D)	29
2.4.1.1.-Requisitos	29
2.4.1.1.1.-Biocompatibilidad	29
2.4.1.1.2.-Porosidad	30
2.4.1.1.3.-Tamaño de poro	30
2.4.1.1.4.-Biodegradabilidad	30
2.4.1.1.5.-Propiedades Mecánicas	31
2.4.1.1.6.-Osteoinducción	32
2.4.1.1.7.-Factibilidad	32
2.4.1.2.-Materiales	32
2.4.1.2.1.-Cerámicas	32
2.4.1.2.2.-Vidrios bioactivos	33

2.4.1.2.3.-Polímeros	33
2.4.1.2.4.- Composites	34
2.4.1.3.-Células	34
2.4.1.4.-Factores de crecimiento	35
Capítulo 2: Hipótesis y Objetivo	41
1.-Hipótesis	42
2.-Objetivo	42
Capítulo 3: Materiales y Métodos	44
1.-Matrices poliméricas	45
1.1.-Materiales	45
1.2.-Obtención de PFIP	45
1.3.-Obtención de la Mezcla PCL-PFIP compatibilizada	46
1.3.1.-Obtencion de membranas porosas	46
1.4.-Obtención de Hidroxiapatita	47
1.5.-Modificación de las partículas de Hidroxiapatita	48
1.6.-Preparación de las películas de polímero	48
1.7.-Evaluación de la distribución de las HAP en las Matrices poliméricas	49
2.-Estudios <i>in Vitro</i>	49
2.1.-Cultivo Celular	49
2.1.1.-MC3T3-E1 (ATCC CRL 2593)	50
2.1.2.-UMR-106 (ATCC CRL 1661)	50
2.1.3.-RAW 264.7 (ATCC TIB-71)	50
2.2.-Adhesión y Proliferación	51
2.3.-Actividad de la enzima Fosfatasa Alcalina (ALP)	52
2.4.-Produccion de Colágeno tipo 1 (COL t1)	52
2.5.-Producción de proteínas totales	53
2.6.-Diferenciación de las células MC3T3-E1	53
2.6.1.-Expresión de RUNX-2	54
2.7.-Inmunofluorescencia para fibras de Actina	55
2.8.-Producción de Oxido Nítrico (NO)	55
2.9.-Producción de Citoquinas	56
3.-Degradación	57
4.-Propiedades Mecánicas	58
5.-Tensión Superficial	59
6.-Análisis Estadístico	60
7.-Equipamiento	60
Capítulo 4: Resultados	62
1.-Obtención de las membranas PCL y PFIP	63
1.1.-Caracterización	63

1.2.-Biocompatibilidad	65
1.2.1.-Adhesión y Proliferación	65
1.2.1.1.-Células UMR-106	65
1.2.1.2.-Células MC3T3-E1	67
2.-Obtención de Mezcla Compatibilizada	68
2.1.-Degradación de los Homopolímeros y de la Mezcla	69
2.2.-Caracterización	72
2.2.1.-Microscopia electrónica	72
2.2.2.-Pruebas Mecánicas	73
2.2.3.-Hidrofobicidad/Hidrofilicidad	75
2.3.-Biocompatibilidad	75
2.3.1.-Adhesión y Proliferación	75
2.3.1.1.-Células UMR-106	76
2.3.1.2.-Células MC3T3-E1	78
2.3.2.-Inmunofluorescencia	79
2.3.3.-Marcadores de diferenciación osteoblástica	81
3.-Obtención de Hidroxiapatita	83
3.1.-Caracterización	84
3.2.-Disminución de tamaños de partículas de Hidroxiapatita	85
4.-Obtención de películas con Hidroxiapatita	87
4.1.-Caracterización	87
4.1.1.-Microscopia Electrónica	87
4.1.2.-Pruebas Mecánica	90
4.1.3.- Hidrofobicidad/Hidrofilicidad	91
4.2.- Biocompatibilidad	92
4.2.1.-Adhesión y Proliferación	92
4.2.1.1.-Células UMR-106	92
4.2.1.2.-Células MC3T3-E1	95
4.2.2-Marcadores osteoblástica	97
4.3.-Degradación	99
5.-Ensayos de Citotoxicidad	101
5.1.-Producción de Oxido Nítrico (NO)	101
5.2.-Producción de Citoquinas	102
6.-Membranas Porosas	103
6.1.-Caracterización	103
6.2.-Estudios <i>in vitro</i>	104
Capítulo 5: Discusiones	108
Capítulo 6: Conclusiones	124
Capitulo 7: Bibliografía	128

Capítulo 1

Introducción

“En el campo de la observación, la oportunidad sólo favorece a la mente preparada...”
Louis Pasteur

Capítulo 1: Introducción.

1. Tejido Óseo

1.1.- Introducción:

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado que forma el esqueleto¹. Este sirve al cuerpo con varios propósitos, entre ellos el *de soporte*, otorgándole una estructura rígida a los músculos; el *de movimiento*, la inserción de los músculos a los huesos por medio de los tendones permite los movimientos; el *de protección*, pues el esqueleto forma cavidades protegiendo a distintos órganos internos y el *de homeostasis mineral*, pues los huesos sirven como depósito de minerales, fundamentalmente de Ca y P [Duplomb, 2007].

El tejido óseo está sujeto constantemente al remodelado

desde su desarrollo. Esta característica le otorga la propiedad de ser el único tejido capaz de repararse a sí mismo sin dejar cicatrices.

1.2.- Composición:

El hueso está compuesto por diversas células y por una matriz extracelular, cuyos principales componentes son Colágeno tipo I, Hidroxiapatita y agua [Rizzoli, 2010]. A pesar de que la composición del hueso depende de varios factores (edad, variabilidad genética, efectos ambientales y localización del hueso en el esqueleto), en promedio (Figura 1) dos tercios de sus componentes corresponden a la fase mineral y el resto a la fase orgánica y agua.

¹ Esqueleto: deriva del griego que significa “seco”, debido a que históricamente se creía que el hueso era un tejido estático, nada más alejado de la realidad!

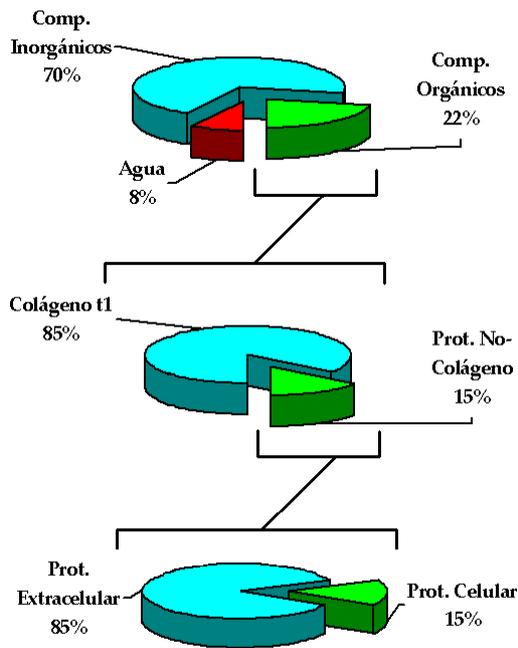


Figura 1: Composición Ósea. Adaptado de Rizzoli, 2010.

1.2.1.- Componentes

Inorgánicos:

El componente inorgánico, constituyente mayoritario del hueso, está compuesto en un 95 % por cristales de una apatita análoga de la Hidroxiapatita geológica (HAP, $(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2\text{Ca}_{10}$). Esta apatita ósea es una hidroxiapatita deficiente en calcio e hidróxido conteniendo además un 5 % de impurezas como sodio, potasio, estroncio, fluoruros, citratos, carbonatos, pirofosfatos y cloruros, entre otras [Bigi, 1997; Boskey, 2006; Holden, 1995; Loong, 2000]. Estos cristales, producidos

por los osteoblastos, y tienen un tamaño aproximado de 30 nm, y conforman una red cristalina imperfecta, favoreciendo la adsorción de iones y su disolución por los osteoclastos. Se depositan entre las fibras de colágeno, otorgándole rigidez al hueso.

1.2.2.- Componentes

Orgánicos:

El mayor de los componentes orgánicos en el hueso es el colágeno tipo 1. Sintetizado por los osteoblastos, esta proteína le confiere al hueso resistencia a la tracción, elasticidad y flexibilidad.

Además, ofrece un sitio adecuado para la nucleación y el crecimiento de los cristales de HAP [Rho, 1998; Landis, 1993, Cooper, 1998]. Si bien existen varios tipos de colágeno, un 95 % del colágeno óseo es del tipo I mientras que el 5 % restante corresponde al tipo V.

Las moléculas de colágeno están compuestas por una triple hélice de aproximadamente 1.5 nm de diámetro con giro hacia la

derecha, integrada por tres cadenas polipeptídicas llamadas cadenas α .

Cada cadena α está compuesta por una estructura característica repetitiva a lo largo de la cadena de tres aminoácidos, "glicina-X-Y", donde X e Y son mayormente prolina e hidroxiprolina, respectivamente [Rho, 1998].

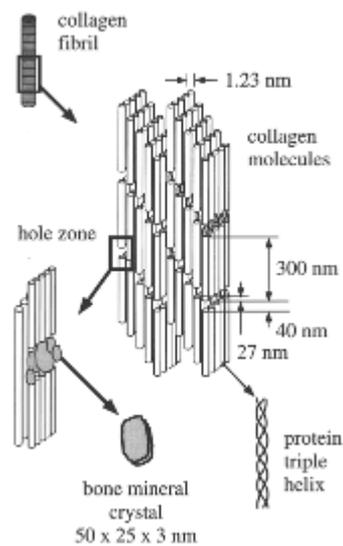


Figura 2 Esquema de ensamble del Colágeno t I y HAP [adaptado de Rho, 1998]

Además del colágeno tI y de la HAP, otras proteínas no colágenas forman la matriz extracelular ósea (Tabla 1), como: los Proteoglicanos, la osteocalcina (OCN), la osteonectina, la osteopontina, la

sialoproteínas, la fibronectina, la trombospondina, la vitronectina y factores de crecimiento [Clarke, 2008; Cooper, 1998; Fernández-Tresguerres, 2006; Gundberg, 2003; Reddi, 1997; Salgado, 2004,].

Proteína (Cromosoma)		Función
Colágeno	tipo I (17q21.23, 7q22.1)	La proteína más abundante en la matriz extracelular ósea.
	tipo X (6q21)	Encontrada en cartílago hipertrófico.
	tipo III (2q31)	Pequeñas cantidades en los huesos, puede regular el diámetro del colágeno fibrilar.
	tipo V (9q34.2-34.3; 2q24.3-31; 19q13.2)	Pequeñas cantidades en los huesos, puede regular el diámetro del colágeno fibrilar.
Proteínas de suero en la matriz ósea (4q11-13)		Decrease el crecimiento de cristales de HAP
Proteínas que contienen Glicaminoglicano y proteínas que contienen regiones ricas en leucina	Agrecano (15q26.1)	Organización de la matriz; retención de calcio y fósforo.
	Versicano (5q14.3)	Define el espacio destinado a convertirse en huesos.
	Decorina (12q21.3)	Regula el diámetro de las fibras de colágeno; unión a TGF- β .
	Biglicano (Xq28)	Unión a colágeno, unión a TGF- β ; determinante genético de masa ósea máxima.
	Hialuronano (complejo multigenico)	Puede trabajar con Versicano en definir el espacio destinado a la formación ósea.
Glicoproteínas	Fosfatasa alcalina (1p36.1-p34)	Hidroliza inhibidores de la deposición de minerales.
	Osteonectina (5q31.3-32)	Regula el diámetro de las fibras de colágeno.
Proteínas SIBLING	Osteopontina (4q21)	Inhibe la mineralización y el remodelado óseo.
	Sialoproteína ósea (4q21)	Inicia la mineralización.
MEPE (4q21.1)		Regulador del metabolismo del fósforo.
Glicoproteínas conteniendo RGD-	Trombospondinas (15q15, 6q27, 1q21, 5q13, 19p13.1)	Adhesión celular.
	Fibronectina (2q34)	Unión a células.
	Vitronectina (17q11)	Adhesión celular.
	Fibrilina 1 and 2 (15q21.1, 5q23-31)	Regula la formación de fibras elásticas.
Proteínas que contienen γ -Carboxy ácido glutámico	Proteína de matriz Gla (12p13.1-p12.3)	Inhibe mineralización.
	Osteocalcina (1q25-q31)	Regulador del osteoclasto; inhibe mineralización.
	Proteína S (3p11.2)	Producto del hígado, puede ser realizada por los osteoblastos.

Tabla 1: principales proteínas constituyentes del matiz extracelular óseo y sus funciones.
Adaptado de Clarke, 2008.

1.2.3.- Células Óseas:

Las células implicadas en el metabolismo óseo son: *Células Mesenquimales*, diferenciándose a *Osteoblastos*, siendo estas últimas las células responsables de la formación de tejido óseo, *Osteocitos* y *Osteoclastos* (proveniente de la línea monocítica) encargados de la reabsorción ósea.

1.2.3.1.- Células

Mesenquimáticas:

Constituyen un tipo de stem cells o también llamadas células progenitoras o troncales. Toda célula troncal se define por sus características funcionales, que son: indiferenciación, auto-mantenimiento, producción de progenies indiferenciadas y

regeneración de tejido [Morrison, 2006].

Las células mesenquimales (MSC: mesenchymal stem cells), se pueden diferenciar en distintos linajes [Aubin, 1998; Potier, 2010; Yin, 2006] celulares como ser los osteoblastos, condroblastos, adipocitos, miocitos y cardiomiocitos (figura 3).

El factor de transcripción Cbfa1/Runx-2 es un factor específico para la diferenciación a osteoblastos [Komori, 2002], que aumentan la expresión de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), colágeno I (COL1), osteopontina (OPN), osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) y la calcificación de la matriz extracelular [Potier, 2010].

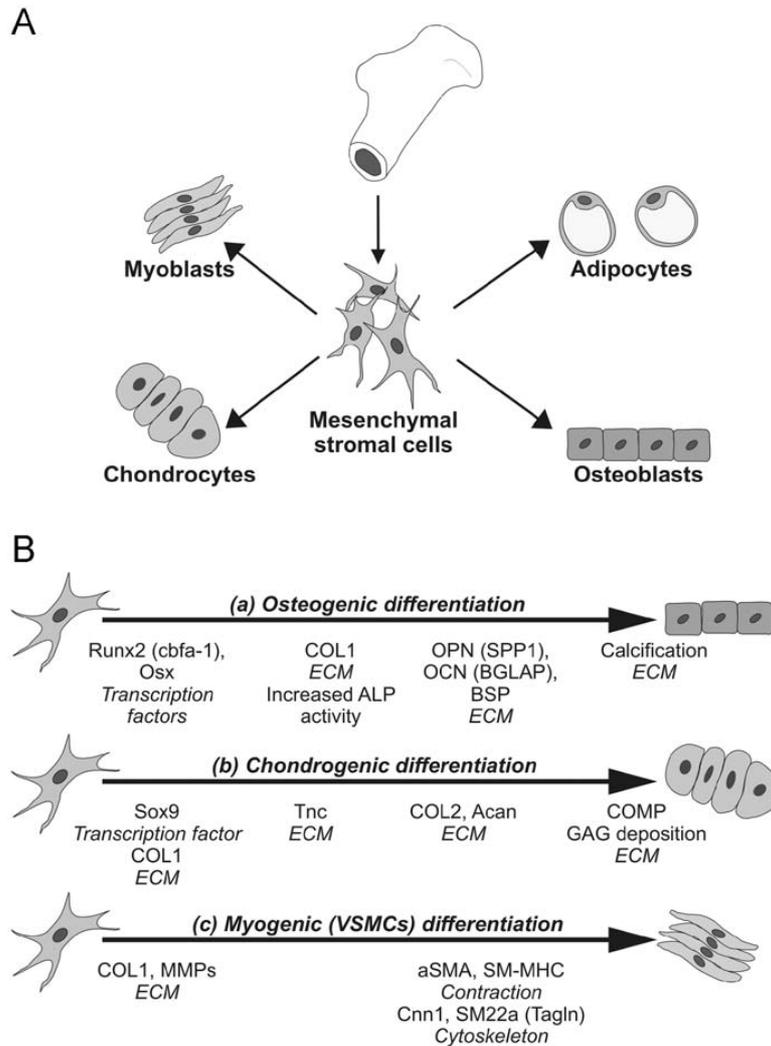


Figura 3: [A] potenciales linajes de células en las cuales puede diferenciarse las células stem cells mesenquimales. [B] principales cascadas de señales involucradas en los distintos potenciales linajes celulares. [Adaptado de Potier, 2010].

1.2.3.2.- Osteoblastos:

Los Osteoblastos son células que se encuentran en la superficie del tejido óseo, cuya función es formar tejido óseo produciendo colágeno tipo I y luego calcificarlo [Anderson, 2005]. Se producen a partir de la diferenciación de las MSCs, tienen un tamaño promedio

de 25 μm de diámetro y una forma poliédrica. Poseen un citoplasma altamente basófilo debido a la alta producción de ARN, un retículo endoplasmático extenso y un aparato de Golgi muy desarrollado, como evidencia de su gran actividad sintética [Duplomb, 2007; Bielby, 2007].

Muestran además, gran actividad de la enzima fosfatasa alcalina en la membrana citoplasmática. Esta enzima desempeña un rol clave en la mineralización del hueso [Clarke, 2005; Orimo, 2010].

1.2.3.3.- Osteocitos:

Luego de la formación de hueso, entre un 10% y un 20% de los osteoblastos quedan alojados en el seno del hueso y se diferencian paulatinamente en Osteocitos [Duplomb, 2007; Franz-Odendaal, 2006].

Los Osteocitos son las células más abundantes del tejido óseo. Su población puede llegar al 90% del total de los constituyentes celulares [Bozal, 2006; Bonewald, 2008]. Ubicados en las lagunas osteocíticas, estos son algo más alargados que los osteoblastos, con un núcleo más grande y con el retículo endoplasmático algo menos desarrollado. Su citoplasma continúa siendo basófilo, además tienen prolongaciones

citoplasmáticas. Estas prolongaciones se introducen en canalículos del hueso y mantienen contacto con otros osteocitos y con los osteoblastos vecinos, formando una red celular y permitiendo una comunicación entre células del seno del hueso y las que se encuentran en la superficie [Bonewald, 2008]. La nutrición de estas células depende de las conexiones entre ellas a través de los canalículos

Los osteocitos pueden censar cambios mecánicos y traducirlos en señales bioquímicas que actúan sobre el hueso. De esta forma la red de osteocitos puede direccionar la remodelación ósea y reparar microfracturas [Burr, 2002; Bonewald, 2006].

1.2.3.4.- Osteoclastos:

Los Osteoclastos son las únicas células conocidas capaces de degradar el hueso. Se originan gracias a la fusión de monocitos que han debido abandonar la sangre circulante, y por lo tanto derivan de las células madres hematopoyéticas

y no de las mesenquimales. Estas células poseen varias características citológicas como ser: gran número de mitocondrias y lisosomas, son multinucleadas, y están altamente polarizadas. Ellas disuelven los cristales de HAP y digieren la matriz orgánica a partir de la secreción de diversas enzimas, entre las cuales las más importantes son las proteasas, cuya función es degradar y reabsorber el hueso [Duplomb, 2007].

1.3.- Organización Ósea

El hueso se puede clasificar según varios puntos de vista. Uno de ellos es su grado de madurez, distinguiéndose el hueso *Fibrilar* del *Laminar*. El hueso fibrilar es aquel hueso inmaduro que se encuentra en los embriones y recién nacidos, en los callos formados en el período de reparación de las fracturas y en las metafisis en crecimiento. Este tipo de hueso se caracteriza por su gran número de células por volumen y por poseer fibras gruesas y no orientadas de colágeno TI, que

le confiere una isotropía mecánica al tejido. En cambio, el hueso laminar se crea sobre el fibrilar, siendo más maduro que el anterior, formándose a partir del proceso de remodelación del hueso inmaduro. Este tipo de hueso se encuentra en todo el esqueleto maduro tanto en el esponjoso como en el cortical. Todas sus fibras de colágeno se encuentran organizadas y orientadas con el eje mayor del hueso. Esto le otorga una anisotropía mecánica al tejido que muestra una resistencia a la deformación cuando la dirección de la fuerza es paralela al eje mayor del hueso que cuando se ejerce de otra forma.

Según su estructura, el hueso se puede clasificar en esponjoso (o trabecular) y compacto (o cortical) (figura 4). Estos tipos óseos se encuentran en una proporción 1:4 trabecular:cortical, aunque distintos huesos o distintas porciones de un mismo hueso, pueden poseer distintas relaciones [Clarke, 2008].

El hueso trabecular, posee una estructura altamente porosa con una porosidad variable entre 50 y 90 % con sus poros interconectados. El hueso compacto o cortical es más

denso que el trabecular, con una porosidad promedio de 5 % y se encuentra en la superficie de los huesos, variando su espesor según su localización.

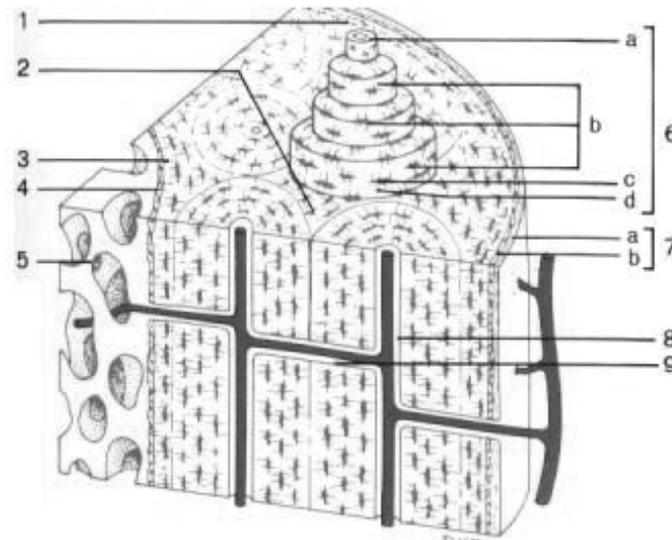


Figura 4: Esquema de corte longitudinal de un hueso, mostrando sus componentes. 1. Lamina circunferencial externa, 2. Lámina intersticial, 3. Lámina circunferencial interna, 4. Endostio, 5. Trabéculas del hueso esponjoso, 6. Sistema de Havers (a. Canal central, b. Lamina, c. Laguna del Osteocito, Canalículos), 7. Periostio (a. Capa fibrosa externa, b. Capa osteogénica interna), 8. Vasos sanguíneos y recubrimiento endostico del canal de Havers, 9. Conducto de Volkman. [Adaptado de Yokochi, 1991].

El hueso esponjoso consiste en una serie de trabéculas formadas por placas y varillas entre las cuales queda contenida la médula ósea. El hueso cortical está compuesto por una disposición paralela al eje mayor del hueso de estructuras cilíndricas llamadas osteonas o

Sistema de Havers. Las paredes de este sistema están formadas por láminas concéntricas (figuras 4 y 5).

El hueso cortical está limitado en su superficie externa, por periostio y en su superficie interior por endostio. La actividad celular en la superficie del periostio es

importante para el crecimiento aposicional y la reparación de fracturas. La superficie del endostio tiene una actividad de remodelación mayor que la superficie perióstica, probablemente debido a una mayor exposición a citoquinas por la proximidad de la médula ósea [Clarke, 2008].

Más allá de la clasificación según la estructura macromolecular, a la estructura ósea se le puede

adjudicar para su estudio una organización jerárquica [Meyers, 2008; Rho, 1998; Liebschner, 2003] cuyo nivel más alto (figura 5) es el hueso-órgano. Este se da como resultante de las sumatoria de los niveles constituyentes inferiores, obteniendo así, un hueso funcional, articulando con otros huesos. Los cambios de estructura en este nivel son mínimos, produciéndose la remodelación ósea en los niveles inferiores.

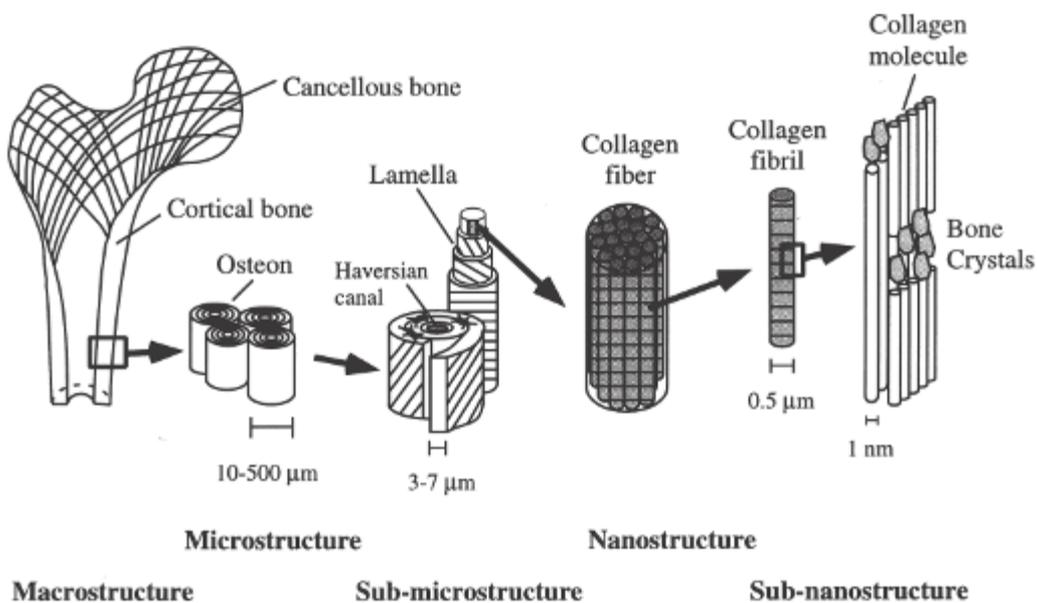


Figura 5: niveles jerárquicos de la estructura ósea [adaptado de Rho, 1998].

La figura 5 muestra una representación esquemática de los constituyentes del tejido óseo, abarcando desde una escala sub-

nanoscópica hasta una macroscópica. En ella se pueden observar la organización y los niveles jerárquicos de su estructura.

Cada nivel depende de los niveles inferiores para contribuir a la arquitectura final de cada hueso.

1.4.- Embriología Ósea:

No todos los huesos del esqueleto humano poseen un origen embrionario común. Hay dos formas de osificación², ellas son osificación intramembranosa y endocondral [Franz-Odendaal, 2006; Shapiro, 2008].

1.4.1.- Osificación

Intramembranosa:

La osificación intramembranosa da lugar a los huesos planos del cráneo, a parte de la mandíbula inferior y a partes de las clavículas. Este tipo de osificación se origina en membranas mesenquimáticas [Franz-Odendaal, 2006; Ornitz, 2002; Morriss-Kay, 2001; Shapiro, 2008].

Las células mesenquimáticas en estas membranas se diferencian a osteoblastos, luego elaboran matriz extracelular, que posteriormente

² Osificación: proceso de formación ósea.

mineralizan (Figura 6). Durante el crecimiento, el hueso membranoso crece por un fenómeno llamado crecimiento aposicional, el cual consta de depósito por medio de osteoblastos de nuevas capas de hueso en la superficie externa, mientras los osteoclastos absorben las capas internas [Morriss-Kay, 2001; Ornitz, 2002].

1.4.2.- Osificación

Endocondreal:

Este tipo de osificación da lugar a la formación de la mayoría de los huesos del cuerpo (huesos cortos y largos, columna vertebral y huesos de la base del cráneo) [Teixeira, 2008]. Si bien estos huesos comienzan en la membrana mesenquimática, en lugar de osificarse, la mesénquima pasa a un estadio intermedio el cual produce un cartílago hialino a partir de la diferenciación de las células mesenquimales en Condrocitos³ [Kanczler, 2008; Olsen, 2000; Ortega,

³ Condrocitos: células derivadas de células mesenquimales capaces de generar tejido cartilaginoso.

2004; Shapiro, 2008; Shum, 2002; Teixeira, 2008] formando así, un molde cartilaginoso del futuro hueso. En el centro del molde se hipertrofian los condrocitos y comienza a calcificarse la matriz, en tanto factores angiogénicos como el VEGF (vascular endothelial growth factor) inducen la formación de vasos sanguíneos en el pericondrio.

Con estos vasos vienen los osteoblastos, osteoclastos y células hematopoyéticas, dando lugar a centros de osificación primaria. Dentro de estos centros, la matriz de cartílago se degrada, los condrocitos entran en apoptosis y los osteoblastos reemplazan la matriz cartilaginosa por hueso trabecular, dando espacio también a la formación de médula ósea.

Al mismo tiempo, los osteoblastos forman un collar de hueso compacto en el pericondrio, alrededor de la parte media del cartílago, quedando localizado dentro de un tubo de hueso, el centro primario de osificación.

En los extremos del cartílago se forman los centros de osificación secundaria entre epífisis y diáfisis⁴, constituido por una placa de crecimiento formada por cartílago. En ellos se da una secuencia coordinada de proliferación de condrocitos, hipertrofia y apoptosis, que resulta en un crecimiento longitudinal del hueso (Figura 7). Estos procesos se encuentran coordinados con el crecimiento de las epífisis y el ensanchamiento de las diáfisis. [Kanczler, 2008; Olsen, 2000; Ornitz, 2002; Ortega, 2004; Shapiro, 2008; Shum, 2002; Teixeira, 2008; Villemure, 2009].

⁴ Diáfisis: zona media de los huesos largos.
Epífisis: extremos de los huesos largos.
Metáfisis: zona intermedia entre la diáfisis y la epífisis.

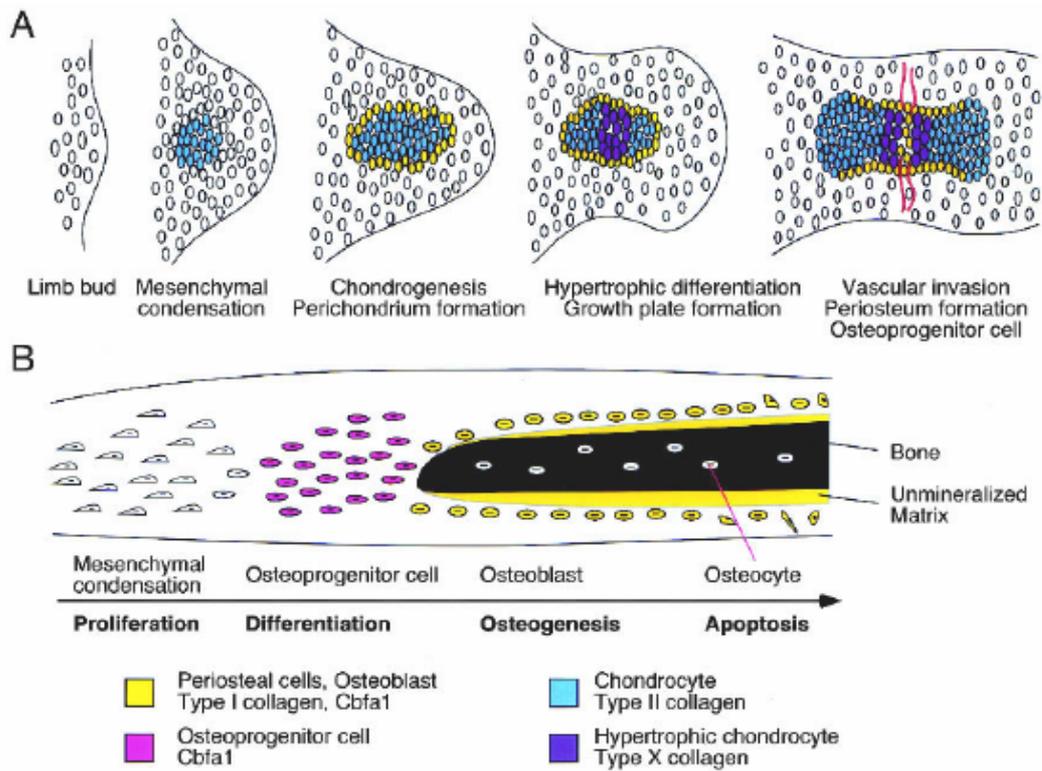


Figura 6: Esquema del desarrollo óseo endocondreal (A) e intramembranosa (B).

[Adaptado de Ornitz, 2002].

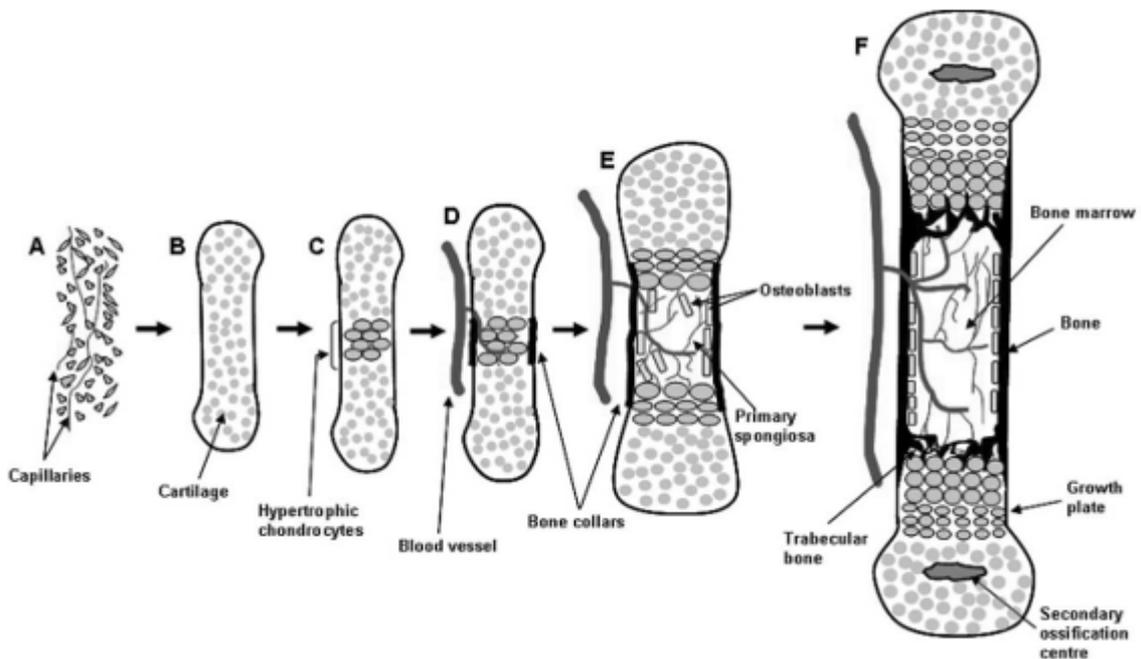


Figura 7: esquema de desarrollo endocondral mostrando centros de osificación secundaria, platos de crecimiento, collar óseo. [Adaptado de Kanczler, 2008]

1.5.- Remodelado óseo:

El remodelado óseo es un proceso que se lleva a cabo en todos los huesos del organismo a lo largo de toda la vida, demostrando que el tejido está muy lejos de ser un tejido estático.

Los principales objetivos del proceso son mantener la fortaleza ósea y la homeostasis mineral. En el remodelado óseo se reabsorben

pequeñas porciones óseas debido a la actividad osteoclástica, luego se deposita matriz extracelular, que posteriormente se mineraliza debido a la actividad osteoblástica (figura 8). En el proceso final, durante la remodelación se reabsorbe hueso viejo y luego se forma hueso nuevo. El proceso puede reparar microfracturas, evitando su acumulación [Lerner, 2006].

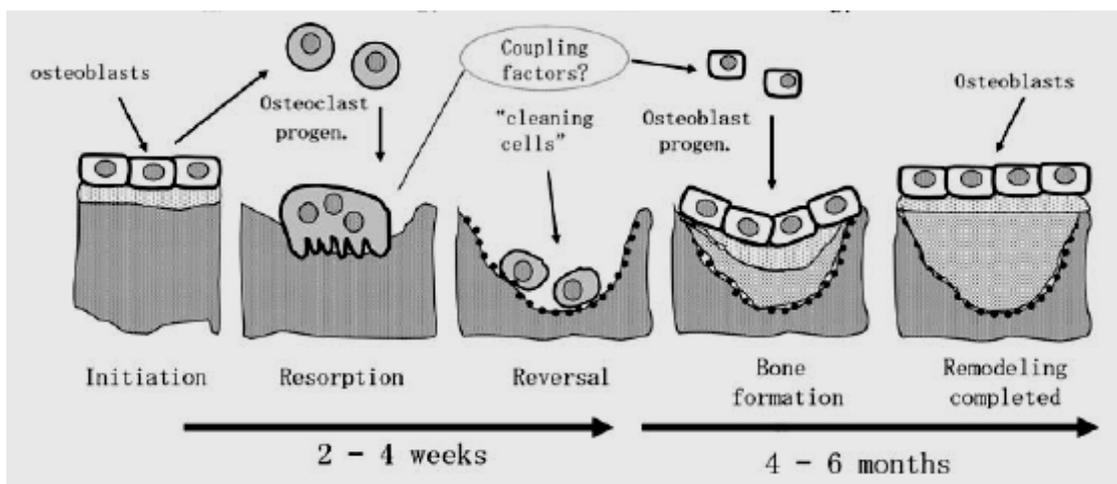


Figura 8: Esquema de la remodelación ósea. [Adaptado de Lerner, 2006]

Cada proceso puntual de remodelado se lleva a cabo por ciclos secuenciales de activación osteoclástica-osteoblástica, formando una Unidad Multicelular Básica (Basic Multicellular Unit:

BMU) [Bain, 1993; Clarke, 2008; Krane, 2005].

La primera fase consta de reclutamiento y activación (figura 9) de los precursores mononucleares

de la circulación para formar osteoclastos [Feng, 2011; Lian, 2006].

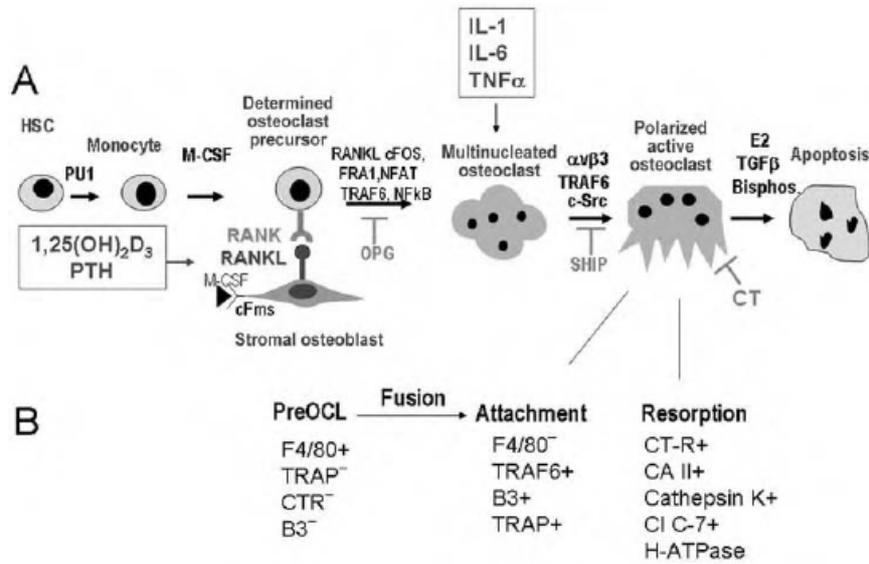


Figura 9: Regulación de la Osteoclastogénesis. A. Estados de progresión de la diferenciación osteoclástica mediada por distintos factores. B. Marcadores usados para determinar fenotipo del linaje osteoclástico. [Adaptado de Lian, 2006]

Los osteoclastos llegan a la superficie del hueso, uniéndose mediante la receptores de integrina a proteínas de la matriz que contienen la secuencia RGD (arginina, glicina, ac. aspártico), formando una zona sellada entre el hueso y el osteoclasto. Esta etapa dura alrededor de 3 semanas en cada ciclo de remodelado [Clarke, 2003; Feng, 2011; Zernicke, 2006].

Como se ve en las figuras 9 y 10, varios factores regulan la actividad de los osteoclastos, tomando un rol central el RANKL (Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand) y la OPG (Osteoprotegerina), ambos producidos por los osteoblastos [Bain, 1993; Boyce, 2008; Clarke 2008; Gallagher, 2010; Lerner, 2006; Martin, 1998].

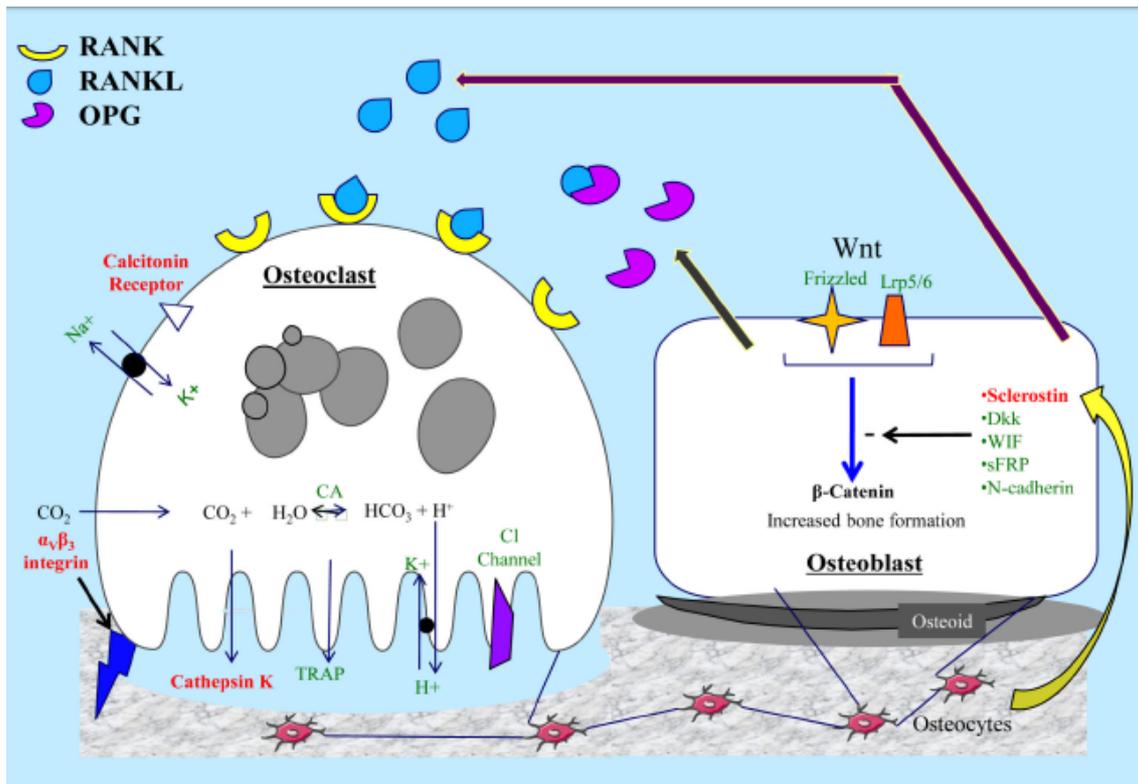


Figura 10: Interacción osteocitos, osteoclastos, osteoblastos en la remodelación ósea. CA (Anhidrasa Carbonica iso-enzima 2), Cl channel (Canales de Cloro), TRAP (Fosfatasa ácida tartrato resistente), Trph1 (Triptofano hidrolasa 1), CREB (proteínas respondedora de cAMP (mono fosfato ciclico de adenosina)), Wnt (familia de factores Wingless), Dkk (Dickkopf-1), WIF (factor inhibitorio de WNT), sFRP (Proteínas relacionadas a frizzled secretadas), Lrp5/6 (Receptor relacionados a lipoproteínas de baja densidad) [Adaptado de Gallagher, 2010].

Una vez unido el osteoclasto al hueso comienza la erosión del tejido, para ello el osteoclasto libera H^+ mediante bombas de protones ATP-dependientes (H^+ ATPasa) con el fin de bajar el pH a 4,5 en el compartimiento de reabsorción para facilitar la remoción de HAP. Además, el osteoclasto libera una serie de enzimas que degradan la matriz extracelular, como fosfatasa

ácida tartrato-resistente, catepsina K, matriz-metaloproteinasas 9 y gelatinasa de lisosomas citoplásmicos, formando por reabsorción las lagunas de Howship [Clarke, 2003; Zernicke, 2006] (figura 10).

Una vez finalizada la reabsorción, los osteoclastos son eliminados mediante apoptosis celular.

Luego de la fase de reabsorción, el remodelado entra en una fase de formación, en la cual los osteoblastos se diferencian a partir de sus precursores (Figura 11) [Lian, 2006]. Si bien el acoplamiento entre el final de la reabsorción y el comienzo de la formación no está aclarado, se cree que el mismo

involucra distintos factores como TGF- β (Transforming growth factor beta), IGF-1 and IGF-2 (Insulin-like growth factor 1 and 2), BMPs (bone morphogenetic proteins) y PDGF (fibroblast growth factor) [Boyce, 2009; Clarke, 2003; Lerner, 2006; Lian, 2006; Martin, 1998].

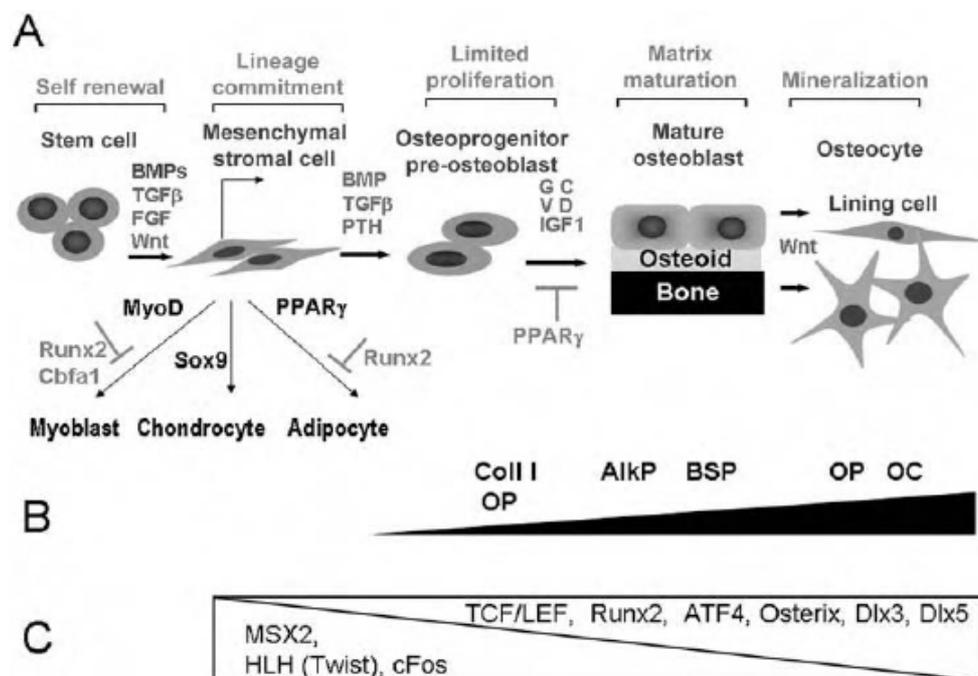


Figura 11: Regulación de la osteoblastogénesis. A. Estados de progresión de la diferenciación osteoblástica mediada por distintos factores. B. Marcadores de fenotipo de linaje osteoblástico (colágeno tI, fosfatasa alcalina, sialoproteína ósea, osteopontina y osteocalcina). C. Progresión de factores de transcripción que regulan la diferenciación. [Adaptado de Lian, 2006].

La formación del hueso dura entre 4 a 5 meses [Clarke, 2003; Zernicke, 2006]. En este tiempo, las

células osteoblásticas secretan matriz extracelular y vesículas conteniendo altas concentraciones

de Ca^{2+} y fosfatos para lograr la mineralización del colágeno producido. A medida que crece la matriz extracelular y su posterior mineralización progresa, algunos osteoblastos quedan atrapados en el hueso, diferenciándose a osteocitos, formando así una extensa red de canalículos en los cuales los osteocitos se conectan entre ellos y con el exterior del hueso [Bozal, 2006; Franz-Odenaal, 2006].

Al finalizar el proceso de formación, un 50-60% de los osteoblastos entran en apoptosis, y el resto se convierte en osteocitos o en células que recubren el hueso (bone-lining cells). Las lining cells funcionan como una barrera sangre-hueso, pero poseen la capacidad de re-diferenciarse a osteoblastos mediante estímulos mecánicos u hormonales.

El proceso de remodelación es básicamente el mismo [Clarke, 2008; Dempster, 2006; Eriksen, 2010; Steiniche, 2003;] tanto en el hueso cortical como en el trabéculas (Figura 12). En la remodelación del hueso compacto los osteoclastos excavan túneles de sección circular a partir de un canal de Havers o de Volkmann. Debido a esto, las osteonas resultan de forma cilíndrica. En la remodelación del hueso esponjoso, los osteoclastos erosionan la superficie de las trabéculas, produciendo excavaciones poco profundas y de base ancha. Por esta razón, los sitios remodelados de las trabéculas tienen forma de lente plano-convexa [Clarke, 2008].

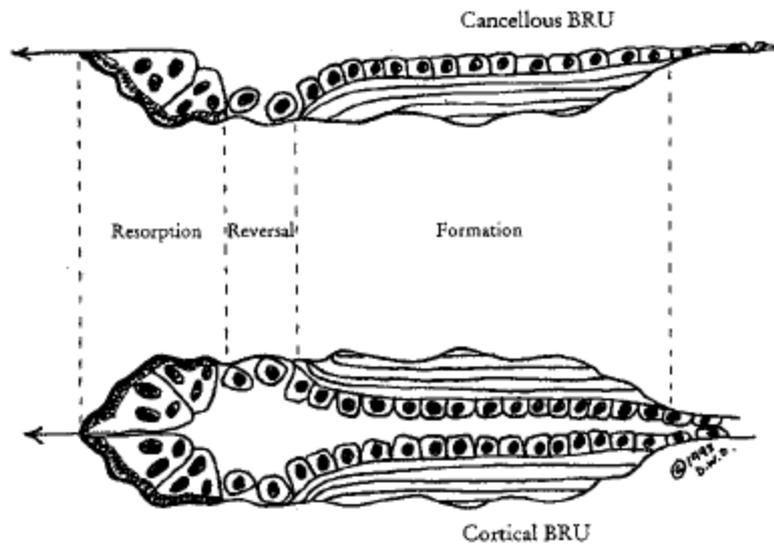


Figura 12: Secuencia de remodelación en hueso cortical y trabécular [Adaptado de Dempster, 2006]

Si bien la remodelación se produce al azar, existe una mayor probabilidad de remodelación [Martin, 2000; Zernicke 2006] en lugares con micro-daños.

1.6.- Modelado óseo:

El proceso de modelación se lleva a cabo con mayor frecuencia durante el crecimiento. A diferencia del de remodelación, no involucra un proceso de acoplamiento cíclico de resorción-formación ósea. Es así que la resorción y la formación ósea son eventos separados [Speaker, 2006].

El proceso de modelado se da con el objetivo de adaptar mecánicamente al hueso a las cargas mecánicas alterando la forma del mismo [Bain, 1993; Boskey, 2006; Boyce, 2008, Clarke, 2008; Książopolska-Orłowska, 2010; Speaker, 2006]

1.7.- Reparación ósea:

El tejido óseo es el único tejido capaz de repararse a sí mismo desde el momento en que se produce el daño y sin dejar cicatrices [Brighton, 1991; Liu, 2010; McKibbin, 1978].

La reparación de los daños se puede dividir en etapas secuenciales

que involucran varios tipos celulares y de factores de crecimiento. Una primera etapa involucra una respuesta inflamatoria, con liberación de distintos tipos de citoquinas pro-inflamatorias de manera temporal y espacialmente regulada durante la primer semana post injuria como ser IL-1, IL-6 y TNF- α [Mountziaris, 2008]. Células osteoprogenitoras que se encontraban en el sitio de lesión, expresan y liberan proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que, junto con la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias, reclutan más células

mesenquimales. Si la fractura es mecánicamente estable, las MSCs se diferencian a osteoblastos para regenerar el hueso pero si la fractura es inestable se diferencia a condrocitos para formar una capa de colágeno que actúa como puente entre los extremos de la fractura, constituyéndose así lo que se conoce como callo blando (figura 13). Este es luego calcificado para formar un callo óseo, que luego es remodelado para formar hueso laminar [Brighton, 1991; Liu, 2010; McKibbin, 1978, Sikavitsas, 2001].

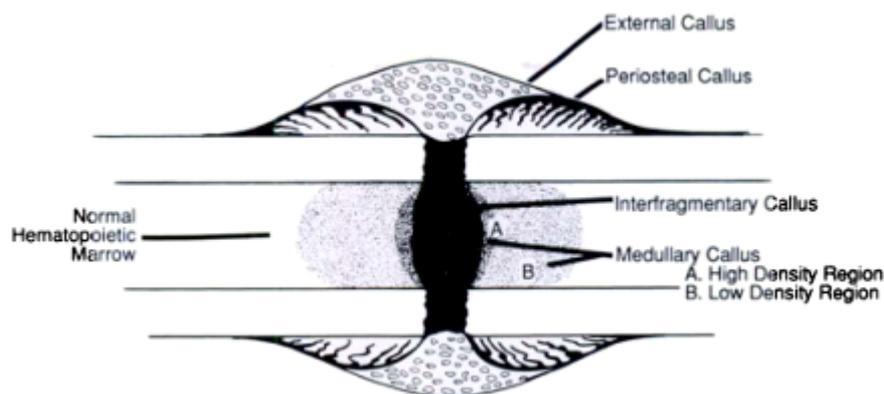


Figura 13: esquema de un callo en una reparación ósea [Adaptado de Brighton, 1991].

2. Ingeniería de Tejido Óseo:

2.1- Introducción:

Si bien el hueso es el único tejido capaz de repararse a si mismo sin dejar cicatrices, existe un gran numero de situaciones en las cuales los mecanismos de reparación ósea no pueden llevarse a cabo. Ejemplo de ellos son grandes fracturas, osteonecrosis, tumores o malformaciones congénitas. En esos casos, se debe intervenir

quirúrgicamente para reparar los huesos dañados [Khan, 2008].

La utilización de materiales artificiales para realizar prótesis parece una estrategia muy antigua para reponer el miembro dañado. La Dra Jacqueline Finch [Finch, 2011] de la Universidad de Manchester ha demostrado que la prótesis más antigua es egipcia y data del año 1.500 a.C. Esta prótesis, realizada a base de madera, cuero y lino, demostró ser una prótesis funcional.



Figura 14: prótesis egipcia. [Adaptado de Finch, 2011].

Este caso no es el único, en 1858 se encontró en la ciudad de Capua, Italia, una prótesis de una pierna que data del año 300 a.C. hecha de madera, cubierta con bronce y ataduras de cuero [Finch, 2011; Thurston, 2007]. Durante la Edad Media, se utilizaban

materiales como madera, metales y cuero para producir prótesis (patas de palo o manos de gancho) prolongándose esta técnica hasta la primera parte del siglo XX. Debido a la falta de anestésicos, las amputaciones producían mucho dolor, con alto riesgo de

hemorragia, infección y muerte [Thurston, 2007]. Con el advenimiento de buenas prácticas de medicina, anestésicos, bactericidas y manejos de materiales se han desarrollado técnicas que disminuyen significativamente la mortalidad post-quirúrgica.

2.2.-Terapias actuales:

Actualmente, se utilizan distintas terapias para las diversas lesiones óseas. Entre ellas se encuentran la utilización de diversos materiales e injertos [Estrada, 2006].

2.2.1.-Metales y Cerámicas:

Distintas aleaciones metálicas se han usado con el fin de producir prótesis, placas, tornillos y clavos, pero la utilización de estos metales presentan varias desventajas. Por ejemplo, los implantes metálicos no pueden cambiar su forma a través del modelado y remodelado óseo para poder adaptarse a las nuevas necesidades del cuerpo. Además, las prótesis suelen aflojarse de su sitio

debido a una falta de osteointegración⁵. Por otro lado, la utilización de placas de osteosíntesis y tornillos hace necesaria una segunda intervención quirúrgica para la extracción de ellos [Estrada, 2006].

Las cerámicas tienen la desventaja de presentar una baja resistencia a la tensión y de ser frágiles, por lo que no puede ser usada en sitios donde se manifiestan altos valores de stresses.

2.2.2.-Injertos:

Los injertos actúan mediante tres tipos de mecanismos biológicos, ellos son osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción. La osteogénesis es la capacidad de generar hueso a partir de las células contenidas en el injerto y por lo tanto depende exclusivamente de la supervivencia de las células transplantadas. La osteoconducción es la capacidad de servir como molde para la incorporación de

⁵ Osteointegración (Definido por Per-Ingvar Branemark): formación de una interfase estable entre el hueso y el implante metálico.

capilares y células osteoprogenitoras de la zona receptora. La osteoinducción es la capacidad de reclutar células mesenquimales del entorno del implante y de diferenciarlas en osteoblastos debido a distintos factores de crecimiento (TGF- β , BMPs, IGF).

Los Injertos se clasifican según su procedencia en: autoinjerto, aloinjerto (homólogos), xenoinjerto (heterólogo) y un cuarto grupo llamado isoinjerto [Benito, 2000; Estrada, 2006; Valle-Ortiz, 2000].

El autoinjerto suele ser el más exitoso de los cuatro debido a que se realiza un trasplante desde otro sitio esquelético del mismo paciente. La clave de su éxito radica en que el tejido está vivo ya que sus células se encuentran intactas y no intervienen rechazo ya que no hay reacciones de naturaleza inmunológicas. Aun así posee ciertas desventajas, como una segunda intervención quirúrgica compleja y costosa para extraer el material a injertar, aumentando el dolor del paciente, el riesgo a

infecciones y costos de las operaciones. Además la cantidad de hueso a que se puede extraer del sitio dador es limitada.

El segundo tipo es el aloinjerto, estos son extraídos de cadáveres. Este posee la ventaja de no necesitar abordajes quirúrgicos extras al paciente y se pueden almacenar. Antes de ser implantados estos tejidos deben ser sometidos a una serie de tratamientos para evitar reacciones inmunológicas o la contaminación cruzada debida a virus alojados en el tejido a implantar. Estos tratamientos incluyen radiación γ , liofilización, lavado en ácido y otros tratamientos de tipo químico. Las desventajas son las transmisiones de enfermedades y el posible rechazo que ocurren entre un 30-60% de los implantes (Tabla 2). Los autoinjertos son incorporados más completamente y más rápido que los aloinjertos. Esta diferencia se debe a la ausencia de respuestas inmunes, ya que esta respuesta disminuye la

neovascularización y retrasa la osteoinducción. Los injertos xenogénicos son los injertos obtenidos a partir de otras especies,

generalmente es hueso desproteinizado y por lo tanto no suele generar reacción inflamatoria.

<i>Tipos de implantes</i>	<i>Mecanismos</i>		<i>Desventajas</i>
<i>Autoinjerto</i>	Osteoconducción	+++	Limitada disponibilidad, Morbilidad de las áreas donadoras, no se puede almacenar.
	Osteoinducción	+++	
	Osteogénesis	+++	
<i>Alloinjerto</i>	Osteoconducción	++	Transmisión de enfermedades, elaboración costosa, poder antigénico, lista de espera.
	Osteoinducción	++	
	Osteogénesis	-	
<i>Xenoinjerto</i>	Osteoconducción	+++	Posible transmisión de enfermedades, elaboración costosa, no posee osteoinducción
	Osteoinducción	-	
	Osteogénesis	-	

Tabla 2: tabla comparativa de los tres tipos de injertos.

El isoinjerto es el injerto cuyo donante es genéticamente idéntico como se da en hermanos gemelos. Aunque puede poseer las ventajas y desventajas del autoinjertos, pueden transmitir enfermedades y algún rechazo debido a pequeñas

diferencias genéticas [Benito, 2000; Estrada, 2006; Malloy, 2002; Valle-Ortiz, 2000].

2.3.-Epidemiología:

El impacto de los tratamientos en los defectos óseos desde el punto

de vista clínico y económico es sumamente grande [Porter, 2009]. Por ejemplo, en el caso de artroplastías⁶ y revisiones de estas, desde el año 1998 al 2005, han aumentado de 700.000 a 1.100.000 casos solo en Estados Unidos. En 2003, se estimaron gastos médicos en más de 20.000.000 de dólares relacionados con las fracturas, reinserciones y reemplazos de cadera y rodilla, previéndose para el año 2015 más de 74.000.000 de dólares. En cuanto a fracturas traumáticas, en el año 2005 se realizaron 8.500.000 visitas médicas de las cuales se requirieron hospitalización en casi 1.000.000 de casos [Porter, 2009].

Nuestro país no está exento de estos problemas. Solo en la Clínica Güemes, de Luján [Prina, 2009], se efectuaron entre los años 2005 y 2007 un total de 35 artroplastías cervicales en 27 pacientes.

⁶ La artroplastía consiste en una cirugía ortopédica que busca reemplazar de forma total o parcial la articulación con un implante artificial.

Una disminución en la calidad y/o densidad mineral ósea (DMO) puede incrementar la incidencia de fracturas óseas debido a la osteoporosis, siendo esta la enfermedad ósea metabólica más frecuente [Morosano, 2005]. La reparación de dichas fracturas puede verse comprometida cuando co-existen patologías que afectan el metabolismo óseo. A nivel mundial, la osteoporosis afecta a más de 200.000.000 de personas, estimándose que 30-50% de las mujeres post-menopáusicas la desarrollarán, con un consecuente aumento en la incidencia de fracturas óseas. En Estados Unidos se producen aproximadamente 6.500.000 de fracturas por año, de las cuales se estima que 15% son difíciles de sanar [Braddock, 2001].

En nuestro país se ha estimado por estudios densitométricos sobre columna lumbar y cuello femoral, que en mujeres mayores de 50 años sólo un 25% poseen DMO normal, mientras que 50% presentan

osteopenia y 25% osteoporosis [Schurman, 2007]. Las fracturas osteoporóticas de mayor prevalencia son las fracturas de cadera, columna vertebral y radio distal. En la ciudad de Rosario, en el año 2001 a 2002 se registraron 763 fracturas de caderas en personas mayores de 50 años de edad, siendo el 75 % de los casos mujeres. Esta incidencia se triplica cuando la edad etárea es 65 en lugar de 50 años.

Además, se estima que las incidencias de fracturas de caderas debido a osteoporosis se incrementará en un 100 % hacia el año 2050 [Morosano, 2005]. Se ha demostrado que para un paciente que sufre una fractura de cadera, además del incremento en la mortalidad (20% más alta en el primer año), existe un importante efecto de dependencia post-fractura: 20% requieren cuidados domiciliarios y menos del 50% retornan a sus actividades habituales, lo cual genera altos

costos directos e indirectos para la sociedad en su conjunto.

2.4.-Ingeniería de Tejido Óseo:

Las distintas alternativas que existen como opción en el reemplazo y restauración de tejido óseo no son eficaces. Los metales poseen una baja osteointegración, las cerámicas son frágiles y los injertos poseen distintas desventajas donde las principales son escasez de donantes y rechazo.

En paralelo al aumento de la población global y expectativa de vida, las frecuencias antes descritas irán en aumento. En vista de esto es que nace la *Ingeniería de Tejido Óseo (ITO)*, que fue definida como

“un campo interdisciplinario de investigación que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la tarea de desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido” [Langer, 1993].

En el pasado, cuando una parte del cuerpo estaba muy comprometida por algún accidente,

se llegaba a la amputación del miembro afectado. En el presente (figura 15), gracias a adecuada selección de materiales y metodologías, así como anestésicos,

esterilización y control de los pacientes durante las intervenciones quirúrgicas, se han desarrollado técnicas de trasplantes e implantes.

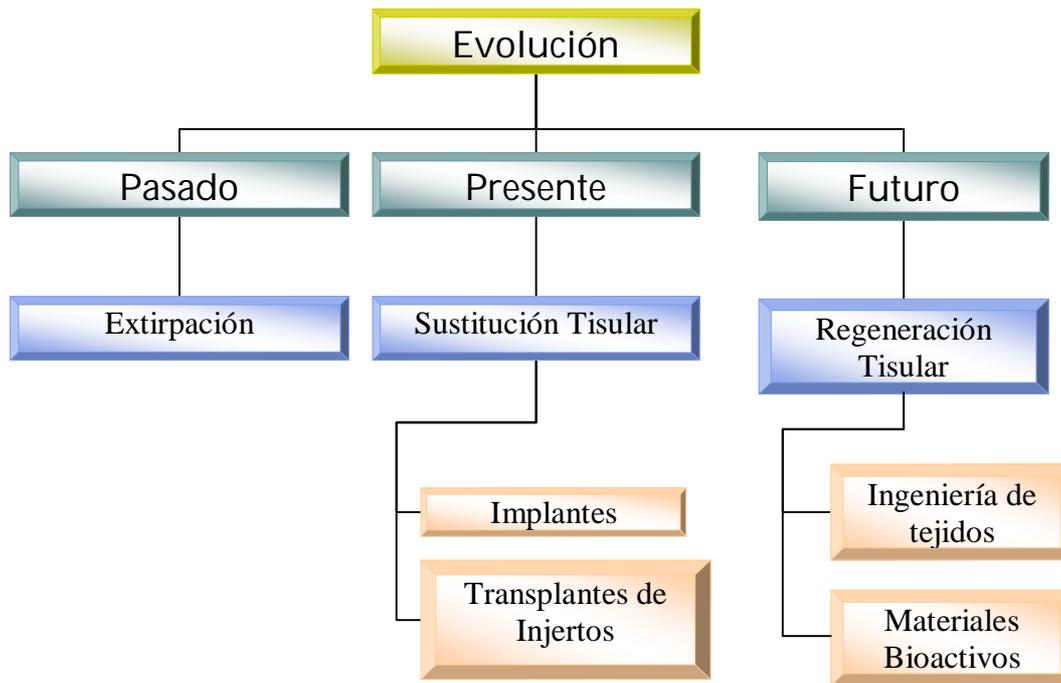


Figura 15: evolución de procedimientos ante una alteración ósea.

El desarrollo se encuentra centrado en los materiales bioactivos y en la Ingeniería de Tejidos. El término material bioactivo se suele aplicar a materiales tales como cerámicas y bio-vidrios. Estos proporcionan una respuesta biológica específica en la interfase del material con el tejido [Barrios de Arena, 2001; Hench, 2002]. Todo

material bioactivo forma una unión interfacial de carbo-hidroxiapatita con tejidos adyacentes. El tiempo de unión, la resistencia de la unión, el mecanismo de unión y el espesor de la zona de unión difiere según el material.

La Ingeniería de tejido óseo (figura 16), que tiene como misión la regeneración del tejido, utiliza

matrices 3D, también llamados *Scaffolds*, células y factores de crecimiento [Salgado, 2004].

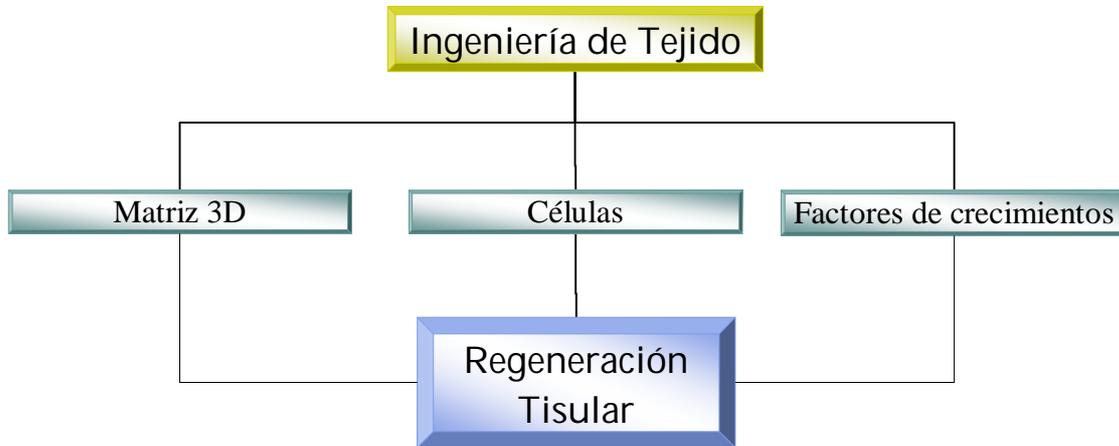


Figura 16: Componentes utilizados en Ingeniería de Tejido óseo.

2.4.1.-Matriz 3D:

Tienen como función, proporcionar apoyo necesario para que las células proliferen, produzcan matriz extracelular y vasos sanguíneos y así poder regenerar el tejido. Al mismo tiempo los materiales utilizados debe tener la capacidad de ser reabsorbibles. Para esto hay una serie de requisitos que se deben cumplir [Chen, 2008; Estrada, 2006; Ma, 2004; Salgado, 2004] para poder así garantizar la regeneración del tejido. Antes de listar los requerimientos, vale decir

que las variables de cada uno de los requisitos varían dependiendo en que hueso será utilizado la matriz.

2.4.1.1.-Requisitos:

2.4.1.1.1.-Biocompatibilidad:

Es la integración al tejido huésped sin presentar efectos tóxicos o reacciones inmunes. La biocompatibilidad permite que el material sea aceptado por el organismo aun cuando no interactúe con él (o sea, que sirva solamente como matriz) y que por lo tanto no haya rechazo del material o

de sus productos de degradación [Estrada, 2006; Hutmacher, 2000; Salgado, 2004].

2.4.1.1.2.-Porosidad:

Los *scaffolds* deben ser porosos, siendo estos abiertos e interconectados; es decir que todos los poros, sin importar su ubicación en el *scaffolds*, deben estar conectados con los poros de la superficie. Esto es necesario para la difusión de nutrientes y gases y remoción de desechos metabólicos como resultado del metabolismo celular. Por otro lado, la porosidad permite la angiogénesis necesaria para la regeneración del tejido.

La porosidad, si bien es muy necesaria, influye drásticamente en otros dos requisitos muy importantes, estos son las propiedades mecánicas del *scaffold* y la tasa de degradación [Burg, 2000; Estrada, 2006; Karageorgiou, 2005; Salgado, 2004].

2.4.1.1.3.-Tamaño de poros:

Los poros no deben tener cualquier tamaño, pues si el tamaño promedio es chico, habrá un efecto tapón por parte de las células que crecen dentro de ellos y disminuye la tasa de ingreso de ellas al seno de la matriz, así también como la limitación de influjo y exflujo de las sustancias. Si son muy grandes afectan drásticamente a las propiedades mecánicas, así el rango de tamaño debe ser entre 200 y 700 μm . Tanto la porosidad como el tamaño promedio de los poros afectan la osteoconducción de la matriz [Burg, 2000; Estrada, 2006; Karageorgiou, 2005; Leong, 2003; Reswan, 2006; Salgado, 2004].

2.4.1.1.4.-Biodegradabilidad:

Los materiales utilizados deben poseer una tasa de degradación adecuada. Así, mientras el tejido óseo se regenera, las cargas producidas sobre el hueso serán soportadas por el *scaffold*, pero éste debe degradarse a medida que el hueso se regenera. Es por esto que la tasa de degradación debe ser

controlada de forma que cuando el hueso este regenerado, no haya vestigios del *scaffolds* [Estrada, 2006; Hutmacher, 2000; Reswan, 2006; Salgado, 2004].

2.4.1.1.5.-Propiedades

mecánicas:

El *scaffold* debe tener una adecuada resistencia mecánica para garantizar el espacio entre las células necesarias para la posterior formación de la matriz extracelular. Esta propiedad varia según el tipo de hueso y del lugar dentro del mismo hueso donde será colocado el

scaffold [Estrada, 2006; Hutmacher, 2000; Reswan, 2006; Salgado, 2004].

En la figura 17 se puede observar la diferencia que hay entre la resistencia a la compresión y el modulo elástico de distintos tipos de huesos y materiales. Se observa como estas propiedades son afectadas paralelamente cuando el material posee poros [Estrada, 2006; Reswan, 2006; Salgado, 2004].

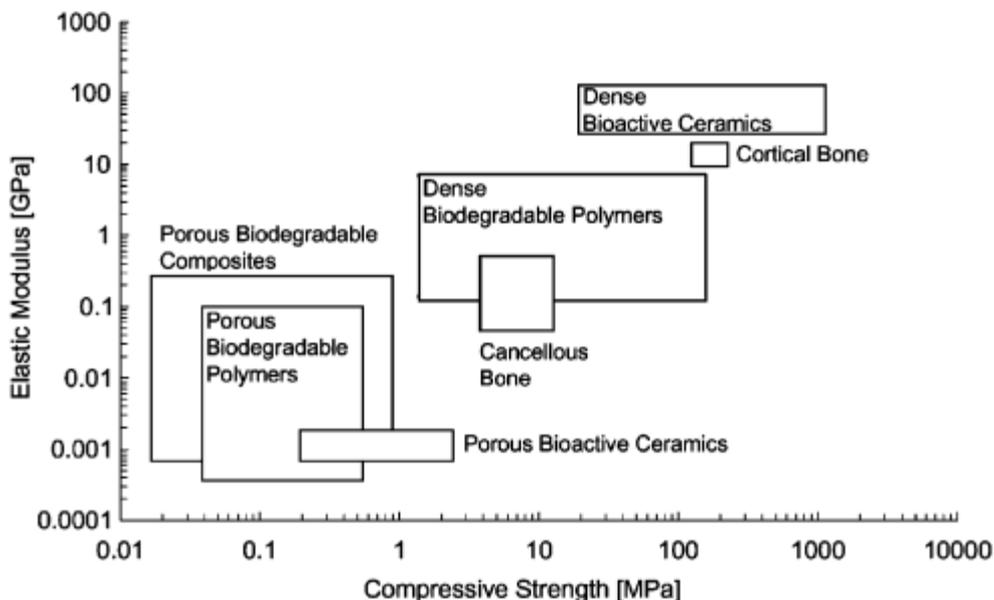


Figura 17: resistencia a la compresión y el modulo elástico de hueso cortical, trabecular y distintos materiales utilizados en Ingeniería de Tejido Óseo [Adaptado de Rezwan, 2006]

2.4.1.1.6.-Osteoinducción:

Las matrices deben tener factores de crecimiento que recluten e induzcan a las MSCs a diferenciarse a osteoblastos, así también como factores angiogénicos [Hutmacher, 2000; Khan, 2008].

2.4.1.1.7.-Factibilidad:

Un requisito no menor para los *scaffolds* debe ser su accesibilidad de fabricación, con la posibilidad de darle una arquitectura tridimensional y factible de esterilizar, al mismo tiempo poseer potencial comercialización.

2.4.1.2.-Materiales:

Los materiales que se pueden utilizar para el desarrollo de las matrices son muy diversos, como ser: cerámicas, vidrios bioactivos, polímeros naturales o sintéticos y composites (o materiales compuestos).

2.4.1.2.1.-Cerámicas:

Son compuestos inorgánicos, no metálicos que presentan estructura cristalina. Las más utilizadas son las apatitas, siendo la más conocida la hidroxiapatita cuya fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y alumina (Al_2O_3).

Las Apatitas se integran rápidamente al hueso y si bien no son degradables, se pueden tener apatitas con baja tasa de degradación dependiendo de los tamaños de partículas, cristalinidad y trazas de otros elementos, tales como ser Na, Sr o aniones como Cl^- , CO_3^- que interfieran en la estructura cristalina de la apatita. El fosfato tricálcico es bioabsorbible y es reemplazado temporalmente por el tejido natural. Su tasa de bioabsorción depende sobre todo del estado cristalino; por ejemplo la tasa de degradación de α -TCP es mayor que la de β -TCP. Estas cerámicas poseen una tasa de degradación difícil de predecir y si

esta es muy rápida, puede comprometer la estabilidad y aumentar la concentración de PO_4^{3-} y Ca^{2+} extracelular local y puede producir la muerte celular [Jones, 2003; Khan, 2008; Salgado, 2004; Rezwan, 2006; Vallet-Regi, 2003]. Así, ordenados en velocidad de disolución creciente se obtiene el siguiente orden:

HAP cristalina \ll β -TCP \ll α -TCP
 \ll HAP amorfo

La alúmina es muy estable ya que no reacciona con el ambiente tisular y por lo tanto presenta gran estabilidad química.

A pesar de mostrar una buena resistencia a la compresión, las cerámicas poseen una baja resistencia a la fractura respecto del hueso, limitándose su uso a odontología.

2.4.1.2.2.- Vidrios bioactivos:

También conocidos como biovidrios, son compuestos inorgánicos no metálicos y amorfos. Estos están compuestos de una

mezcla de óxidos de Si, Ca, P, Na y en algunos casos B y K. El más conocido es Bioglass® 45S5. Poseen una alta bioactividad, integrándose en forma excelente al hueso mediante la formación de una capa de carboxiapatita en la interfase de unión al hueso.

En estos últimos años, se ha descubierto que se liberan algunos óxidos constituyentes del biovidrio en baja concentración aumentando la expresión de ciertos genes y promoviendo la osteogénesis de las células [Hench, 2002; Hench, 2009; Peitl, 2001]. Dos características comparten con la cerámica, ambos poseen excelente biocompatibilidad pero muy baja resistencia a la fractura [Chen, 2008; Jones, 2003; Karlsson, 2008; Khan, 2008; Salgado, 2004; Rezwan, 2006; Vallet-Regi, 2003].

2.4.1.2.3.-Polímeros:

Son un gran grupo de materiales y se clasifican en naturales o sintéticos. Constituye el grupo más diverso debido a su

variada naturaleza, ya que dependiendo de su química e incluso de su forma de preparación, se puede tener una gran gama de materiales con distintas propiedades, a su vez, se pueden modificar por distintos métodos físico o químicos. Algunos polímeros naturales son: quitina, quitosano (un derivado del anterior), almidón, colágeno y los polihidroxicarbonatos. Algunos polímeros sintéticos usados son policaprolactona, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y sus copolímeros y policarbonatos [Chen, 2008; Karlsson, 2008; Khan, 2008; Liu, 2004; Salgado, 2004; Rezwani, 2006; Vallet-Regí, 2003].

2.4.1.2.4.-Composites:

Los "composites" o materiales compuestos, son una combinación de al menos dos materiales distintos. Desde el punto de vista de la ciencia de los materiales, un simple material no provee usualmente todas las necesidades mecánicas y/o químicas

requeridas. Es así que se suele usar combinación de materiales donde la estrategia más común es la mezcla de algún polímero con alguna cerámica o algún bioglass donde cada componente aporta sus propiedades con el fin de cubrir las falencias del otro [Hench, 2009; Ma, 2004; Salgado, 2004].

2.4.1.3.- Células:

Debido a que las matrices carecen de la propiedad de osteogénesis, a los *scaffolds* se les pueden agregar células como ser MSCs u Osteoblastos propios del paciente. Para esto se crean las células en la matriz en bioreactores y luego se lo implanta en el sitio óseo a reparar. El problema de este método es el tiempo que requiere el crecimiento de las células en el *scaffold*. Esto puede solucionarse con células xenogénicas, pero se necesita un estricto sistema de control para evitar infección o contagio de virus y rechazos [Ma, 2004; Salgado, 2004].

2.4.1.4.-Factores de Crecimiento:

Como se describió antes, es muy importante que estos posean efecto osteoinductor. Para lograr tal cometido, a las membranas se les puede agregar distintos factores de crecimiento como BMPs, TGF- β 1, VEGF, IGFs, RGD, integrinas y factores angiogénicos [Rezwan, 2006; Salgado, 2004]

La necesidad de obtener matrices porosas ha impulsado a los investigadores a diseñar distintos sistemas o métodos.

En la literatura se puede encontrar una gran cantidad de métodos de obtención de matrices porosas para regeneración de tejido óseo [Chen, 2008; Hutmacher, 2000; Khan, 2008; Liu, 2004; Ma, 2004; Mano, 2004; Rezwan, 2006; Salgado, 2004]. En la figura 18 se detallan algunos de los métodos [Hutmacher, 2000].

La metodología para la obtención de las matrices porosas, así como los polímeros, cerámicas o biovidrios a usar depende no solo del hueso donde será implantado sino también de la sección del mismo. Por ejemplo, la resistencia mecánica que soportaran los implantes en los huesos planos como en el cráneo no serán las mismas que en un hueso largo como el húmero. No solo variarán en la resistencia mecánica sino también en la porosidad. Además, los requerimientos para las matrices, también variarán según la ubicación dentro del mismo hueso. Estas diferencias se pueden notar en la supuesta necesidad de implantes en la zona media de un hueso largo, como la diáfisis de fémur y la cabeza del mismo, donde las estructuras del hueso varían a lo largo del mismo.

Fabrication technology	Processing	Material properties required for processing	Scaffold design and reproducibility	Achievable pore size in μm	Porosity in %	Architecture
Solvent casting in combination with particular leaching	Casting	Soluble	User, material and technique sensitive	30–300	20–50	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Membrane lamination	Solvent bonding	Soluble	User, material and technique sensitive	30–300	< 85	Irregular pore structure
Fabrication of non-woven	Carding, Needling, Plate pressing	Fibres	Machine controlled	20–100	< 95	Insufficient mechanical properties
Melt moulding	Moulding	Thermoplastic	Machine controlled	50–500	< 80	Spherical pores, salt particles remain in matrix
Extrusion in combination with particular leaching	Extrusion through dies	Thermoplastic	Machine controlled	< 100	< 84	High volume of inter-connected micropore structure
Emulsion freeze drying	Casting	Soluble	User, material and technique sensitive	< 200	< 97	High volume of inter-connected micropore structure
Thermally induced phase separation	Casting	Soluble	User, material and technique sensitive	< 200	< 97	High volume of inter-connected micropore structure
Supercritical-fluid technology	Casting	Amorphous	Material and technique sensitive	< 100	10–30	High volume of non interconnected micropore structure
Supercritical-fluid technology in combination with particle leaching	Casting	Amorphous	Material and technique sensitive	Micropores < 50 macropores < 400	< 97	Low volume of non-interconnected micropore structure combined with interconnected macropore structure
3-D printing in and without combination of particle leaching	Solid free form fabrication	Soluble	Machine and computer controlled	45–150	< 60	100% interconnected macropore (triangles, pentagons, honey comb, etc.), design and fabrication layer by layer, by use of water-based binder incorporation of biological agents into matrix possible
Fused deposition modelling	Solid free form fabrication	Thermoplastic	Machine and computer controlled	> 150	< 80	100% interconnected macropore structure (triangles, pentagons, honey comb, etc.), design and fabrication layer by layer

Figura 18: Tabla detallando algunos métodos de obtención de matrices porosas

[Adaptado de Hutmacher, 2000].

Electrospraying es un método de fabricación basado en la electrohidrodinámica, permitiendo la construcción de *scaffolds* con una microestructura controlables en la escala micro y/o nanométrico [Wu, 2008].

Esta técnica produce partículas con dimensiones que van desde los micrómetros a nanómetros en función de los parámetros de procesamiento, y representa una gran oportunidad para la fabricación de *scaffolds* para aplicaciones biomédicas.

El principio de la técnica de *electrospraying* es esencialmente el

mismo que el del *electrospinning*. En un proceso típico, una solución se alimenta mediante una boquilla y se forma una gota en la salida de esta. Cuando la gota está expuesta a un fuerte campo eléctrico, la superficie de esta es cargada. Influenciado por el campo electrostático, la gota en la punta de la boquilla adopta una forma cónica. Desde la punta del cono, un chorro de la solución cargada es impulsado a un colector.

Debido a la tensión superficial de este se fragmenta, adquiriendo así una forma esférica, antes de ser depositado sobre el colector (figura 19).

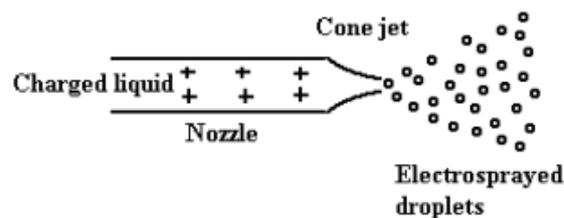


Figura 19: Esquema del principio básico de la técnica de *electrospraying* [Adaptado de Wu, 2008]

Estos procesos moleculares del polímero, la electrohidrodinámicos se encuentran afectados por una multitud de variables, tales como las propiedades físico-químicas (peso molecular del polímero, la concentración de solventes, conductividad, tensión superficial), y los parámetros de procesamiento (tensión aplicada, distancia entre la

aguja-colector y el caudal de solución). La variable más importante para distinguir entre *electrospraying* y *electrospinning* es la concentración de la solución del polímero utilizada en el proceso. La generación de las gotas es una consecuencia de la utilización de una menor concentración (y por lo tanto menor viscosidad) de la solución de polímero que lo que se

utiliza en *electrospinning* [Chakraborty, 2009; Arya, 2009].

La figura 20 muestra un diagrama esquemático del proceso de *electrospraying*. La tecnología de deposición del *electrospray* se puede utilizar para diseñar materiales que imiten la matriz extracelular para guiar el crecimiento celular o generación de tejidos.

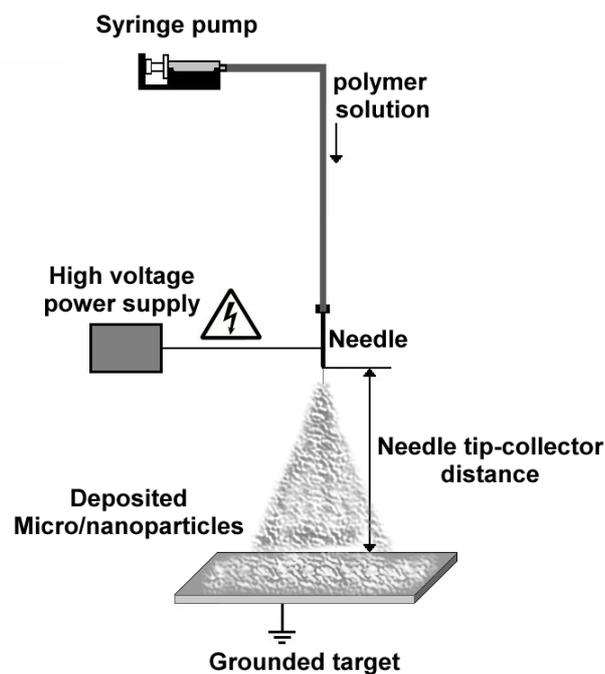


Figura 20: Diagrama esquemático de un sistema experimental del método de *electrospraying*.

También se ha informado que la técnica de *Electrospraying* sirve como un método alternativo útil para modificar la superficie de los implantes biomédicos y cambiar las

propiedades de la superficie de los implantes utilizando revestimientos superiores [Kumbar, 2007]. Esta técnica también es atractiva para las aplicaciones de administración de

fármacos, lo que permite la liberación de agentes bioactivos con una gran variedad de perfiles de liberación [Kumbar, 2007].

Peter Ma [Ma, 2004] ha propuesto un *scaffold* biomimético (figura 21) en el cual se tienen en cuenta los requerimientos antes propuestos.

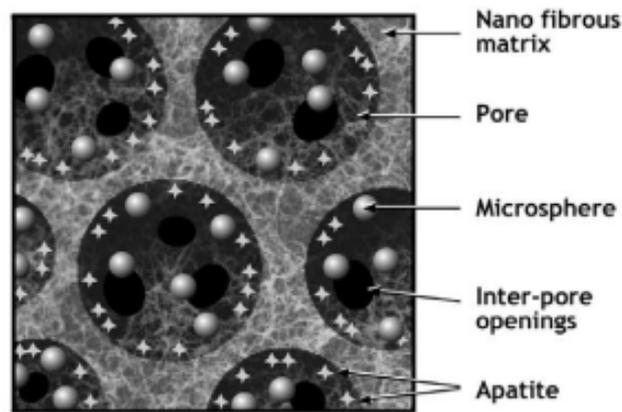


Figura 21: esquema de un *scaffold* biomimético. [Adaptado de Ma, 2004]

Su estructura (figura 21) muestra una matriz polimérica formada por macroporos interconectados para permitir la migración celular hacia el interior de la matriz y la angiogénesis y por microporos para favorecer la difusión de nutrientes. También contienen compuestos inorgánicos como apatitas, para mejorar las propiedades mecánicas, ya que como se ve en la figura 17, la utilización de polímero solo, no

vasta para obtener buenas propiedades mecánicas.

Además, se plantea la necesidad de incorporar en la matriz un sistema formado por microesferas degradables que contengan en su interior los factores de crecimientos que se irán liberando al medio extracelular a medida que estas se degradan.

En resumen, la ingeniería de tejido óseo es un campo interdisciplinario que aplica los

principios de la ingeniería y las ciencias de la vida, hacia el desarrollo de un sustituto biológico que combina materiales biodegradables, células y factores de crecimiento para reparar tejido óseo dañado. La elección de los materiales adecuados y su arquitectura son de máxima importancia, tales propiedades afectan no únicamente a la supervivencia de las células, señalización, crecimiento, propagación y reorganización, sino también su expresión de genes y preservación del fenotipo.

El material ideal debe ser fácil de fabricar y controlar en una arquitectura deseada, debe ser biocompatible, poseer propiedades mecánicas óptimas y no debe ser tóxico.

Hasta el presente no existe ningún material que reúna todos estos requerimientos, por lo que el diseño de nuevos materiales continúa constituyendo un desafío.

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

“Hay algo más importante que la lógica: es la imaginación.”
Alfred Hitchcock

Capítulo 2: Hipótesis y Objetivos.

1. *Hipótesis:*

Se propone el uso de biomateriales o matrices basados en polímeros o copolímeros sintéticos, combinados o no con hidroxiapatita, podrán ser usados para implantes óseos. Estos materiales tendrán aplicación en la reparación de fracturas de diversos orígenes y el tratamiento de enfermedades inflamatorias óseas.

2. *Objetivos:*

En el presente trabajo de tesis se planteó el objetivo general de desarrollar biomateriales que estimulen la formación ósea mediada por los osteoblastos. Para ello se propone el desarrollo de sistemas basados en los polímeros, poli- ϵ -caprolactona (PCL) polifumarato de diisopropilo (PFIP), con o sin el agregado de partículas de hidroxiapatita (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), con el fin de

mejorar tanto las propiedades mecánicas como biológicas de las membranas, que podrán ser utilizados en el desarrollo de tejido óseo y posterior aplicación en implantes óseos.

Con el fin de abordar el problema planteado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1.-Sintetizar matrices utilizando los polímeros sintéticos PCL y PFIP combinados con HAP.

2.-Caracterizar en forma fisicoquímica las matrices obtenidas a partir de los polímeros puros o sus mezclas, utilizando diversas técnicas: espectroscopia infrarroja, cromatografía de exclusión molecular, microscopía electrónica de barrido, pruebas de degradación, ángulo de contacto y ensayos mecánicos.

3.-Analizar la biocompatibilidad de las matrices

utilizando osteoblastos en cultivo MC3T3-E1 y UMR-106.

4.-Investigar la posible citotoxicidad de los biomateriales utilizando cultivos de macrófagos murinos RAW 264.7.

5.-Obtener una matriz porosa de la mezcla compatibilizada mediante la técnica de electrospray.

6.-Caracterizar las matrices porosas obtenidas mediante SEM y WCA y realizar sobre ellas estudios de adhesión, proliferación y actividad de ALP de las células UMR-106 y MC3T3-E1.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

“La situación ejemplificada es típica. Muchas clases de procesos están ocurriendo en el mundo que nos rodea; se superponen e interaccionan unos con otros de maneras complejas. Una hoja que cae esta sometida a la acción de la gravedad, a la resistencia del aire y a la fuerza del viento, y se pudrirá también en alguna medida muy pequeña mientras cae. No es posible llegar a la comprensión de los distintos procesos con solo observar cuidadosamente los acontecimientos tal como ocurren típica y naturalmente. La observación de la hoja cayendo no producirá la ley de caída de Galileo. La lección a aprender en este caso es bastante sencilla. Con el fin de recoger hechos relevantes para la identificación y especificación de los diversos procesos que ocurren en la naturaleza, es en general necesario intervenir prácticamente para tratar de aislar los procesos que se investigan y eliminar los efectos de otros. En pocas palabras, es necesario hacer experimentos.”

Alan F. Chalmers.

Capítulo 3: Materiales y Métodos.

1. Matrices poliméricas:

1.1.- Materiales:

Todos los productos químicos y reactivos fueron adquiridos comercialmente y son de grado analítico.

Los polímeros utilizados para obtener las matrices fueron poli- ϵ -caprolactona (PCL) y polifumarato de di-isopropilo (PFIP). Además se utilizó

hidroxiapatita (HAP) para agregar en las matrices poliméricas.

La PCL (Figura 1A) fue adquirida comercialmente de Sigma-Aldrich y tiene un peso molecular promedio en peso (Mw) e índice de polidispersidad (IP) de 65 kg/mol y 1,53 respectivamente, según lo indicado por el fabricante.

El PFIP (Figura 1B) y la HAP fueron obtenidos en el laboratorio.

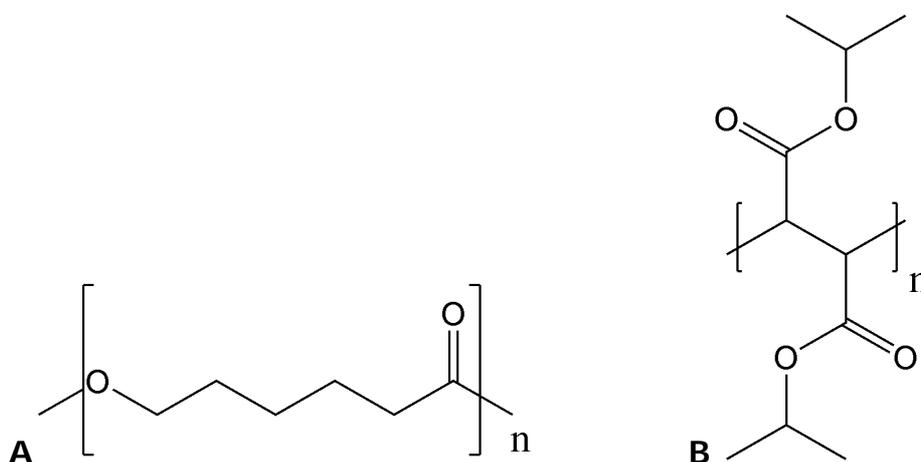


Figura 1: poli- ϵ -caprolactona (PCL) [A], polifumarato de di-isopropilo (PFIP) [B]

1.2.-Obtención de PFIP:

El PFIP fue sintetizado mediante una polimerización

radicalaria asistida por microondas, utilizando peróxido de benzoilo como iniciador de la reacción [Cortizo, 2007; Cortizo, 2008]. En un

matraz cónico de vidrio Pyrex se agregó 1 g de monómero (fumarato de di-isopropilo) y una cantidad previamente pesada del iniciador obteniendo así una concentración final de este de 30 mM. Luego, bajo un baño de hielo y con el matraz cerrado a la atmósfera mediante un septum se burbujeó nitrógeno durante 30 minutos. La reacción fue sometida a distintos tiempo y a distintos poderes de irradiación en horno de microondas doméstico. Después de la reacción, los polímeros fueron aislados y purificados por solubilización-precipitación (tolueno / metanol = 1:8) y se secaron hasta llegar a peso constante mediante el empleo de un tambor de vacío. El PFIP utilizado en este trabajo posee un Mw y un IP de 131 Kg/mol y 2,0, respectivamente según lo determinado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Para la obtención del PFIP marcado con el grupo cromóforo se

utilizó polimerización radical con calentamiento térmico, utilizando peróxido de m-fenilazobenzoilo como iniciador [Cortizo, 1989].

1.3.-Obtención de la mezcla PCL-PFIP compatibilizada:

Para la obtención de la mezcla compatibilizada se utilizó el PFIP anteriormente sintetizado y la PCL comercial. La degradación de las muestras en cloroformo se realizó mediante un equipo de ultrasonido a distintos tiempos a una potencia de 37 watts a una temperatura de 20°C. Las muestras estudiadas se disolvieron en cloroformo a una concentración de 1 %p/v. La mezcla de ambos polímeros se preparó en una proporción 3:1 de PCL a PFIP. A distintos tiempos se tomaron alícuotas para su análisis por SEC para evaluar la cinética de la degradación midiendo los pesos moleculares promedio a 25°C.

1.3.1.-Obtención de membranas porosas:

Las películas porosas fueron obtenidas mediante la técnica de electrospray. Las soluciones se prepararon por disolución de la mezcla PCL/PFIP en cloroformo (4% en peso). La solución fue cargada en una jeringa de plástico estándar de 10 ml conectada a un tubo de poliamida y este a una aguja hipodérmica de acero inoxidable de calibre 18 (ID = 0,838 mm) que se utiliza como boquilla de salida de la solución. Una bomba de jeringa programable (Activa A22 ADOX SA, Argentina) se conectó a la jeringa de control del caudal. Se utilizó una fuente de energía de alto voltaje (ES30P, Gamma High Voltage Research Inc.) para cargar la solución colocando el electrodo en polaridad positiva a la boquilla y el colector (una placa de aluminio) conectado a tierra. Sobre esta placa colectora se colocaron vidrio de dimensiones 2,6 cm de largo x 1,8 cm de ancho para obtener las matrices porosas sobre dichos vidrios.

1.4.-Obtención de HAP:

La HAP fue obtenida por incineración [Ooi, 2007] de hueso bovino de la siguiente forma: un trozo de hueso fémur de vaca fue exhaustivamente limpiado y triturado en trozos mas pequeños, colocado en un crisol e incinerado con un mechero tipo Bunsen en triangulo de pipa (bajo campana). Cuando la preparación llegó a cenizas blancas, fue transportado a una mufla eléctrica y llevado a una temperatura de 900 °C durante una hora, con una rampa de calentamiento de 5 °C/min, dejándose enfriar luego en un desecador. Las cenizas así obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) También se analizaron las cenizas mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) para conocer la distribución de los tamaños de partículas y la relación Ca/P mediante el análisis de rayos X por dispersión de electrones (EDAX).

1.5.-Modificación de las partículas de HAP:

La HPA anteriormente obtenida fue sometida a ultrasonido con el fin de obtener un tamaño de partícula menor. Primeramente, en un mortero se trituró la HAP y se la tamizó por un tamiz numero 200 con un tamaño de poro $75 \mu\text{m}$ [Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition], luego se realizó una suspensión de la misma en cloroformo a una concentración 0,7 %p/v. Dicha muestra se sometió a disgregación mecánica utilizando un equipo ultraturrax a 20500 rpm durante 10 minutos 3 veces y luego se subió potencia a 24000 rpm durante 5 minutos 3 veces, en todo momento bajo un baño de hielo. A continuación la suspensión se volcó en un cristizador y el solvente fue evaporado y secado hasta peso constante en vacío.

La HAP recuperada fue caracterizada nuevamente por FTIR, EDAX y SEM para evaluar cambios

en su composición y tamaño de partículas.

1.6.-Preparación de las películas de polímero:

Para llevar a cabo experimentos con células osteoblásticas en cultivo, se prepararon matrices de los homopolímeros PCL, PFIP y mezcla PCL-PFIP compatibilizada. Este tipo de muestras nos permite evaluar con un microscopio óptico la morfología y el crecimiento de estas células. Las matrices de polímero fueron preparados por el método de colada de soluciones o *solvent casting*. Para ello, se preparó una solución de la mezcla de polímeros (física o compatibilizado) o de los homopolimeros en cloroformo (5% p/v) y se volcó en placas de Petri de vidrio (19.6 cm^2). El solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente y luego las películas resultantes se secaron en un tambor de vacío hasta peso constante. Las películas fueron esterilizadas por la exposición a luz

UV durante 2 h, previa inmersión en alcohol etílico al 70 %.

De manera similar se prepararon matrices PCL y mezcla PCL-PFIP compatibilizada con 1% en peso de HAP.

1.7.- Evaluación de la distribución de las partículas de HAP en las matrices poliméricas:

Un hecho muy importante en el diseño de las matrices, es conocer la distribución de las partículas de HAP en las matrices poliméricas una vez preparadas las películas. Con este fin, las mismas fueron sometidas a tinción con el colorante Rojo de Alizarina (1,2-dihydroxiantraquinona, ICN). Este colorante tiene alta afinidad por Ca^{+2} , constituyente de la HAP [Ueno, 2001]. Para este fin, un trozo de las matrices cortadas se cubrió con rojo de alizarina (ver preparación en 2.6.- *Diferenciación de células MC3T3-E1*) durante 5 minutos, luego se quitó el exceso del colorante y lavó varias veces con agua, se montaron las películas

teñidas sobre un portaobjeto y se observó al microscopio óptico.

2. *Estudios in Vitro:*

2.1.-Cultivo celular:

Para los estudios de biocompatibilidad y citotoxicidad se utilizaron células de tipo osteoblástico y macrófagos murinos. Las células se mantuvieron en frascos de 75 cm² de superficie en atmosfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ y a 37 °C en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Laboratorio MicroVet S.A., Buenos Aires, Arg.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GBO Argentina S.A., Buenos Aires, Arg.), 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin en estufa de cultivo. Los cultivos fueron visualizados utilizando un microscopio invertido.

Cuando las monocapas celulares llegaron a subconfluencia, se cosecharon de la superficie del frasco con una solución de 0,25 % p/v de tripsina en PBS a pH=7.4

suplementado con 1mM de EDTA. Las células se resuspendieron en el medio de cultivo DMEM -10%SFB. Las células empleadas fueron MC3T3-E1, UMR-106 y RAW 264.7.

2.1.1.-MC3T3-E1 (ATCC CRL-2593):

Las células MC3T3-E1 pre-osteoblásticas, corresponden a una línea celular no transformada derivada de calvaria de ratón recién nacido (*Mus musculus*). Su morfología es fibroblástica y adherente.

Esta línea celular tiene la característica de poseer dos fenotipos secuenciales [Sudo, 1983; Takeuchi, 1993; Quarles, 1992; Franceschi, 1992 y 1994; Wang, 1999].

Una primera etapa proliferativa, donde las células se dividen exponencialmente en el medio de cultivo antes mencionado.

Cuando al medio de cultivo se lo suplementa con β -glicerofosfato (5 mM) y ácido ascórbico (25 mg/L) [Franceschi, 1992], las células se

diferencian, pasando de un fenotipo pre-osteoblástico a osteoblástico, expresando elevados niveles de marcadores típicos del fenotipo osteoblástico como ser la síntesis de colágeno tipo 1 y actividad de fosfatasa alcalina.

2.1.2.-UMR-106 (ATCC CRL-1661):

Esta línea celular, a diferencia de la anterior, es una línea clonal derivada de osteosarcoma de rata (*Rattus norvegicus*) inducida por inyección del radioisótopo ^{32}P , de morfología epitelial y adherente [Forrest, 1985]. Expresa varios marcadores del fenotipo osteoblasto, tales como la enzima fosfatasa alcalina y síntesis de colágeno tipo I.

2.1.3.-RAW 264.7 (ATCC TIB-71):

Este tipo celular es derivada de macrófagos de ratón (*Mus musculus*), establecida a partir de un tumor inducido por el virus de leucemia Abelson. Su morfología es monocítica y adherente [Raschke,

1978]. Expresa distintos marcadores de actividad celular, como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) [Denlinger, 1996]. Por estas características constituyen un excelente modelo para estudios de citotoxicidad de distintas sustancias sobre sistemas biológicos.

2.2.- Adhesión y proliferación:

Con el objetivo de conocer la adhesión y la proliferación de las células sobre las membranas preparadas en este trabajo de tesis, se realizó el siguiente experimento.

Se cortaron membranas de los polímeros de dimensiones aproximadas de 3 cm x 3 cm y se colocaron en plato de 6 pocillos. Se esterilizaron como se describió anteriormente. A continuación, se plaquearon las células MC3T3-E1 ó UMR-106 en medio de cultivo DMEM-10%SFB y se incubaron durante 1 hora (adhesión) o 24 horas (proliferación) a 37 °C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% de

CO₂. Luego de este periodo de incubación, se sacó el medio de cultivo, se lavaron las matrices con las células con solución buffer fosfato (PBS), se fijó con metanol absoluto durante 5 minutos, se lavó con agua destilada se tiñó con Hematoxilina (Hematoxilina "activada", lista para usar, Biopur, Rosario, Arg.) durante 3 a 5 minutos y se lavó con agua corriente por 2 o 3 minutos para lograr que la hematoxilina vire al azul (tiñendo estructuras ácidas o basófilas en tonos azules, por ejemplo los núcleos de las células). Finalmente, las células se tiñeron con Eosina (Biopack, Arg.) por 1 o 2 minutos (tiñendo estructuras básicas o acidófilas en tonos rosas como el citoplasma celular), se lavaron con agua destilada y se visualizaron al microscopio óptico. Se contó la cantidad de células de alrededor en 15 campos/muestra con un aumento de 40X. Los resultados se expresan como porcentaje (%) del control \pm SEM, donde $SEM = Ds \times (n-1)^{-1/2}$, siendo SEM el Error estándar de la

media, D_s el desvío estandar y n el número de repeticiones o de muestras. El control son las células crecidas durante los mismos periodos sobre los platos de cultivo.

2.3.- Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP):

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP), un marcador del fenotipo osteoblástico asociada a la capacidad de formación ósea, se evaluó sobre extractos de las células crecidas sobre las diferentes matrices. Para este fin las células UMR-106 y MC3T3-E1 se plaquearon y cultivaron durante 24 hs. A final de este periodo de incubación, se eliminó el medio de cultivo, se lavó con PBS y se lisaron las células con Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Arg.) 0,1% v/v en agua destilada. De esta forma se obtuvo un extracto de las células crecidas sobre las películas de los polímeros. Sobre este extracto, se midió la ALP [Cortizo, 1995] y la concentración de proteínas

mediante el método de Bradford [Bradford, 1976].

La actividad de ALP de los extractos se determinó por incubación de una alícuota del mismo con el sustrato p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Arg.) [2,3 mg/ml] en buffer glicina [glicina 55 mM, $MgCl_2$ 0.55 mM, pH=10.5] a 37°C durante un periodo de tiempo adecuado. La producción de p-nitrofenol se evaluó mediante espectrofotometría a longitud de onda de 405 nm.

2.4.- Producción de colágeno tipo I:

Otro marcador fenotípico osteoblástico evaluado sobre las membranas fue la producción de colágeno tipo I.

Para ello, se lavaron las membranas con PBS luego de incubar las células 24 hs sobre ellas. Se cubrieron las membranas durante 30 minutos con solución fijadora de Bouin (Ácido pícrico, formol y Ac.

Acético en proporción [15:5:1]) y luego de lavar con agua destilada, se cubrió con Sirius red (Sigma-Aldrich Buenos Aires, Arg.) 0,1% p/v en solución acuosa saturada con ácido pícrico durante 60 minutos [Junqueira, 1979; Tullberg-Reinert, 1999]. Este colorante aniónico tiene una alta afinidad a través de sus grupos sulfónicos por los grupos básicos de la molécula de colágeno.

Trascurrido este tiempo se retiró el exceso del colorante, se lavó con HCl 0,01 N y se extrajo con HONa 0,1 N. De este extracto se tomó una alícuota para medir concentración de proteínas mediante el método de Bradford y otra alícuota para evaluar la cantidad de colágeno tipo I, mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 550 nm.

2.5.- Producción de proteínas totales:

De las alícuotas obtenidas de los ensayos 2.3 y 2.4, se evaluó el contenido de proteínas mediante el método de Bradford [Bradford,

1976]. Para esto se usó unas alícuotas del extracto celular total, a la que se agregaron 2 ml de reactivo de trabajo Bradford (reactivo de Bradford: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250 en 50 ml de etanol al 95%, 100 ml de ácido fosfórico 85% (w/v). Reactivo de trabajo Bradford = 1 vol de reactivo de Bradford + 4 vol de agua destilada). A esta preparación se agregó un volumen de la alícuota y se midió la cantidad de proteínas utilizando espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm.

2.6.- Diferenciación de células MC3T3-E1:

Sobre las membranas de los polímeros, se cultivaron células MC3T3-E1 hasta alcanzar la confluencia. A continuación se las indujo a diferenciarse utilizando un medio de cultivo osteogénico [DMEM-10%SFB suplementado con β -glicerofosfato (5 mM) y ácido ascórbico (25 mg/L)] durante 7 y 15 días. Al cabo de estos períodos de cultivo, se evaluó la actividad de

ALP y producción de colágeno tipo I.

Los nódulos mineralizados en la matriz extracelular debido osteoblastos MC3T3-E1 se observaron [Ueno, 2001] tiñendo con Rojo de alizarina S de la siguiente forma: luego de lavar las células crecidas sobre las matrices con PBS, se fijó las células con formalina al 10 % p/v en PBS durante 10 minutos, luego se lavó con agua destilada y se coloreó durante 10 minutos con rojo de alizarina (2% p/v en agua, pH=4,2). Luego de quitar el colorante, se lavaron las matrices y se solubilizó el colorante con NaOH 0,1 N. Sobre este extracto se realizó la cuantificación de proteínas utilizando espectrofotometría a una longitud de onda de 548 nm.

No fue posible evaluar la formación de nódulos mineralizados, mediante las técnicas de rojo de Alizarina ó de von Kossa, debido a que algunas membranas contienen HAP que se tiñen con

ambos colorantes debido al contenido de Ca y P.

2.6.1.- Expresión de RUNX-2:

Las células MC3T3-E1 se cultivaron durante un periodo de dos o tres semanas sobre las matrices en DMEM 10% FBS, diferenciándose en osteoblastos como se describió anteriormente. Al final de los períodos de cultivo, las células fueron lisadas en buffer de Laemmli [Laemmli, 1970]. Estos lisados se calentaron a 100 °C durante 3 min y se sembraron 30 µg de proteínas del extracto a fin separarlas por electroforesis mediante un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) al 12%. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF (Fluoruro de polivinilideno). Después de lavar y de bloquearlas con 1% de albúmina en PBS, las membranas fueron incubadas durante la noche a 4 °C con un anticuerpo dirigido contra Cbfa-

1/Runx-2 (Biotecnología de Santa Cruz, Santa Cruz, CA, EE.UU.) para la evaluación de osteoblastogénesis [Molinuevo, 2010]. Con el fin de normalizar los resultados, todas las manchas fueron despojadas del primer anticuerpo y re-determinadas con un anticuerpo anti β -actina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Las membranas de PVDF fueron reveladas mediante el método de quimioluminiscencia. La intensidad de las bandas específica fue cuantificada mediante densitometría, tras el análisis de la película fotográfica. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Scion-beta 2.

2.7.-Inmunofluorescencia para fibras de actina:

A fin de evaluar la interacción de las células con las matrices poliméricas, se estudio la organización de las fibras de actina de las células crecidas sobre la membrana. Para esto, las células UMR-106 y MC3T3-E1 se incubaron durante 24 hs y luego de este

periodo de cultivo se fijaron con p-formaldehido durante 10 minutos. Luego de un breve lavado con PBS, se permeabilizó las membranas citoplasmáticas de las células con metanol frío durante 5 minutos y se lavó con PBS. Las uniones inespecíficas se bloquearon con albúmina sérica bovina [3% en PBS] durante 30 minutos. Finalmente se agregó la Paloidina-FITC (Molecular Probes, Buenos Aires, Arg.) [1:200] durante 1 hora a la oscuridad. Con el fin de visualizar los núcleos de las células se agregó Ioduro de Propidio (Molecular Probes, Buenos Aires, Arg.). Finalmente, se montaron las matrices con las células entre porta y cobre objetos utilizando glicerol:PBS (9:1) y se visualizaron en microscopio confocal Leica.

2.8.-Producción de óxido nítrico (NO):

El óxido nítrico o monóxido de nitrógeno (NO), es un efector de la respuesta inmune innata, producido por la enzima NO sintasa-2 (NOS-2)

o NO sintasa inducible (iNOS) de los macrófagos en respuesta a la presencia de diversos patógenos [Lowenstein, 2004].

Se utilizó el método de Greiss [Tsikas, 2005; Tsikas, 2007] para medir la liberación de NO en el medio de cultivo de los macrófagos RAW-264.7 crecidos sobre las matrices. Para ello, se incubaron dichas células en medio de cultivo DMEM sin rojo de fenol y durante diferentes períodos de incubación. Al cabo de estos tiempos, se tomó el medio de cultivo y se dosó el producto final estable del óxido nítrico. El método utiliza como agente de diazotación ácido Sulfanílico (1 gr en 100 ml de ácido Fosfórico al 5%. Reactivo A) y como agente de acoplamiento el N-1-naftilén diamina (100 mg en 100 ml de agua destilada. Reactivo B). El reactivo de Greiss se prepara mezclando volúmenes iguales de reactivo A y reactivo B. Luego para llevar a cabo la reacción se mezcló el reactivo de Greiss con el medio de

cultivo en proporción 1:1 y se midió la cantidad de nitrito liberado al medio por las células utilizando espectrofotometría a longitud de onda de 550 nm.

2.9.-Producción de citoquinas:

Al igual que la síntesis de NO, los macrófagos producen y liberan al medio, diversas citoquinas pro inflamatorias cuando se encuentran con sustancias toxicas. Es así, que se midió la liberación al medio de cultivo de las citoquinas Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) e Interleuquina 1 (IL-1) de las células RAW-264.7 cultivadas sobre las matrices de los polímeros mediante la técnica de ELISA. Para esto se utilizaron kit comerciales: *Mouse IL-1 β ELISA Set, BD Biosciences OptEIA™* para IL 1 y el kits *Mouse TNF- α ELISA Set, BD Biosciences OptEIA™* para TNF α , utilizando 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) del 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 la medición de NO. Para esto se utilizó una placa de 96 pocillos (NUNC Maxisorp®), a la cual se agregó el anticuerpo de captura en una concentración de 1:250 en el buffer específico para cada anticuerpo de captura (TNF α : buffers 11,8g Na_2HPO_4 , 16,1gr NaH_2PO_4 en 1 litro de agua destilada, pH=6,5; IL-1: 7,13gr NaHCO_3 , 1,59gr Na_2CO_3 en 1 litro de agua, pH=9,5 con NaOH 10 N). Se incubó en heladera toda la noche en una cámara húmeda. Luego de este período de incubación, se lavó 3 veces con PBS-0,05% Tween 20. Luego de esto se bloqueó con PBS-10% v/v SFB durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, se lavó 2 veces con PBS-0,05% v/v Tween 20 y se agregó la muestra, incubándose durante 2 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al cabo de este tiempo, se lavó 5 veces con PBS-0,05% v/v Tween 20 y se colocó el anticuerpo de detección a

una concentración de 1:500 en PBS-10% v/v SFB, incubando durante 1 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, se lavó 5 veces con PBS-0,05% v/v Tween 20 y se agregó el reactivo enzimático provisto por el kits a una concentración de 1:250 en PBS-10% v/v SFB durante 30 minutos. A continuación se lavó 7 veces con PBS-0,05% v/v Tween 20 y se agregó la solución sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) del kits a temperatura ambiente y en la oscuridad. Transcurrido un tiempo adecuado, generalmente de 3 a 30 minutos, se agregó la solución de stop (HNO_3 8N) y se leyó en un lector de ELISA a las longitudes de onda de 450 y 540 nm.

3. *Degradación:*

Como se explicó en los capítulos Introducción y Objetivos, fue parte de este trabajo desarrollar materiales que sean reemplazados a medida que se regenere el tejido óseo, por lo que es muy importante, conocer los tiempos de degradación

de las membranas de los polímeros. Con este fin se realizaron estudios con el objetivo de analizar el grado de degradación de las películas en DMEM-10% v/v SFB, cortando las muestras y colocándolas en platos de 24 pocillos. Luego de esto, se agregó el medio de cultivo DMEM-10%v/v SFB y se colocó en estufa de cultivo a 37 °C y con una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂.

Se tomaron muestras cada semana, renovando el medio de cultivo, durante 10 semanas y se calculó el porcentaje de pérdida de peso según la fórmula (1).

$$\%W = (W_o - W_t) \times 100 / W_o \quad (1)$$

Donde W_o es el peso inicial de la muestra y W_t es el peso de la muestra a tiempo t de degradación.

4. *Propiedades mecánicas:*

Como se explicó en la Introducción, un requisito muy importante para la aplicación de los materiales en el área de la Ingeniería de Tejidos, son las propiedades mecánicas. Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de las distintas membranas, se realizaron pruebas de tracción.

Las muestras (5 muestras por membranas) fueron cortadas con forma de "hueso de perro" (50 x 18 mm²). La velocidad de ensayo fue de 5 mm/min hasta el punto de ruptura. Resistencia última a la tracción, el módulo elástico y deformación en el punto de ruptura (también llamado, Breaking strength) se calcularon sobre la base de las curvas (figura 2) generadas en las pruebas de tensión-deformación.

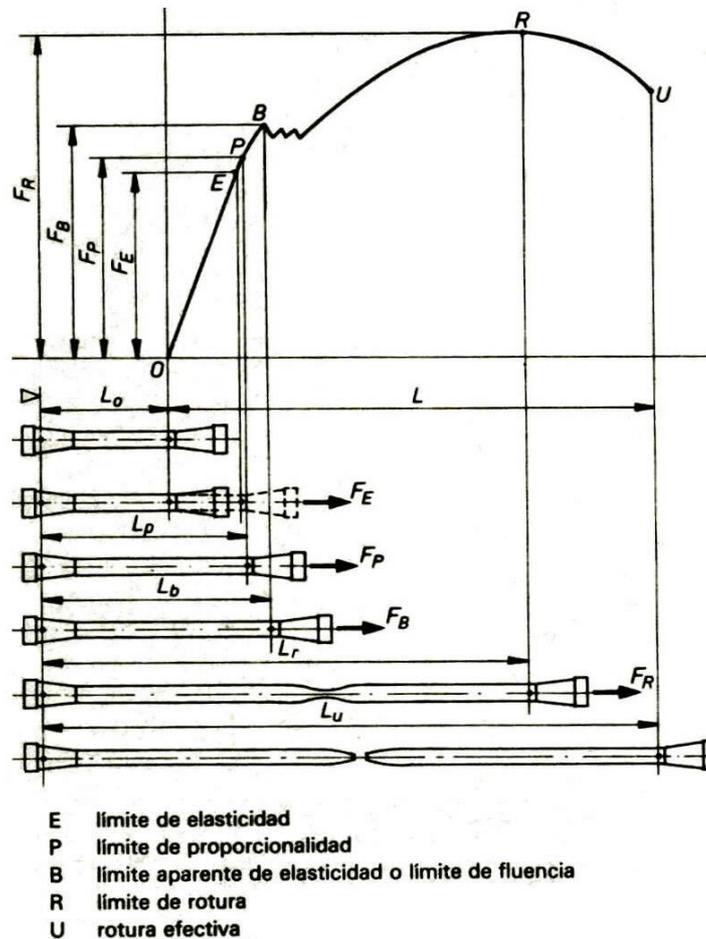


Figura 2: Ejemplo de gráfica de ensayo de tensión (stress) - deformación (strain) [http://wikitecno.wikispaces.com/TI_diagrama_de_tracción].

5. Tensión superficial:

Con el fin de conocer la hidrofobicidad de las membranas de los polímeros y poderla relacionar con los ensayos de biocompatibilidad, se realizaron pruebas de tensión superficial sobre las matrices, a partir de mediciones del ángulo de contacto (WCA). Todas las pruebas fueron realizadas en la interfase superficie-aire. Se realizaron seis mediciones en

diferentes puntos para calcular el ángulo de contacto.

En la figura 3 se representa una gota de agua sobre un material sólido. Se observa la descomposición de fuerzas entre las distintas interfaces teniendo como resultante el ángulo θ conocido como ángulo de contacto.

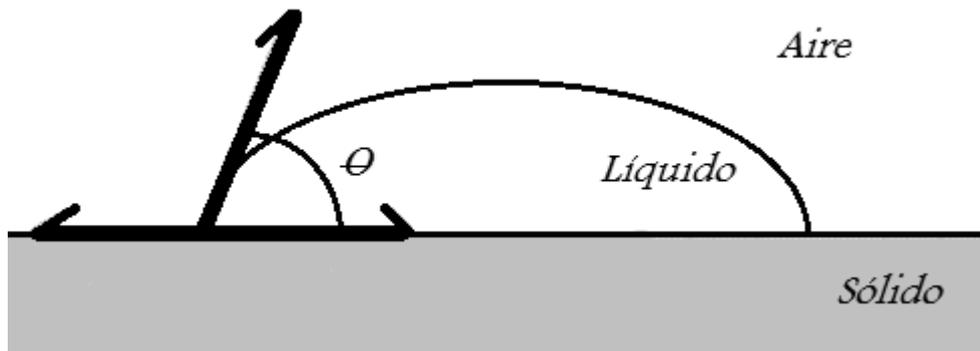


Figura 3: Determinación del ángulo de contacto.

6. *Análisis estadístico:*

El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante *t-test student* de dos muestras asumiendo varianzas iguales y mediante ensayos de ANOVA usando un único factor para comparar las muestras. Los datos se consideraron significativos cuando la probabilidad (p) < 0,05.

7. *Equipamiento:*

1. Horno de microondas doméstico Zenith, modelo ZVP-2819, con potencia máxima de 700 W.

2. Equipo de Ultrasonido Bandelin HD60.

3. Equipo Ultraturrax T25 Janke & Kunkel.

4. Cromatógrafo de exclusión molecular LKB-2249. Se utilizó una serie de 4 columnas μ -Styragel, que varían en tamaño de poro (10^5 , 10^4 , 500, 100 Å) y empleando cloroformo como eluyente. La concentración de polímero fue del orden de 5-7 mg ml⁻¹ y la velocidad de flujo fue de 0,5 ml min⁻¹. Se utilizaron 2 detectores en serie UV-Visible Shimadzu, seleccionado a una $\lambda=320$ nm para la detección del grupo cromóforo. El segundo detector, es un Infrarrojo (Miram 1A) fue seleccionado a una $\nu=5,75$ μm , frecuencia característica de los grupos carbonílicos del éster. La calibración se realizó siguiendo el procedimiento general con

estándar de polimetil metacrilato (PMMA)

5. Nicolet 380 FTIR entre las frecuencias 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} y una acumulación de 32 scans. Para el análisis de los espectros obtenidos se utilizó el software EZ-OMNIC.

6. Equipo universal de ensayos de tracción-compresión Digimes TC500 con una celda de carga ("Interface" de Arizona, EE.UU.) de capacidad de 50N (SM-50N) a temperatura ambiente.

7. Se utilizó un instrumento Ramé-Hart Modelo 500 goniómetro (Ramé-Hart Instrument co., USA) para la medición de WCA. Las imágenes fueron analizadas con DROP image avanzadas de software v2.2.

8. Microscopio Electrónico de Barrido Phillips 505, con una aceleración de voltaje de 20 kV. Las imágenes obtenidas fueron

analizadas con el software Soft Imaging System ADDAII. Además, la relación Ca/P fue evaluada mediante un detector de análisis de espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDAX) adicionado al SEM.

9. Microscopio óptico Nikon Eclipse E400, utilizando una cámara Nikon Coolpix 4500.

10. Microscopio invertido Nikon Eclipse TS100.

11. Microscopio Confocal LeicaTSC SP5 AOBS, perteneciente al consorcio conformado en la Facultad de Cs. Exactas, U.N.L.P.

12. Estufa de cultivo CO_2 Incubator HF 151 UV Heal Force®.

13. Espectrofotómetro Zeltec modelo ZL 5000 y PG Instruments modelo (UV-Visible spectrophotometer).

14. Lector de placas de ELISA Sirio S SAECS, Radim Company, Buenos Aires, Argentina.

Capítulo 4

Resultados

"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo."
Albert Einstein

Capítulo 4: Resultados.

1. *Obtención de las membranas*

PCL y PFIP:

Antes de obtener la mezcla compatibilizada entre PCL y PFIP, se caracterizaron las membranas de los homopolímeros por separado, evaluando la topografía de las mismas. Luego se realizaron ensayos de adhesión y proliferación celular para conocer la influencia de los homopolímeros sobre el crecimiento celular.

De acuerdo al punto 1.6 del capítulo de Materiales y métodos, las primeras membranas obtenidas fueron de los polímeros poliepsilon-caprolactona (PCL) y polifumarato de di-isopropilo (PFIP), obtenidas mediante el método de casting usando cloroformo como solvente.

1.1.-Caracterización:

Ambas membranas fueron caracterizadas mediante la utilización de microscopia electrónica de barrido (SEM). La figura 1 presenta las fotografías en las que se pueden observar las características de superficie de las membranas de los polímeros obtenidas por el método casting. En ellas se puede observar las diferencias topográficas entre las membranas de los homopolímeros. La película obtenida de PFIP, posee una superficie muy homogénea y lisa, mientras que la obtenida a partir de PCL presenta algunos poros de aproximadamente unos 40 a 50 μm de diámetro. Se observan también estructuras cristalinas con forma de esferulitas de diámetros variables.

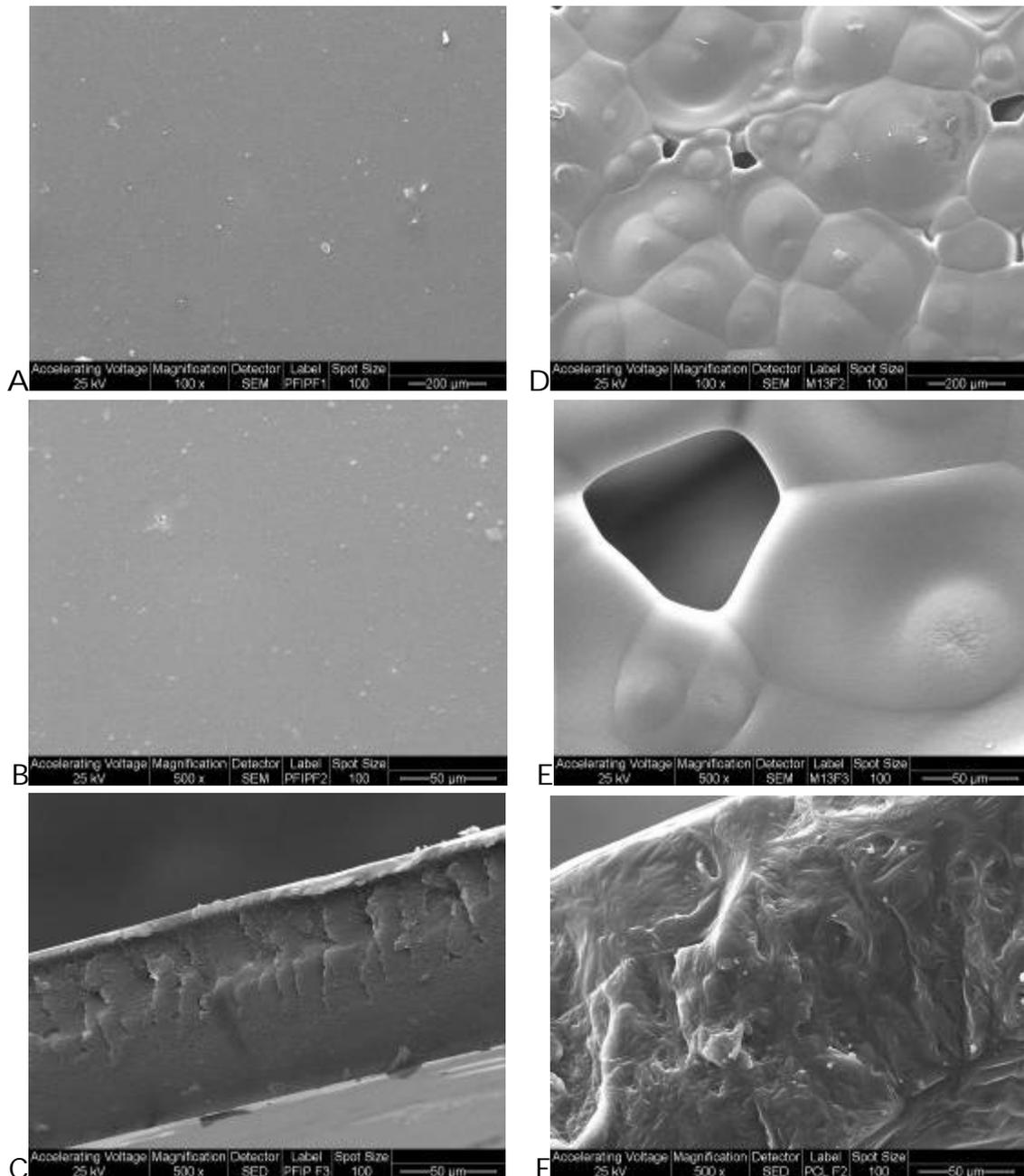


Figura 1: Micrografías de SEM de las membranas PFIP [A, B y C] y PCL [D, E y F]

En la figura se muestran también los perfiles transversales de las membranas (Figura 1 C y 1F). Se puede notar que las membranas son homogéneas no sólo en la superficie sino también en el seno de ellas. En la membrana de PCL se observa,

además, que hay algunos poros dentro de ella al igual que en su superficie. Vale aclarar que para obtener estas últimas fotografías, las películas no fueron cortadas con tijera para evitar alteraciones de los

perfiles por efectos de las presiones durante el corte.

1.2.-Biocompatibilidad:

1.2.1.-Adhesión y proliferación:

Para estos estudios las células UMR-106 y MC3T3-E1 fueron crecidas sobre las matrices, fijadas con metanol y teñidas con Hematoxilina y Eosina a los tiempos de 1 hora de incubación celular para evaluar adhesión y 24 horas para

proliferación usando como control (en los mismos períodos de tiempo) las células crecidas sobre un disco de plástico de cultivo de tejido estándar.

1.2.1.1-UMR-106:

La figura 2 muestra los resultados del ensayo de adhesión y proliferación de las células UMR-106 crecidas sobre las membranas de los homopolímeros PCL y PFIP.

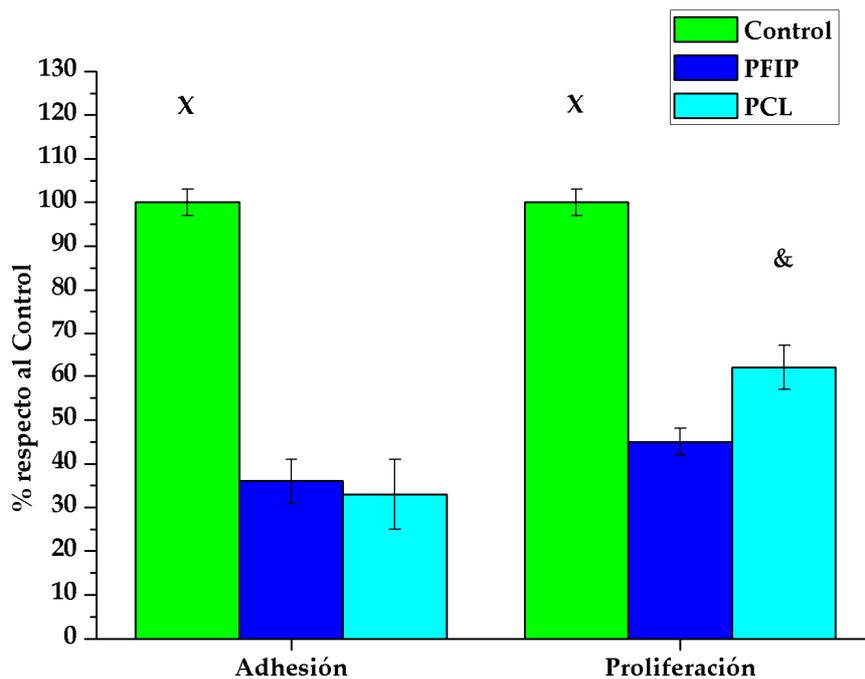


Figura 2: Adhesión y proliferación de las células UMR-106 en las membranas de PCL y PFIP.

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM.

Se puede observar una menor adhesión de las células UMR-106 (36 \pm 5 % respecto al control; X:

p<0,001) sobre la membrana de PFIP al igual que con las matrices de PCL (33 \pm 8 % respecto al control; X: p<0,001). No se encontraron

diferencias significativas en la adhesión celular entre los homopolímeros.

En cuanto a la proliferación celular, se puede observar también un menor crecimiento celular sobre ambos homopolímeros (PCL: 62 ± 5 % respecto al control; #: $p < 0,05$ y PFIP: 45 ± 3 % respecto al control; X: $p < 0,001$). Por otro lado, encontramos que las células proliferaron alrededor de 40% más sobre las películas de PCL que sobre las de PFIP (&: $p < 0,01$). En la figura 3 se

puede observar el aspecto de las células teñidas con Hematoxilina y Eosina al microscopio óptico. Las células adheridas a estas matrices poliméricas muestran una morfología redondeada con extensiones de filopodios. Algunas parecen estar incluidas dentro de las películas. Por otro lado, los osteoblastos adheridos a la matriz de PFIP se ven más picnóticos, de forma redondeada y se distribuyen en forma aislada o formando grupos de células en la superficie.

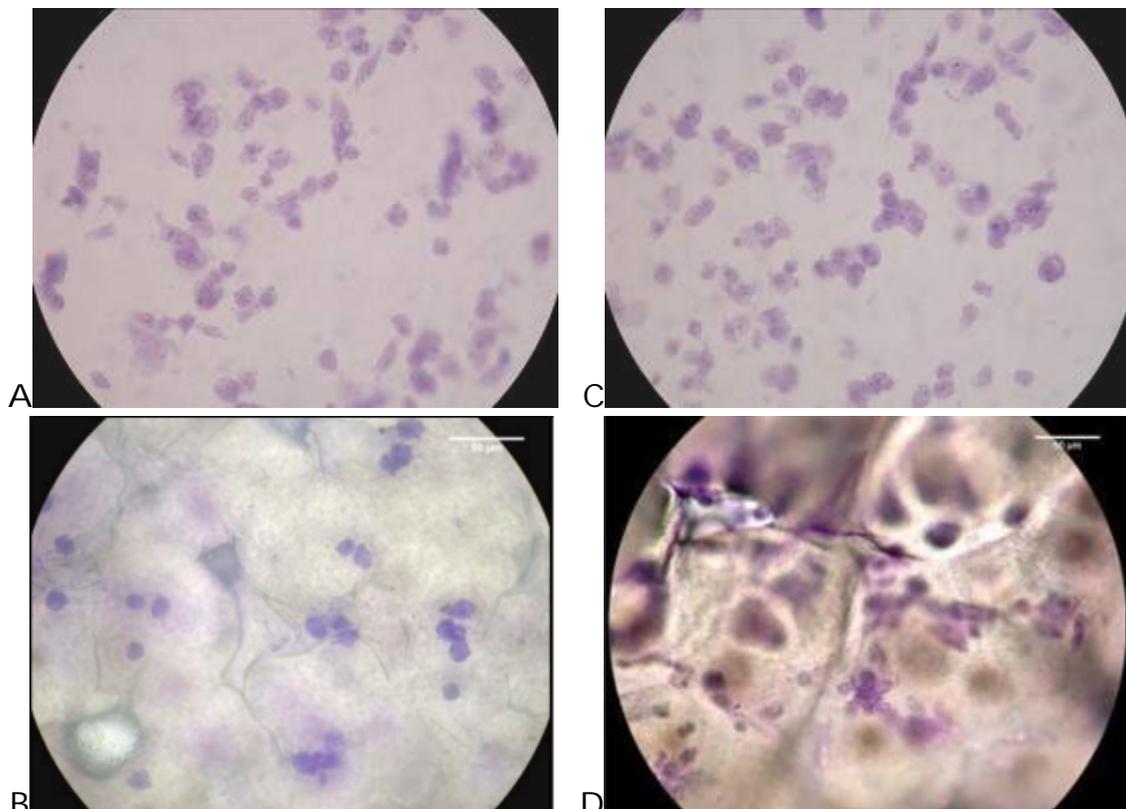


Figura 3: Células UMR-106 crecidas en PCL y PFIP. A, B Adhesión. C y D Proliferación. A y C PFIP. B y D, PCL. Obj 40x

1.2.1.2.-MC3T3-E1:

Al igual que las UMR-106, se sembraron células MC3T3-E1

evaluando su adhesión y proliferación (figura 4) después de ser teñidas con Hematoxilina y Eosina.

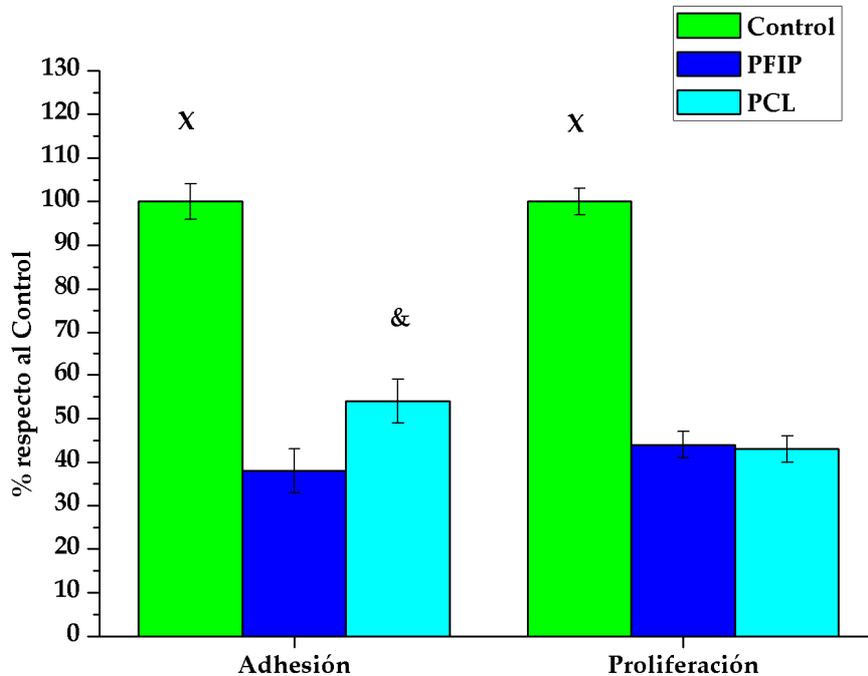


Figura 4: Adhesión y proliferación de las células MC3T3-E1 en las membranas de PCL y PFIP.

La figura 4 muestra los resultados de los ensayos de adhesión y proliferación de las células MC3T3-E1 crecidas sobre las membranas, en donde la adhesión fue significativamente menor en las membranas de PFIP ($38\pm 5\%$; X: $p < 0,001$) y PCL ($54\pm 5\%$; &: $p < 0,01$) respecto al control. La adhesión en PCL fue mayor que sobre los films

de PFIP (alrededor de 40% del PFIP; &: $p < 0,01$).

En cuanto a proliferación, tanto en PFIP ($44\pm 3\%$; #: $X < 0,001$) y como en PCL ($43\pm 3\%$; &: $X < 0,001$) las células proliferaron menos que el control. No se observaron diferencias significativas en la proliferación entre las células MC3T3-E1 crecidas en PCL y PFIP. En la figura 5 se observa el aspecto

de las células MC3T3-E1 crecidas

sobre las membranas.

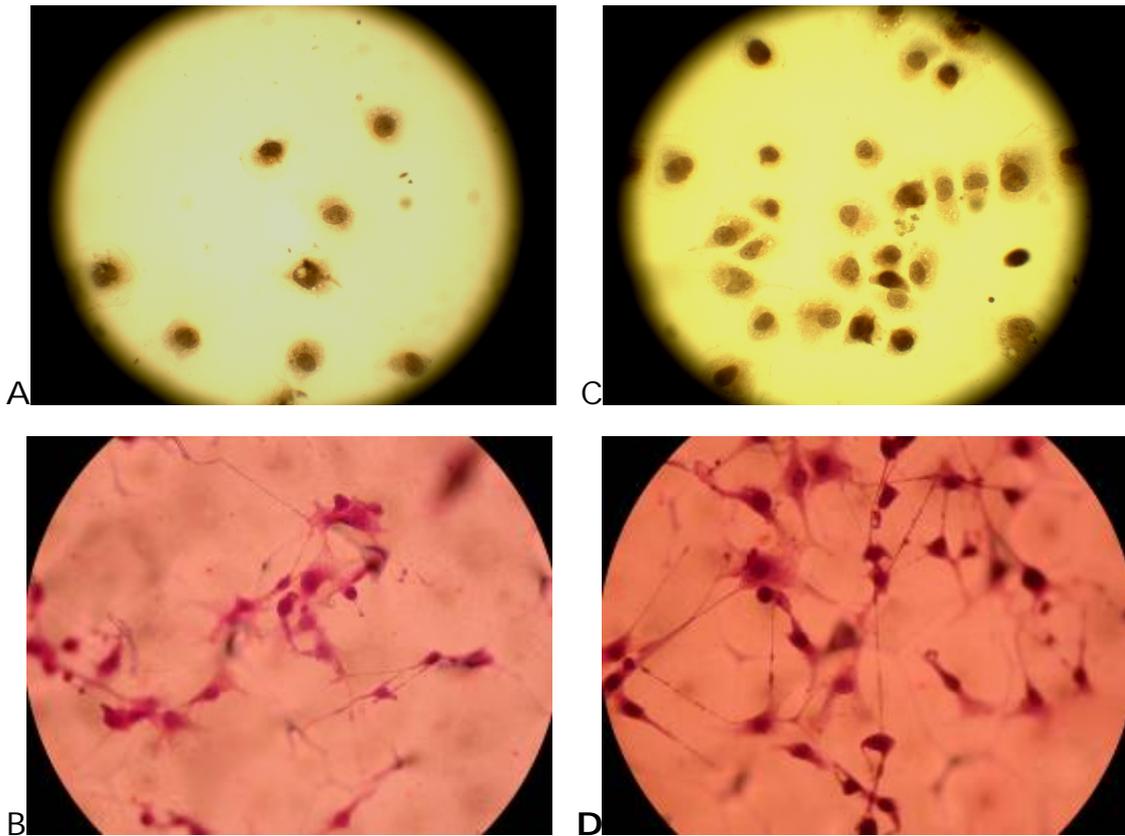


Figura 5: Células MC3T3-E1 crecidas en PCL y PFIP. A, B Adhesión. C y D Proliferación. A y C PFIP. B y D, PCL.

2. *Obtención de Mezcla Compatibilizada:*

En esta etapa se consideraron el hecho de la diferente naturaleza química y propiedades de ambos homopolímeros (PCL y PFIP). Por ejemplo, el PFIP se caracteriza por ser más vítreo que PCL, haciéndolo por lo tanto un material más rígido, frágil y quebradizo que este último. A su vez, debido a que PCL es un

poliester, posee una capacidad de biodegradación mayor que PFIP. Esta diferencia es consecuencia de la naturaleza de su correspondiente estructura catenaria. En el caso del PFIP la cadena polimérica está constituida exclusivamente por uniones C-C, mientras que el PCL posee en su estructura puentes éster, C-O-(O)C, lo que le confiere, sitios factibles de ruptura hidrolítica. Estas diferencias estructurales

explican la mayor hidrofobicidad del PFIP respecto a PCL. Como consecuencia de tales diferencias una mezcla física de tales polímeros presentará separación de fases y un deterioro de sus propiedades mecánicas. Por este motivo es muy importante poder realizar una mezcla compatibilizada entre ambos polímeros con el fin de lograr una combinación deseable de las propiedades que están a menudo ausentes en los homopolímeros.

Sin embargo, en la mayoría de los casos la simple mezcla de dos polímeros no produce buenos resultados, debido a la incompatibilidad de la misma. Algunos estudios han demostrado [Lebovitz, 2003; Oh, 2003] que debido a la aplicación de ultrasonido se forman macrorradicales por escisión de las cadenas poliméricas. Las reacciones pueden llevar a la formación de interpolímeros debido al acoplamiento de dichos macrorradicales y a la obtención de

un copolímero de tipo *block*⁷ útil para la compatibilización de la mezcla. Por este motivo, se utilizó la degradación por medio de la aplicación de ultrasonido para producir una mezcla compatibilizada entre ambos homopolímeros.

2.1.-Degradación de los homopolímeros y de la mezcla:

Como se explicó en el punto 1.3 del capítulo Materiales y métodos, se utilizó un equipo de ultrasonido para degradar las soluciones de los polímeros (1% en cloroformo). Se tomaron muestras en el proceso de degradación a distintos períodos de tiempos y se evaluó la disminución en el peso molecular promedio empleando un cromatógrafo de exclusión molecular (SEC).

El estudio de degradación se realizó sobre los homopolímeros

⁷ Un copolímero *block* es un polímero constituido por dos monómeros distintos, en los cuales todos los monómeros de un mismo tipo se encuentran agrupados entre sí, lo mismo para el otro tipo de monómeros. Se puede imaginar a un copolímero *block* como dos homopolímeros unidos.

PCL y PFIP* (PFIP contiene un grupo final fluorescente 3-phenylazobenzoilo) y sobre la mezcla PCL-PFIP* en una proporción en peso de 3:1.

En la figura 6 se pueden observar la disminución relativa de

los pesos moleculares promedio en peso (M_w) expresado como M_{wt}/M_{wo} , donde M_{wt} es el peso molecular promedio en peso del polímero luego de la degradación a tiempo t (minutos) y M_{wo} es el peso molecular promedio en peso inicial del polímero (tiempo $t = 0$).

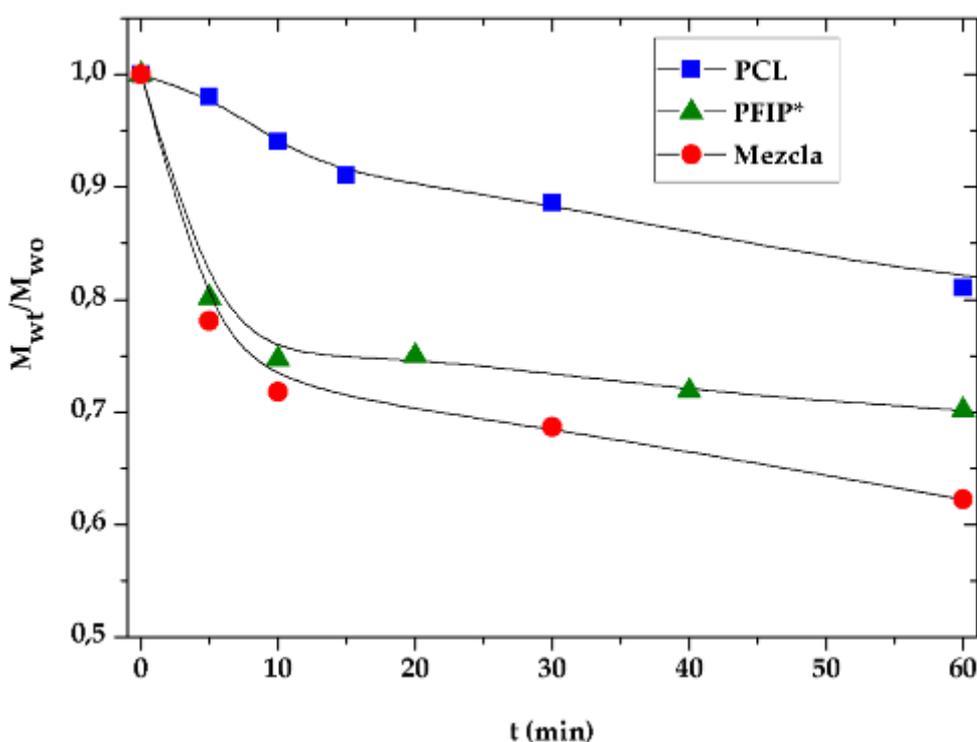


Figura 6: Degradación de los homopolímeros y de la mezcla a distintos tiempos por ultrasonido.

Tanto la mezcla como el PFIP* fueron degradados más rápido que PCL, aunque en todos los casos se observó una disminución de la tasa de degradación después de 10 minutos. Este resultado está de

acuerdo con otros estudios de ultrasonido [Lebovitz, 2003; Oh, 2003], que han informado que la escisión de la cadena alcanza un peso molecular límite, por debajo del cual no se produce una mayor degradación.

En la figura 7 se puede observar los elugramas de la mezcla PFIP*/PCL a los tiempos 0 y 60

minutos de exposición a ultrasonido.

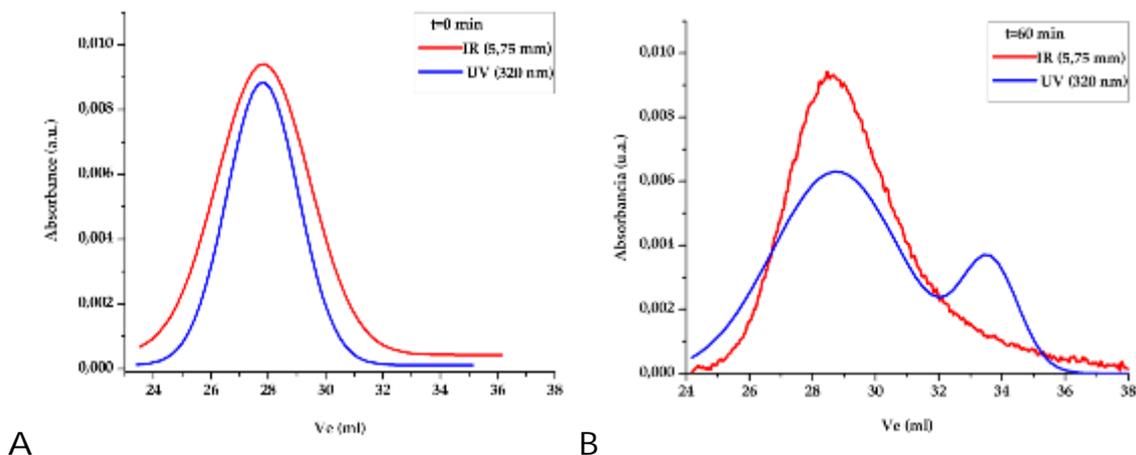


Figura 7: Elugramas de la mezcla degradada a tiempo 0 min [A] y tiempo 60 min [B]. (Ve: volumen de elución)

La formación de productos de interpolímero por acoplamiento de los macrorradicales formados por ultrasonidos se comprobó mediante el análisis de SEC de una mezcla que incluía PFIP* (Figura 7A y 7B).

grupo cromóforo derivado del iniciador. El segundo detector (en serie con el anterior) es un detector infrarrojo, seleccionado a la frecuencia específica de los grupos carbonilo de los ésteres ($5,75 \mu\text{m}$ o 1720cm^{-1}), que permite la detección de ambos polímeros (PCL y PFIP).

En el elugrama la señal de este polímero, obtenido por polimerización radicalaria con peróxido de 3-fenilazobenzoilo como iniciador, se registró empleando doble detección. El primer detector, UV-visible seleccionado a 320 nm es indicativo de las cadenas terminadas en el

El cromatograma centrado en 27,8 ml (figura 7A), representa la mezcla de los polímeros PCL y PFIP* en el momento inicial de la degradación por ultrasonido.

La figura 7B presenta el cromatograma correspondiente a

dicha mezcla luego de los 60 minutos de sonicación. Después de exponer la solución de la mezcla a la fuente de ultrasonido de alta intensidad, el cromatograma presentó una distribución bimodal de los pesos moleculares: se observan dos picos: el primero, centrado a un volumen de elución de 28,8 ml, y el segundo a un volumen de elución mayor (33,5 ml) que corresponde a un menor peso molecular. Este segundo pico puede ser atribuido a productos de reacción de los radicales generando así interpolímeros de tipo block. Aunque los productos finales no fueron aislados, la detección por UV pone en evidencia la presencia de nuevas especies conteniendo mayor relación de cromóforo por unidad repetitiva.

2.2.-Caracterización:

2.2.1.-Microscopia Electrónica:

Las figuras 8 A-D muestran las imágenes de SEM de las películas obtenidas a partir de la mezcla compatibilizada (A), una mezcla física, mezcla de PCL/PFIP 3:1 sin compatibilizar por ultrasonido (B) y los dos homopolímeros, PCL (C) y PFIP (D). La mezcla compatibilizada de PCL/PFIP (Figuras 8A) presenta una superficie más homogénea que la mezcla física. En la figura 8B se observa que en la mezcla física existe separación de fases, con una superficie irregular y rugosa que corresponde a la fase de PFIP dispersa en la fase continua de PCL.

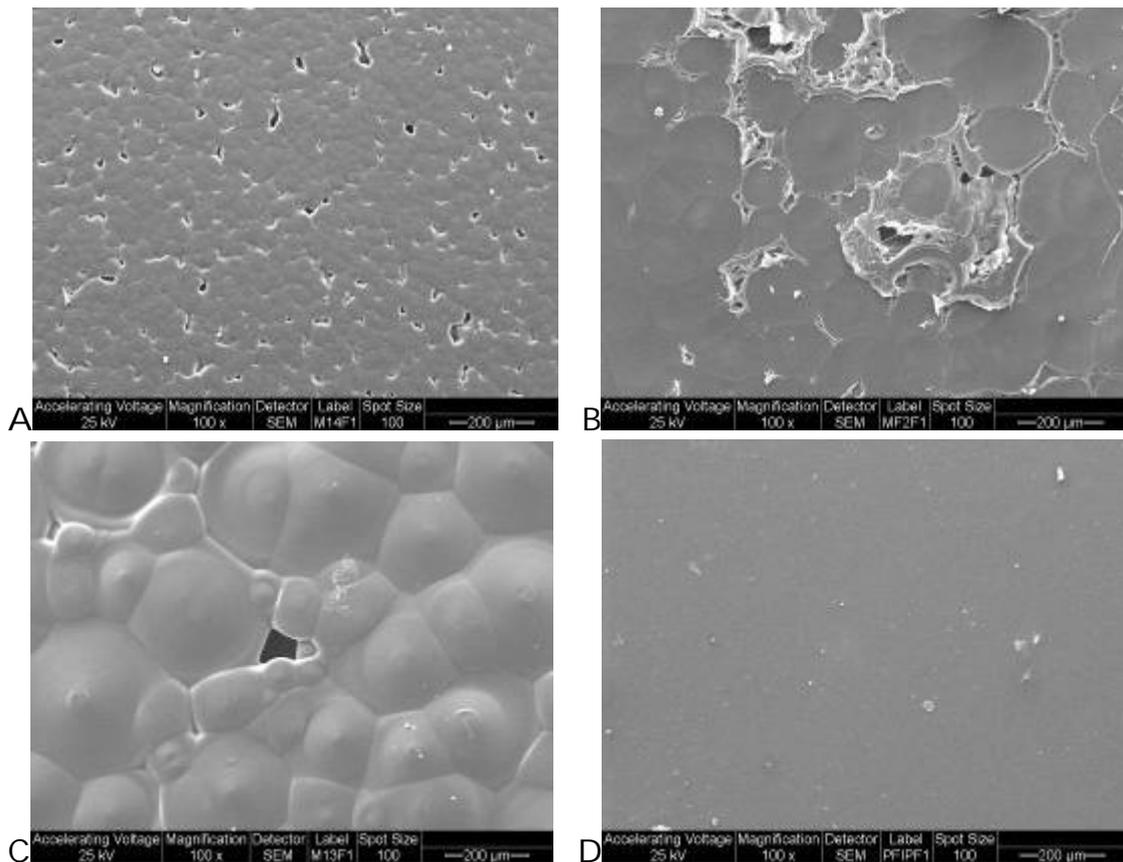


Figura 8: Microscopía electrónica de barrido de la mezcla compatibilizada [A], mezcla física [B], película de PCL [C] y PFIP [D].

Estos resultados sugieren que el tratamiento por ultrasonido es una técnica eficaz para la generación de una mezcla compatibilizada de dos polímeros no miscibles entre sí.

2.2.2.-Pruebas mecánicas:

Como se describió en el capítulo Introducción, uno de los requisitos importantes para el uso de los materiales como matrices en regeneración de tejido óseo son sus propiedades mecánicas. Estas deben

ser adecuadas para que no se colapsen durante las actividades normales de los pacientes [Rezwan, 2006].

Se sabe que el PFIP es un material frágil con una alta resistencia a la tracción, pero estas características se pueden mejorar mediante la mezcla con otros polímeros [Koinuma, 1997]. La tabla 1 muestra las propiedades mecánicas evaluadas para mezcla

compatibilizada, la mezcla física y PCL.

Muestra	Modulo elástico (MPa)	Resistencia última a la tracción (MPa)	Alargamiento en el punto de ruptura (%)
Mezcla Compatibilizada	143 ± 12	7,5 ± 0,7	60 ± 12
Mezcla Física	96 ± 16 #	6,4 ± 1,7	75 ± 4
PCL	161 ± 12	15,2 ± 1,7 #	366 ± 96 #

Tabla 1: Propiedades mecánicas de las películas mezclas PCL / PFIP compatibiliza, mezcla física PCL/PFIP y PCL.

Los datos presentados en la tabla 1 indican que la mezcla física de los polímeros PCL y PFIP posee un modulo elástico menor (#: $p < 0,05$) respecto a la mezcla compatibilizada y que el film de PCL. También se encontró una disminución de casi un 50% en la resistencia ultima a la tracción (#: $p < 0,05$), en las mezclas física y compatibilizada respecto de PCL. Respecto del Alargamiento en el punto de ruptura, se observó una

disminución de 84% y 62% en las mezclas compatibilizadas y física, respectivamente (#: $p < 0,05$) respecto de PCL.

El alargamiento al punto de ruptura, una estimación de la ductilidad de un material, mostró una disminución estadísticamente significativa en ambas mezclas, debido al agregado de PFIP, dado que este polímero es más rígido que PCL.

2.2.3.-Hidrofobicidad- hidrofilicidad:

Muchos autores [Harnett, 2007; Jansen, 2004; Liu, 2010; Tangpasuthadol, 2003; Williams, 1995; Zanchetta, 2001] sugieren que la interacción entre las membranas de los materiales y las células, en una primera instancia, depende de interacciones débiles, por ejemplo dipolo-dipolo, entre las distintas estructuras de la membrana citoplasmática y el material.

Es así que la hidrofobicidad o hidrofilicidad de las películas

obtenidas a partir de un biomaterial es un dato muy importante para el diseño de las matrices y selección de materiales.

Por este motivo se determinó el ángulo de contacto de las películas (figura 9) de los homopolímeros y de la mezcla compatibilizada.

PFIP posee un ángulo de contacto mayor ($92,6^\circ \pm 0,2^\circ$; X: $p < 0,001$) que PCL ($70,5^\circ \pm 0,2^\circ$), mientras que la mezcla compatibilizada ($75,4^\circ \pm 0,2^\circ$; X: $p < 0,001$ respecto PCL y PFIP) muestra un mayor equilibrio entre los dos homopolímeros.

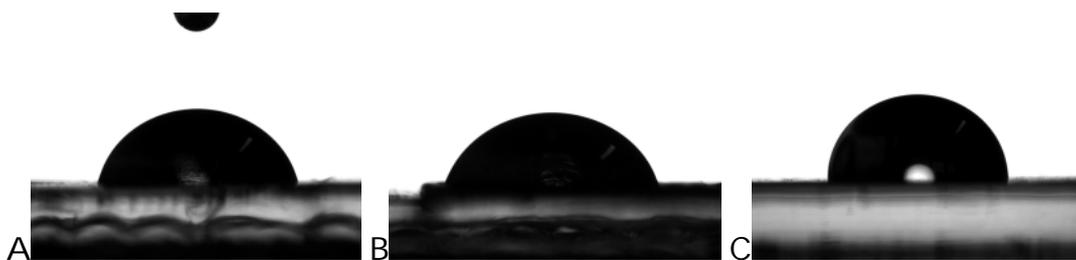


Figura 9: fotografías de ángulo de contacto de Mezcla compatibilizada [A], PCL [B] y PFIP [C].

2.3.- Biocompatibilidad:

La biocompatibilidad de la mezcla compatibilizada PCL/PFIP fue evaluada por su capacidad de soportar la adhesión y proliferación

de las células UMR 106 y MC3T3 E1 así como la diferenciación de las células MC3T3 E1 osteoblásticas.

2.3.1.-Adhesión y Proliferación:

2.3.1.1.-Células UMR-106:

La figura 10 muestra los resultados de los ensayos de adhesión y proliferación de las

células UMR-106 en las membranas. Los resultados se expresan como porcentaje de células adheridas o proliferadas respecto a la mezcla compatibilizada.

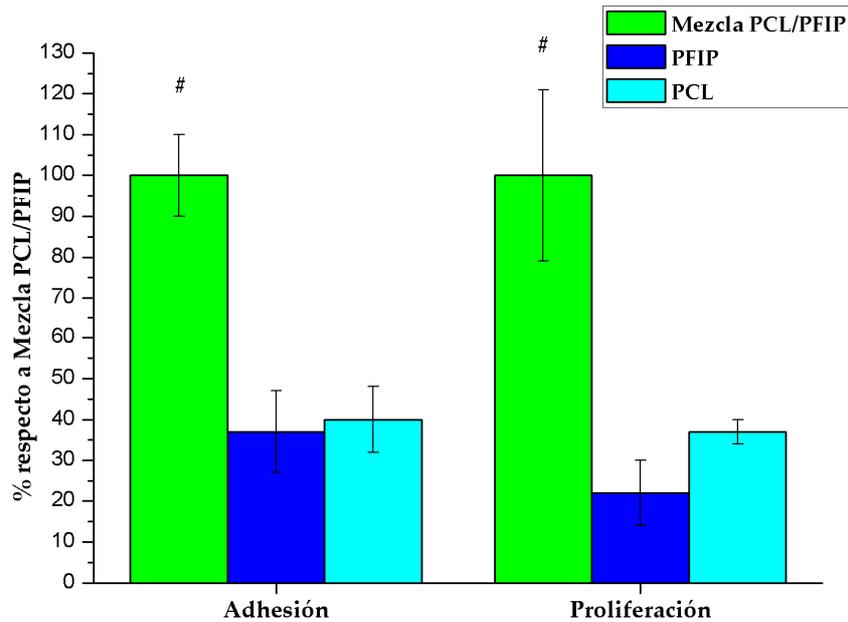


Figura 10: adhesión y proliferación de las células UMR-106 en las membranas de PCL, PFIP y mezcla compatibilizada.

De la figura anterior, se puede observar un aumento significativo (#: $p < 0,05$) tanto en la adhesión como en la proliferación de las células UMR-106 plaqueadas sobre la mezcla compatibilizada respecto a los homopolímeros.

En la figura 11 se pueden ver la morfología de las células sobre las diferentes membranas. Se puede observar la opacidad de la membrana de la mezcla compatibilizada y la del PCL.

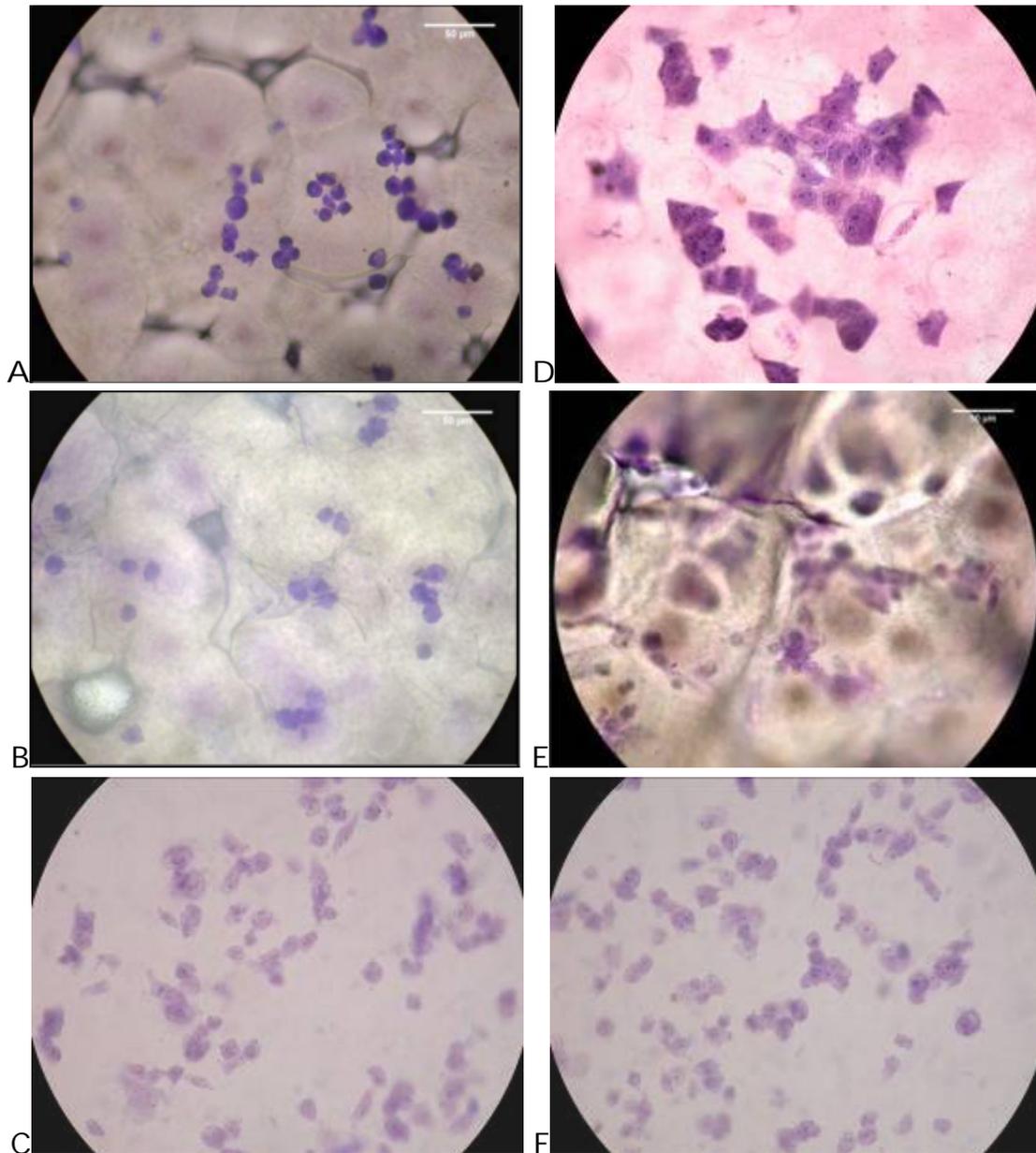


Figura 11.: Células UMR-106 crecidas en Mezcla compatibilizada, PCL y PFIP. A, B y C Adhesión. D, E y F Proliferación. A y D, Mezcla compatibilizada. B y E, PCL. C y F, PFIP. Barra de referencia: 50 μm .

En el caso de la proliferación, las células en la mezcla compatibilizada mostraron un mayor número de filopodios que en las membranas obtenidas de los

homopolímeros, estas observaciones sugieren que las células osteoblásticas crecen mejor en la mezcla de polímeros que en las películas de cualquiera de los homopolímeros.

2.3.1.2.-Células MC3T3-E1:

Al igual que las células UMR-106, se plaquearon células MC3T3-

E1 y se evaluó adhesión y proliferación. En la figura 12 se puede observar los valores relativos a la mezcla compatibilizada.

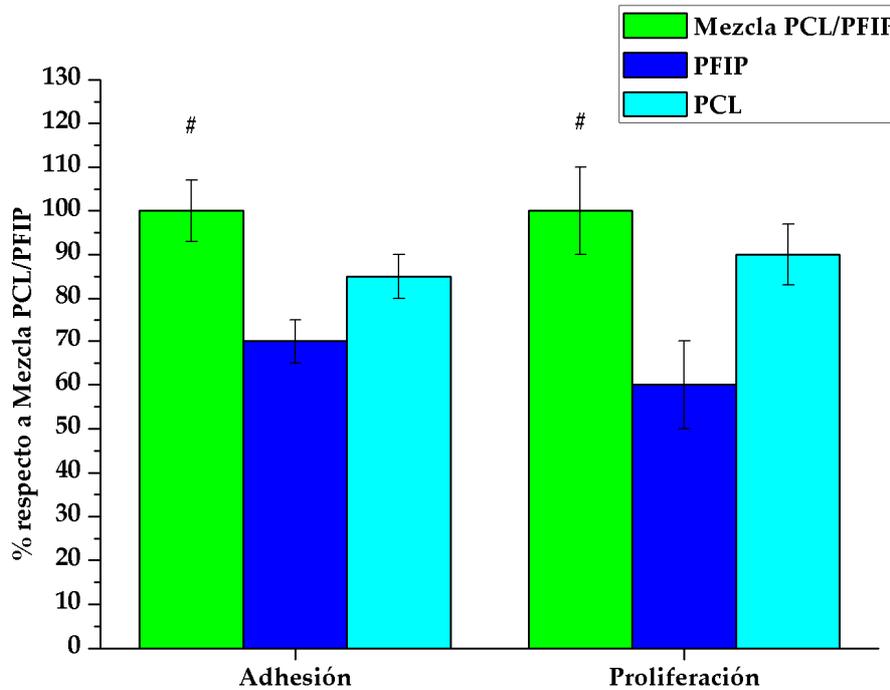


Figura 12: adhesión y proliferación de las células MC3T3-E1 en las membranas de PCL, PFIP y mezcla compatibilizada.

En la figura anterior se puede observar un aumento tanto en la adhesión como en la proliferación (#: $p < 0,05$) de las células MC3T3-E1 cultivadas sobre la membrana de la mezcla compatibilizada respecto a los homopolímeros.

En la figura 13 se muestran las células sobre las membranas

mediante microscopía óptica. Las células adheridas y proliferadas sobre las matrices mostraron un buen desarrollo y difusión de sus prolongaciones.

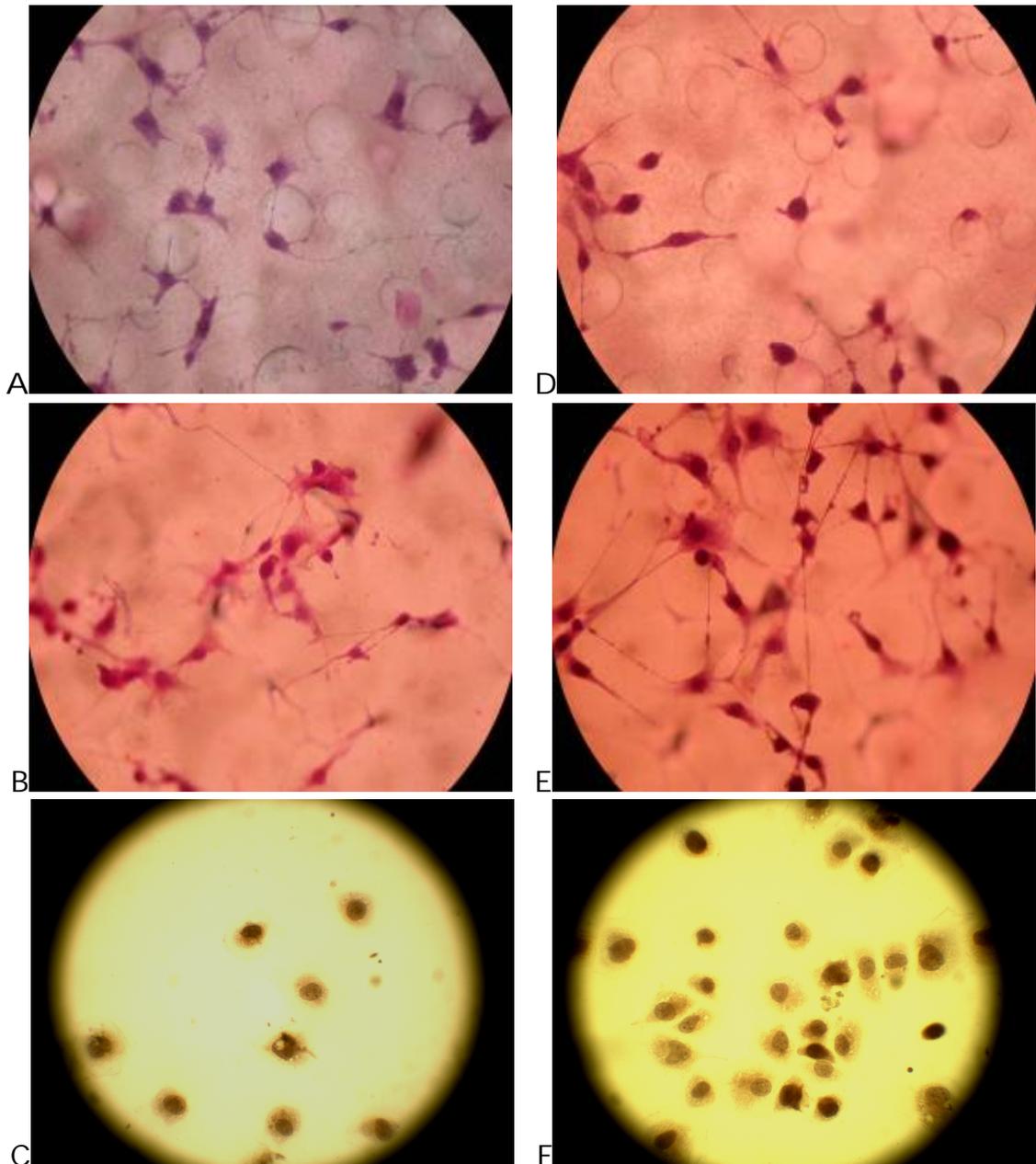


Figura 13: Células MC3T3-E1 crecidas en Mezcla compatibilizada, PCL y PFIP. A, B y C Adhesión. D, E y F Proliferación. A y D, Mezcla compatibilizada. B y E, PCL. C y F, PFIP.

2.3.2- Inmunofluorescencia:

La interacción de los osteoblastos con las diferentes películas poliméricas fue investigada mediante la evaluación del desarrollo del citoesqueleto de

actina. Después de 24 horas de cultivo se evaluó la organización del citoesqueleto y los núcleos de las células UMR-106 cultivadas en las diferentes películas (figura 14). Las células previamente fijadas se tiñeron para actina (verde) con FITC

phalloidin y los núcleos (azul) con *DAPI*, observándolas luego por microscopía de fluorescencia.

Las células crecidas sobre la mezcla exhibieron un citoesqueleto

de actina con filamentos bien desarrollados. Las células crecidas sobre los homopolímeros presentaron una morfología diferente, mostrando un esqueleto de actina desorganizado.

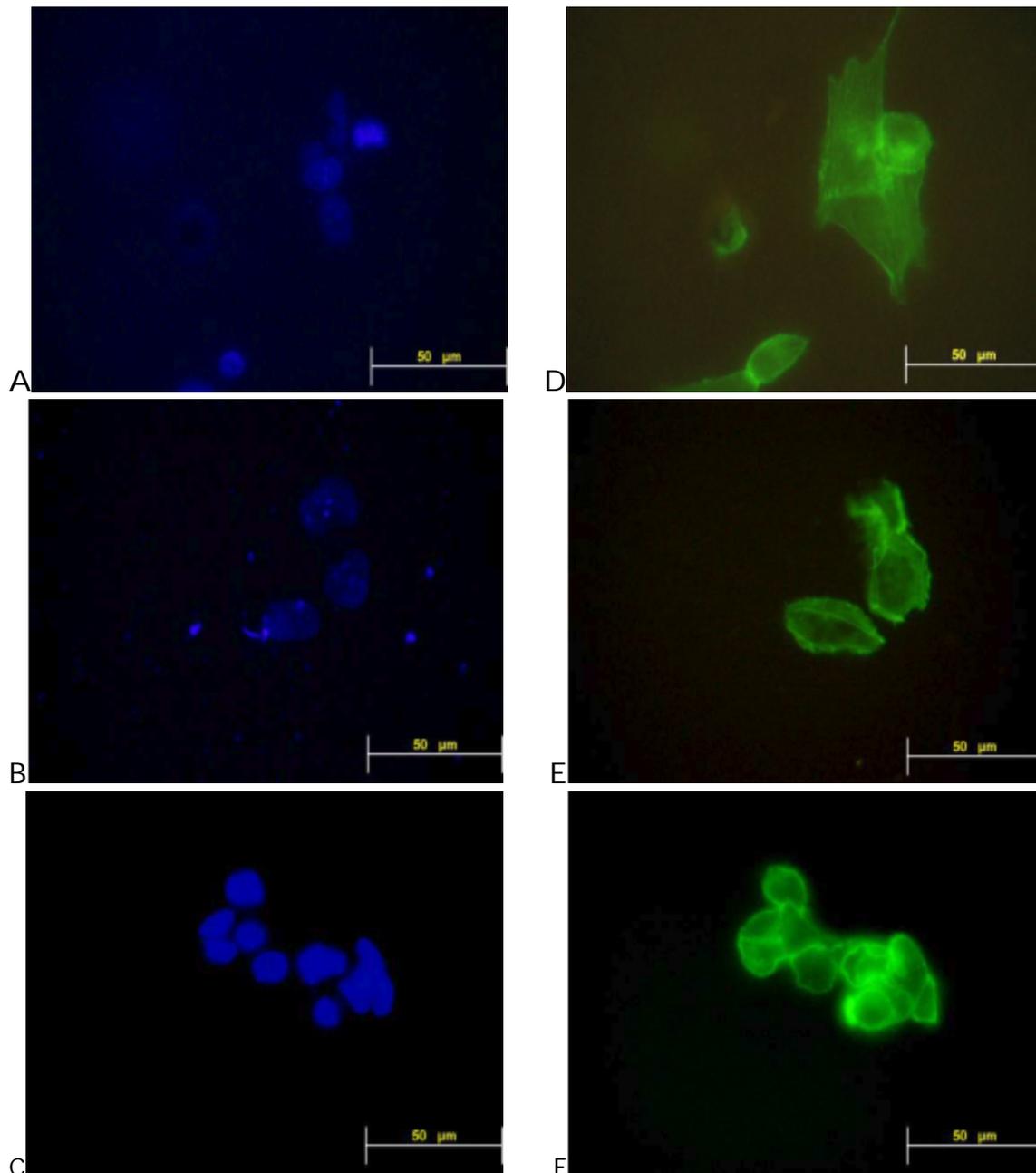


Figura 14: Células UMR-106 crecidas en Mezcla compatibilizada, PCL y PFIP. A, B y C *DAPI*. D, E y F *FITC phalloidin*. A y D, Mezcla compatibilizada. B y E, PCL. C y F, PFIP.

2.3.3.-Marcadores de diferenciación osteoblástica:

Se evaluó la capacidad de las células crecidas sobre las diferentes matrices de expresar dos marcadores de diferenciación osteoblástica: la síntesis de colágeno tipo 1 (COL t1) y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP).

La figura 15 muestra la expresión de ALP después de 48

horas de cultivo de las células UMR-106. Este parámetro no se vio afectado por la naturaleza de las matrices investigadas. Por el contrario, se observó una mayor producción (#: $p < 0,05$) de COL t1, producido por células UMR-106 que crecieron en la mezcla compatibilizada de los polímeros, sugiriendo una mayor biocompatibilidad con esta película.

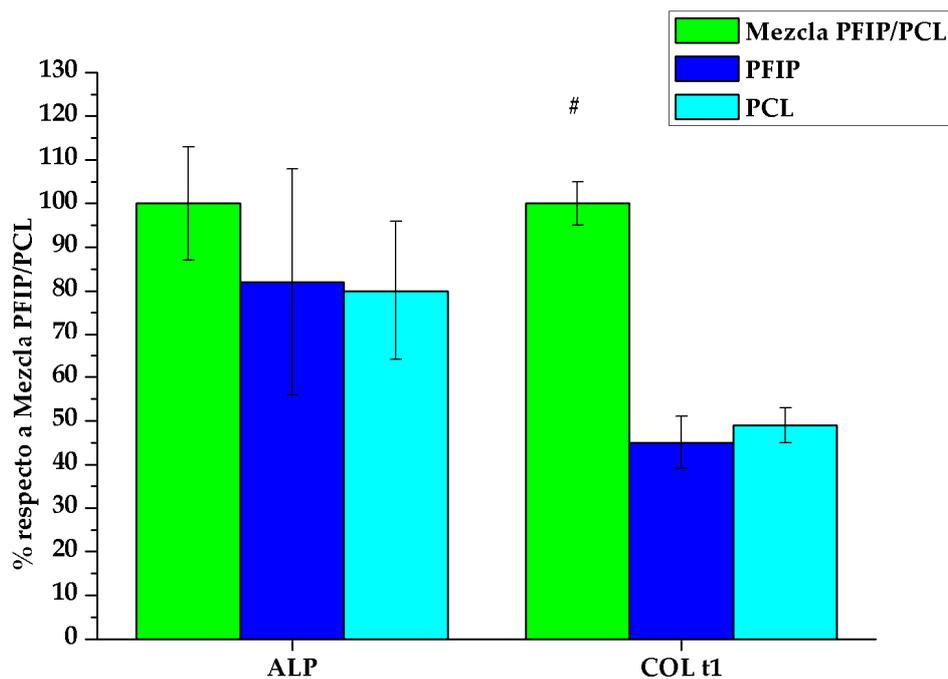


Figura 15: Producción de marcadores Osteoblásticos durante 48 horas de las células UMR-106 sobre las membranas de PCL, PFIP y mezcla compatibilizada.

También se evaluó la producción de los marcadores osteoblástico en la línea

preosteoblástica MC3T3-E1. La figura 16, muestra la producción de dichos ALP y Col t1 luego de 2

semanas de cultivo en un medio osteogénico. En este grafico, se observa que no hay cambios significativos en la expresión de

ALP, mientras que si hay un aumento (#: $p < 0,05$) en la producción de COL t1 en las membranas de PCL.

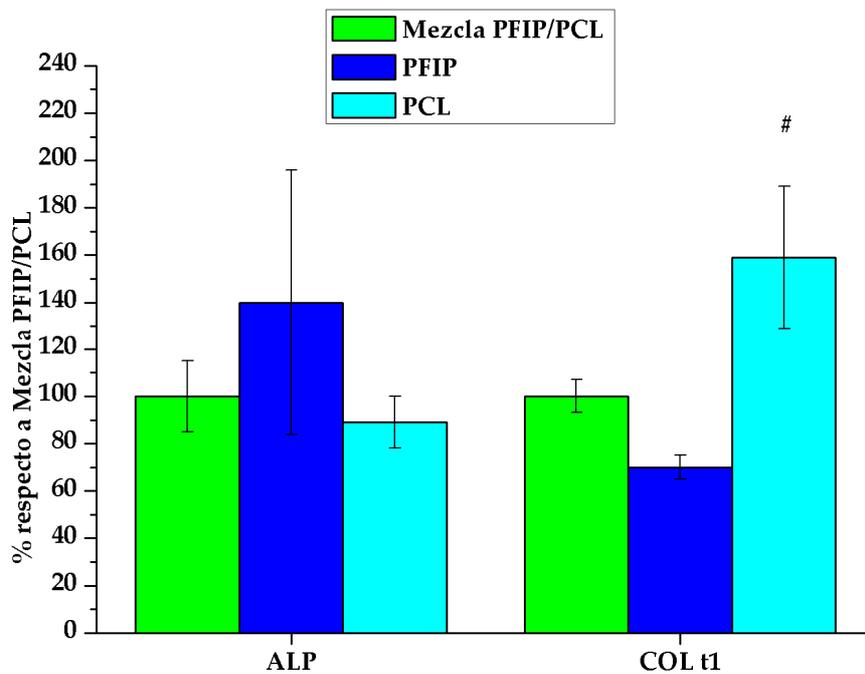


Figura 16: Producción de marcadores Osteoblásticos durante 2 semanas de las células MC3T3-E1 sobre las membranas de PCL, PFIP y mezcla compatibilizada.

Finalmente se evaluó la capacidad de las células MC3T3-E1 para mineralizar la matriz extracelular en las diferentes membranas poliméricas después de tres semanas de cultivo en presencia de de β -glicerol fosfato y ácido ascórbico.

deposición en los nódulos mineralizados según la evaluación de la tinción con rojo de alizarina S, en comparación con las películas de los homopolímeros.

La figura 17 muestra que la mezcla promueve fuertemente la

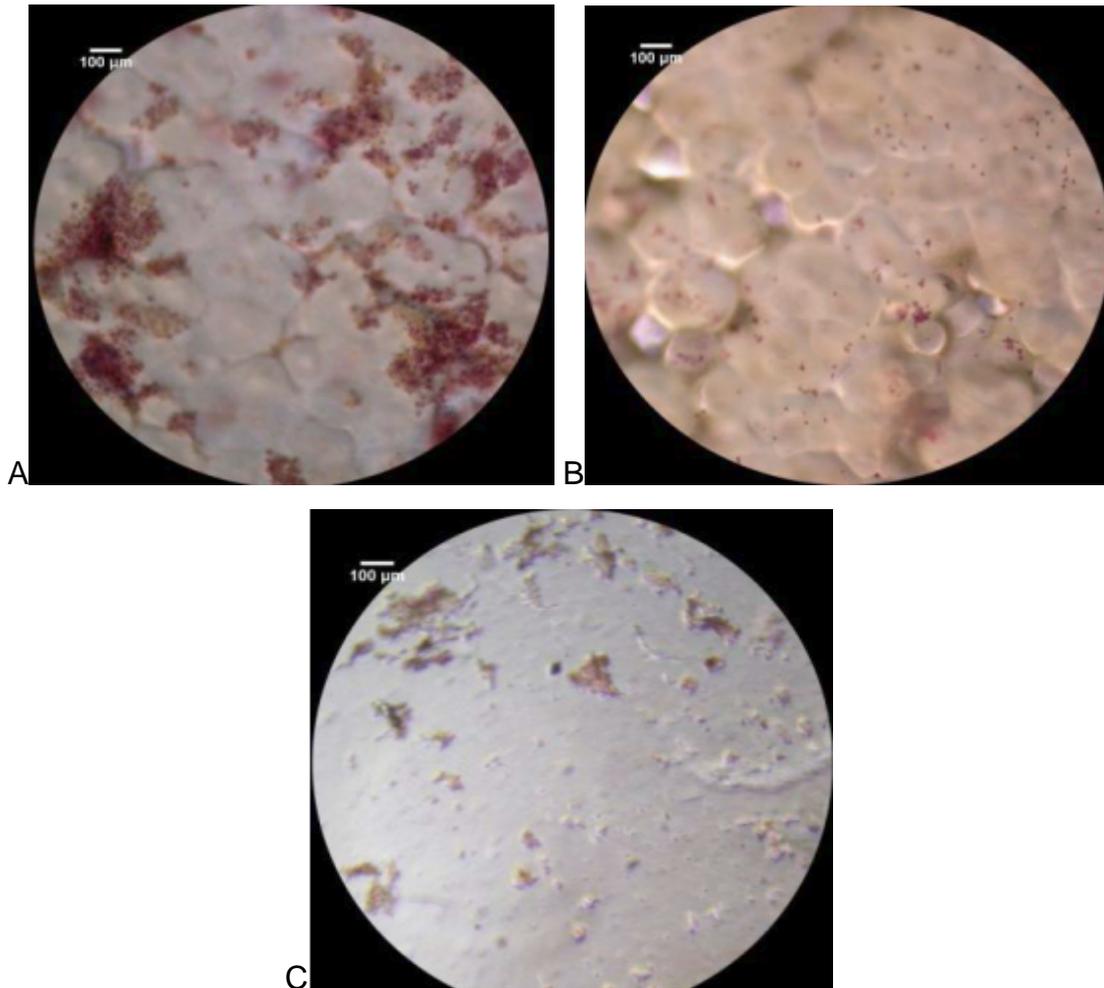


Figura 17: fotografías de nódulos de mineralización teñidos con Rojo de Alizarina .A: Mezcla compatibilizada, B: PCL y C: PFIP. Barra de referencia: 100 µm.

3. *Obtención de Hidroxiapatita:*

Con el fin de mejorar las propiedades tanto mecánicas como osteogénicas, se suelen agregar a la matrices poliméricas partículas de distintas sustancias inorgánicas tales como partículas de hidroxiapatita (HAP), componente inorgánico de los huesos.

En la literatura [Cao, 1996; Jarcho, 1976; Toriyama, 1996; Otsuka, 1994], se pueden encontrar distintas formas de obtener HAP.

En la presente sección, se mostrarán los resultados de la obtención y caracterización de HAP obtenida a partir de hueso bovino. Como se explicó en el capítulo Materiales y métodos, la HAP se

obtuvo incinerando [Ooi, 2007] trozos de huesos bovino a 900°C durante 1 hs.

3.1.-Caracterización:

Con el fin de caracterizar las cenizas obtenidas y comprobar que se ha obtenido HAP, se realizaron medidas de Espectroscopia infrarroja con transformada de

Fourier (FTIR) con el fin de conocer el espectro infrarrojo mientras que por espectroscopia de energía dispersa de rayos X (EDAX) es posible conocer la composición química. En la figura 18 se puede observar el espectro FTIR de HAP obtenida con indicación de las principales bandas.

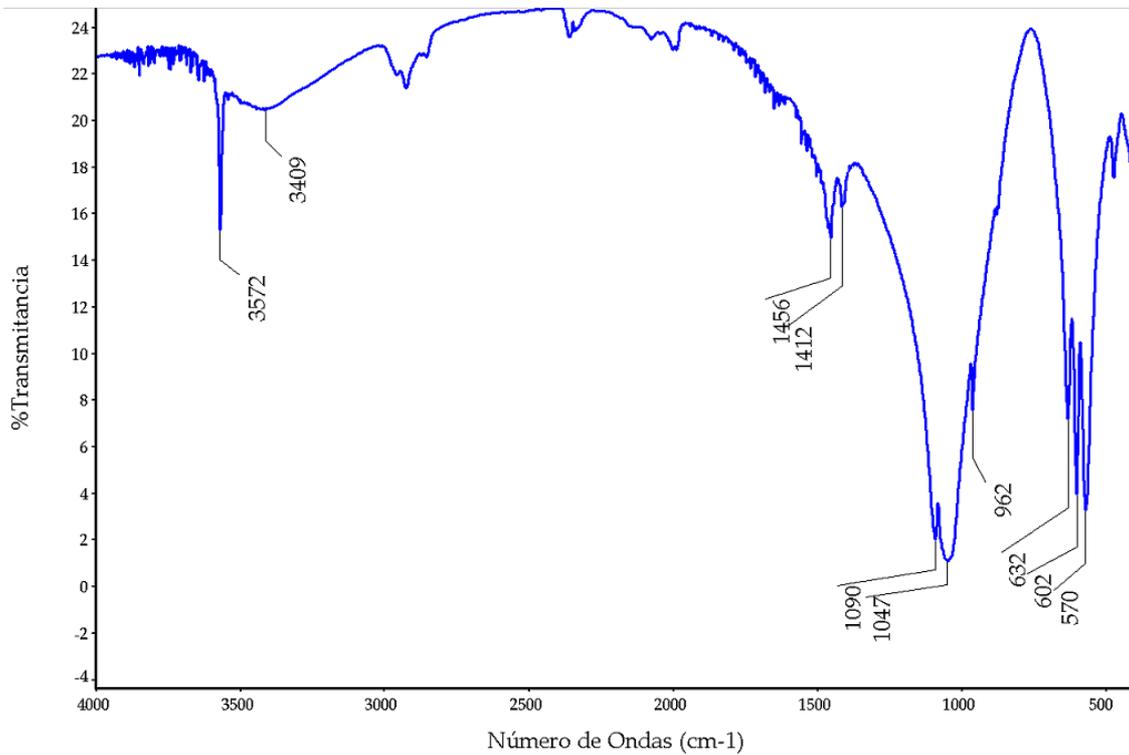


Figura 18: espectro FTIR de HAP.

Las bandas a 3.572, 3.409 y 632 cm^{-1} corresponden a los grupos OH estructurales (libre y asociado) en

los cristales de HAP [Joschek, 2000; Walters, 1990]. Las bandas a 1.090, 1.047, 602 y 570 cm^{-1} indican la presencia de los grupos PO_4^{3-} . Además, se observan dos bandas en

1.456 y 1.412 cm^{-1} que corresponden a al componente CO_3^{2-} .

La figura 19 muestra el espectro EDAX de HAP obtenida.

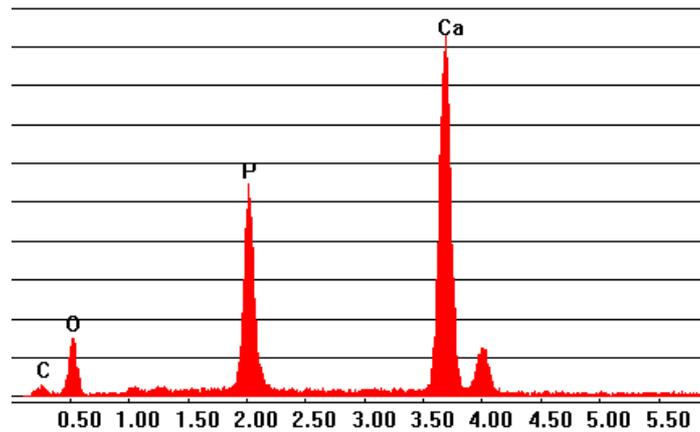


Figura 19: espectro EDAX de HAP.

De la figura anterior se puede observar que en la HAP analizada existen los elementos constituyentes O, P y Ca, siendo estos constituyentes de dicho material. A partir de la integración de áreas de los picos característicos se calculó la relación molar Ca/P dando el resultado de 1,67; mientras que el teórico es 1,66 para la HAP mineral. Además, se encuentra trazas del elemento C, dando una relación molar C/P de 0,03.

Los resultados conjuntos obtenidos mediante espectroscopía FTIR (figura 18) en el que se

observan las bandas características del grupo carbonato (1.456 y 1.412 cm^{-1}), así como los obtenidos por EDAX para la relación C/P, demuestran que si bien existe una pequeña impureza de 1,07 % de CO_3^{2-} , la obtención de HAP pura a partir de hueso bovino ha sido altamente eficiente.

3.2.-Disminución de tamaño de las partículas de HAP:

La reducción de tamaño promedio de las partículas de HAP obtenidas es importante por varias razones. En particular, ayuda a mejorar la integración de las mismas

en la matriz poliméricas y permite una suspensión estable cuando se disuelven las mismas con el polímero en el cloroformo. Además, el tamaño de las partículas de HAP presentes en el hueso, como se describió en Introducción, son del orden de 50 nm.

Las partículas obtenidas en este trabajo de tesis, fueron tamizadas con un tamiz numero 200, con un

tamaño de poro 75 μm [CRC Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition], luego se disgregaron mecánicamente utilizando un equipo de degradación mecánica Ultra-turrax T25 como se describió en el capítulo de Materiales y métodos. La figura 20 muestra las fotografías de SEM de las partículas de HAP antes y después del tratamiento.

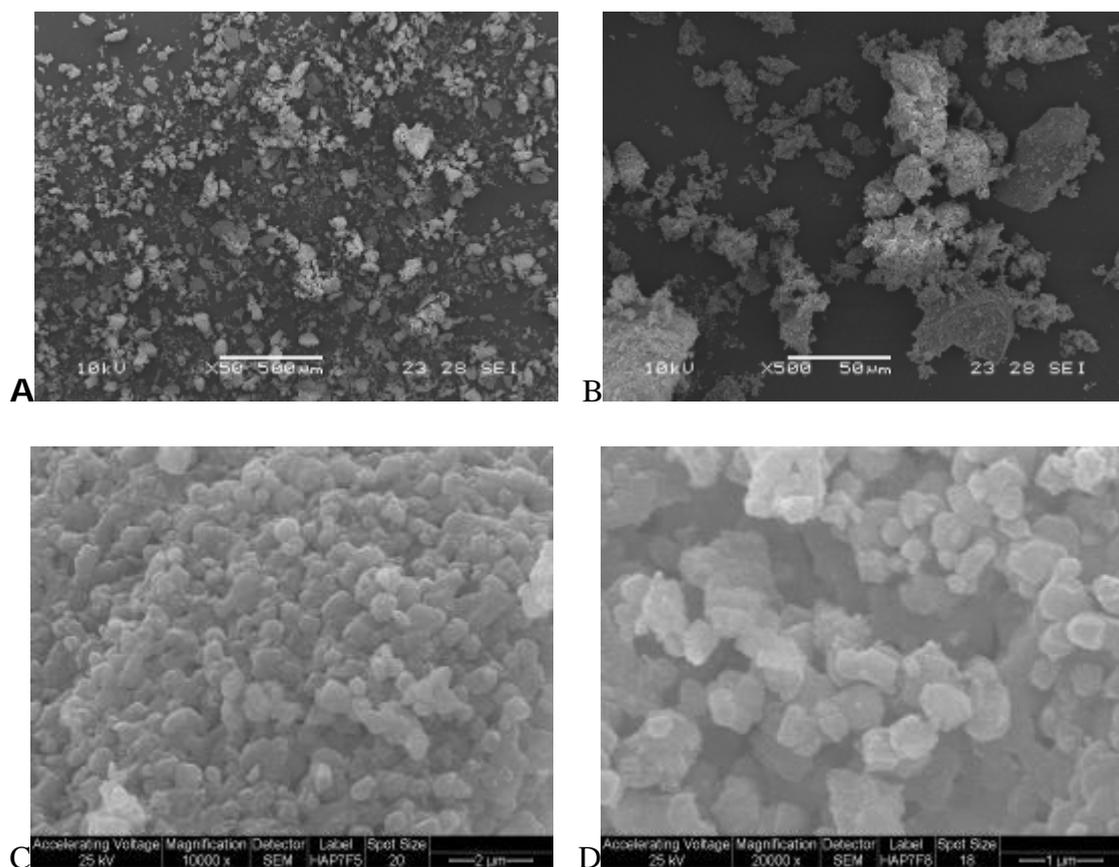


Figura 20: fotografías de SEM de HAP antes [A y B] y después [C y D] de la aplicación de ultrasonido.

En la figura anterior se puede observar la diferencia de tamaño de

partículas entre las no tratadas y las tratadas por ultraturrax.

En la figura 21 se representa mediante un histograma los

tamaños de las partículas y la dispersidad de las mismas.

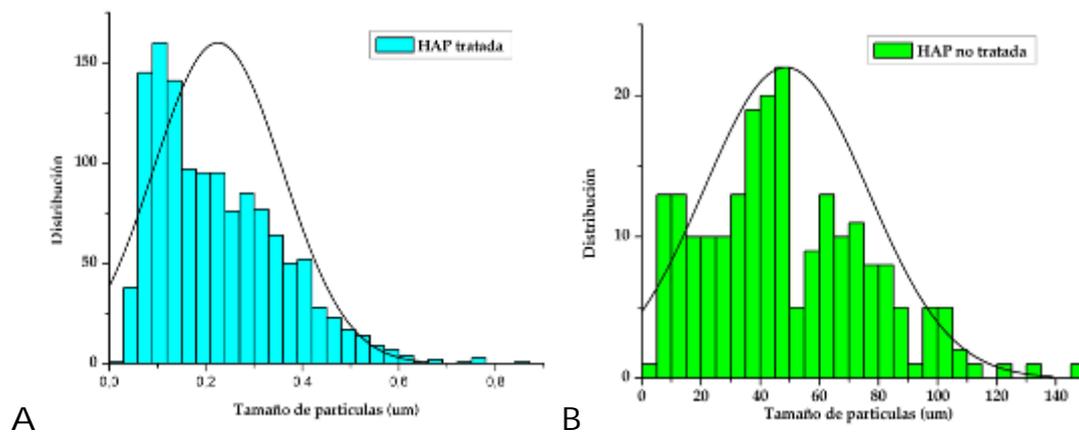


Figura 21: distribución de tamaños de la partícula de HAP, tratadas con ultraturrax [A] y no tratadas [B].

Así, se obtuvo por este tratamiento, un tamaño de partículas de 225 ± 4 nm frente a las no tratadas de 48.639 ± 1.886 nm. Es decir, el tamaño de partículas se redujo a un 0,46 % del tamaño tamizado.

disolviendo la mezcla polímero-HAP (1 % p/p de HAP en polímero) en cloroformo, homogenizada y vertida sobre placa de petri, secándose a temperatura ambiente y luego en tambor de vacío hasta llegar a peso constante.

4. Obtención de películas con HAP:

4.1.-Caracterización:

Una vez caracterizada la HAP obtenida a partir de hueso vacuno, se obtuvieron membranas de PCL y de mezcla compatibilizada de PCL/PFIP conteniendo HAP. Como se explicó en el capítulo Materiales y métodos, las películas se obtuvieron

4.1.1.-Microscopia Electrónica:

Las películas obtenidas, de PCL y de Mezcla compatibilizada PCL/PFIP (mezcla) con y sin HAP 1% p/p, fueron caracterizadas mediante SEM con el fin de conocer su topografía. Además, se tiñeron con rojo de Alizarina (este colorante

tiene alta afinidad por Ca^{2+} , constituyente de HAP) para conocer la distribución de las partículas de HAP en las membranas.

En la figura 22 se observan las fotografías de SEM de las películas obtenidas.

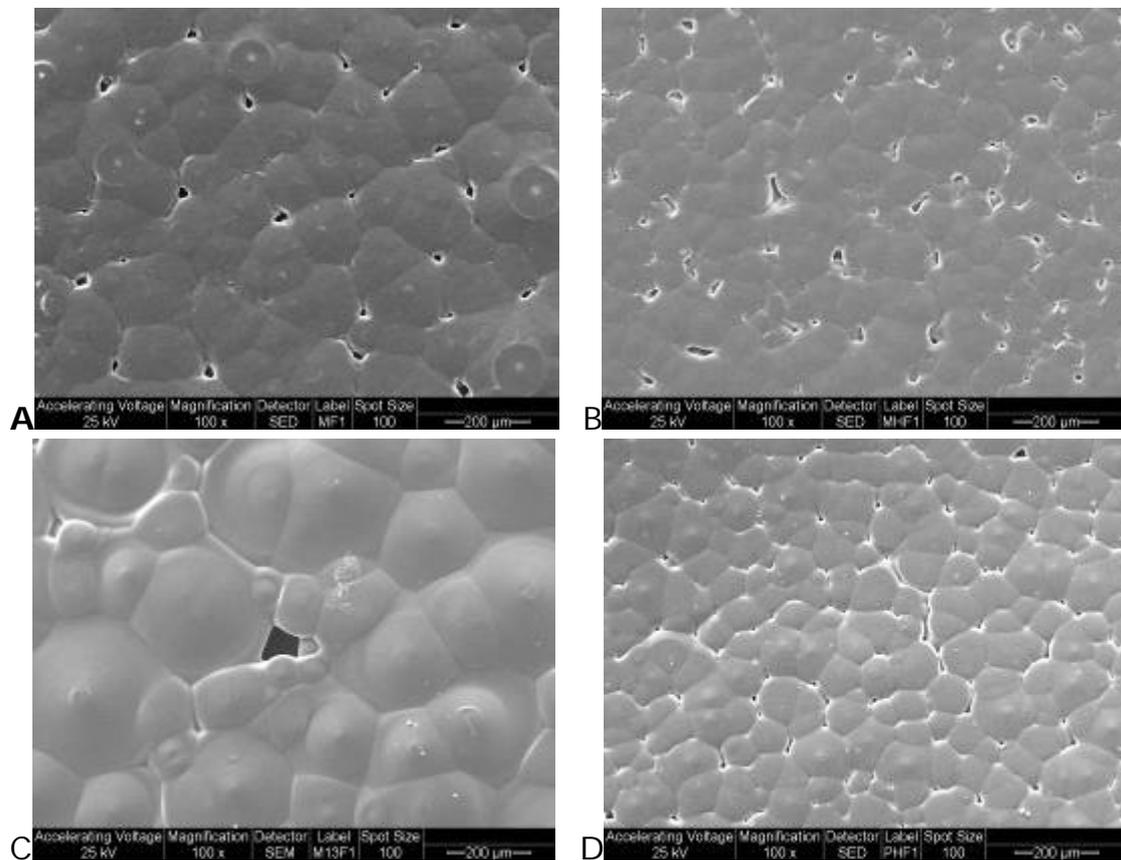


Figura 22: imágenes de SEM de la superficie de Mezcla [A], Mezcla-HAP [B], PCL [C] y PCL-HAP [D].

Las membranas muestran la morfología típica tipo esferulitas similar a la descrita previamente para PCL pura. La adición de un pequeño porcentaje de HAP a la matriz induce una pequeña disminución en el tamaño de las

esferulitas. Esto también se asoció con un aumento de la rugosidad de la superficie del polímero-HAP.

En la figura 23 se pueden observar las membranas teñidas con rojo de alizarina.

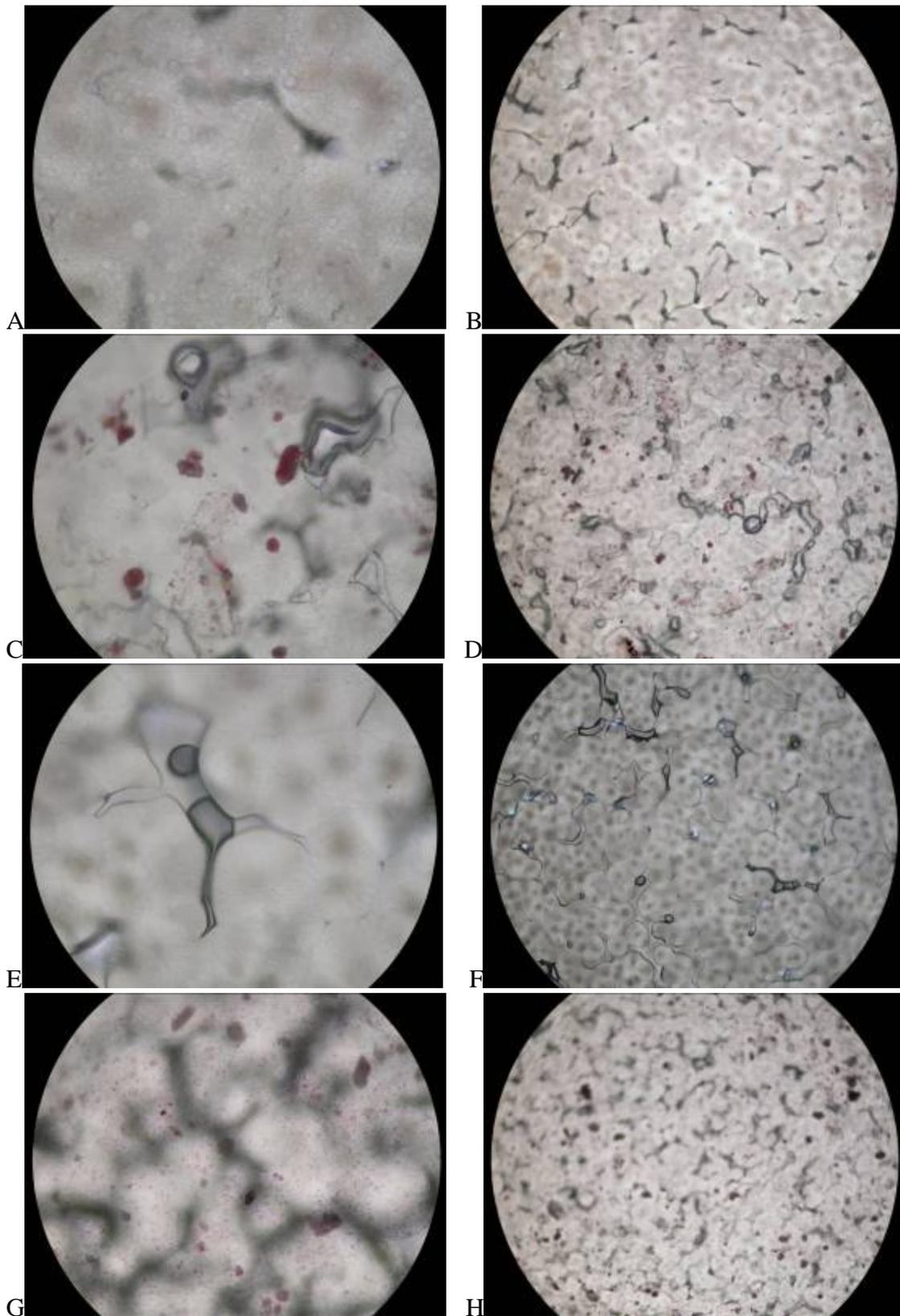


Figura 23: Microscopia óptica de las membranas teñidas con rojo de alizarina: Mezcla a 40X [A] y 10X [B], Mezcla con HAP 1% p/p a 40X [C] y 10X [D], PCL a 40X [E] y 10X [F] y PCL con HAP 1% p/p a 40X [G] y 10X [H].

En la figura 23 se puede observar una distribución homogénea de las partículas de HAP en la matriz de PCL-HAP, mientras que las partículas son algo

más grandes en la Mezcla-HAP. Además, no se encontraron regiones teñidas en los controles de PCL y Mezcla.

4.1.2.-Pruebas mecánicas:

Muestra	Modulo Elástico (MPa)	Resistencia última a la tracción (MPa)	Alargamiento en el punto de ruptura (%)
Mezcla	143 ± 12	7,5 ± 0,7	60 ± 12
Mezcla-HAP	182 ± 6 #	7,4 ± 0,7	20 ± 1 #
PCL	161 ± 12	15,2 ± 1,7 x	366 ± 96 x
PCL-HAP	249 ± 12 #	16,5 ± 0,5 x	210 ± 21

Tabla 2: Propiedades mecánicas de las películas Mezcla, Mezcla-HAP, PCL y PCL-HAP.

La Tabla 2 muestra las propiedades mecánicas evaluadas de las diferentes matrices. La adición de HAP aumenta el módulo elástico de las matrices PCL y Mezcla. El módulo de PCL-HAP y Mezcla-HAP exhiben un incremento del 55% (#: p<0,05) y 27% (#: p<0,05) respectivamente en comparación

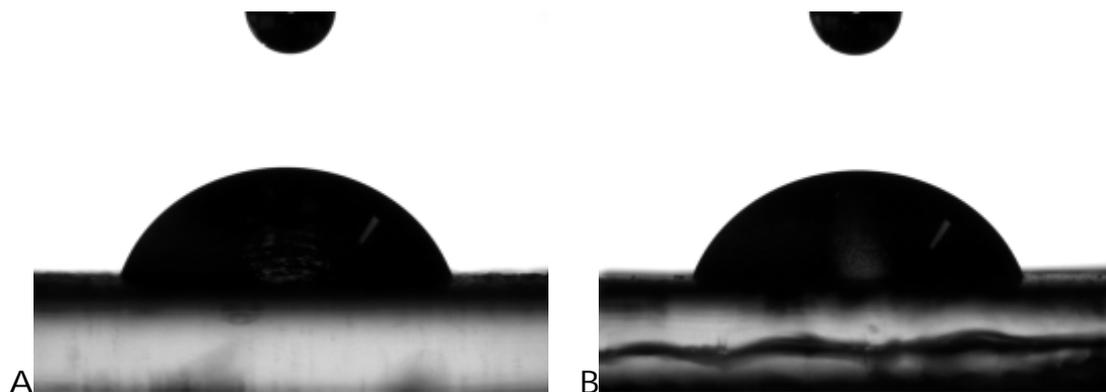
con las matrices sin el agregado de HAP. No se observaron cambios en la resistencia última a la tracción por la adición de hidroxiapatita a las matrices. Sin embargo, HAP indujo una reducción en el alargamiento en el punto de ruptura del 43% para PCL (x: p<0,001) y del 67% para la Mezcla (#: p<0,05), una medida de la

ductilidad de un material. En conjunto estas observaciones sugieren que las propiedades mecánicas de las matrices-HAP han mejorado significativamente obteniéndose, como era de esperar, un material más rígido.

4.1.3-Hidrofobicidad-hidrofilicidad:

En la figura 24 se pueden observar los ángulos de contacto de las membranas polímeros PCL y Mezcla compatibilizada con el agregado de HAP. El valor de ángulo de contacto para la mezcla compatibilizada con HAP ($70,5^\circ \pm 0,2^\circ$; X: $p < 0,001$) fue

significativamente mayor que PCL con HAP ($66,8^\circ \pm 0,3^\circ$). En la figura 24 C, se puede observar la diferencia producida en el ángulo de contacto de las membranas de los polímeros con el agregado de HAP. Dicho agregado de HAP disminuye el ángulo de contacto de las matrices poliméricas (PCL: $70,5^\circ \pm 0,2^\circ$ vs PCL HAP: $66,8^\circ \pm 0,3^\circ$; X: $p < 0,001$ y Mezcla: $75,4^\circ \pm 0,2^\circ$ vs Mezcla HAP: $70,5^\circ \pm 0,2^\circ$; X: $p < 0,001$), haciéndolas más hidrofílicas.



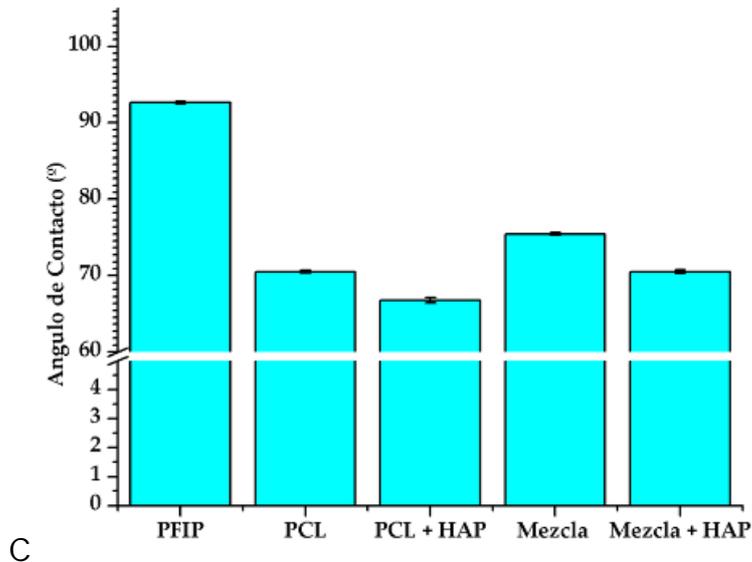


Figura 24: fotografías de ángulo de contacto de Mezcla-HAP [A] y PCL-HAP [B]. C presenta las medidas experimentales de los ángulos de contactos de las matrices obtenidas.

4.2.-Biocompatibilidad:

membranas de PCL y Mezcla sin el agregado de HAP.

4.2.1.-Adhesión y proliferación:

Al igual que el punto 2.3.1 del presente capítulo, se evaluaron la adhesión y la proliferación de las células UMR-106 y MC3T3-E1 sobre las membranas PCL-HAP Mezcla-HAP, usando como control las

4.2.1.1.-UMR-106:

En la figura 25 se puede observar los resultados de adhesión y proliferación de las células UMR-106 crecidas sobre las membranas.

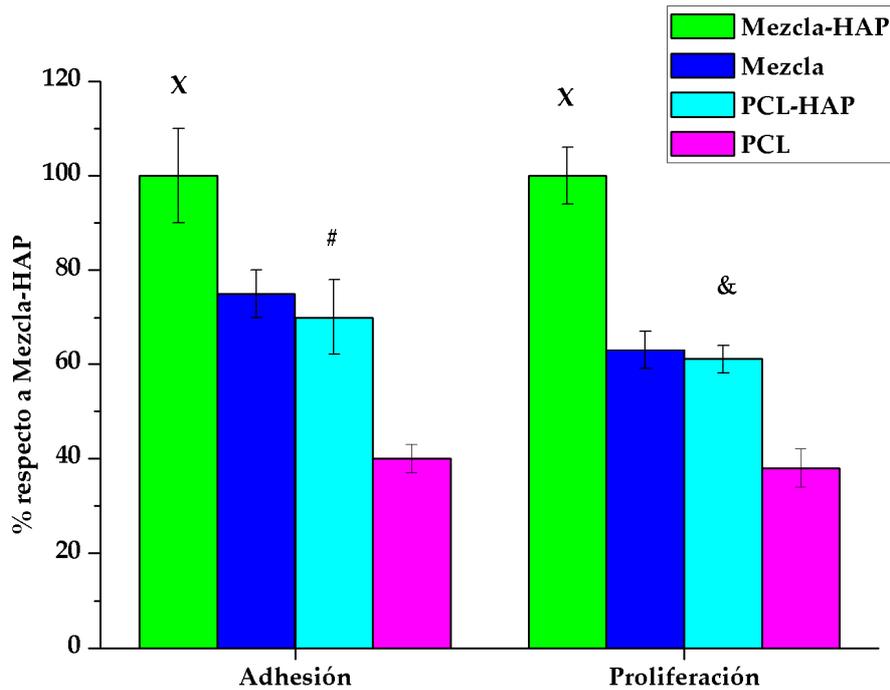


Figura 25: Adhesión y proliferación de células UMR-106 sobre las membranas de Mezcla-HAP, Mezcla, PCL-HAP y PCL.

De la figura anterior, se puede observar el aumento significativo de adhesión y proliferación con el agregado de HAP de las células UMR-106 sobre las membranas con el agregado de HAP. Observando los resultados de adhesión, el agregado de HAP produce un aumento de la adhesión sobre la Mezcla-HAP respecto a la Mezcla ($x: p < 0,001$) y también sobre de PCL-HAP respecto al PCL ($\#: p < 0,05$), además, existe una diferencia significativa entre la Mezcla-HAP y

el PCL-HAP ($x: p < 0,001$). En cuanto a la proliferación, hay un comportamiento similar al de la adhesión. El agregado de HAP aumenta la proliferación sobre la Mezcla-HAP respecto a la Mezcla ($x: p < 0,001$), así como sobre PCL-HAP respecto a PCL ($\&: p < 0,01$) con diferencias entre la Mezcla-HAP y PCL-HAP ($x: p < 0,001$).

En la figura 26 se observan las imágenes de las células teñidas sobre las membranas.

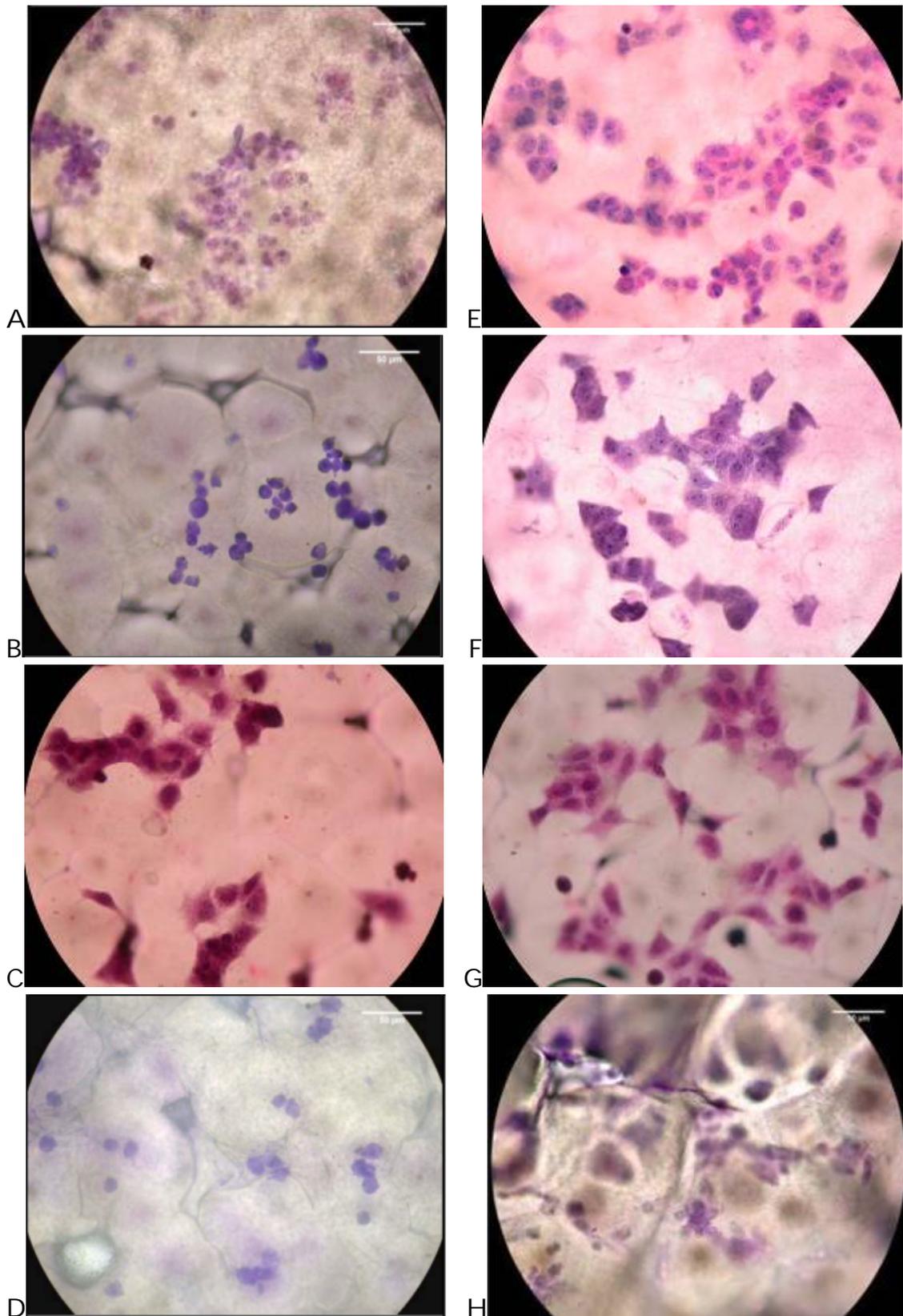


Figura 26: Microscopia óptica de células UMR-106 crecidas sobre las membranas. A-D: adhesión. E-H: proliferación. A y E: Mezcla-HAP. B y F: Mezcla. C y G: PCL-HAP. D y H: PCL.

4.2.1.2.-MC3T3-E1:

En la figura 27 se observan los resultados de los ensayos de adhesión y de proliferación de las

células MC3T3-E1 crecidas sobre las membranas.

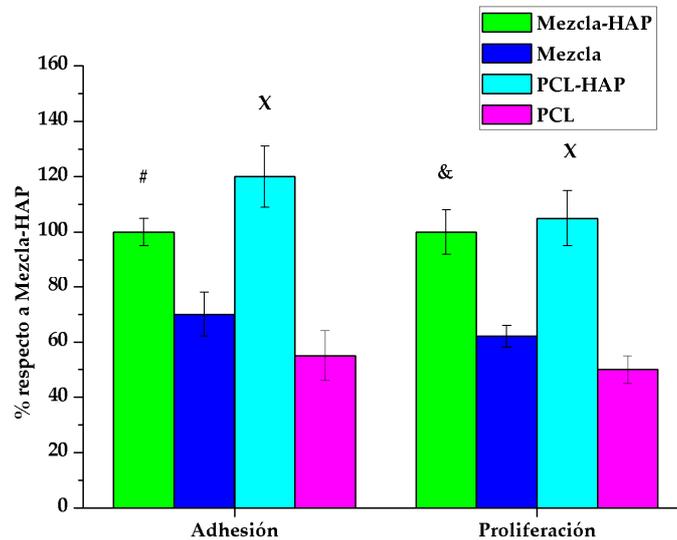


Figura 27: Adhesión y proliferación de células MC3T3-E1 sobre las membranas de Mezcla-HAP, Mezcla, PCL-HAP y PCL.

De la figura anterior, se puede ver que el agregado de HAP aumenta la adhesión celular sobre la Mezcla-HAP respecto a la Mezcla (#: $p < 0,05$) y sobre PCL-HAP respecto al PCL (x: $p < 0,001$). No hay diferencia significativa entre el comportamiento de adhesión celular sobre Mezcla-HAP y PCL-HAP. En cuanto a proliferación, el agregado de HAP aumenta la proliferación de las células sobre las películas de Mezcla-HAP respecto a Mezcla (&: $p < 0,01$), así como sobre PCL-HAP

respecto del PCL (&: $p < 0,01$), no habiendo diferencia significativa entre los resultados encontrados sobre películas de Mezcla-HAP y PCL-HAP. En la figura 28 se pueden observar las células MC3T3-E1 crecidas sobre las membranas. En general, las células desarrollaron buenas extensiones citoplasmáticas, tanto las adheridas como las que proliferaron. Además, el agregado de HAP a las membranas pareció aumentar el número de estas prolongaciones

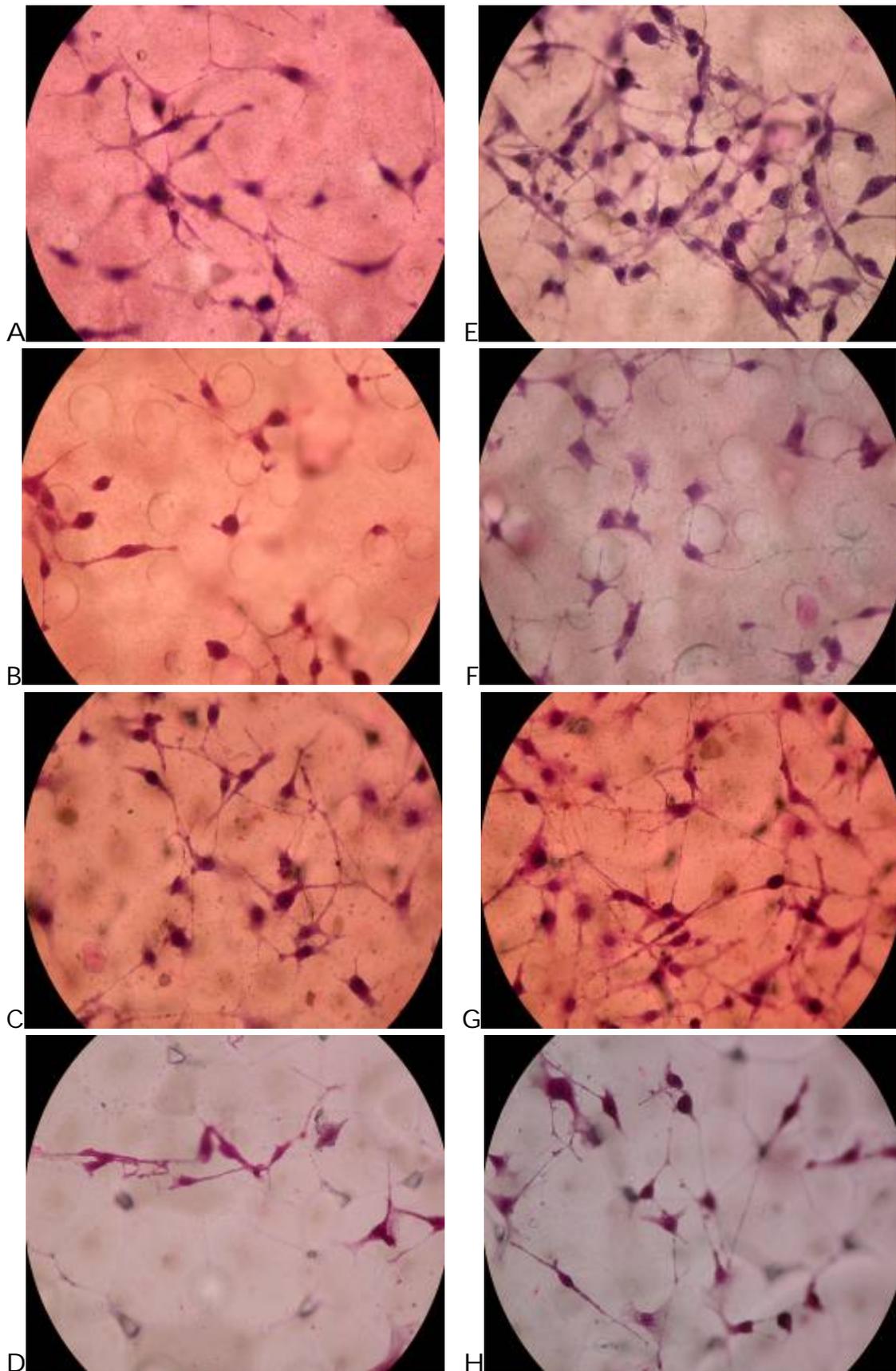


Figura 28: Microscopía óptica de células MC3T3-E1 crecidas sobre las membranas. A-D: adhesión. E-H: proliferación. A y E: Mezcla-HAP. B y F: Mezcla. C y G: PCL-HAP. D y H: PCL.

4.2.2.-Marcadores

Osteoblásticos:

Se evaluó en las células UMR-106 crecidas sobre las diferentes matrices, la capacidad de expresar los marcadores de diferenciación antes descritos, la síntesis de colágeno tipo 1 (COL t1) y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP). La figura 29 muestra la expresión de ALP y la producción de COL t1 después de 48 horas de cultivo de células UMR-106. En ella se puede ver que el agregado de HAP aumentó la expresión de ALP

de las células sobre la Mezcla-HAP (#: $p < 0,05$) respecto de la Mezcla pero no produjo cambios en PCL-HAP respecto de PCL.

En cuanto a la producción de COL t1, el agregado de HAP indujo un aumento en la expresión del COL t1 para las células crecidas sobre la Mezcla-HAP y la PCL-HAP respecto de la Mezcla (&: $p < 0,01$) y respecto del PCL (#: $p < 0,05$).

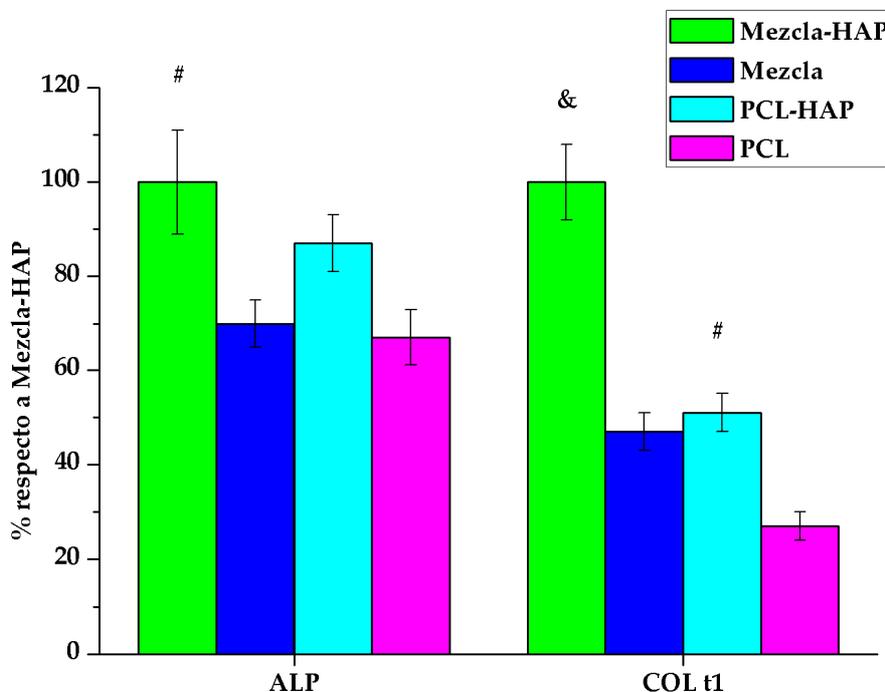


Figura 29: Producción de marcadores Osteoblásticos durante 48 horas de las células UMR-106 sobre las membranas Mezcla-HAP, Mezcla, PCL-HAP y PCL.

También se utilizaron células MC3T3-E1 (figura 30) para evaluar los marcadores osteogénicos, en un cultivo de 2 semanas en un medio de diferenciación osteogénico.

El agregado de la HAP a las matrices de la Mezcla y de PCL, inhibió significativamente (#:

$p < 0,05$) la expresión de ALP cuando las células MC3T3-E1 fueron inducidas a diferenciarse durante 2 semanas. En cuanto a la producción de COL t1, sólo hubo un aumento significativo (#: $p < 0,05$) cuando las células crecieron sobre la Mezcla-HAP respecto a de la Mezcla.

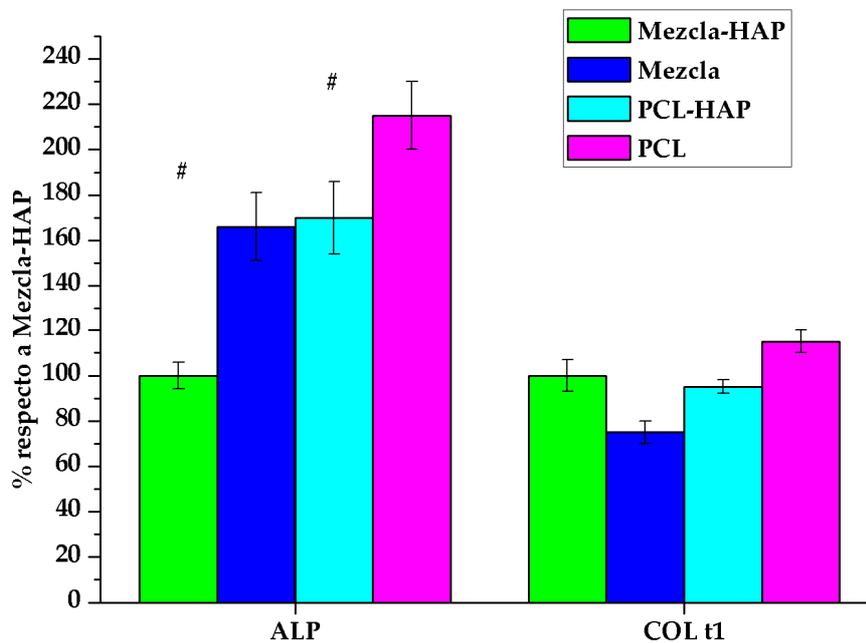


Figura 30: Producción de marcadores Osteoblásticos durante 2 semanas de las células MC3T3-E1 sobre las membranas Mezcla-HAP, Mezcla, PCL-HAP y PCL.

Dado que las membranas contienen Ca y P provenientes de la HAP, no es posible evaluar la mineralización (deposición de Ca/P) en la matriz por técnicas clásicas como la tinción con Sirius red (colorante específico para Ca) como

en el punto 2.3.4 de este capítulo o con von Kossa (colorante específico para P). Por este motivo se evaluó la expresión de *Runx-2*, uno de los principales factores de transcripción expresados durante la osteogénesis. La expresión de *Runx-2* y la actina

se determinaron mediante la técnica de *Western blot*.

Después de tres semanas (período de mineralización) del cultivo en un medio osteogénico, la línea de células osteoblástica MC3T3-E1 se han diferenciado y mineralizado la matriz. El factor

Runx-2 se expresó mayormente (figura 31) cuando las células fueron cultivadas sobre *scaffolds* que contenían HAP (#: $p < 0,05$).

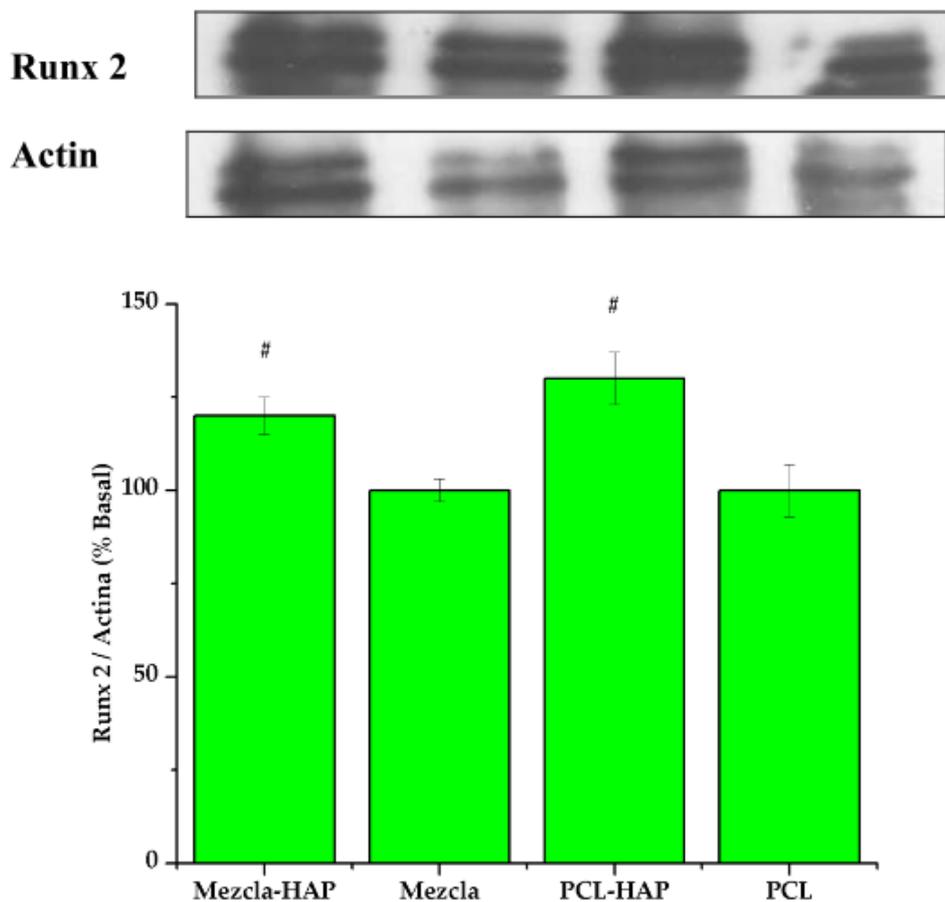


Figura 31: Efecto de los andamios sobre la expresión de *Runx-2* en células MC3T3-E1.

4.3.-Degradación:

La tasa de degradación de las membranas de los polímeros es un dato muy importante, ya que uno de

los requisitos para su utilización como *scaffolds* en el área de la regeneración de tejido óseo es que

los polímeros se degraden a medida que el tejido óseo se encuentra en proceso de regeneración.

Los estudios de degradación se llevaron a cabo como se mencionó en el capítulo de Materiales y métodos. Brevemente, se analizó la degradación de las películas en DMEM-10%SFB a 37°C, calculando el porcentaje de pérdida de peso según la fórmula 1.

$$\%W = (W_o - W_t) \times 100 / W_o$$

fórmula 1

W_o es el peso inicial de la muestra y W_t es el peso de la muestra a tiempo t de degradación.

En la figura 32 se presentan los resultados del ensayo de degradación de las diferentes membranas: PCL, PCL-HAP, Mezcla y Mezcla-HAP.

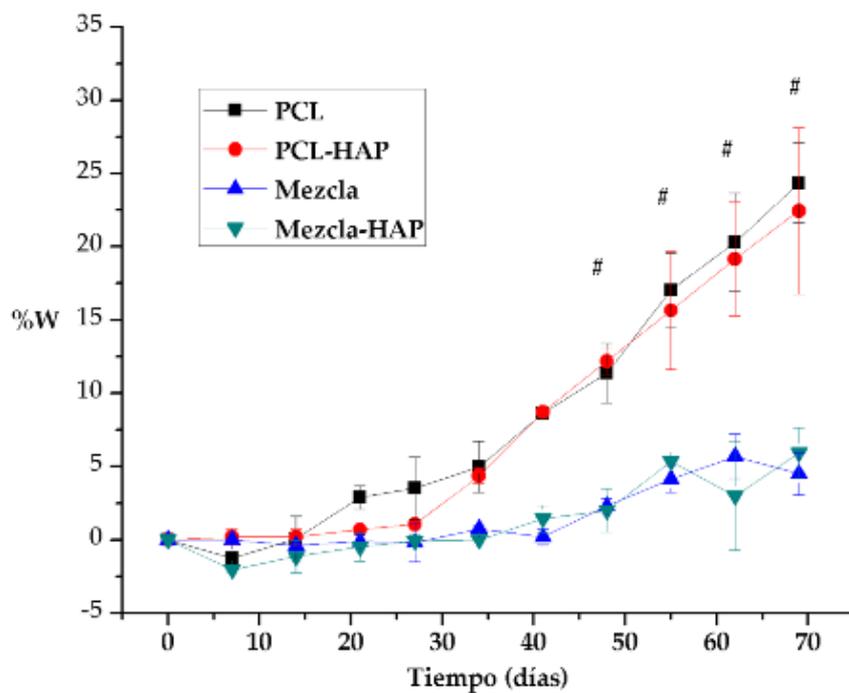


Figura 32: degradación de las membranas de PCL, PCL-HAP, Mezcla y Mezcla-HAP en DMEM-10%SFB.

A partir de los 50 días de incubación se puede observar que las membranas de PCL y PCL-HAP se degradan significativamente más

rápido (#: p<0,05) que las membranas de Mezcla y Mezcla-HAP. Esto se debe a la naturaleza química de los polímeros, dado que

la mezcla contiene PFIP, un polímero con estructura catenaria C-C. Además, el agregado de HAP en las películas, no produce cambios significativos durante el periodo de tiempo analizado.

5. Ensayos de Citotoxicidad:

Debido a que los *scaffold* eventualmente serán introducidos en pacientes, es sumamente importante que estos materiales no induzcan efectos tóxicos para el organismo. A fin de investigar la posible toxicidad de las membranas, se midió la liberación de óxido

nítrico (NO), IL-1 y TNF- α al medio de cultivo de macrófagos RAW 264.7 crecidos sobre las membranas de los polímeros PCL, PCL-HAP, Mezcla y Mezcla-HAP.

5.1.- Producción de óxido nítrico:

Como se explicó en el capítulo de Materiales y métodos, la determinación de NO en el medio de cultivo se realizó mediante la técnica de Greiss. En la figura 33 se presentan los resultados del ensayo de la liberación de NO en el medio de cultivo a diferentes tiempos: 24, 48 y 72 Hs.

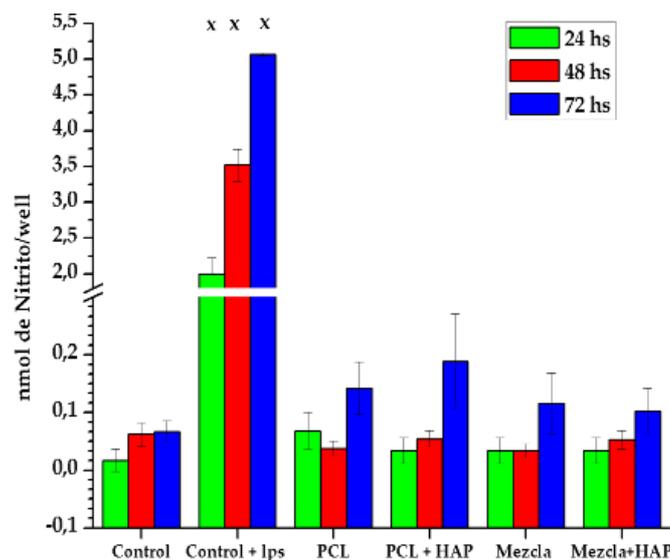


Figura 33: liberación de NO al medio de cultivo por las células RAW 264.7 crecidas sobre plato de cultivo (control), PCL, PCL-HAP, Mezcla y Mezcla-HAP durante 24, 48 y 72 Hs.

Se puede observar que ninguno de los polímeros investigados indujo liberación de NO cuando se lo comparó con la respuesta de células crecidas sobre un disco de cultivo de tejidos estándar (control). Cabe destacar que, además del control, sobre el plato de cultivo se hicieron controles positivos agregando al medio de cultivo lipopolisacárido (LPS) en una concentración de 0,1 ug/ml,

produciendo un aumento (x: p<0,001) estadísticamente significativo en la producción y liberación de NO al medio.

5.2.-Producción de Citoquinas:

Una vez evaluada la producción de NO por las células RAW 264.7, se analizó la producción de dos citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 y TNF α . En la figura 34 se puede observar los resultados de producción de citoquinas.

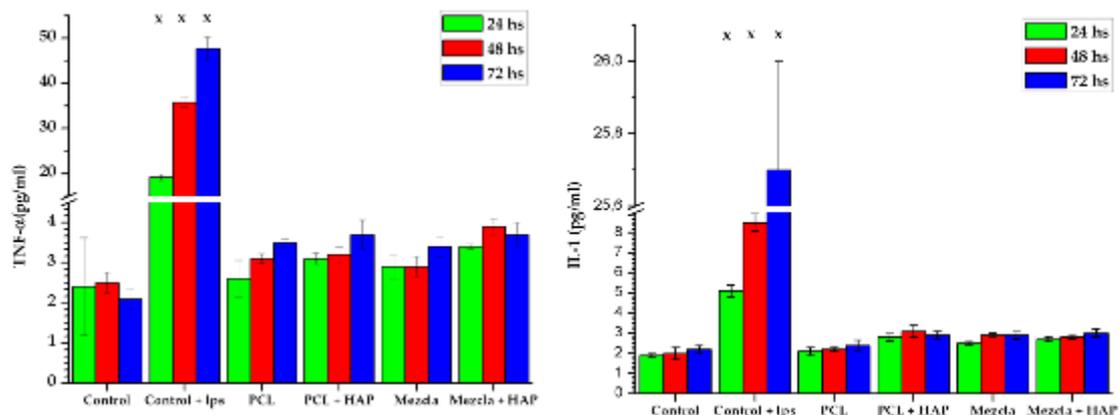


Figura 34: producción de citoquinas de células RAW 264.7 crecidas sobre plato de cultivo como control, PCL, PCL-HAP, Mezcla y Mezcla-HAP durante 24, 48 y 72 Hs.

En la figura anterior se puede ver que no hay diferencia significativa en los niveles de producción y liberación de las citoquinas TNF α e IL 1 liberadas al medio de cultivo de las células

crecidas sobre los polímeros respecto al control. Las células respondieron en presencia de LPS aumentando la producción de las dos citoquinas después de 24 a 72h de cultivo.

6. Membranas porosas:

6.1.-Caracterización:

Las figuras 35a y 35b muestran la morfología de la superficie de las películas obtenidas por el método de *casting*. Las micrografías revelaron una superficie lisa con la presencia de huecos y la morfología típica de esferulita, tal como se describió anteriormente. La morfología de las estructuras

obtenidas por *electrospraying* también fue examinada por SEM (Figuras 35C y 3D). El *electrospraying* produjo una película caracterizada por micropartículas homogéneas y uniformes sobre los vidrios colectores. En las condiciones experimentales de este trabajo, se obtuvieron micropartículas de polímero de un tamaño uniforme ($6,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de diámetro).

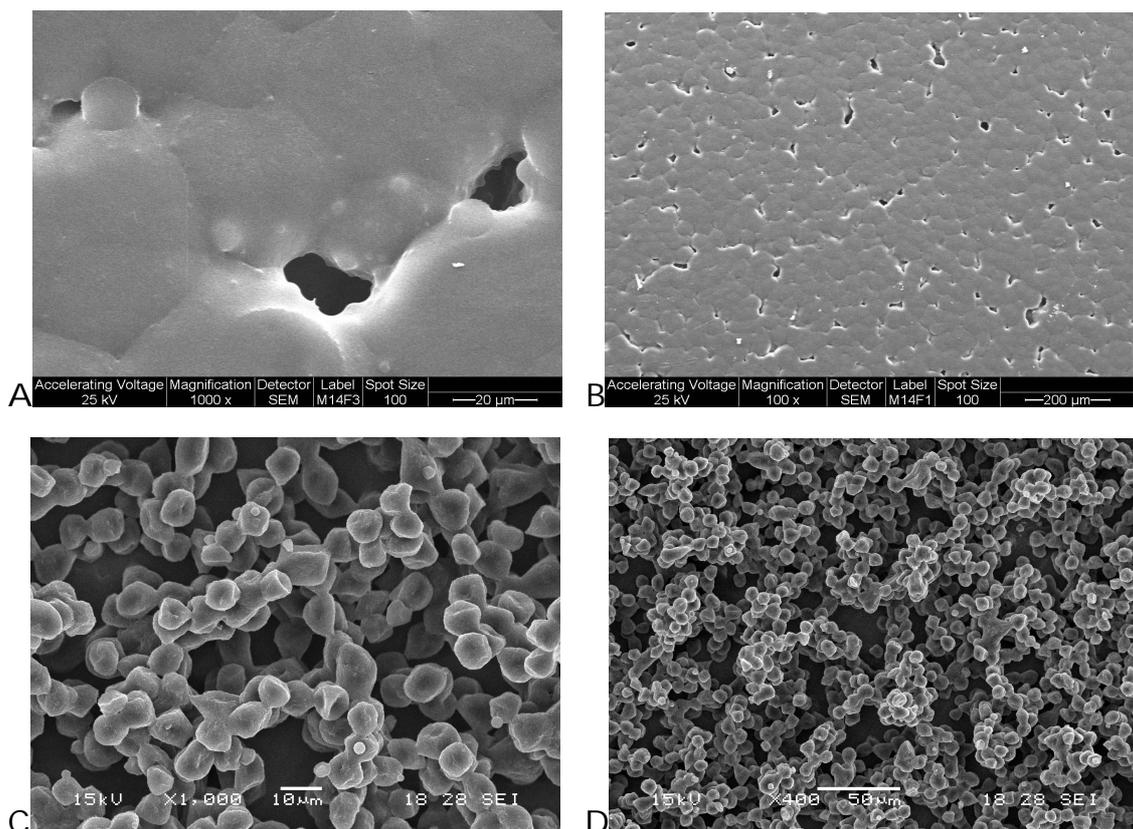


Figura 35: micrografías electrónicas de barrido que muestra la morfología de la superficie de PCL/PFIP: a) y b) películas obtenidas por *casting* con un aumento de 1000x y 100x, respectivamente, c) y d), placas de vidrio cubiertas con múltiples capas de micropartículas formadas por *electrospraying*, en 1000x y 400x.

La evaluación del WCA reveló una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre los valores de ángulo de contacto de las membranas no porosas ($74^\circ \pm 1^\circ$) y de las matrices porosas ($132^\circ \pm 1^\circ$).

6.2.-Estudios *in vitro*:

Con el fin de investigar la biocompatibilidad respecto de la topografía de las matrices porosas y no porosas, dos líneas celulares osteoblásticas se sembraron sobre las matrices. Se estudiaron su adhesión y proliferación y la expresión de la enzima fosfatasa alcalina, un marcador de diferenciación de los osteoblastos.

El aspecto y el análisis cuantitativo del número de osteoblastos adheridos a las matrices porosas y no porosas se

muestran en la figura 36. Después de una hora de incubación, los osteoblastos presentan un aspecto en forma redondeada y aparecen en áreas discretas de las películas. Sin embargo, en el caso de las células que fueron sembradas en las matrices porosas, se puede observar un mayor número de células adheridas. La cuantificación de estas observaciones se muestra en el panel inferior de la figura 36, lo que demuestra que las células se adhirieron estadísticamente en mayor proporción (alrededor de 3 veces) a las matrices porosas.

Estas observaciones sugieren que una matriz porosa y más hidrofóbica está promoviendo o favoreciendo una fuerte adhesión de los osteoblastos.

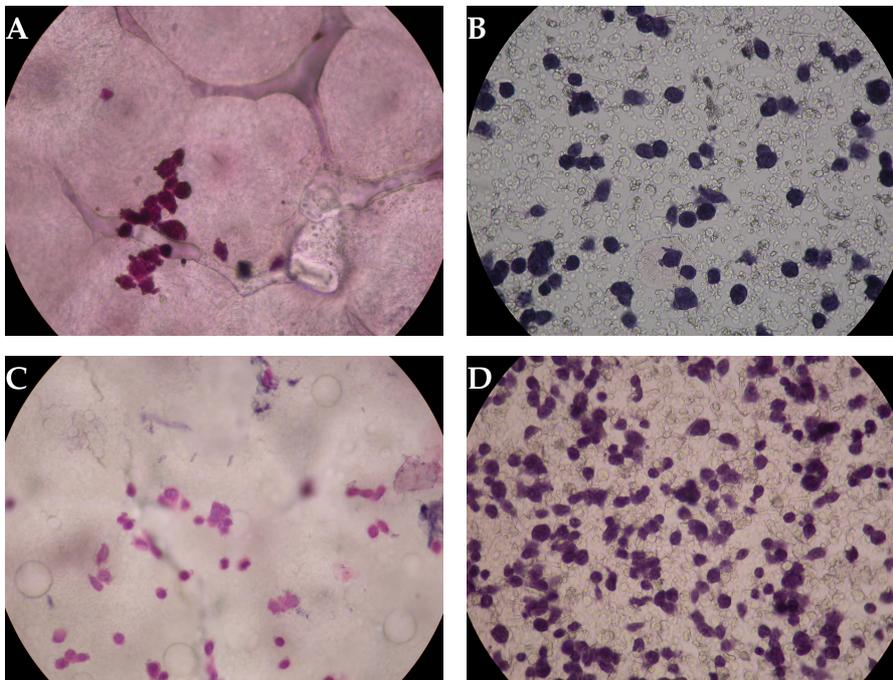
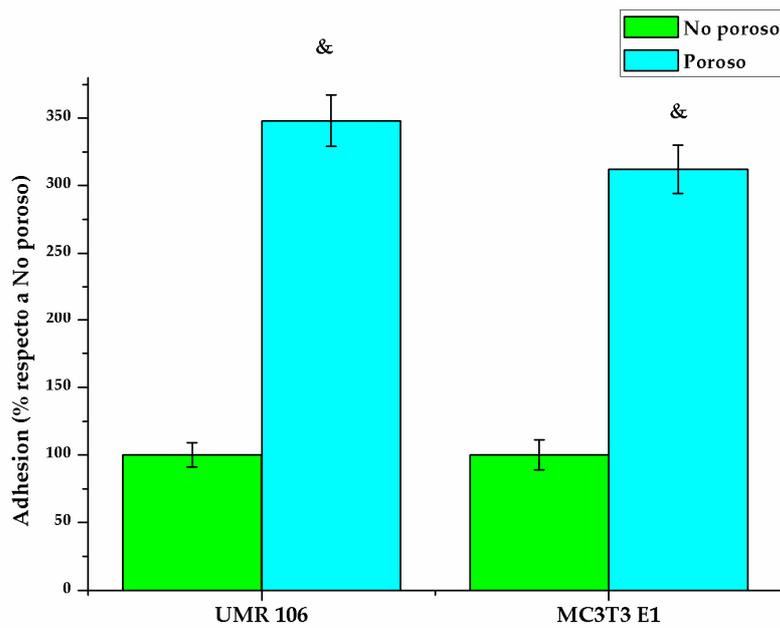


Figura 36: Adhesión de UMR-106 y células MC3T3-E1 sobre la matrices porosas y no porosas. &: $p < 0,01$. A y B: UMR-106, C y D: MC3T3-E1. A y C: matrices no porosas. B y D: matrices porosas.

Además de la adhesión celular, se evaluó la proliferación de ambas líneas celulares sobre las matrices. La Figura 37 muestra la morfología y el número de osteoblastos crecidos

tanto sobre las matrices porosas como sobre las no porosas luego de 24 h de cultivo. Se puede ver que las células UMR-106 y MC3T3-E1 muestran *spreading* (extensiones) y

conexiones entre sí en ambas superficies. Sin embargo, en las matrices porosas obtenidas mediante el método de *electrospray*, el número de células que han proliferado fue significativamente

mayor en comparación con la células crecidas sobre las membrana no porosa (2 y 3,7 veces con las células MC3T3-E1 y UMR-106, respectivamente).

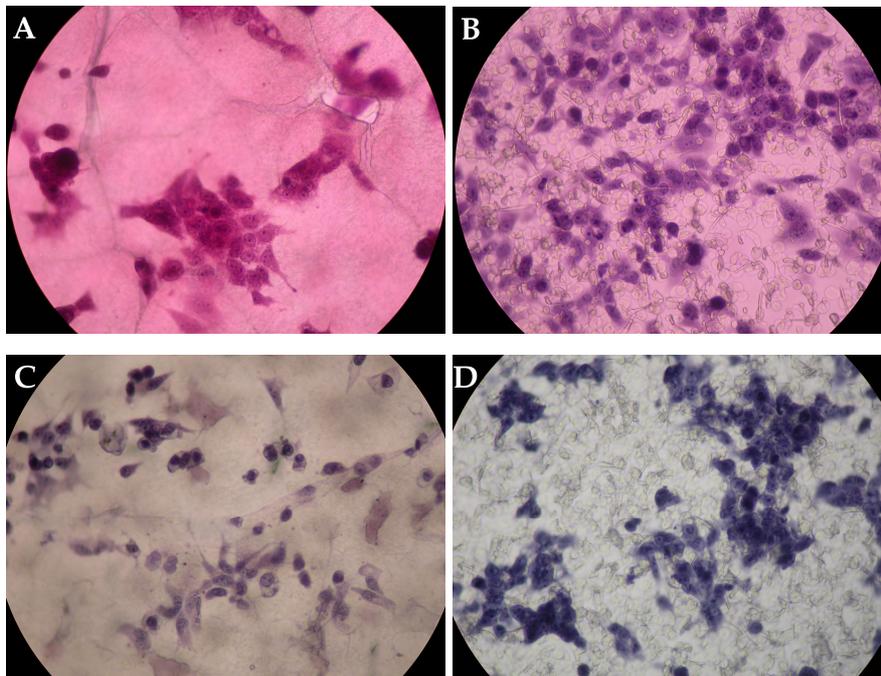
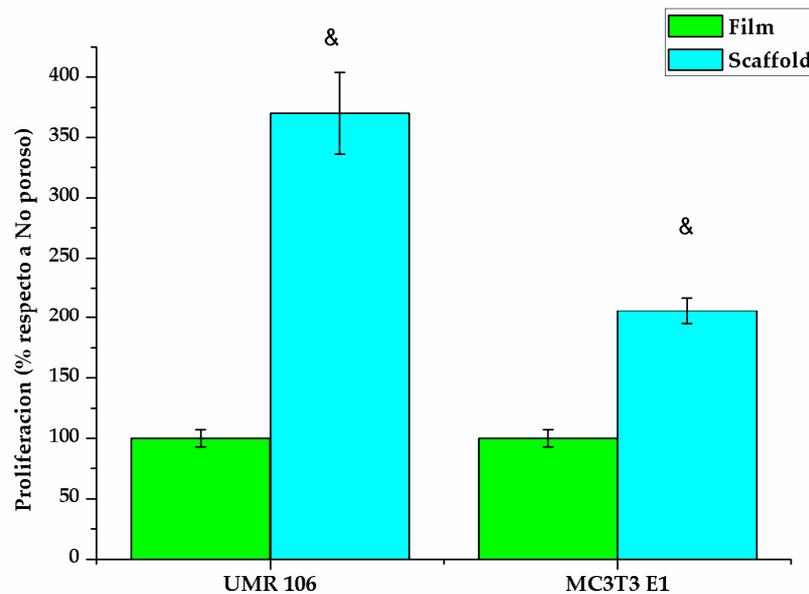


Figura 37: Proliferación de las células UMR-106 y MC3T3-E1 sobre las matrices porosas y no porosas. &: $p < 0,01$. A y B: UMR-106, C y D: MC3T3-E1. A y C: no porosas. B y D: porosas.

Por último, la capacidad de diferenciarse y expresar ALP, un marcador de la actividad osteoblástica, fue investigada en los cultivos de células UMR-106 y MC3T3-E1 durante 2 o 7 días, respectivamente, en ambos sistemas

de matrices. Las dos líneas osteoblásticas fueron inducidas a expresar más ALP, cuando se cultivaron sobre las matrices porosas respecto de las no porosas, como se muestra en la figura 38.

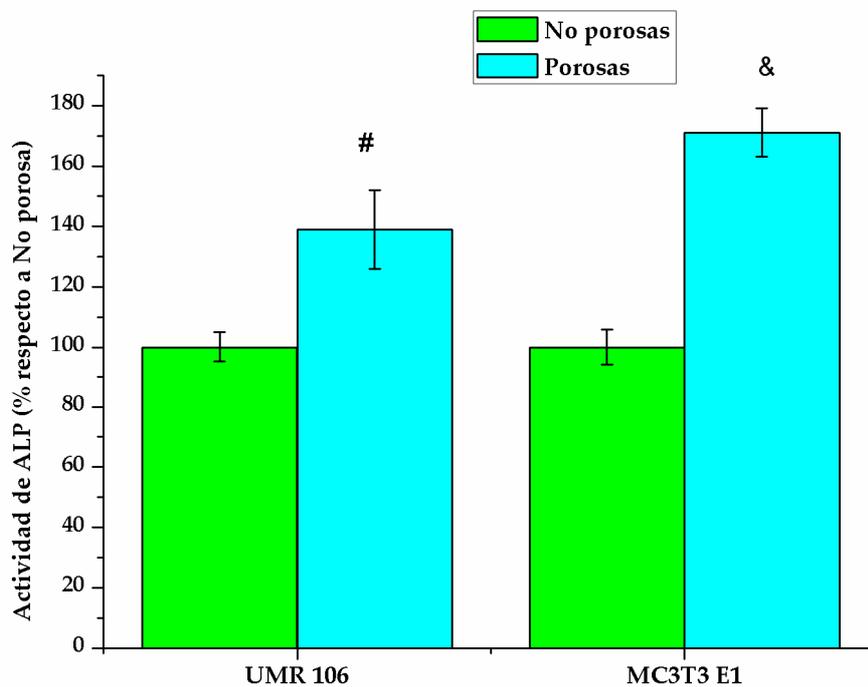


Figura 38: Actividad ALP del células UMR-106 y MC3T3-E1 sobre las matrices porosas y no porosas. &: $p < 0,01$; #: $p < 0,05$.

Capítulo 5

Discusiones

"Si tú tienes una manzana y yo tengo una manzana e intercambiamos las manzanas, entonces tanto tú como yo seguiremos teniendo una manzana. Pero si tú tienes una idea y yo tengo una idea e intercambiamos ideas, entonces ambos tendremos dos ideas."

George Bernard Shaw

Capítulo 5: Discusiones.

El tejido óseo es un tejido capaz de repararse a sí mismo sin dejar ninguna cicatriz. Sin embargo, existen algunas situaciones, como fracturas traumáticas, osteonecrosis, tumores o malformaciones congénitas, en las que la reparación del hueso puede no llevarse a cabo. Es así que en la historia de la humanidad se han planteado distintas estrategias para subsanar estas patologías.

Antiguamente, los miembros afectados eran amputados. Con el advenimiento de buenas prácticas quirúrgicas de la mano del desarrollo de los antibióticos, analgésicos y sobre todo anestésicos, el objetivo del tratamiento ha evolucionando tendiendo a mantener el miembro afectado utilizando distintos tipos de injertos. Además, el uso de metales y sus aleaciones ha permitido el

desarrollo de prótesis, tornillos y placas.

Sin embargo, como se ha descrito en el capítulo Introducción, las metodologías usadas actualmente presentan varias desventajas.

Las distintas alternativas que existen como opción en el reemplazo y la restauración de tejido óseo no son eficaces. Los metales poseen bajo osteointegración, las cerámicas son frágiles y los injertos poseen distintas desventajas, principalmente escasez de donantes y rechazo.

Con la necesidad de resolver la problemática planteada, nace la Ingeniería de Tejido Óseo. Esta área interdisciplinaria utiliza conceptos fundamentales de Ingeniería, Medicina, Química, Física, Bioquímica, etc, para desarrollar

materiales que reviertan la necesidad de utilizar las metodologías antes mencionadas.

En este capítulo se discutirán los resultados encontrados en esta tesis, cuyo objetivo principal fue desarrollar y caracterizar biomateriales que estimulen la formación ósea a partir de dos polímeros, poli- ϵ -caprolactona (PCL) polifumarato de diisopropilo (PFIP) y de una cerámica, Hidroxiapatita (HAP).

En este trabajo, las matrices se obtuvieron utilizando el método de *casting*. Este método consiste en disolver el polímero en un solvente volátil, luego, esta solución se vierte en una caja de petri y se evapora el solvente para obtener así una membrana del polímero. Bajo estas condiciones las membranas obtenidas se caracterizan por presentar una superficie lisa e internamente son no porosas.

Las imágenes de SEM de las membranas de PCL y PFIP, obtenidas mediante el método de

casting muestran una gran diferencia en sus estructuras superficiales. En el caso del PFIP, se ve una estructura lisa y homogénea. Para realizar la fotografía de perfil, fue necesario cortar la membrana por quiebre siguiendo las líneas de fractura, las fotos así obtenidas muestra un corte recto, típico de un material vítreo. No hay referencias bibliográficas sobre el uso de este material o su aplicación en ingeniería de tejidos.

En cuanto a la estructura de la membrana de PCL se observan algunas estructuras cristalinas llamadas esferulitas. Este tipo de estructura ha sido descrita previamente por otros autores que usaron este polímero para obtener diferentes *scaffolds* [Beekmans, 200]. Además, en esta membrana se observan algunos poros de un diámetro aproximado de unos 50 μm . Sin embargo, observando la cantidad de poros por área y la imagen de perfil de las películas, hay que destacar que dichas

películas no exhiben una estructura porosa.

Analizando los resultados de biocompatibilidad, se puede ver que las películas de PFIP y PCL sintetizadas por método de *casting*, mostraron buena biocompatibilidad.

Estos resultados sugieren que la mezcla de los dos polímeros podría presentar mejores propiedades y por lo tanto ser de interés para la ingeniería de tejido óseo.

Ambos polímeros tienen algunas desventajas, en el caso de PFIP, es un material vítreo, por lo que presenta una baja resistencia a la tracción, por lo cual es un material muy difícil de manejar y utilizar en forma de membranas debido a su gran fragilidad. En cuanto a PCL posee una menor T_g^8 (-60 °C), por lo que sus películas son menos frágiles que las de PFIP. Por otro lado, exhibe una tasa de

degradación hidrolítica relativamente más rápida, debido a la naturaleza de su cadena polimérica. En el caso del PFIP, la cadena principal está constituida por enlaces C-C mientras que, en el caso de PCL, la existencia de enlaces éster en la cadena polimérica [-C-O-(C=O)-] hace a este material susceptible a degradaciones hidrolíticas [Más Estellés, 2008].

Con el fin de generar un material que combine las mejores características de cada uno de los homopolímeros individuales (elasticidad y resistencia a la tracción, biodegradabilidad, biocompatibilidad, etc) se ha buscado compatibilizar una mezcla de ambos polímeros. Los resultados (figuras 6 y 7 del capítulo Resultados) de la obtención de la mezcla PCL/PFIP empleando ultrasonido, demuestran que una mezcla compuesta por estos homopolímeros puede ser compatibilizada a través de la formación de un conjunto de

⁸ T_g : temperatura de transición vítrea, temperatura en la cual ocurre un cambio de estado reversible entre vítreo o cristalina y amorfo.

copolímeros de tipo *block* creados durante la aplicación de ultrasonido. Lebovitz et al. [Lebovitz, 2003] también han demostrado la presencia de copolímero en bloque utilizando un procedimiento similar sobre mezclas de poliestireno y poli(*n*-butil) metacrilato. Observando las figuras de SEM (figura 8) de la mezcla así obtenida, se puede ver que dicho material no presenta la separación de fases, típicas de dos sustancias inmiscibles, como en la mezcla física PCL/PFIP (figura 8B).

En conjunto, estos resultados sugieren que la mezcla compatibilizada mediante ultrasonido consigue una integración adecuada de los homopolímeros. Esta metodología parece ser un procedimiento sencillo, accesible y que consume relativamente poco tiempo para obtener la mezcla compatibilizada de dos polímeros no miscibles entre sí.

Se sabe que PFIP es un material más frágil con una alta resistencia a

la tracción, pero estas propiedades se pueden cambiar mediante la mezcla con otros polímeros [Koinuma, 1997], tal como se ha realizado en el presente estudio. La Tabla 1 muestra las propiedades mecánicas evaluadas para la mezcla compatibilizada, la mezcla física y PCL. Es posible ver que la adición de PFIP a PCL no afecta significativamente la resistencia de las matrices según lo evaluado por el módulo de elasticidad. La Elongación al punto de quiebre es una medida de la ductilidad de un material y mostró una disminución estadísticamente significativa en ambas mezclas, debido al efecto del agregado de PFIP a PCL. Diferentes autores han evaluado las propiedades mecánicas del hueso cortical y trabecular [Linde 1989; Poumarat, 1993; Rohlmann, 1980]. En particular, el hueso trabecular tiene una resistencia última a la tracción que es muy similar a la de la mezcla compatibilizada de PCL/PFIP (alrededor de 10 MPa), aunque con un módulo elástico tres

veces mayor, lo que indica que el hueso trabecular es mucho más rígido que nuestra mezcla polimérica. Esta diferencia en las propiedades mecánicas sin embargo, podría ser superada mediante la incorporación de un aditivo inorgánico y osteoinductivo al polímero, tal como la hidroxiapatita. Se retomará este punto de la discusión cuando se traten los resultados del agregado de HAP a las membranas poliméricas.

Se evaluó la biocompatibilidad de la mezcla compatibilizada PCL/PFIP mediante los ensayos de adhesión, proliferación de las células UMR-106 y MC3T3-E1 y la evaluación de los marcadores osteoblásticos en dichas líneas celulares. También se estudio los posibles cambios en la morfología osteoblástica y el citoesqueleto. A pesar de que las membranas de las mezclas de los polímeros, así como las películas de PCL son opacas, se pueden observar al microscopio

óptico las células que se adhieren a las matrices poliméricas. Éstas, presentan una morfología circular con extensión de filopodios. Las células plaqueadas en estas matrices también parecen estar incluidas dentro de las películas. Por otro lado, los osteoblastos adheridos a la matriz de PFIP se observan más picnóticos y de forma redondeada distribuidos en forma aislada o formando grupos o acúmulos de células en la superficie. El hecho de que las células se vean incluidas dentro de la mezcla y las matrices de PCL puede ser ventajoso para la diferenciación osteoblástica indicando un ambiente propicio para el crecimiento de los osteoblastos.

La posible interacción de los osteoblastos con diferentes películas poliméricas también fue investigada a través de la evaluación de los cambios en el citoesqueleto de actina luego de 24 horas de cultivo. En los osteoblastos, crecidos en las películas de los polímeros, se

identificaron los núcleos mediante tinción con DAPI (azul). Las células exhibieron un citoesqueleto de actina bien desarrollado, con las fibras de estrés que se observan en verde gracias a la tinción con FITC-phalloidin. Las células que crecieron en las películas de PFIP y PCL mostraron una morfología diferente, con un anillo de actina desorganizado, periférico y de forma redondeada. Estos resultados son de esperar en el contexto del equilibrio entre la hidrofobicidad y la hidrofiliidad de los diferentes polímeros. El PFIP es más hidrofóbico y por lo tanto induce aglutinación de células mientras que el PCL es más hidrofílico. Así, la mezcla compatibilizada posee un buen balance hidrofóbico/hidrofílico entre ambos polímeros, que favorece una eficiente adhesión celular con abundantes extensiones celulares o filopodia y la formación de un citoesqueleto de actina más organizado. Trabajos de nuestro grupo han demostrado previamente que las células

osteoblásticas UMR-106 se puede unir a un sustrato de colágeno tipo 1 a través de receptores de la integrina mediante las vías $\alpha 1,5\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ [McCarthy, 2004]. Sin embargo, cuando las células se siembran en una superficie que no está cubierta por proteínas de matriz extracelular (MEC), tales como los polímeros evaluados en el presente estudio, la adhesión celular depende del tiempo de secreción de ECM [Kawano, 2001]. Esta secreción habría sido mayor en nuestros experimentos con la mezclas compatibilizada PCL/PFIP, y probablemente explica el aumento observado en la adhesión osteoblástica y la organización del citoesqueleto de actina. Estas observaciones sugieren que las células osteoblásticas crecen mejor en la mezcla de polímeros que en las películas de los correspondientes homopolímeros.

También se evaluó la capacidad de las células que crecen en diferentes matrices para expresar

dos marcadores de actividad osteoblásticas. En la figura 15 se muestran los resultados de la expresión de fosfatasa alcalina después del cultivo de osteoblastos por 48 horas. Este parámetro no se vió afectado por la naturaleza de la matriz investigada. La producción de Colágeno tipo I, la principal proteína de la matriz extracelular expresada en los huesos, también se evaluó. Como se puede observar en la figura 15, una mayor cantidad de colágeno fue producido por las células UMR-106 que crecieron en la mezcla de polímeros, lo que sugiere una afinidad mayor con este material. Sin embargo, cuando la línea MC3T3-E1 se cultivó durante dos semanas en un medio osteogénico, las células produjeron más colágeno en la matriz de PCL (figura 16). Estas observaciones sugieren que un cierto grado de especificidad en el desarrollo osteoblástico es dependiente de la línea celular utilizada en los estudios.

Además, el efecto de los diferentes *scaffolds* poliméricos en la capacidad de las células MC3T3-E1 para mineralizar la matriz se evaluó después de 2 semanas de cultivo en presencia de fosfato de β -glicerol y ácido ascórbico. La figura 17 muestra que la mezcla promueve fuertemente la deposición en los nódulos mineralizados, según la evaluación mediante tinción con rojo de alizarina S, en comparación con los homopolímeros.

Una estrategia muy utilizada para mejorar las diversas propiedades de los *scaffolds*, como las propiedades mecánicas y de osteoinducción, es el agregado a las matrices poliméricas de distintas sustancias inorgánicas, como por ejemplo alúmina, biovidrios, fosfatos de calcio o hidroxiapatita (HAP), entre otros [Cao, 1996]; obteniendo así, materiales compuestos también llamados *composites*. En este capítulo se discutirá la obtención y caracterización de HAP y como su

agregado a las películas de polímeros mejora las propiedades de los *scaffolds*.

Existen varias formas de obtención de HAP [Cao, 1996; Jarcho, 1976; Toriyama, 1996; Otsuka, 1994], empleándose distintos ácidos y bases, solventes orgánicos, control estricto de pH y temperaturas durante la reacción, con una posterior purificación y secado de la HAP obtenida.

Como se comentó en los capítulos anteriores, la HAP en este trabajo fue obtenida incinerando hueso bovino [Ooi, 2007].

En las figuras 18 y 19 se pueden ver los espectros de FTIR y EDAX respectivamente de la HAP obtenida. Estos resultados indican que se obtuvo una HAP con una impureza del 1,07% de CO_3^{2-} respecto al producto final lo que demuestra que se puede obtener así, una HAP de buena calidad en forma mas económica que los métodos antes mencionados.

Nuestros resultados empleando tinción con rojo de alizarina demuestran que la forma irregular de la HAP obtenida interactúa adecuadamente con el polímero, mostrando una distribución de tamaño bimodal de la misma en la membrana. Supova et. al. [Supova, 2009] sugiere que esta distribución bimodal mejora aún más las propiedades de los *composites* ya que partículas de menor tamaño ocupan espacios libres entre partículas más grandes. En relación con el tamaño de las partículas de HAP, algunos investigadores [Webster, 2000; Li (2009)] han mostrado un aumento significativo en la adhesión celular y la proliferación mediante la inclusión de nano-HAP (tamaño promedio de partículas <100 nm) en los *scaffolds* poliméricos.

Se ha demostrado que, debido a las características de su superficie, los cristales de nano-HAP tiene una mayor capacidad para absorber ciertas proteínas que a su vez

promueven la adhesión celular [Webster, 2000; Li (2009)]. Aunque la HAP obtenida en esta tesis tiene un tamaño en el rango del nanómetro (225 nm), su morfología y buena compatibilidad entre la fase del material compuesto ofrecen resultados promisorios, además de un bajo costo en la metodología de obtención.

Como se mencionó anteriormente un requisito importante para los materiales de los *scaffolds* son sus propiedades mecánicas, teniendo en cuenta que como sustitutos temporales del hueso estos deben fomentar la reparación del tejido prestando apoyo mecánico hasta que el tejido se regenere y ocurra la remodelación de forma natural [Prabhakaran, 2009]. Nuestros resultados muestran que los *composites* obtenidos de polímero-HAP presentan un aumento en el módulo de elasticidad en comparación con los polímeros (PCL o Mezcla) sin HAP, lo que

sugiere que la inclusión de este cerámico mejora su rigidez. El estrés causado por la rotura por tracción de Mezcla-HAP de compuestos es muy similar al del hueso trabecular [Rohlmann, 1980], mostrando diferencias significativas con respecto a la PCL-HAP.

La resistencia última a la tracción de HAP-mezcla es muy similar a la del fémur de ratones (alrededor de 10 MPa) [Ding, 2010], mostrando diferencias significativas con respecto a la PCL-HAP.

La disminución en el alargamiento a la rotura inducida por HAP en PCL y mezcla sugiere que el compuesto obtenido es menos dúctil. El aumento en el módulo elástico como la disminución en resistencia última a la tracción de los compuestos polímero-HAP puede ser explicado por la rigidez y una menor plasticidad de la deformación producida por la incorporación del mineral de HAP que es típico de las fases duras inorgánicas.

En el presente estudio se han evaluado diferentes parámetros con el fin de conocer la biocompatibilidad y la citotoxicidad de los *scaffolds* para las dos líneas osteoblásticas UMR-106 y MC3T3-E1. Hemos encontrado que la adición de HAP a PCL y a Mezcla, mejora en forma significativa la biocompatibilidad y la osteogenicidad de los *scaffolds*. La evidencia de esta idea se basa en varias observaciones, a saber: a) la inclusión de HAP en los polímeros aumenta la proliferación de las células osteoblásticas, b) la HAP incluida en la mezcla aumenta la expresión de ALP en las células UMR-106, c) la Mezcla-HAP aumenta la producción de COL tipo I en los dos líneas celulares, y d) se detectaron mayores niveles del factor de transcripción osteogénico Runx-2 cuando los osteoblastos MC3T3-E1 fueron inducidos a diferenciarse y a mineralizar las matrices polímero-HAP. Estas observaciones indican que la incorporación de la hidroxiapatita

produce aumentos en osteogenicidad *in vitro* de las películas PCL y Mezcla.

En una primera etapa desarrollamos una mezcla compatibilizada, que fue capaz de estimular en mayor medida el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos en comparación con los homopolímeros. Otros autores han propuesto matrices PCL-HAP para la ingeniería ósea. Por ejemplo, Choi [Choi, 2004] preparó un compuesto de PCL-HAP con un apatita sintética que se incluyó en el 10-40% en peso en el polímero. Se propuso que este material era adecuado como sustituto óseo o *scaffolds*, aunque los autores no investigaron su biocompatibilidad y/o sus propiedades sobre la osteoinducción. Además, Kim [Kim 2004] desarrolló un material compuesto PCL-HAP poroso para la liberación de drogas. Recientemente, Scaglione [Scaglione, 2009] ha diseñado y desarrollado una malla tridimensional osteoconductiva

basada en un amplia red de polímeros usando PCL y HAP. Ellos demostraron que los *scaffolds* poseen una adhesión celular preferencial en las fibras de PCL con HAP en comparación con la fibra pura de PCL, así como el mejor crecimiento del hueso en ensayos *in vivo* y la colonización de vasos sanguíneos (vascularización). Por lo tanto, nuestro compuesto actual tiene la ventaja de utilizar un poliéster caracterizado previamente (PCL), así como un polímero sintetizado en nuestro laboratorio (PFIP). Este polifumarato es un material más frágil con una alta resistencia a la tracción, que compatibilizada con PCL da lugar a un material con mejores propiedades mecánicas. La adición de HAP a la mezcla mejora aún más sus propiedades mecánicas y su capacidad osteoinductiva, avalando su posible uso como sustrato para el reemplazo de tejidos duros.

Nuestros resultados muestran también que la Mezcla-HAP es un

mejor sustrato para la diferenciación osteoblástica y la mineralización, y la expresión de factores de transcripción osteogénico que son cruciales para la formación de hueso. Dado que el material contiene hidroxiapatita, no fue posible evaluar la mineralización (deposición de Ca y P) en la matriz por técnicas de tinción clásicas como Sirio rojo (para el Ca) o von Kossa (para el P). Así, se evaluó la expresión de Runx-2, uno de los principales factores de transcripción expresados durante la osteogénesis [Komori, 2002]. Después de tres semanas (período de mineralización) de cultivo en un medio osteogénico, la línea de células MC3T3-E1 pre-osteoblástica se ha diferenciado y la mineralizado la matriz, expresando Runx-2 más fuertemente cuando las células son cultivadas sobre *scaffolds* de polímero-HAP.

En cuanto a la degradación, las matrices obtenidas, PCL y Mezcla con y sin el agregado de HAP,

fueron incubadas en DMEM-10% v/v SFB en la estufa de cultivo. Este ensayo demostró que las matrices de PCL con y sin HAP, tuvieron una tasa de degradación mayor que las de las mezcla con o sin HAP; mostrando una diferencia significativa luego de la 7ª semana de incubación. Esto se debe a la estructura de PCL, la cual poseen grupos esterés en su cadena polimérica susceptibles a ser hidrolizados, hecho que no ocurre con el PFIP. El agregado de HAP no modificó la degradación de las membranas.

Existen muchos trabajos [Harnett, 2007; Jansen, 2004; Liu, 2010; Tangpasuthadol, 2003; Williams, 1995; Zanchetta, 2001] que intentan dilucidar sobre cuán hidrofóbicas deben ser las membranas para considerarse buenos *scaffolds*. Esto se debe a que, en una primera instancia las interacciones entre las membranas y las células dependen de interacciones débiles, por ejemplo

dipolo-dipolo. Es así que, si bien todavía no se entiende como la hidrofobicidad o hidrofiliidad de los materiales a usar regularían la actividad celular y posterior regeneración del tejido, es importante conocer estos parámetros. Con el fin de investigar estos aspectos, se determinó el ángulo de contacto de las membranas.

En las matrices obtenidas en esta tesis, se observó que las películas de PFIP poseen un ángulo de contacto mayor que PCL, mientras que el valor obtenido para la Mezcla es intermedio entre ambos polímeros. Estos datos se condicen con la estructura de los polímeros. PFIP es un polímero constituido por una cadena carbonada teniendo a su vez grupos pendientes alifáticos secundarios, siendo este polímero más hidrofóbico que PCL. Notablemente, el ángulo de contacto disminuye con el agregado de HAP, indicando que las películas obtenidas son más hidrofílicas

Un hecho muy importante es que los materiales no deben ser tóxicos ya que van a ser incorporados en el organismo. Por eso, los materiales desarrollados en esta tesis fueron evaluados para conocer la posible toxicidad de los mismos.

En las matrices formadas a partir de los polímeros PCL y Mezcla con y sin agregado de HAP se sembraron células del linaje macrofágico RAW 264.7. Estas células expresan distintos marcadores de actividad celular, tales como, síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) [Denlinger, 1996].

Se evaluó la liberación de óxido nítrico (NO) y de dos citoquinas TNF α e IL-1 [An, 2002; Bixby, 2005; Blonska, 2003; Huttunen, 2000; Maldovan, 2005; Olszanecki, 2002; Sakata, 2003]. Se observó que las membranas no producen una cantidad significativa

de IL-1, TNF- α y NO durante los períodos de tiempo ensayados. Estos resultados sugieren una baja toxicidad de las matrices desarrolladas en este trabajo. Si bien son necesarios estudios adicionales *in vivo*, estos resultados parecen prometedores en la aplicación de las matrices en futuros usos en ingeniería del tejido óseo.

En esta tesis se han mostrado resultados con matrices porosas obtenidas mediante la técnica de *electrospray*. Estas matrices porosas fueron obtenidas por la deposición de microgotas. La concentración y la viscosidad de la solución PCL/PFIP utilizados en el proceso *electrospraying* fue lo suficientemente baja como para evitar la formación de micro o nanofibras.

Las capas de las gotas depositadas al azar generaron un *scaffolds* tridimensional de alta porosidad, con una estructura de poros interconectados. Este hecho es de suma importancia, debido a que en otras estructuras porosas, tales

como *scaffolds* de nanofibras obtenidas por *electrospinnig*, la infiltración de células o la permeabilidad es difícil de lograr y se requiere de estrategias adicionales para permitir la incorporación de células [Beachleya, 2010].

La determinación del ángulo de contacto (WCA) es dificultosa por la presencia de arquitecturas porosas o de la textura [Bico, 2002; Hołownia, 2008; Mamur, 2003]. La rugosidad y porosidad afecta de forma importante las medidas del ángulo de contacto. Se ha descrito que durante estos ensayos, debajo de la gota de agua quedan atrapadas bolsas de aire. La gota queda así sobre un mosaico de sólidos y aire, dando lugar a la medida de un ángulo de contacto aparente con carácter más hidrofóbico. Los detalles cuantitativos de este comportamiento son muy complejos debido a la estructura compleja de los medios porosos reales [Mamur,

2003], análisis que están fuera del alcance de este trabajo. Sin embargo, estas superficies aparentemente más hidrofóbica podría afectar, al menos al principio la unión de las células a la matriz. En consecuencia, es de esperar que el crecimiento y desarrollo de los osteoblastos sea modulado por las características de hidrofobicidad y topografía de las superficies.

El comportamiento celular en biomateriales es un factor crucial para la evaluación de su biocompatibilidad. Esta estructura de las membranas obtenidas por el método de *electrospray* se caracteriza por una superficie rugosa y porosa, aunque más hidrofóbica. Sin embargo, estas propiedades son capaces de mejorar la adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos en cultivo. Otros autores han relacionado anteriormente la porosidad o la hidrofobicidad a la biocompatibilidad de los materiales. Nuestros resultados actuales, sin

embargo no están de acuerdo con la conclusión general de que los materiales hidrofóbicos no son compatibles con la adhesión y la propagación de las células [Webb, 1998]. De todos modos, otros

autores han demostrado que, incluso cuando los materiales son relativamente hidrofóbicos, los osteoblastos pueden crecer, diferenciarse y mineralizar la matriz [Liu, 2010].

Capítulo 6

Conclusiones

"La ciencia siempre se equivoca. Nunca resuelve un problema sin crear otros diez."
George Bernard Shaw

Capítulo 6: Conclusiones.

En este trabajo de tesis se han desarrollado y caracterizado, matrices poliméricas con y sin agregados de HAP con el fin de ser utilizadas en la reparación de tejido óseo y para su posterior aplicación en implantes óseos.

1.-Se obtuvieron matrices de PCL, PFIP y mezcla compatibilizada entre estos homopolímeros mediante la aplicación de ultrasonido. Se logró obtener una mezcla compatibilizada mediante la generación de copolímero de tipo *block*, permitiendo así estabilizar la mezcla. La mezcla obtenida mostró mejores características superficiales respecto a la mezcla física.

2.-El análisis de sus propiedades mecánicas sugiere una similitud con el hueso trabecular y una posible aplicación en la ingeniería de tejido óseo.

3.-Los estudios de biocompatibilidad no mostraron evidencia de efectos citotóxicos cuando las células fueron cultivadas en la mezcla PFIP/PCL. Por el contrario, las células fueron capaces de crecer, de desarrollar las extensiones que se comunicaron con la superficie de la mezcla y expresar diferentes marcadores de fenotipo osteoblástico en este nuevo material.

4.-Por otra parte, las células MC3T3-E1 fueron capaces de depositar más minerales en la membrana de la mezcla.

5.-Se obtuvieron además partículas de Hidroxiapatita (HAP) a partir de la incineración de hueso bovino. Estas fueron caracterizadas por distintas técnicas demostrando la obtención de HAP con muy baja cantidad de impurezas. Estas partículas fueron sometidas a un tratamiento mecánico para

disminuir su tamaño promedio. Es así que se obtuvo un tamaño de partículas semi-nano, mejorando también la dispersión de los tamaños.

6.-Se sintetizaron nuevas matrices mediante la incorporación HAP a la mezcla PFIP/PCL y PCL. Las partículas de HAP mostraron una dispersión uniforme en las matrices poliméricas con una buena compatibilidad entre las fases.

7.-Las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de las matrices se compararon con las de mezcla y PCL sin apatita. La inclusión de HAP mejora sustancialmente las propiedades mecánicas de la mezcla y PCL. Los experimentos en cultivos celulares *in vitro* sugieren que la Mezcla-HAP posee un efecto más osteogénico que las matrices de mezcla o PCL.

8.-Los resultados con las células macrofágica Raw 264.7 demostraron que las matrices PCL y Mezcla, con y sin HAP no son

tóxicas en el período de tiempo evaluado.

9.-La degradación de las matrices en el medio de cultivo demostró que la mezcla posee una tasa de degradación menor respecto a PCL. Además, el agregado de HAP no produce modificación en la degradación de las matrices.

10.-Matrices con alta porosidad de la mezcla compatibilizada de los polímeros PCL y PFIP, se produjeron por la deposición de micropartículas mediante la técnica de *electrospraying*. Estas matrices presentan una característica topográfica diferente en comparación con las películas obtenidas mediante la técnica de *casting*, así como con matrices porosas obtenidas por otras técnicas clásicas. Los experimentos de cultivo celular sugieren que las matrices tridimensionales ofrecen una topografía superficial y un medio ambiente favorable, osteoinductivo y osteoconductor, para la fijación y crecimiento de las

células como osteoblastos, siendo la matriz porosa más osteogénica que las matrices no porosas de la misma mezcla. Estas estructuras porosas

potencialmente pueden ser utilizadas en la ingeniería de tejido óseo.

Capítulo 7

Bibliografía

"No hay propiamente historia, sólo biografías."
Emerson

Capítulo 7: Bibliografía.

1. An S.J., Pae H.O., Oh G.S., Choi B.M., Jeong S., Jang S.I., Oh H., Kwon T.O., Song C.E., Chung H.T. *Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae).* International Immunopharmacology 2 (8) (2002) 1173.
2. Anderson H. C., Garimella R., Tague S. E. *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization.* Frontiers in Bioscience 10 (2005) 822.
3. Arenas G.N., Cañas L.A. *Procedimiento para medir ángulos de contacto en sólidos particulados finos.* Scientia et Technica Año XIII 36 (2007) 833.
4. Arya N., Chakraborty S, Dube N, Katti D.S. *Electrospraying: A Facile Technique for Synthesis of Chitosan-Based Micro/Nanospheres for Drug Delivery Applications.* Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 88B (2009) 17.
5. Aubin J.E. *Bone Stem Cells.* Journal of Cellular Biochemistry - Supplement. 30/31 (1998) 73.
6. Bain S.D., Watkins B.A. *Local Modulation of Skeletal Growth and Bone Modeling in Poultry.* Journal of Nutrition. 123 (1993) 317.
7. Barrios de Arenas I., Schattner C., Vásquez M. *Bioactividad de vidrios modificados del sistema $Na_2O \cdot CaO \cdot SiO_2 \cdot P_2O_5$.* Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. 21 (2) (2001) 90.

8. Beachleya V., Wen X. *Polymer nanofibrous structures: Fabrication, biofunctionalization, and cell interactions*. *Progress in Polymer Science* 35(7) (2010) 868.
9. Beekmans L.G.M., Vancso G.J. *Real-time crystallization study of poly(ϵ -caprolactone) by hot-stage atomic force microscopy*. *Polymer* 41 (2000) 8975.
10. Benito J.C., Puig A.G. *La respuesta inmunitaria en el trasplante de aloinjertos óseos*. *Inmunología* 19(4) (2000) 148.
11. Bico J., Thiele U., Quéré D. *Wetting of textured surfaces*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 206 (2002) 41.
12. Bielby R., Jones E., Mc Gonagle D. *The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone*. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 38S1 (2007) S26.
13. Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Ripamonti A., Roveri N., Romanello M., Noris Suarez K., Moro L. *Chemical and Structural Characterization of the Mineral Phase from Cortical and Trabecular Bone*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 68 (1997) 45.
14. Bixby J., Ray T.D., Chan F.K.M. *TNF, Cell Death and Inflammation*. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4 (6) (2005) 557.
15. Blonska M., Czuba Z.P., Krol W. *Effect of Flavone Derivatives on Interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA Expression and IL-1 β Protein Synthesis in Stimulated RAW 264.7 Macrophages*. *Scandinavian Journal of Immunology* 57 (2) (2003) 162.
16. Bozal C. *Biología del Osteocito*. *Actualizaciones en Osteología* 2(1) (2006) 19.
17. Bonewald L.F. *Osteocytes as multifunctional cells*. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 6 (4) (2006) 331.

18. Bonewald L.F., Johnson M.L. *Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling*. Bone 42 (2008) 606.
19. Boskey A.L. *Chapter 12; Mineralization, Structure and Function of Bone en Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Editado por Seibel M. J., Robins S.P., Bilezikian J.P. 2º edicion (2006).
20. Boyce B.F., Xing L. *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Archives of Biochemistry and Biophysics 473 (2008) 139.
21. Braddock M., Houston P., Campbell C., Ashcroft P. *Born Again Bone: Tissue Engineering for Bone Repair*. News in Physiological Sciences. 16 (2001) 208.
22. Bradford M.M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry 72 (1976) 248.
23. Brighton C.T., Hunt R.M. *Early Histological and Ultrastructural Changes in Medullary Fracture Callus*. Journal of Bone and Joint Surgery 73 (1991) 832.
24. Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F. *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials 21 (2000) 2347.
25. Burr D.B., Robling A.G., Turner C.H. *Effects of Biomechanical Stress on Bones in Animals*. Bone 30 (2002) 781.
26. Cao W., Hench L.L. *Bioactive Materials*. Ceramics International 22 (1996) 493.
27. Chakraborty S., Liao I.-C., Adler A., Leong K.W. *Electrohydrodynamics: A facile technique to fabricate drug delivery systems*. Advanced Drug Delivery Reviews 61 (12) (2009) 1043.
28. Chen Q., Roether J. A., Boccaccini A. R. *Chapter 6; Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials en Topics in Tissue Engineering, Vol. 4* (2008). Eds. Ashammakhi N., Reis R., Chiellin F.

29. Choi D., Marra K.G., Kumta P.N. *Chemical synthesis of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) composites*. Materials Research Bulletin 39 (2004) 417.
30. Clarke B. *Normal bone anatomy and physiology*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 3 (2008), S131.
31. Clarke H., Garimella R., Tague S. E. *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization*. Frontiers in Bioscience 10 (2005) 822.
32. Cooper L.F. *Biologic determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements*. Journal of Prosthetic Dentistry 80 (1998) 439.
33. Cortizo A.M., Etcheverry S.B. *Vanadium derivatives act as growth factor--mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells*. Molecular and Cellular Biochemistry. 145 (2) (1995) 97.
34. Cortizo M. S., Andreetta H. A., Figini R.V. *Molecular Characterization of Poly(diisopropylfumarate) by the Absolute Calibration Method in Molecular Exclusion Chromatography (GPC)*. Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications 12, (1989) 372.
35. Cortizo M.S. *Polymerization of diisopropyl fumarate under microwave irradiation*. Journal of Applied Polymer Science, 103(6) (2007) 3785.
36. Cortizo M.S., Molinuevo M.S., Cortizo A.M. *Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2 (2008) 33.
37. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition. CRC Press, pag F110.

38. Dempster D. W., Zhou H. *Chapter 22; New Concepts in Bone Remodeling en Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Editado por Seibel M.J., Robins S.P., Bilezikian J.P. 2º Edition (2006).
39. Denlinger L.C., Fiset P.L., Garis K.A., Kwon G., Vazquez-Torres A., Simon A.D., Nguyen B., Proctor R.A., Bertics P.J., Corbett J.A. *Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium*. *The Journal of Biological Chemistry* 271(1) (1996) 337.
40. Ding W.G., Jiang S.D., Zhang Y.H., Jiang L.S., Dai L.Y. *Bone loss and impaired fracture healing in spinal cord injured mice*. *Osteoporos International* 22 (2) (2011) 507.
41. Duplomb L., Dagouassat M., Jourdon P., Heymann D. *Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation*. *Stem Cells* 25 (2007) 544.
42. Erben R.G: *Trabecular and Endocortical Bone Surfaces in the Rat: Modeling or Remodeling?* *The anatomical record* 246 (1996) 39.
43. Eriksen E. F. *Cellular mechanisms of bone remodeling*. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 11 (2010) 219.
44. Estrada C., Paz A.C., López L.E. *Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas*. *Revista EIA* 5 (2006) 93.
45. Feng X., McDonald J.M. *Disorders of Bone Remodeling*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 6 (2011) 121.
46. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera Gracia M.A., del Canto Pingarrón M., Blanco Jerez L. *Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11 (2006) E47.

47. Finch J. *The ancient origins of prosthetic medicine*. *The Lancet* 377 (9765) (2011) 548.
48. Forrest S. M., Ng K.W., Findlay D.M., Michelangeli V.P., Livesey S.A., Partridge N.C., Zajac J.D., Martin T.J. *Characterization of an osteoblast-like clonal cell line which responds to both parathyroid hormone and calcitonin*. *Calcified Tissue International* 37 (1) (1985) 51.
49. Franceschi R.T, Iyer B.S. *Relationship Between Collagen Synthesis and Expression of the Osteoblast Phenotype in MC3T3-E1 Cells*. *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (2) (1992) 235.
50. Franceschi R.T, Iyer B.S., Cui Y. *Effects of Ascorbic Acid on Collagen Matrix Formation and Osteoblast Differentiation in Murine MC3T3-E 1 Cells*. *Journal of Bone Mineral Research* 9 (6) (1994) 843.
51. Franz-Odenaal T.A., Hall B.K., Witten P. E. *Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes*. *Developmental Dynamics* 235 (2006) 176.
52. Gallagher J.C., Sai A.J. *Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis*. *Maturitas*. 65 (4) (2010) 301.
53. Gundberg C.M. *Matrix proteins*. *Osteoporos Internatinal* 14 (5) (2003) S37.
54. Harnett E.M., Alderman J., Wood T. *The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture*. *Colloids and Surface B: Biointerface* 55 (2007) 90.
55. Hench L.L. *Third-Generation Biomedical Materials*. *Science* 295 (2002) 1014.
56. Hench L.L. *Genetic design of bioactive glass*. *Journal of the European Ceramic Society* 29 (7) (2009) 1257.
57. Hochedlinger K., Jaenisch R. *Nuclear reprogramming and pluripotency*. *Nature* 441 (2006) 1061.

58. Holden J.L., Clement J.G., Phakey P.P. *Age and Temperature Related Changes to the Ultrastructure and Composition of Human Bone Mineral*. Journal of Bone and Mineral Research 10 (9)(1995) 1400.
59. Hołownia D., Kwiatkowska I., Hupka J. *An investigation on wetting of porous materials*. Physicochemical Problems of Mineral Processing 42 (2008) 251.
60. Hutmacher D. W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Biomaterials 21 (2000) 2529.
61. Huttunen K., Ruotsalainen M., Iivanainen E., Torkko P., Katila M.-L., Hirvonen M.-R. *Inflammatory responses in RAW264.7 macrophages caused by mycobacteria isolated from moldy houses*. Environmental Toxicology and Pharmacology 8 (4) (2000) 237.
62. Jansen E.J.P., Sladek R.E.J., Bahar H., Yaffe A., Gijbels M.J., Kuijjer R., Bulstra S.K., Guldemon N.A., Binderman I., Koole L.H. *Hydrophobicity as a design criterion for polymer scaffolds in bone tissue engineering*. Biomaterials 26 (21) (2005) 4423.
63. Jarcho M., Bolen C.H., Thomas M.B., Bobick J., Kay J. *Hidroxyapatite synthesis and charectization in dense plicrystalline form*. Journal of Materials Science 11 (1976) 2027.
64. Jones J.R., Hench L.L. *Regeneration of trabecular bone using porous ceramics*. Current Opinion in Solid State and Materials Science 7 (2003) 301.
65. Joschek S., Nies B., Krotz R., Gofpferich A. *Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone*. Biomaterials 21(2000) 1645.
66. Junqueira L. C. U., Bignolas G., Brentani R. R. *A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen*. Analytical Biochemistry 94 (1) (1979) 96.

67. Kanczler J.M., Oreffo R.O.C. *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. European Cells and Materials 15 (2008) 100.
68. Karageorgiou V., Kaplan D. *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. Biomaterials 26 (2005) 5474.
69. Karlsson K.H., Hupa L. *Thirty-five years of guided tissue engineering*. Journal of Non-Crystalline Solids 354 (2008) 717.
70. Kawano K., Kantak S. S., Murai M., Yao C. C., Kramer R. H. *Integrin alpha3beta1 engagement disrupts intercellular adhesion*. Experimental Cell Research. 262 (2001) 180.
71. Khan Y., Yaszemski M.J., Mikos A.G., Laurencin C.T. *Tissue Engineering of Bone: Material and Matrix Considerations*. The Journal of Bone & Joint Surgery. 90 (1) (2008) 36.
72. Kim H.W., Knowles J.C., Kim H.E. *Hydroxyapatite/poly(epsilon-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery*. Biomaterials 25 (2004) 1279.
73. Koinuma Y., Murata Y., Otsu T., Gotok K., Fujiwarah H., Takita Y. *Thermal and Mechanical Properties of Poly (diisopropyl fumarate) Blends with Various Polymers*. Kobunshi Ronbunshu 54 (1997) 301.
74. Komori T. *Runx2, A Multifunctional Transcription Factor in Skeletal Development*. Journal of Cellular Biochemistry 87 (2002) 1.
75. Krane S.M. *Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic target*. The Journal of Experimental Medicine 201(2005) 841.
76. Książopolska-Orłowska K. *Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy*. Polskie archiwum medycyny wewnerznej 120 (9) (2010) 368.

77. Kumbar S.G., Bhattacharyya S., Sethuraman S., Laurencin C.T. *A preliminary report on a novel electrospray technique for nanoparticle based biomedical implants coating: precision electrospraying*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Appl Biomater 81B (2007) 91.
78. Laemmli U.K. *Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227 (1970) 680.
79. Landis W.J., Song M.J., Leith A., McEwen L., McEwen B.F. *Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in 3 dimensions by high-voltage electron-microscopic tomography and graphic image-reconstruction*. Journal of Structural Biology. 110 (1) (1993) 39.
80. Langer R., Vacanti J. P. *Tissue Engineering*. Science 260 (1993) 920.
81. Lebovitz A. H., Gray M. K., Chen A. C., Torkelson J.M. *Interpolymer radical coupling reactions during sonication of polymer solutions*. Polymer 44 (2003) 2823.
82. Leong K. F., Cheah C. M., Chua C. K. *Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs*. Biomaterials 24 (13) (2003) 2363.
83. Lerner U.H. *Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis*. Journal of Dental Research 85 (7) (2006) 584.
84. Li J., Dou Y., Yang J., Yin Y., Zhang H., Yao F., Wang H., Yao K. *Surface characterization and biocompatibility of micro- and nano- hydroxyapatite/chitosan gelatin network films*. Materials Science and Engineering: C-Bio S 29 (2009) 1207.
85. Lian J.B., Stein G.S. Chapter 14; *The cells of bone en Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. Editado por Seibel M. J., Robins S.P., Bilezikian J.P. 2º edicion (2006).

86. Liebschner M.A.K., Wettergreen M.A. *Chapter 6. Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications*. Topics in Tissue Engineering. Eds. N. Ashammakhi & P. Ferretti (2003).
87. Lievers W.B., Waldmana S.D., Pilkey A.K. *Minimizing specimen length in elastic testing of end-constrained cancellous bone*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials 3 (2010) 22.
88. Linde F., Hvid I. *The effect of constraint on the mechanical behaviour of trabecular bone specimens*. Journal of Biomechanics. 22 (1989) 485.
89. Liu R., Schindeler A., Little D.G. *The potential role of muscle in bone repair*. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions 10 (1) (2010) 71.
90. Liu X., Ma P.X. *Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Annals of Biomedical Engineering 32 (3) (2004) 477.
91. Liu Z-M., Gu Q., Xu Z.-K., Groth T. *Synergistic effect of Polyelectrolyte Multilayers and Osteogenic Growth Medium on Differentiation of Human Mesenchymal stem cells*. Macromolecular Bioscience. 10 (2010) 1043.
92. Loong C.-K, Rey C., Kuhn L. T., Combes C., Wu Y., Chen S.-H., Glimcher M. J. *Evidence of Hydroxyl-Ion Deficiency in Bone Apatites: An Inelastic Neutron-Scattering Study*. Bone 26 (6) (2000) 599.
93. Lowenstein C.J., Padalko E. *iNOS (NOS2) at a glance*. Journal of Cell Science 117 (2004) 2865.
94. Ma P.X. *Scaffolds for tissue fabrication*. Materials Today (2004) 30.
95. Malloy K.M., MD; Hilibrand A.S. *Autograft versus Allograft in Degenerative Cervical Disease*. Clinical orthopaedics and related research 394 (2002) 27.
96. Marmur A. in *Contact Angle, Wettability and Adhesion*, Edited Mittal K. L., VSP, Utrecht 3 (2003) 373.
97. Martin R.B. *Toward a unifying theory of bone remodeling*. Bone 26 (1) (2000) 1.

98. Martin T.J., Udagawa N. *Hormonal Regulation of Osteoclast Function*. Trends in Endocrinology & Metabolism 9 (1) (1998) 6.
99. Más Estallés J., Vidaurre A., Meseguer Dueñas J.M., Castilla Cortázar I. *Physical characterization of polycaprolactone scaffolds*. The Journal of Materials Science: Materials in Medicine 19 (1) (2008) 189.
100. McCarthy A. D., Uemura T., Etcheverry S. B., Cortizo A. M. *Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-1 collagen matrix*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 36 (2004) 840.
101. McKibbin B. *The biology of fracture healing in long bones*. The Journal of Bone and Joint Surgery. 60-B (2) (1978) 150.
102. Meyers M.A., Chen P.Y., Lin A.Y.M., Seki Y. *Biological materials: Structure and mechanical properties*. Progress in Materials Science 53 (2008) 1.
103. Moldovan N.I. *Emerging roles of reactive oxygen and nitrogen species in stem/progenitor cells*. Antioxidants & Redox Signaling 7 (11&12) (2005) 1409
104. Molinuevo M.S., Schurman L., McCarthy A.D., Cortizo A.M., Tolosa M.J., Gangoití M.V., Arnol V., Sedlinsky C. *Effect of Metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: In Vivo and In Vitro Studies*. Journal of Bone and Minerals Research 25 (2010) 211.
105. Morrison S., Kimble J. *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. Nature 441 (2006) 1068.
106. Morriss-Kay G. M. *Derivation of the mammalian skull vault*. Journal of Anatomy 199 (2001) 143.
107. Morosano M., Masoni A., Sanchez A. *Incidence of hip fractures in the city of Rosario, Argentina*. Osteoporosis International 16 (2005) 1339.

108. Mountziaris P.M., Mikos A.G. *Modulation of the Inflammatory Response for Enhanced Bone Tissue Regeneration*. Tissue Engineering: Part B 14(2) (2008) 179.
109. Oh J.S., Isayev A.I., Rogunova M.A. *Continuous ultrasonic process for in situ compatibilization of polypropylene/natural rubber blends*. Polymer 44 (2003) 2337.
110. Olsen B.R., Reginato A.M., Wang W. *Bone development*. Annual Review of Cell and Developmental Biology 16 (2000) 191.
111. Olszanecki R., Gebska A. Kozlovski V.I., Gryglewski R.J. *Flavonoids and nitric oxide synthase*. Journal of Physiology and Pharmacology 53 (4) (2002) 571.
112. Ooi C.Y., Hamdi M., Ramesh S. *Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone*. Ceramics International 33 (2007) 1171.
113. Orimo H. *The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in Health and disease*. Journal of Nippon Medical School 77 (1) (2010) 4.
114. Ornitz D.M., Marie P.J. *FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease*. Genes & Development 16 (2002) 1446.
115. Ortega N., Behonick D. J., Werb Z. *Matrix remodeling during endochondral ossification*. Trends in Cell Biology. 14(2) (2004) 86.
116. Otsuka M., Matsuda Y., Hsu J., Fox J., Higuchi W. *Mechanochemical synthesis of bioactive material: effect of environmental conditions on the phase transformation of calcium phosphates during grinding*. Bio-Medical Materials and Engineering. 4 (5)(1994) 357.
117. Peitl O., Zanotto E.D., Hench L.L. *Highly bioactive $P_2O_5-Na_2O-CaO-SiO_2$ glass-ceramics*. Journal of Non-Crystalline Solids 292 (2001) 115.

118. Porter J.R., Ruckh T.T., Popat C.K. *Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies*. *Biotechnology Progress* 25 (2009) 1539.
119. Potier E., Noailly J., Ito K. *Directing bone marrow-derived stromal cell function with mechanics*. *Journal of Biomechanics* 43 (2010) 807.
120. Poumarat G., Squire P. *Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft*. *Biomaterials* 14 (5) (1993) 337.
121. Prabhakaran M.P., Venugopal J., Ramakrishna S. *Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering*. *Acta Biomaterials* 5 (2009) 2884.
122. Prina R., Rubino P., Gutiérrez R., Cassini F. *Resultados tempranos de la artroplastia cervical utilizando PRODISC-C*. *Revista Argentina de Neurocirugia* 23 (2009) 5599.
123. Quarles L.D., Yohay D.A., Lever L.W., Caton R., Wenstrup R.J. *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 (1992) 683.
124. Raschke W. C., Baird S., Ralph P., Nakoinz I. *Functional Macrophage Cell Lines Transformed by Abelson Leukemia Virus*. *Cell* 15 (1978) 261.
125. Reddi A.H. *Bone Morphogenesis and Modeling: Soluble Signals Sculpt Osteosomes in the Solid State*. *Cell* 89 (1997) 159.
126. Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. *Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 27(2006) 3413.
127. Rho J.Y., Spearing L.K., Zioupos P. *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*. *Medical Engineering & Physics* 20 (1998) 92.

128. Rohlmann A., Zilch H., Bergmann G., Kolbel R. *Material properties of femoral cancellous bone in axial loading. Part I: Time independent properties.* Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 97 (1980) 95.
129. Rizzoli R. Atlas of Postmenopausal Osteoporosis. Third edition (2010).
130. Sakata K., Hirose Y., Qiao Z., Tanaka T., Mori H. *Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line.* Cancer Letters 199 (2003) 139.
131. Salgado A.J., Coutinho O.P., Reis R.L. *Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends.* Macromolecular Bioscience 4 (2004) 743.
132. Scaglione S., Ilengo C., Fato M., Quarto R. *Hydroxyapatite-coated polycaprolactone wide mesh as a model of open structure for bone regeneration.* Tissue Engineering Part A 15 (2009) 155.
133. Shapiro F. *Bone development and its relation to fracture repair the role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts.* European Cells and Materials 15 (2008) 53.
134. Shum L., Nuckolls G. *The life cycle of chondrocytes in the developing skeleton.* Genes and Development 16 (2002) 1446.
135. Schurman L., Bagur A., Claus-Hermberg H., Messina OD., Negri A., Sánchez A. *Guías para diagnóstico, prevención y tratamiento de la osteoporosis 2007.* Revista Argentina de Osteología 6 (2007) 27.
136. Sikavitsas V.I., Temenonoff J.S., Mikos A.G. *Biomaterials and bone mechanotransduction.* Biomaterials 22 (2001) 2581.
137. Speaker B.L. *Influence of rapid growth on skeletal adaptation to exercise.* Journal of musculoskeletal & neuronal interactions 6(2) (2006) 147

138. Steiniche T., Hauge E.M. *Chapter 3; Normal Structure and Function of Bone* en *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*. Editado por An Y. H., Martin K. L. (2003).
139. Sudo H., Kodama H.A., Amagi Y., Yamamoto S., Kasai S. *In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria*. *The Journal of Cell Biology* 96 (1) (1983) 191.
140. Supova M. *Problem of hydroxyapatite dispersion in polymer matrices: a review*. *The Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009) 1201.
141. Takeuchi Y., Matsumoto T., Ogata E., Shishiba Y. *Effects of transforming growth factor beta 1 and L-ascorbate on synthesis and distribution of proteoglycans in murine osteoblast-like cells*. *Journal of Bone and Mineral Research* 8(7) (1993) 823.
142. Teixeira C.C., Agoston H., Beier F. *Nitric oxide, C-type natriuretic peptide and cGMP as regulators of endochondral ossification*. *Developmental Biology* 319(2) (2008) 171.
143. Thurston A.J. *Paré and prosthetics: the early history of artificial limbs*. *ANZ Journal of Surgery*. 77 (12) (2007) 1114.
144. Toriyama M., Ravaglioli A., Krajewski A., Celotti G., Piancastelli A. *Synthesis of hydroxyapatite-based powders by mechano-chemical method and their sintering*. *Journal of the European Ceramic Society*. 16 (1996) 429.
145. Tsikas D. *Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids*. *Free Radical Research*. 39(8) (2005) 797.
146. Tsikas D. *Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research*. *Journal of Chromatography B* 851 (2007) 51.

147. Tullberg-Reinert H., Jundt G. *In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate.* Histochemistry and Cell Biology 112 (1999) 271.
148. Ueno A., Kitase Y., Moriyama K., Inoue H. *MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells.* Matrix Biology 20 (5-6) (2001) 347.
149. Valle-Ortiz M., Crespo Romero R., Garcia G.V., Gonzalez Roldan C.J, Sanchez-Cruzado B., Martinez B.T. *Aloinjertos óseos.* Acta Ortopedica Castellano-Manchega 1 (1) (2000) 59
150. Vallet-Regi M. *Biocerámicas.* Anales de la Real Sociedad Española de Química 2 (2003) 167.
151. Villemure I., Stokes I.F. *Growth plate mechanics and mechanobiology. A survey of present understanding.* Journal of Biomechanics 42 (2009) 1793.
152. Walters M.A., Leung Y.C., Blumenthal N.C., LeGeros R.Z., Konsker K.A. *A raman and infrared spectroscopic investigation of biological hydroxyapatite.* Journal of Inorganic Biochemistry 39 (1990) 193.
153. Wang D., Christensen K., Chawla K., Xiao G., Krebsbach P. H., Franceschi R.T. *Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential.* Journal of Bone and Minerals Research 14 (6) (1999) 893.
154. Webb K., Hlady V., Tresco P. *Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading and cytoskeletal organization.* Journal of Biomedical Materials Research 41 (1998) 422.

155. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R. *Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics*. Journal of Biomedical Materials Research 51 (2000) 475.
156. Williams D.F. , Zhong S.P. *Biodeterioration/Biodegradation of polymeric medical devices In Situ*. Internatinal Biodeterioration & Biodegradation 130 (1994) 95.
157. Wu Y., Clark R.L. *Electrohydrodynamic atomization: a versatile process for preparing materials for biomedical applications*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition 19 (5) (2008) 573.
158. Yin T., Li L. *The stem cell niches in bone*. J. Clin Invest. 116 (2006) 1195.
159. Yokochi C., Rohen J.W., Weinreb E.L. *Atlas fotografio de anatomia del cuerpo humano*. 3^{era} Edicion. 1991.
160. Zanchetta P., Guezennec J. *Surface thermodynamics of osteoblasts: relation between hydrophobicity and bone active biomaterials*. Colloids and Surface B: Biointerfaces 22 (2001) 301.
161. Zernicke R., MacKay C., Lorincz C. *Mechanims of bone remodeling during weigth-bearing excercise*. Applied Physiology, Nutrition and Metabolism 31 (2006) 655.

Nunca llega el momento en que puedas decir: he trabajado bien, y mañana es domingo. En cuanto te detienes, vuelves a empezar otra vez desde el principio. Puedes dejar de lado un cuadro y decir que no lo vas a tocar más. Pero nunca podrás ponerle debajo la palabra... FIN.

Pablo Picasso