



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Diseño y aplicación de hidrogeles
basados en polisacáridos para
ingeniería de tejidos***

Tesista: Lic. Lara F. Medina

Directoras: Prof. Dra. M. Susana Cortizo

Prof. Dra. Ana M. Cortizo

Año: 2019

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

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



RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una ciencia altamente multidisciplinaria que se sustenta en distintas ciencias como la medicina clínica, ingeniería mecánica, ingeniería de materiales, genética y disciplinas relacionadas tanto a la ingeniería como a las ciencias de la vida. Especialmente, la ingeniería tisular nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos que se utilizan actualmente. En contraste con el enfoque clásico de biomateriales, se basa en la comprensión de la formación y regeneración de los tejidos, y tiene como objetivo inducir nuevos tejidos funcionales, en lugar de simplemente implantar nuevas piezas de repuesto. Este enfoque se basa en gran medida en el uso de biomateriales que puedan funcionar como sustitutos biológicos, como andamios 3D porosos, para proporcionar el entorno adecuado para la regeneración de los tejidos y órganos dañados. Estos andamios esencialmente actúan como una plantilla para guiar la formación de tejido y el crecimiento celular.

La hipótesis de este trabajo es que la combinación de polímeros naturales adecuadamente compatibilizada, junto con la incorporación de un biocerámico, permite lograr un nuevo biomaterial hidrogel para aplicación en medicina regenerativa ósea. Para probar esta hipótesis se desarrolló un biomaterial a partir de polímeros naturales. En particular, el quitosano (Qo), un biopolímero policatiónico, presenta muy buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad pero sus propiedades mecánicas y tasa de degradación no son las adecuadas para su aplicación en ingeniería de tejido óseo. La carboximetilcelulosa (CMC), un polímero polianiónico derivado de la celulosa con grupos carboximilo unidos a los grupos hidroxilo de la unidad de glucosa, tiene gran importancia industrial, y su uso se ha incrementado, no sólo porque es de bajo costo y tiene capacidad para reaccionar con moléculas cargadas dentro de rangos de pH específicos, sino porque sus productos de degradación son biocompatibles y biodegradables.

Como objetivo general de esta tesis doctoral se propuso desarrollar un biomaterial basado en hidrogeles de polisacáridos para aplicación en medicina regenerativa, empleando una metodología de ultrasonido para mejorar la compatibilidad, la estabilidad, las propiedades mecánicas y las propiedades biológicas de los complejos de polielectrolitos (PEC) basados en quitosano (Qo) y carboximetilcelulosa (CMC), a través del acoplamiento de macrorradicales interpoliméricos producidos por la reacción sonoquímica. El biomaterial obtenido fue caracterizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Además, se realizaron pruebas de hinchamiento (swelling), se estudiaron las propiedades mecánicas y la cinética de degradación del biomaterial

obtenido. Conjuntamente, se evaluó la posible citotoxicidad in vitro de los andamios utilizando cultivos de macrófagos *RAW 264.7*. El material obtenido no mostró evidencia de citotoxicidad, lo que sugiere que los biomateriales basados en un complejo polielectrolito desarrollados en condiciones de ultrasonido (PEC-US) podrían ser útiles en el campo de la ingeniería de tejidos óseo-cartilaginoso.

Además, la hidroxiapatita (HAp) de dimensiones nanométricas fue obtenida a partir de la incineración de hueso bovino, mediante un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio. La reducción de tamaño promedio de las partículas de HAp obtenidas, fue analizada mediante imágenes de SEM y TEM, demostrando que es posible disminuir el tamaño de las partículas hasta dimensiones nanométricas (del orden de los 25nm) por medio de una combinación de técnicas (mecánica y ultrasonido). Las nanopartículas de HAp (nHAp) fueron utilizadas en la segunda parte del trabajo como nano-refuerzo del scaffold PEC-US desarrollado. La reducción del tamaño promedio de partículas resultó importante porque mejoró la integración de las mismas en la matriz polimérica.

En conjunto, los resultados indican que el biomaterial desarrollado posee características adecuadas, tanto desde el punto de vista fisicoquímico como de biocompatibilidad, mostrando su potencialidad para ser utilizado en la regeneración de tejido óseo-cartilaginoso.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es el resultado de varios años de trabajo y estudio, en los cuales he encontrado personas 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, han colaborado a llevar a cabo este trabajo.

En primer lugar, a mis directoras de tesis, la Dra. Susana Cortizo y la Dra. Ana Cortizo, no solo por ser mis guías académicas y brindarme la oportunidad abriéndome las puertas de sus respectivos grupos de trabajo, sino también por todo su apoyo a nivel personal.

Agradezco también a todos los macromoleculares del INIFTA: Sole, Tama, Pablo, Fer, Leti y Sofi. Al Negro mención especial por ser un “padre académico y de la vida”. A los liommenses: Juanma, Vir, Silvina, Antonio, Nahuel, Lucía, Aye, Agus, Lau, Luz y Lucas. A los que pasaron y se fueron: Gime, Mati y Maga. A todos ellos, por haber dejado huellas y no cicatrices, porque de todos algo he aprendido.

A Inés... por ser una persona de acero inolvidable que me enseñó por sobre todo que “Caminando en línea recta, uno no puede llegar muy lejos”. A Britez por alentarme siempre, por enseñarme que “Todo lo mal ganado es bien perdido”, este título es para ella. A Samuel por hacerme reír sobre todo de mí misma, y enseñarme que “Solo los que corren el riesgo de avanzar, pueden saber a dónde pueden llegar”. A Medina por darme lo mejor de él y por que “cada uno, cada uno; cada cual, cada cual”. A Gastón, Mari, Cutu, Juanjo, Frankie, Ema y Marco, por ser parte de mi vida y por “Que las verdades no tengan complejos”. A Vera, por enseñarme el “hoy y ahora”. A ACDC porque “It's a long way to the top (if you wanna Rock'n'Roll)”.

Quiero agradecerle también, a la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP y al CONICET por las becas y financiamiento; por brindarme la posibilidad de un título de posgrado, por su educación gratuita y de excelente calidad. Gracias a todos los miembros del INIFTA, que hacen posible el trabajo diario, y a los que acompañan con un mate (siempre bienvenido) o una charla de pasillo.

Gracias Totales!

INDICE

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
I.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	10
I.1.1 Tejido óseo	10
<i>I.1.1.1 Composición ósea</i>	10
<i>I.1.1.2 Osteogénesis</i>	13
<i>I.1.1.3 Funciones endocrinas del tejido óseo</i>	13
<i>I.1.1.4 Estructura del hueso</i>	14
<i>I.1.1.5 Remodelación y reparación ósea</i>	17
<i>I.1.1.6 Lesiones y tratamientos actuales</i>	19
I.1.2 Ingeniería de Tejidos	22
<i>I.1.2.1 Paradigma de la Ingeniería del Tejido Óseo</i>	23
<i>I.1.2.2 Biomateriales de primera generación</i>	25
<i>I.1.2.3 Biomateriales de diseño</i>	25
I.2 HIPOTESIS	28
I.3 OBJETIVOS	29
I.3.1 Objetivo General	29
I.3.2 Objetivos Específicos	29
CAPÍTULO II: Diseño, síntesis y caracterización de matrices poliméricas	30
II.1 INTRODUCCIÓN	31
II.1.1. Complejos de Polielectrolitos	32
<i>II.1.1.1. Quitosano (Qo)</i>	33
<i>II.1.1.2. Carboximetilcelulosa (CMC)</i>	36
II.1.2. Técnicas de procesamiento: Liofilización	37
II.1.3. Ultrasonido	38
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS	40
II.2.1. Reactivos y drogas	40
II.2.2. Caracterización de los polímeros	40
II.2.3. Degradación por ultrasonido	41
II.2.4. Obtención del biomaterial	41
II.2.5. Caracterización fisicoquímica de las matrices	42
<i>II.2.5.1. Espectroscopia ATR-FTIR</i>	42
<i>II.2.5.2. Microscopia SEM</i>	42
<i>II.2.5.3. Estudio de hinchamiento</i>	42
<i>II.2.5.4. Estudios de degradación</i>	43
<i>II.2.5.5. Pruebas mecánicas</i>	44
II.2.6. Ensayos biológicos	44
<i>II.2.6.1. Cultivos de células MC3T3-E1 preosteoblásticas</i>	44
<i>II.2.6.1.1 Ensayo de morfología y crecimiento celular</i>	45
<i>II.2.6.2 Cultivos de macrófagos murinos RAW264.7</i>	45

II.2.6.2.1 Viabilidad celular	46
II.2.6.2.2. Producción de NO	47
II.2.7. Análisis Estadístico de los datos	47
II.3 RESULTADOS y DISCUSIÓN	48
II.3.1. Caracterización de los polímeros	48
II.3.2. Degradación por ultrasonido	48
II.3.3. Obtención del biomaterial	52
II.3.4. Caracterización fisicoquímica de las matrices	53
II.3.4.1. Espectroscopia ATR-FTIR	53
II.3.4.2. Microscopia SEM	54
II.3.4.3. Estudio de hinchamiento	57
II.3.4.4. Estudios de degradación	59
II.3.4.5. Pruebas mecánicas	61
II.3.5 Ensayos biológicos	63
II.3.5.1 Ensayo de morfología y crecimiento celular de células MC3T3-E1 preosteoblásticas	64
II.3.5.2 Cultivos de macrófagos murinos RAW264.7	65
II.3.5.2.1 Viabilidad celular	65
II.3.5.2.2 Producción de NO	66
II.4 CONCLUSIONES PARCIALES	68
CAPITULO III: Refuerzo nano-cerámico de matrices poliméricas	69
III.1 INTRODUCCIÓN	70
III.1.1 Cerámicos	70
III.1.2 Hidroxiapatita	71
III.1.3. Bionanocompuestos	72
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	74
III.2.1. Reactivos y drogas	74
III.2.2. Caracterización de los polímeros	74
III.2.3. Obtención de nano-hidroxiapatita	74
III.2.4. Obtención del biomaterial	75
III.2.5. Caracterización fisicoquímica de las matrices	76
III.2.5.1. Espectroscopia ATR-FTIR	76
III.2.5.2. Microscopia SEM	76
III.2.5.3. Microtomografía computarizada (Micro-CT)	76
III.2.5.4. Estudio de hinchamiento	77
III.2.5.5. Estudios de degradación	77
III.2.5.6. Pruebas mecánicas	77
III.2.6. Ensayos biológicos	78
III.2.6.1 Cultivos de macrófagos murinos RAW264.7	78
III.2.6.2 Viabilidad celular	78
III.2.6.3 Evaluación de la citotoxicidad	79
III.3 RESULTADOS	80
III.3.1. Obtención y caracterización de nano-hidroxiapatita	80
III.3.2. Caracterización fisicoquímica de las matrices	82

<i>III.3.2.1. Espectroscopia ATR-FTIR</i>	82
<i>III.3.2.2. Microscopia SEM</i>	83
<i>III.3.2.3. Tomografía micro-computada (Micro-CT)</i>	85
<i>III.3.2.3. Estudio de hinchamiento</i>	89
<i>III.3.2.4. Estudios de degradación</i>	90
<i>III.3.2.5. Pruebas mecánicas</i>	92
III.3.3. Ensayos biológicos	94
<i>III.3.3.1 Interacción de macrófagos murinos RAW264.7 con las matrices</i>	94
<i>III.3.3.2 Viabilidad celular</i>	96
<i>III.3.3.3. Evaluación de la citotoxicidad</i>	97
III.4 CONCLUSIONES PARCIALES	99
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	100
REFERENCIAS	103
INDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS	119
ABREVIATURAS	123

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



I.1.INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1.1 Tejido óseo

El tejido óseo¹ es una forma especializada del tejido conjuntivo, que constituye aproximadamente el 18% del peso corporal, es el componente primordial de los huesos y desempeña varias funciones. Entre las principales se pueden atribuir las propiedades mecánicas de la locomoción, que ofrecen el sitio y el soporte para la inserción del tejido muscular esquelético, incluyendo el sostén y la protección de los tejidos blandos y órganos vitales (como corazón, pulmones, cerebro, médula ósea, etc.); la producción de células sanguíneas (hemopoyesis²); el almacenamiento de triglicéridos en la médula ósea como reserva potencial de energía química; y la función metabólica, ya que la matriz mineral ósea representa la principal reserva de iones minerales, especialmente de calcio y fósforo [Duplomb *et al.* 2007; Florencio-Silva *et al.* 2015; Tortora, G. J. 2013]. Tanto el calcio como el fósforo pueden ser movilizados de la matriz ósea y captados por la sangre según sea necesario, para mantener las concentraciones adecuadas en todo el organismo, desempeñando un papel importante en la regulación homeostática de la calcemia³ [Ross & Pawlina 2013].

El tejido óseo está sujeto constantemente al remodelado cíclico desde su desarrollo. A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un órgano altamente dinámico que es resorbido continuamente por los osteoclastos y restaurado por los osteoblastos, otorgándole la propiedad de ser el único tejido capaz de repararse a sí mismo sin dejar cicatrices [Florencio-Silva *et al.* 2015].

I.1.1.1 Composición ósea

La composición y la estructura de los huesos están sujetas a influencias hormonales, metabólicas y nutricionales múltiples. En principio, el tejido óseo está compuesto por células y matriz extracelular. La característica que lo distingue de los otros tejidos conjuntivos es la mineralización de su matriz, que produce un tejido duro con gran resistencia a la compresión y a la tracción. Dentro de los componentes inorgánicos que conforman la matriz (que contribuye con un 65-70% a la matriz), la sal inorgánica: el fosfato de calcio $[Ca_3(PO_4)_2]$; se combina con otra sal mineral, el hidróxido de calcio $[Ca(OH)_2]$, formando cristales de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Además se encuentran otras sales minerales, como el carbonato de calcio ($CaCO_3$), e iones como el

¹ El adjetivo óseo deriva del término latino *os* u *osseus* (usado para nombrar lo que pertenece o está vinculado a ciertos huesos). Anatomía Humana Práctica. Tomo I – Omar Félix Campohermoso Rodríguez. Ed. "Original San José". La Paz, Boivia. 2016.

² Hematopoyesis o **hemopoyesis** (del griego *αἷμα*, *-ατος*-, 'sangre' y *ποίησις*, 'creación').

³ **Calcemia**: Concentración de calcio en sangre

magnesio, flúor, sodio, manganeso, potasio y sulfato [Ross & Pawlina 2013; Cediél *et al.* 2009].

Los principales componentes orgánicos de la matriz ósea son los elementos proteicos (que comprenden el 25-30% restante), que se dividen en proteínas de tipo colágeno, especialmente el tipo I y, en menor medida, el colágeno tipo V y vestigios de otros tipos de colágeno (tipo III, XI y XIII); constituyendo entre todos alrededor del 90% del peso total de las proteínas de la matriz ósea. Conjuntamente contiene otras proteínas no colágenas (como osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fibronectina y factores de crecimiento) que participan activamente en la mineralización, además de regular la relación de los elementos orgánicos de la matriz con los elementos inorgánicos y con las células óseas [Duplomb *et al.* 2007; Cediél *et al.* 2009]. Junto con el colágeno, las proteínas no colágenas de la matriz forman un andamio para la deposición de hidroxapatita y dicha asociación es responsable de la rigidez y resistencia típicas del tejido óseo [Datta *et al.* 2008]. Desde la perspectiva de la ciencia de los materiales, el hueso se puede considerar como un material verdaderamente compuesto.

En el tejido óseo se describen cinco tipos celulares: *células osteoprogenitoras*, *osteoblastos*, *osteocitos*, *células de revestimiento* y *osteoclastos*. Con excepción del osteoclasto, cada una de estas células puede considerarse una forma diferenciada del mismo tipo celular (**Figura I.1**). Las **células osteoprogenitoras** (u osteogénicas⁴) derivan de células madre mesenquimáticas de la médula ósea que tienen la potencialidad de diferenciarse en muchos tipos celulares diferentes (fibroblastos, osteoblastos, adipocitos, condrocitos y células musculares). Los **osteoblastos**⁵ son células cuboidales polarizadas que se ubican a lo largo de la superficie, cuya función es sintetizar y secretar la matriz ósea orgánica (el osteoide⁶: fibras de colágeno, proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, etc.); por eso se los denomina como células osteoformadoras diferenciadas que conservan la capacidad de dividirse. Además producen la enzima fosfatasa alcalina (FAL), que favorece la deposición de fosfato de calcio, siendo su actividad uno de los primeros marcadores del fenotipo osteoblástico [Ross & Pawlina 2013; Florencio-Silva *et al.* 2015]. Una vez que algunos osteoblastos quedan totalmente rodeados por matriz ósea, se diferencian a **osteocitos**⁷, que son células maduras sin capacidad proliferativa localizados dentro de lagunas rodeadas por una matriz ósea mineralizada, en donde muestran una morfología⁸ dendrítica (que difiere según el tipo

⁴ –génicas, de *gennán*, producir.

⁵ –blasto, de *blastós*, germen.

⁶ **Osteoide**: Porción orgánica sin mineralizar de la matriz ósea que se forma con anterioridad a la maduración del tejido óseo.

⁷ –cito, de *kýtos*, célula.

⁸ **Morfología**: del griego μορφή *morphé* 'forma', y λογία *logía* 'tratado o estudio'.

de hueso). Los osteocitos extienden prolongaciones citoplasmáticas a través de canalículos en la matriz para establecer contacto con las prolongaciones de osteocitos vecinos y de células del revestimiento óseo del entorno. Estas células son cruciales en el mantenimiento de la matriz ósea y, en establecer una relación entre los cambios mecánicos del hueso y su actividad metabólica (mecanotransducción), alterando no sólo la expresión génica sino también el mecanismo apoptótico celular. De esta manera, los osteocitos actúan como orquestadores de la remodelación ósea, a través de la regulación de osteoblastos y osteoclastos, adaptando al hueso a las fuerzas mecánicas diarias. Las **células del revestimiento óseo** tapizan el tejido óseo que no se está remodelando, que en las superficies externas del hueso reciben el nombre de **células periósticas** y en las superficies internas se denominan **células endósticas**.

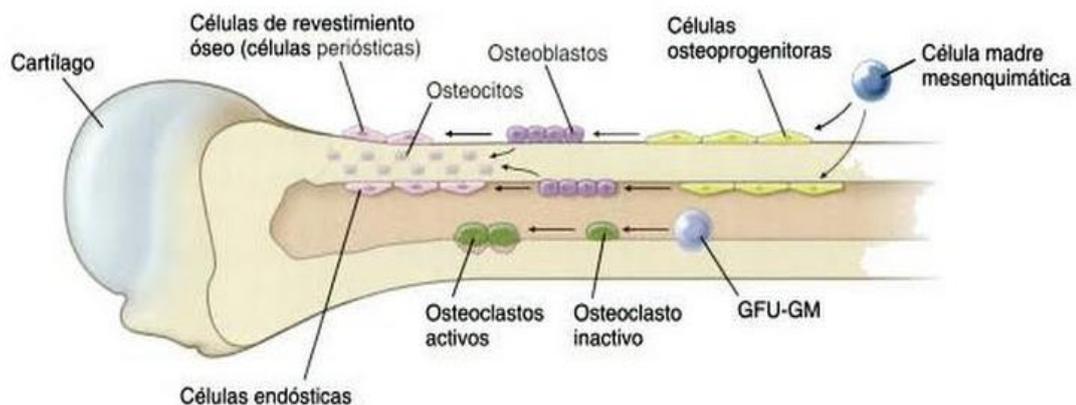


Figura I.1: Representación esquemática de las células asociadas con el hueso. [Ross & Pawlina 2013].

Los **osteoclastos**⁹ son células multinucleadas diferenciadas a partir de precursores hematopoyéticos mononucleares (CFU-GM) ubicados en la médula ósea y están estrechamente relacionados con los macrófagos. Poseen varias características citológicas (multinucleación, morfología altamente polarizada y numerosas mitocondrias). Los osteoclastos reabsorben la matriz mineralizada al adherirse a la superficie y secretar protones e hidrolasas lisosomales en un compartimento extracelular restringido formado debajo de su borde ondulado o festoneado (llamado también *laguna de resorción*). Esta secreción es necesaria para la solubilización de minerales óseos y la digestión de la matriz orgánica por las proteasas ácidas [Duplomb

⁹ -clastos, de *klastós*, roto.

et al. 2007]. Esta descomposición de la matriz osteoide se denomina **resorción**, y es parte del proceso normal de crecimiento, mantenimiento y reparación del hueso.

1.1.1.2 Osteogénesis

El proceso por el cual se forma el hueso, se denomina osificación u **osteogénesis**. Se han descrito dos formas para el desarrollo del tejido óseo. La osificación intramembranosa a partir de la diferenciación del tejido mesenquimatoso, sin la intervención de un cartílago precursor; y la osificación endocondral, mediante un “molde” previo de cartílago hialino. Durante la embriogénesis el desarrollo normal del esqueleto¹⁰ comienza con el reclutamiento y la agregación de células madre mesenquimales (MSCs, del inglés *mesenchymal stem cells*), dentro de estas agregaciones las células se diferencian en condrocitos en la osificación endocondral, para dar lugar a los huesos de las extremidades y del esqueleto axial que soportan peso (por ejemplo, las vértebras); o directamente en osteoblastos en la vía de formación ósea intramembranosa, para formar los huesos planos del cráneo y de la cara, la mandíbula y la clavícula, entre otros [Welsch *et al.* 2008; Cediél *et al.* 2009]. En ambos tipos de osificación, el hueso inicialmente formado es un hueso inmaduro también denominado hueso *primario* o *reticular*, que paulatinamente se va remodelando hasta conformar un hueso maduro, también conocido como hueso *secundario* o *laminar*.

En situaciones normales, conforme los huesos crecen en longitud es necesario el modelado y remodelado óseo, que consiste en la resorción preferencial de algunas partes de un hueso (remoción de minerales y fibras colágenas del hueso por los osteoclastos) y la formación ósea (deposito e incorporación de minerales y fibras colágenas al hueso por los osteoblastos) en otras partes del mismo. El proceso de modelado óseo, donde los huesos son esculpidos, ocurre durante el período de crecimiento y conduce al incremento constante de masa ósea, teniendo en esta etapa independencia entre la formación y la resorción, pero siendo predominante la primera. En el adulto, normalmente la formación ósea está en equilibrio con la resorción, mientras que en los ancianos la resorción con frecuencia supera la formación ósea [Duplomb *et al.* 2007; Tortora, G. J. 2013].

1.1.1.3 Funciones endocrinas del tejido óseo

Estudios recientes se han centrado en las funciones endocrinas óseas que pueden afectar a otros órganos [Fukumoto & Martin 2009; Guntur & Rosen 2012; Karsenty 2014]. Por ejemplo, se ha demostrado que la osteocalcina producida por los osteoblastos actúa en otros órganos y se la puede encontrar en dos formas: carboxilada

¹⁰ **Esqueleto**, del griego σκελετός, skeletós = "secó". Se usaba para referirse a las momias u objetos disecados o resecos.

y no carboxilada. La forma carboxilada tiene una alta afinidad con los cristales de hidroxiapatita, permaneciendo en la matriz ósea durante su mineralización. La forma no carboxilada muestra una menor afinidad por los minerales, y es transportada por el torrente sanguíneo, llegando a otros órganos, tales como el páncreas, el tejido adiposo, testículos y el sistema nervioso. En el páncreas, la osteocalcina actúa como un regulador positivo de la secreción de la insulina pancreática, así como para la proliferación de las células β - pancreáticas. En el tejido adiposo, la osteocalcina estimula la expresión del gen de la adiponectina, que a su vez aumenta la sensibilidad a la insulina. En los testículos, la osteocalcina puede unirse a un receptor específico en las *células de Leydig* y aumenta la síntesis de testosterona y, en consecuencia, aumenta la fertilidad. La osteocalcina también estimula la síntesis de neurotransmisores en el hipocampo e inhibe la síntesis de ácido gamma-aminobutírico (GABA), mejorando las habilidades de aprendizaje y memoria [Florencio-Silva *et al.* 2015]. Los osteocitos también actúan sobre el sistema inmunológico modificando el microentorno en los órganos linfoides primarios y, por lo tanto, influyendo en la linfopoyesis, y son capaces de regular el metabolismo de los fosfatos, actuando sobre otros órganos, como la glándula paratiroidea y los riñones, reduciendo los niveles circulantes de fosfatos [Fukumoto & Martin 2009; Guntur & Rosen 2012; Sato *et al.* 2013; Karsenty, G. 2014].

1.1.1.4 Estructura del hueso

El hueso está compuesto típicamente por tejido óseo y otros tejidos conjuntivos, incluidos el hematopoyético y el adiposo, junto con vasos sanguíneos y nervios. Si el hueso forma parte de una articulación móvil (sinovial) hay cartílago hialino presente. El tejido óseo se organiza de manera tal, que hacia la periferia de cada hueso y en la diáfisis de los huesos largos, las células y la matriz forman una masa sólida continua a la que se denomina *hueso compacto o cortical* (alrededor del 80% del esqueleto total), que rodea una gran cavidad central en la que el tejido óseo se dispone a manera de una malla como un sistema tridimensional de espículas o trabéculas finas y ramificadas, que se denomina *hueso esponjoso o trabecular* (alrededor del 20% del esqueleto total). Estos dos tipos de hueso diferente, compacto o cortical y esponjoso o trabecular, se continúan entre sí sin un límite bien definido. Entre las trabéculas quedan espacios amplios para tejido hematopoyético o tejido adiposo. Tanto el hueso compacto como el esponjoso en estado maduro se caracterizan por organizarse a manera de láminas o laminillas, en las que los osteocitos emiten prolongaciones para comunicarse con sus vecinas (de la misma lámina y de las adyacentes), a través de unos pequeños canales denominados *canalículos óseos*. Las láminas conforman una serie de estructuras a manera de cilindros denominadas *osteonas o sistemas de Haver*¹¹, en las que se encuentra un canal central

¹¹ El epónimo proviene del médico anatomista inglés Clopton Havers (1657 - 1702), que realizó investigaciones pioneras sobre la microestructura del hueso.

o *conducto de Havers*, paralelo al eje de la osteona, por el que transitan elementos vasculares que nutren al tejido óseo. Las osteonas vecinas se encuentran comunicadas entre sí por medio de canales denominados *conductos de Volkman* [Welsch & Sobotta 2008, Cediél *et al.* 2009].

A escala macroscópica la estructura del hueso puede analizarse considerando las partes de un hueso largo, como el fémur ilustrado en la **Figura 1.2**. Un *hueso largo* tiene mayor longitud que diámetro y consta de las siguientes partes:

- ✓ La diáfisis es el cuerpo del hueso
- ✓ Las epífisis son las terminaciones proximal y distal del hueso
- ✓ Las metáfisis son las regiones de hueso maduro donde la diáfisis se une a la epífisis. En un hueso en crecimiento, cada metáfisis incluye el cartílago de crecimiento (o *placa epifisiaria*), una capa de cartílago hialino que permite a la diáfisis del hueso crecer en longitud. Cuando un hueso deja de crecer en longitud, alrededor de los 18 a 21 años de edad, el cartílago de la placa epifisiaria se reemplaza por hueso.
- ✓ El cartílago articular es una capa fina de cartílago hialino que cubre la zona de la epífisis donde un hueso se articula con otro, reduciendo la fricción y absorbiendo los impactos en las articulaciones móviles.
- ✓ El periostio¹² es una vaina dura de tejido conectivo denso e irregular que envuelve la superficie ósea en los lugares que no están cubiertos por cartílago, con predominio de colágeno tipo I y células osteoprogenitoras del periostio que permiten el crecimiento en espesor, pero no en longitud. El periostio también protege al hueso, lo asiste en la reparación de fracturas, ayuda a la nutrición del tejido óseo y sirve como punto de inserción a ligamentos y tendones. Se encuentra unido al hueso subyacente mediante *fibras de Sharpey*¹³, finos haces de fibras colágenas que se extienden desde el periostio hacia la matriz extracelular del hueso (matriz osteoide).
- ✓ La cavidad medular es el espacio dentro de la diáfisis que en los adultos contiene médula ósea amarilla.
- ✓ El endostio es una fina membrana que limita la cavidad medular. Contiene una sola capa de células formadoras de hueso y una pequeña cantidad de tejido conectivo [Tortora, G. J. 2013].

¹² **Periostio**: del griego περί 'alrededor de' y osteo- ὀστέον del griego 'hueso'.

¹³ Descubiertas por el anatomista escocés William Sharpey en 1846.

- ✓ Las arterias nutricias atraviesan sin ramificarse la sustancia compacta para llegar al espacio medular e irrigar la médula ósea y la sustancia esponjosa.

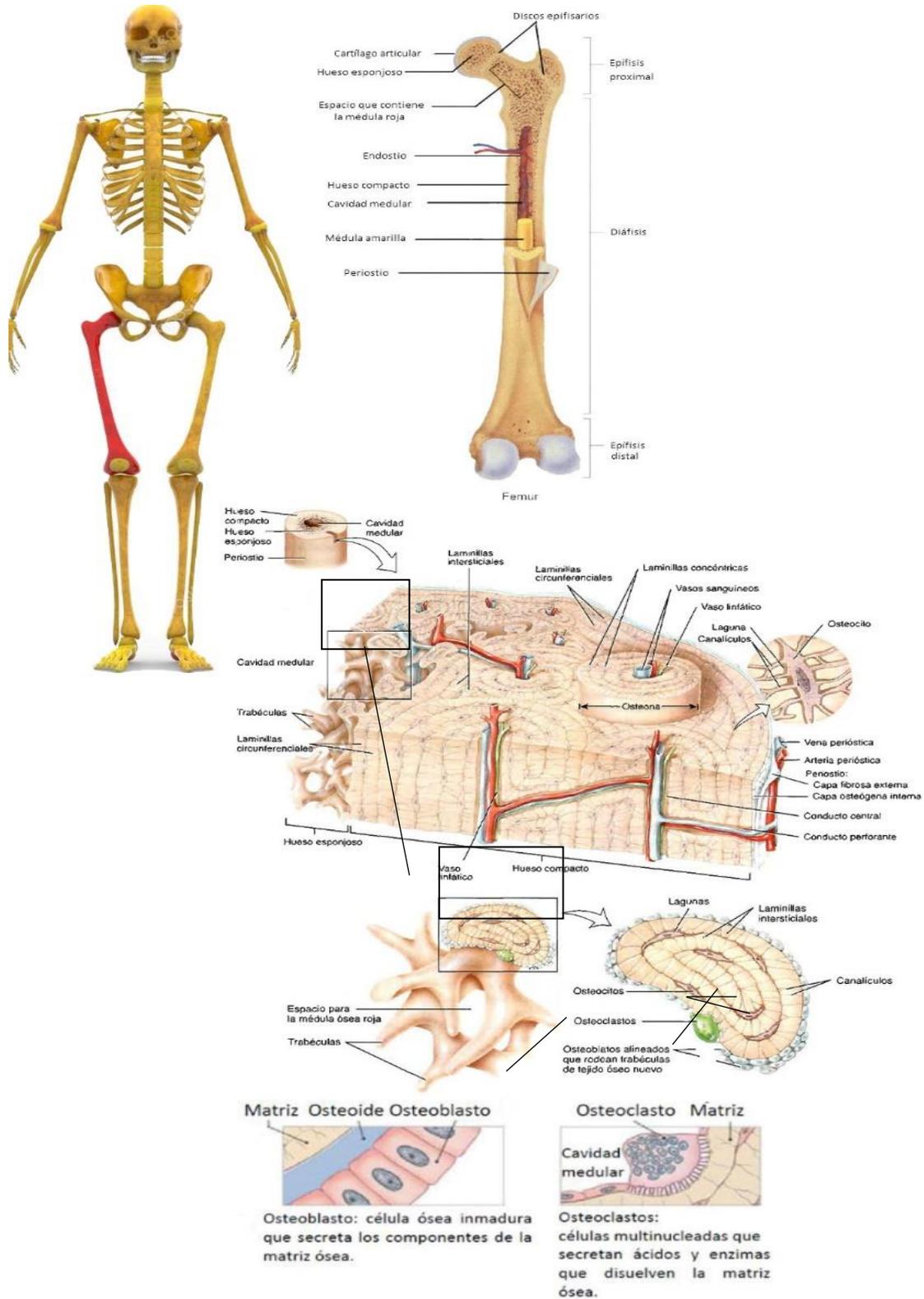


Figura I.2: Estructura de un hueso largo. Adaptado de [OpenStax College, 2013a].

Según su forma, los huesos se pueden clasificar en cuatro grupos. Los *huesos largos*, que tienen una longitud mayor que las otras dos dimensiones y están compuestos por una diáfisis y dos epífisis, como el fémur, la tibia y los metacarpianos. Los *huesos cortos*, que tienen sus tres dimensiones casi iguales, como los huesos del carpo. Los *huesos planos*, que son delgados y anchos, como la calota craneana y el esternón; y están formados por dos capas de tejido óseo compacto bastante gruesas con una capa interpuesta de tejido óseo esponjoso. Y los *huesos irregulares*, que poseen una forma que no permite clasificarlos dentro de ninguno de los tres grupos anteriores, tales como las vértebras.

1.1.1.5 Remodelación y reparación ósea

El hueso sufre modificaciones cíclicas, denominadas remodelación ósea, que permiten adaptarse a las limitaciones mecánicas, mantener la homeostasis del fósforo y el calcio, y reemplazar periódicamente el hueso viejo por nuevo. La remodelación ósea es un proceso altamente complejo, en un ciclo que consta de tres fases: (1) inicio de la resorción ósea por osteoclastos, (2) la transición (o período de reversión) de la resorción al hueso nuevo en formación, y (3) la formación de hueso nuevo por los osteoblastos. Este proceso se produce debido a las acciones coordinadas de los osteoclastos y los osteoblastos, mientras que los osteocitos actúan como mecanosensores y orquestadores del proceso de remodelación ósea, que junto con las células de revestimiento óseo forman la estructura anatómica temporal llamada unidad multicelular básica (BMU) [Duplomb *et al.* 2007; Florencio-Silva *et al.* 2015].

El estímulo fisiológico clave para la remodelación ósea adulta normal es la alteración de la carga mecánica. Las cargas pesadas o los impactos que se aproximan o superan el límite de tensión máxima (compresión/ flexión) que puede soportar, pueden provocar fracturas y proporcionan un poderoso desencadenante para que los osteoblastos formen una nueva matriz para fortalecer el hueso. A la inversa, una carga insuficiente (y, por lo tanto, una tensión reducida) desencadena la resorción ósea osteoclástica, ya que el hueso es "percibido" como demasiado grueso y pesado para el nivel actual de actividad. La remodelación ósea también se desencadena por daños, es decir, la necesidad de reparar micro / macro fracturas. Además, el recambio óseo puede estar sujeto a regulación por un "reloj biológico" a largo plazo que garantiza que el hueso viejo se reemplace antes de que se dañe o se vuelva quebradizo [Arnett, T. 2015].

Uno de los principales problemas con los materiales de implantes actuales es que son mucho más rígidos que el hueso cortical humano. De acuerdo con el principio de carga compartida de la teoría compuesta [Hull & Clyne, 1996], si se coloca un implante rígido de metal o cerámica en el hueso, el hueso se someterá a un entorno mecánico reducido y, en consecuencia, el hueso se reabsorberá. Esto concuerda con lo que se

conoce como "*Ley de Wolff*"¹⁴, es decir, con el cambio de tensión o el estrés impuesto en el hueso, este se remodelará de manera que la tensión se mantenga dentro de niveles específicos. En el caso de prótesis de reemplazo, se cree que la resorción ósea en el hueso proximal conduce a un aflojamiento aséptico de la prótesis (que es un problema muy común). Las características elásticas del implante desempeñan un papel importante al permitir que el hueso alcance un estado de carga fisiológicamente aceptable.

Por otro lado, un desequilibrio de la resorción y formación ósea puede dar como resultado diversas enfermedades óseas. Por ejemplo, el aumento anormal en la formación y actividad de los osteoclastos, donde la resorción excede la formación, contribuye a la disminución de la densidad ósea, pérdida de masa ósea y a un aumento de fracturas. En algunas afecciones patológicas que incluyen metástasis¹⁵ óseas y artritis inflamatoria, la activación anormal de los osteoclastos produce erosiones periarticulares y lesiones osteolíticas dolorosas. En la periodontitis, una enfermedad del periodonto¹⁶ causada por la proliferación bacteriana induce la migración de células inflamatorias. Estas células producen mediadores químicos como IL-6 y RANKL que estimulan la migración de los osteoclastos. Como resultado, se produce un aumento anormal de la resorción ósea en el hueso alveolar, lo que contribuye a la pérdida de las inserciones de los dientes y a la progresión de la periodontitis [Florencio-Silva *et al.* 2015]. Por el contrario, el aumento de masa ósea puede producir osteopetrosis, una enfermedad congénita presente desde el nacimiento en la que los huesos son superdensos. Estas enfermedades demuestran la importancia del proceso normal de remodelación ósea para el mantenimiento de la homeostasis ósea. El equilibrio entre la formación y la resorción ósea es necesario y depende de la acción de varios factores locales (por ejemplo, factores de crecimiento y citoquinas) y sistémicos (hormonas tales como calcitonina y estrógeno) [Manolagas, S. C. 2000; Duplomb *et al.* 2007; Florencio-Silva *et al.* 2015].

¹⁴ «La forma y estructura de los huesos en crecimiento y de los adultos, depende del estrés y la tensión - esfuerzos- a los que están sometidos. Alterando las líneas de tensión, la forma de los huesos puede ser cambiada». Tomado de su libro «The law of Prone Transformation» en 1892 -antes del descubrimiento de los Rayos X. Julius Wolff (1836 – 1902).

¹⁵ La **metástasis** (del griego Μετάσταση – mudarse de lugar o transferencia), es el proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició.

¹⁶ Los dientes se encuentran rodeados por tejidos periodontales o **periodonto**, (del latín *peri*, que significa "alrededor" y el griego *odonto*, que significa "diente").

1.1.1.6 Lesiones y tratamientos actuales

El tejido óseo, a diferencia del cartílago, tiene la capacidad de reparar constantemente los microdaños que se producen en forma cotidiana; sin embargo, frente a fracturas de gran tamaño o pérdida ósea, puede ser necesaria la estabilización mecánica de la lesión, o bien el empleo de sistemas de “*scaffolds*” (andamiajes) que permitan el desarrollo osteoblástico para reparar la lesión.

La primera terapia empleada para reparar estas lesiones, y que se mantiene hasta hoy, consistió en la implantación de prótesis hechas de materiales capaces de restablecer el funcionamiento mecánico de los huesos. Implantes hechos de materiales metálicos tales como clavos, tornillos, placas y prótesis tanto de acero quirúrgico, zirconio, cromo-cobalto o titanio; y cementos óseos como las mezclas de metacrilato de metilo con ácido metacrílico o el poli-metil metacrilato (PMMA, por sus siglas en inglés), son capaces de lograr este objetivo. Actualmente se desarrollan prótesis basadas en PMMA. El uso en el campo médico de los materiales mencionados anteriormente (es decir, metales, cerámicas y polímeros) que se desarrollaron originalmente para aplicaciones de ingeniería general en lugar de para el reemplazo de tejidos del cuerpo humano, obviamente ha sido exitoso y es cierto que la mayoría de estos materiales fueron ampliamente probados y son continuamente utilizados en la industria de la salud. Sin embargo, también hay deficiencias de estos materiales para sus aplicaciones médicas previstas, que conllevan a una serie de efectos secundarios que limitan su efectividad [Wang M. 2003]. El primero es la falta de osteo-integración; es decir, el grado de interacción entre los materiales implantados y el tejido circundante es mínimo y acarrea un problema aun mayor, el daño de más tejido. Debido a la falta de integración, las fuerzas de roce causadas durante el movimiento del paciente van desgastando el tejido óseo que se encuentra próximo al implante y provocan daños estructurales. Pero no es sólo el tejido cercano el que sufre daños, con el tiempo el material del implante va cediendo a la fatiga inducida por el uso continuo hasta colapsar y a veces, incluso fracturarse. Los metales, por ejemplo, aunque proporcionan un soporte mecánico inmediato en el sitio del defecto, exhiben una integración general deficiente con el tejido en el sitio de implantación, y pueden fallar debido a la carga de fatiga. Por otro lado, las cerámicas tienen una resistencia a la tracción muy baja y son frágiles y, por lo tanto, no se pueden usar en lugares con una torsión, flexión o esfuerzo de corte significativos [Salgado *et al.* 2004]. Otra complicación común son las infecciones post-operatorias que pueden acarrear osteomielitis severa¹⁷ [Chuang, H. C. *et al.* 2006; Eingartner C. 2007; Laurencin *et al.* 1999]. En cualquiera de los casos, ya sea daños estructurales del hueso nativo o el colapso del implante o la aparición de infecciones,

¹⁷ **Osteomielitis** es el término médico que se usa para referirse a la inflamación de un hueso. Suele estar causada por una infección bacteriana.

serán necesarias intervenciones quirúrgicas posteriores, que resultan en más dolor para el paciente y disminuyen las posibilidades de éxito del proceso terapéutico [Alvarez Barreto, J. F. 2009].

Estas limitaciones condujeron a investigadores a la búsqueda de alternativas terapéuticas capaces de superar las limitaciones presupuestas con el uso de prótesis. Los injertos óseos se han usado para llenar los defectos óseos causados por enfermedades o traumas, como fracturas, infecciones y tumores [Shelke *et al.* 2014]. Es así como surgió el uso de injertos autólogos, alólogos y xenólogos. Los autoinjertos o **injertos autólogos**, consisten en fragmentos de tejido óseo, generalmente médula ósea, obtenidos de una zona sana del paciente e implantados en el área afectada. Tienen la ventaja distintiva de la histocompatibilidad, sin los riesgos de transferencia de enfermedades y siguen siendo el mejor material para la reparación ósea. Sin embargo, existe poca disponibilidad para cubrir defectos de gran tamaño, al mismo tiempo que se expone la región donadora a alta morbilidad y no se puede almacenar; demandando el desarrollo de sustitutos óseos alternativos. Los injertos óseos alogénicos, aloinjertos, o **injertos alólogos**; que son obtenidos de otro sujeto de la misma especie, generalmente cadáveres; tienen mejor disponibilidad que los autoinjertos y evitan la necesidad de un segundo procedimiento quirúrgico para obtener un autoinjerto, tienen alta posibilidad de integrarse al huésped si se hacen los exámenes de compatibilidad adecuados y son previamente tratados para disminuir las probabilidades de una reacción inmune de rechazo. No obstante, existe el peligro de transmisión de enfermedades, tiene una elaboración costosa y hay una lista de espera, lo que puede llevar a la falla del injerto [Bostrom *et al.* 1997; Strong *et al.* 1996]. Los **xenoinjertos**, fragmentos obtenidos de sujetos de una especie diferente, en sí son un hueso desproteinizado que funciona como un molde de hidroxiapatita; poseen un alto potencial de generar reacciones inmunes severas, no poseen osteoinducción¹⁸, y, al igual que los alólogos, presentan un gran riesgo de transmisión de enfermedades y una elaboración costosa [Cascalho *et al.* 2006; Yang, Y. G. *et al.* 2007].

Una gran cantidad de alternativas de injerto de hueso están actualmente disponibles comercialmente para uso ortopédico. Varían en composición, mecanismo de acción y características especiales. La **Tabla I.1** muestra una variedad de materiales sustitutos del injerto óseo. Es importante tener en cuenta que todos son osteoconductores¹⁹, ofrecen varios niveles de soporte estructural y tienen poca o ninguna capacidad para la osteoinducción. Si bien se realizaron importantes avances en

¹⁸ **Osteoinducción:** Capacidad de inducir la migración celular, estimulando y activando las MSCs del tejido circundante, e interactuando activamente con el entorno, para que se diferencian en osteoblastos formadores de hueso.

¹⁹ **Osteoconducción:** Capacidad de conducir la formación y remodelación del tejido óseo, facilitando y orientando los vasos sanguíneos y la creación de los nuevos sistemas de *Havers* en el hueso.

el campo de la medicina regenerativa ósea durante los últimos años, las terapias actuales, como los injertos óseos, aún tienen varias limitaciones [Salgado *et al.* 2004].

Tabla I.1. Andamios osteoconductores. Adaptado de [Giannoudis *et al.* 2005]. Puntuación: 0 (ninguno) a 3 (excelente). DBM: Matriz ósea desmineralizada; TCP: fosfato tricálcico; BMA: Aspirado de médula ósea; BMP: Proteína morfogenética ósea.

Tipo	Injerto	Osteo-conducción	Osteo-inducción	Osteo-génesis	Ventajas
Hueso	Autoinjerto	3	2	2	Histocompatibilidad
	Aloinjerto	3	1	0	Disponibilidad en muchas formas
Biomateriales	DBM	1	2	0	Suministra BMPs osteoinductivos
	Colágeno	2	0	0	Bueno como sistema de delivery
Ceramicos	TCP, Hap	1	0	0	Biocompatible
	Cemento de fosfato de calcio (CPC)	1	0	0	Soporte estructural inicial
Injertos Compuestos	β -TCP / BMA compuesto	3	2	2	Amplio suministro
	BMP / Compuesto sintético	-	3	-	Suministro potencialmente ilimitado

La incidencia mundial de trastornos y afecciones óseas ha tendido abruptamente hacia arriba y se espera que se duplique para 2020, especialmente en poblaciones donde el envejecimiento se combina con un aumento de la obesidad y una actividad física deficiente [Amini, A. R. *et al.* 2012]. El hueso es uno de los tejidos más trasplantados, con más de 3,5 millones de procedimientos de injerto óseo (autoinjertos o aloinjertos) que se realizan anualmente en todo el mundo [Giannoudis, *et al.* 2005]. Por esta razón, el objetivo principal de la ingeniería del tejido óseo en los últimos 20 años ha sido desarrollar materiales biodegradables como sustitutos del injerto óseo para el llenado de grandes defectos óseos, buscando crear andamios artificiales capaces de inducir la formación del tejido óseo a través de la activación de una cascada de eventos relacionados con la curación de heridas y el proceso osteogénico. A pesar del hecho de que la tecnología de ciencia de materiales ha dado lugar a mejoras claras en el campo de la medicina de sustitución ósea, no se ha desarrollado un sustituto de hueso adecuado. Por lo tanto, la mayoría de las lesiones graves relacionadas con el hueso aún no se pueden recuperar o no se tratan adecuadamente [Salgado *et al.* 2004].

I.1.2 Ingeniería de Tejidos

La medicina regenerativa, uno de los nuevos campos en las ciencias de la vida presente y futura, finalmente apunta a la restauración y el reemplazo de órganos perdidos o dañados, por el trasplante de nuevos tejidos combinados con matrices de apoyo y biomoléculas. La medicina regenerativa es un campo altamente interdisciplinario, que generalmente se define conectando las áreas de la ingeniería de tejidos, la síntesis y modificación de polímeros, el cultivo de células, la investigación de células madre, la terapia génica y la clonación terapéutica [Nair, L. S *et al.* 2007; Dash, M. *et al.* 2011].

Especialmente, la ingeniería tisular nace como respuesta a los problemas que presentan las terapias de reparación y regeneración de tejidos que se utilizan actualmente. Ha surgido como un enfoque alternativo prometedor y como ciencia que aplica los principios de la ingeniería de los materiales en combinación con las ciencias de la vida para desarrollar sustitutos que reparen o mejoren la función biológica de un tejido u órgano. En contraste con el enfoque clásico de biomateriales, se basa en la comprensión de la formación y regeneración de los tejidos, y tiene como objetivo inducir nuevos tejidos funcionales, en lugar de simplemente implantar nuevas piezas de repuesto [Salgado *et al.* 2004]. Desde este enfoque, se necesita un **andamio temporal** usado como sustrato adhesivo para las células implantadas y que puede ser empleado como soporte físico para guiar la formación de los nuevos órganos hasta el completo restablecimiento de su funcionalidad, y que a su vez, esté diseñado para desaparecer del cuerpo luego de cumplir su función, degradándose a una velocidad controlada para proporcionar espacio para la formación del tejido nuevo [Chen, G. *et al.* 2002]. Se han desarrollado varios andamios porosos tridimensionales fabricados a partir de diversos tipos de materiales biodegradables durante las últimas dos décadas, logrando avances significativos para aplicaciones biomédicas [Alvarez Barreto, J. F. 2009; Rodríguez-Vázquez *et al.* 2015; Muzzarelli *et al.* 2015], sin embargo, aún no se alcanzaron productos que puedan ser utilizados de forma masiva y rutinaria.

En particular, ha habido un interés creciente en el diseño de biomateriales para la ingeniería de tejidos óseo-cartilaginoso. El hueso, el componente central del sistema músculo-esquelético, es un tejido conectivo duro, calcificado, que tiene como funciones proteger órganos vitales, proveer soporte para la movilidad del cuerpo, almacenar calcio y otros iones, al igual que células madres mesenquimales y hematopoyéticas [Buckwalter *et al.* 1996]. Como se explicó previamente, los huesos son susceptibles a daños significativos causados por fracturas, tumores óseos, y enfermedades tales como

osteoporosis²⁰, osteonecrosis²¹, o cicatrización ineficiente post injuria traumática, que se caracterizan por pérdida de masa ósea con deterioro de la microarquitectura, lo que se asocia con riesgo de fractura, un problema que afecta a la población mundial [Campana, V. *et al.* 2014]. Las terapias convencionales para la reparación de lesiones óseas incluyen la reconstrucción quirúrgica, el trasplante, y el reemplazo por prótesis artificiales. Por el momento existe muy poca terapia efectiva en los casos donde no ocurre el cierre de la fractura.

En la actualidad el tratamiento de dichas enfermedades es un área de gran interés, a tal punto que la ingeniería de tejidos se ha convertido en una terapia alternativa para tratar la pérdida de hueso por medio de la utilización de productos biomédicos obtenidos a partir de biomateriales como prótesis artificiales.

1.1.2.1 Paradigma de la Ingeniería del Tejido Óseo:

La estimulación de la producción ósea requerida para tratar la pérdida de hueso emplea estrategias basadas en técnicas de ingeniería de tejidos: usando factores de crecimiento o agentes osteogénicos (moléculas bioactivas), utilizando matrices biodegradables a la velocidad adecuada para funcionar como soportes para el desarrollo óseo y/o sistemas de liberación controlada de drogas que faciliten la acción sobre el hueso de agentes terapéuticos específicos (biomateriales o *scaffolds*); combinadas con células, en este caso osteoblásticas o progenitoras (*stem cells* o células madre) [Shin, H. *et al.* 2003; Salgado *et al.* 2004]. Este principio está representado en este gráfico (**Figura 1.3**) denominado la **Tríada de la Ingeniería de Tejidos**, donde se ilustra el hecho de que estos tres elementos deben actuar de manera orquestada para lograr la meta central de este novedoso campo.

El siguiente paso después del desarrollo de una estructura porosa adecuada es la elección de una fuente confiable de células que permita su aislamiento y propagación. De hecho, una fuente de células ideal debería ser fácilmente expandible a pasajes más altos, no inmunogénicos y tener un patrón de expresión de proteínas similar al tejido que se va a regenerar [Salgado *et al.* 2004]. La estrategia más común utilizada por investigadores en el área consiste en la extracción de una pequeña biopsia de tejido autólogo, del cual se aislarán células para ser expandidas *in vitro*²². Las células madres

²⁰ La palabra **osteoporosis** significa hueso (osteo) poroso (porosis) o lleno de hoyos, provocado cuando el tejido óseo se degrada más rápidamente de lo que se reemplaza, causando huesos débiles al volverse delgados (pérdida de masa) y frágiles (susceptibles a fracturas).

²¹ La **osteonecrosis**, también conocida como necrosis avascular, necrosis ósea isquémica o necrosis aséptica, significa literalmente “hueso muerto” (necrosis = muerto; del griego: νεκρός. Pronunciación: /nekrós/. Significado: 'cadáver'), y es el resultado de la falta de circulación sanguínea a partes específicas de los huesos.

²² **In vitro** del latín: dentro del vidrio.

mesenquimáticas (MSCs), son una alternativa viable en la regeneración de numerosos tejidos. Estas son células pluripotenciales, es decir, que tienen el potencial de diferenciarse hacia distintos linajes celulares, que dan origen al hueso, cartílago, grasa, piel, tendón y músculo, con una tasa de proliferación mayor a la de muchas células diferenciadas como los osteoblastos y condrocitos [Caplan *et al.* 2001]. Adicionalmente, las MSCs pueden ser expandidas extensivamente y mantener su estado indiferenciado y su potencial de diferenciación. Las fuentes más comunes de MSCs son la médula ósea y el tejido adiposo, y por ende se pueden extraer de zonas de fácil acceso y causar la menor incomodidad posible al paciente [Alvarez Barreto, J. F. 2009].

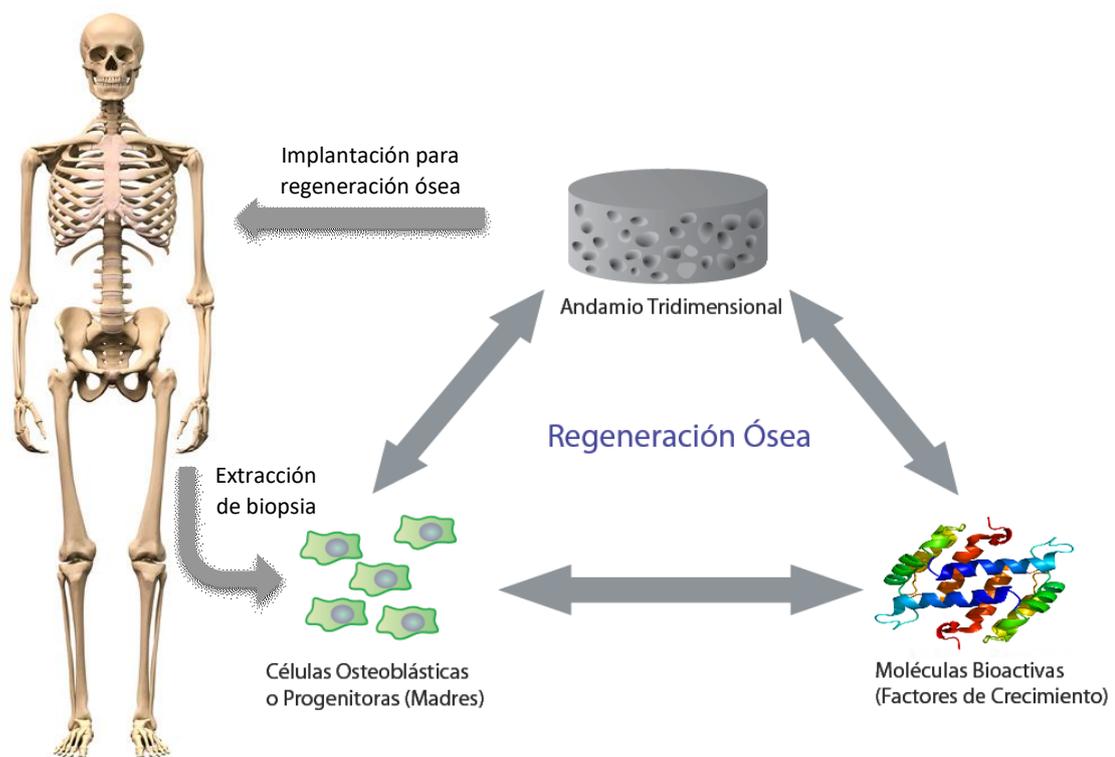


Figura I.3: Triada de la Ingeniería de Tejidos Óseos. Una matriz 3D (andamio), células osteoblásticas o progenitoras y moléculas bioactivas son necesarias para la creación de implantes osteogénicos eficientes. Adaptado de [Alvarez Barreto, J. F. (2009)].

Estas células son posteriormente sembradas en la matriz tridimensional y sometidas a un estímulo químico ejercido por las moléculas bioactivas que provocan respuestas celulares específicas, con la finalidad de acelerar la producción de un implante eficiente. La diferenciación hacia un linaje deseado se puede lograr a través de medios condicionados con factores de crecimiento u otras moléculas específicas para tal fin. Los factores de crecimiento son citoquinas que son secretadas por muchos tipos

de células y funcionan como moléculas de señalización. Dentro de estas, las proteínas morfogénicas óseas (BMP, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de insulino - similar I y II (IGF I / II) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) son los más comunes y aquellos que se han propuesto de manera realista para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo [Lind *et al.* 2001; Salgado *et al.* 2004; Lee *et al.* 2006; Alvarez Barreto, J. F. 2009; Discher *et al.* 2009].

El andamio debe soportar las demandas del sitio lesionado durante todo el proceso de regeneración, y esto depende de las propiedades del material, de la zona por regenerar y del paciente como tal, ya que las diferentes regiones del cuerpo tendrán diferentes cargas funcionales y vascularidad. Es posible que la construcción de la triada; células, biomateriales y moléculas bioactivas; deba modificarse de acuerdo con varias variables, como la edad del paciente, el sexo, la salud, las condiciones sistémicas, los hábitos y la forma anatómica del implante [Alvarez Barreto, J. F. 2009]. La morfología del hueso se encuentra adaptada a la función del mismo y a las agresiones continuadas que sobre el mismo ejercen diferentes factores externos. Sin embargo, la morfología de los huesos también depende de los factores genéticos inherentes a cada individuo. Cada tipo de tejido particular que se quiera reemplazar exige materiales con propiedades físicas, químicas, biológicas, biomecánicas y de degradación específicas para proporcionar una terapia eficaz.

1.1.2 Biomateriales de primera generación:

Aunque algunos materiales, a saber, los biocerámicos, han demostrado ser capaces de inducir la formación de hueso sin un implante celular previo, se cree que esta estrategia solo podría usarse para defectos pequeños, donde se necesitaría una pequeña cantidad de MSCs circulantes y de células osteoprogenitoras. Esta técnica no sería exitosa en el caso de defectos óseos grandes, debido al alto número de células que se necesitarían [Perka *et al.* 2000].

También se ha abordado el uso de estrategias basadas en hidrogeles o polímeros inyectables [Burdick *et al.* 2002; Shin *et al.* 2003; Shung *et al.* 2003; Drury *et al.* 2003; Kretlow *et al.* 2007]. Este enfoque puede ser útil en áreas de difícil acceso o para la regeneración de pequeños defectos, ya que pueden ser introducidos en forma líquida en la lesión y luego se lleva a cabo un proceso de entrecruzamiento (*cross-linking*) *in situ*²³, por lo que la forma del defecto no es una limitación para este tipo de fracturas. Sin embargo, pueden no ser adecuados para la regeneración de grandes defectos óseos, y si bien su implantación es poco invasiva, puede resultar citotóxica o nociva para las células. En muchos casos, para poder llevar a cabo el entrecruzamiento es necesaria la

²³ “*In situ*” es una expresión latina que significa 'en el sitio' o 'en el lugar'.

presencia de iniciadores o la aplicación de luz ultravioleta, generando un proceso exotérmico que puede ir en detrimento del tejido circundante [Alvarez Barreto, J. F. 2009]. Además el problema principal con este tipo de polímeros inyectables es que no se pueden usar en áreas que presenten una carga mecánica extrema [Salgado *et al.* 2004].

Los andamios pre-fabricados son aquellos que se construyen antes de ser implantados en la zona afligida. Estas estructuras tridimensionales poseen diversas ventajas sobre las inyectables, entre las que se encuentran propiedades mecánicas más acordes a la necesidad del tejido óseo - cartilaginoso y facilidad de obtención de macroporosidad, que permita un buen nivel de conducción y mejor control de la morfología estructural. Estos tipos de andamios se prestan para aplicaciones en la regeneración de hueso en zonas de alta demanda mecánica. Las arquitecturas y morfologías son muy variadas, pero las más comúnmente utilizadas para hueso son las esponjas porosas. Estas se fabrican por medio de diferentes técnicas, tales como disolución selectiva, en la cual se hace una mezcla sólida de un polímero con un agente poroso (cloruro de sodio, azúcar comercial, etc.); esta mezcla es prensada y calentada simultáneamente para darle la forma deseada y es luego colocada en un solvente preferencial para el agente poroso, a fin de crear la red porosa [Mikos *et al.* 1993; Mikos *et al.* 1994; Butler *et al.* 2007]. Otra forma de construir esponjas es a través del uso de micro y nano-esferas sinterizadas (fusión de las esferas a través de calentamiento) [Chen, Q. Z. *et al.* 2006; Deville *et al.* 2006]. Una técnica muy novedosa es la de microimpresión (*microprinting*, en inglés), basada en la inyección del polímero mediante un sistema computarizado. En este caso, el andamio es diseñado en la computadora y una aguja se encarga de imprimir una solución polimérica en capas sobre un substrato que induce la rápida evaporación del solvente. Este proceso permite crear andamios de cualquier forma y morfología, pero hasta el momento, no se han logrado las dimensiones apropiadas para grandes lesiones en humanos [Leong *et al.* 2003; Mapili *et al.* 2005; Bose *et al.* 2012; Tarafder *et al.* 2012]. A pesar de las ventajas antes expuestas, los andamios pre-fabricados sólo pueden ser implantados a través de procesos invasivos que resultan dolorosos para el paciente, presentan limitaciones en cuanto a su forma y son difíciles de aplicar en lesiones con formas irregulares.

1.1.2.3 Biomateriales de diseño:

Con el fin de superar el problema del módulo - desajuste entre los materiales de implantes existentes y el hueso, y promover la formación de una unión segura entre el implante y el tejido del huésped, el concepto de biomateriales análogos fue introducido por Bonfield en la década de 1980 [Bonfield *et al.* 1981]. Desde entonces, se ha producido e investigado una variedad de materiales compuestos bioactivos. Estos materiales, es decir, los materiales compuestos, que están conformados por la unión de más de un tipo

de material (metálicos, cerámicos y/o polímeros), a diferencia de los biomateriales de primera generación que extendieron su uso de la ingeniería a la medicina, pueden ser diseñados específicamente para aplicaciones médicas y, por lo tanto, se puede hablar verdaderamente de "**biomateriales de diseño**" [Wang 2003]. El propósito del material compuesto es obtener una combinación de propiedades mejoradas con respecto a cada material constituyente, y para ello es importante que cada uno de ellos sea biocompatible [Perez, R. A. *et al.* 2013; Vasco *et al.* 2016].

En este sentido, se le ha dado cada vez más atención al quitosano y sus derivados, convirtiéndose en una biomolécula indiscutible de gran potencial debido a sus propiedades como polielectrolito, incluida la presencia de grupos funcionales reactivos, capacidad de formación de gel, alta capacidad de adsorción, biodegradabilidad completa, su marcada actividad antibacterial y fungistática. El quitosano también es biocompatible y no tóxico para los tejidos vivos. Además posibilita el desarrollo de *scaffolds* en una gran variedad de formas como polvos, micropartículas y *films* [Shi, C. *et al.* 2006; Hamman, J. H. 2010; Depan, D. 2015]. Algunos ejemplos de materiales compuestos reportados hasta el momento incluyen un andamio bicapa de hidroxiapatita/ quitosano para aplicación en ingeniería tisular osteocondral [Oliveira *et al.* 2006], películas de poli (DL-ácido láctico) modificadas con quitosano, que mejoran la adhesión y proliferación celular de osteoblastos humanos [Cai *et al.* 2002], y andamios nanofibrosos de policaprolactona (PCL) /quitosano que estimulan la formación de tejido óseo [Yang *et al.* 2009; Mohammadi *et al.* 2007].

En este trabajo de tesis, se logró preparar una matriz compatibilizada por una metodología de ultrasonido, de un complejo polielectrolito (PEC) basado en los polímeros naturales, carboximetilcelulosa (CMC) y quitosano (Qo), la cual fue aditivada con un cerámico de tamaño nanométrico (nano hidroxiapatita, nHAp) que posee propiedades osteogénicas y actúa como refuerzo mecánico de la matriz.

I.2 HIPOTESIS

Se plantea el desarrollo de un nuevo biomaterial hidrogel o matriz basado en polímeros naturales combinados, para su uso y aplicación en medicina regenerativa ósea. Para la mezcla de polímeros naturales se propone el empleo de un material tal como el quitosano (Qo), derivado de quitina, en combinación con otro polisacárido, la carboximetilcelulosa (CMC), y un cerámico tal como la hidroxiapatita (HAp). El quitosano en particular, presenta muy buena biocompatibilidad y baja citotoxicidad, pero sus propiedades mecánicas y tasa de degradación no son adecuadas para el desarrollo de *scaffolds* que puedan ser utilizados en ingeniería de tejido óseo. La carboximetilcelulosa por su parte, es un polisacárido con un diverso rango de aplicaciones no sólo por su bajo costo, sino porque los subproductos de su descomposición son productos no tóxicos, biocompatibles y biodegradables. Asimismo, la HAp de dimensiones nanométricas ha sido previamente obtenida en nuestro laboratorio partiendo de hueso bovino [Fernández, J.M. *et al.* 2011], es decir aprovechando un producto natural proveniente de la industria cárnica. La elección de esta combinación de materiales se basa tanto en la capacidad de los mismos para la obtención de hidrogeles con potencialidad para generar entrecruzamientos físicos, como en los resultados previamente obtenidos. Por estos motivos esperamos que estos conocimientos en su conjunto conduzcan al diseño racional de un biomaterial óptimo para la regeneración de tejidos óseos.

I.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de un biomaterial basado en hidrogeles de polisacáridos para aplicación en medicina regenerativa.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollo de un biomaterial hidrogel basado en polisacáridos, quitosano y carboximetilcelulosa, combinados con hidroxiapatita.
2. Caracterización del biomaterial obtenido mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). Evaluación de sus propiedades de hinchamiento (*swelling*), y propiedades mecánicas.
3. Evaluación de la cinética de degradación del biomaterial obtenido.
4. Evaluación de la posible citotoxicidad del biomaterial desarrollado empleando un modelo de macrófagos murinos en cultivo.

CAPÍTULO II

Diseño, síntesis y
caracterización de
matrices poliméricas



II.1 INTRODUCCIÓN

La selección del material más apropiado para producir un andamio que pueda ser utilizado en aplicaciones de ingeniería de tejido óseo es un paso muy importante hacia la construcción de un producto de ingeniería tisular, ya que sus propiedades determinarán, en gran medida, las propiedades del andamio. Como se mencionó anteriormente, hasta ahora se han propuesto varios materiales como metales, cerámicas y polímeros de origen natural o sintético. Sin embargo, los metales y la mayoría de las cerámicas no son biodegradables, lo que deja la elección del investigador reducida a una pequeña cantidad de cerámicas y polímeros biodegradables [Salgado *et al.* 2004].

Andamios para la regeneración de tejido óseo han sido fabricados con una amplia variedad de biomateriales, tanto naturales como sintéticos. Entre los naturales encontramos el colágeno tipo I, ácido hialurónico, heparina y quitosano [Yin, Y. J. *et al.* 1999; Mizuno *et al.*, 2001; Feng, Z. *et al.* 2003; Cristino *et al.* 2005; Sagnella *et al.* 2005; Shin, H. *et al.* 2003; Xu, H. *et al.* 2007; Cortizo AM *et al.* 2012]. Algunos de estos polímeros naturales, por estar presentes en el organismo humano, ya poseen propiedades que les permiten interactuar con los componentes celulares; de no ser el caso, estos son generalmente fáciles de modificar con moléculas que se lo permitan. Entre los biomateriales sintéticos se pueden mencionar el polietilenglicol (PEG) y algunos polímeros biodegradables, como los poliésteres. Entre estos últimos, los más estudiados han sido: policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y co-polímeros, muchos de ellos utilizados en la fabricación de suturas y otros materiales quirúrgicos [Kenley *et al.* 2003; Rebelo, R. *et al.* 2017]. A diferencia de los naturales, los polímeros sintéticos en su mayoría carecen de grupos funcionales activos que puedan interactuar con las células [Ishaug *et al.* 1997; Barreto 2009].

La búsqueda de nuevos materiales que puedan ser empleados en el campo de la ingeniería de tejidos ha permitido que en los últimos años surja un especial interés en la investigación de las sustancias poliméricas, fundamentalmente de origen natural. Los biomateriales poliméricos degradables son los candidatos preferidos para desarrollar dispositivos terapéuticos tales como prótesis temporales, estructuras porosas tridimensionales como andamios para ingeniería de tejidos y vehículos de administración de fármacos de liberación controlada / sostenida, por no presentar limitaciones en cuanto a biocompatibilidad, biodegradabilidad y toxicidad. Los polímeros naturales poseen además numerosas ventajas, incluida la abundancia natural, la relativa facilidad de aislamiento y el espacio para la modificación química capaz de satisfacer las diversas necesidades tecnológicas. Además, estos polímeros experimentan degradación enzimática y/o hidrolítica en ambientes biológicos

originando subproductos de degradación no tóxicos [Shelke *et al.* 2014; Laurienzo, P. *et al.* 2015].

II.1.1. Complejos de Polielectrolitos

Debido a la toxicidad potencial de los reticulantes covalentes libres sin reaccionar que requerían una etapa de purificación durante la fabricación de hidrogeles, se llegó a la conclusión de que era deseable el desarrollo de tipos alternativos de hidrogeles [Berger *et al.* 2004]. Entre los sistemas basados en polímeros naturales, se destacan los complejos de polielectrolitos (PEC). La principal interacción en la mezcla de polielectrolitos de carga opuesta en solución dará como resultado su autoensamblaje o asociación espontánea debido a la formación de enlaces electrostáticos fuertes pero reversibles, que pueden verse reforzados por otros tipos de interacciones tales como uniones dipolo-dipolo, enlaces puente de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. Estas interacciones directas entre las cadenas poliméricas conducen a la formación de redes complejas de polielectrolitos con estructuras no permanentes, al tiempo que se evita el uso de reticulantes covalentes, precursores orgánicos, catalizadores o agentes reactivos, aliviando la preocupación por la toxicidad o las reacciones con una carga útil terapéutica [Il'ina & Varlamov 2005; Hamman, J. H. 2010; Dash, M. *et al.* 2011]. Dado que los PEC están formadas por redes no permanentes, presentan la ventaja de que puede producirse la disolución [Berger *et al.* 2004].

Recientemente, numerosos PEC han encontrado aplicación como transportadores para la administración de fármacos, inmovilización de enzimas, unión de ADN, como membranas, ingeniería de tejidos, biosensores, prótesis médicas, recubrimientos antiestáticos, separación de proteínas, entre otras [Yang, M. *et al.* 2004; Kim, S. J. *et al.* 2004; Kara, F. *et al.* 2006; De Oliveira, H. C. L. *et al.* 2008; Wen, Y. *et al.* 2012; Cifani, N. *et al.* 2015]. En todos estos casos, es importante notar que la estabilidad del PEC podría verse afectada por muchos factores que incluyen densidad de cargas, el grado de ionización de cada uno de los polielectrolitos, concentración de polielectrolitos, distribución de grupos iónicos sobre las cadenas poliméricas, la estabilidad de la interacción, la naturaleza de los grupos iónicos, peso molecular, proporción de mezcla, orden de reacción de los polielectrolitos, así como la temperatura, pH del medio de reacción y proceso de secado [Luo & Wang 2014].

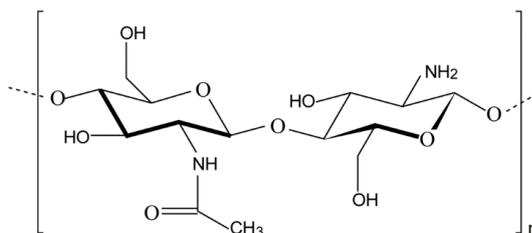
Cuando los polielectrolitos se mezclan en una proporción tal que hay un exceso de una carga (positiva o negativa), se forma un complejo no estequiométrico que normalmente es soluble. Por otro lado, un PEC estequiométrico contiene cantidades iguales de cada carga opuesta, con una carga neta igual a cero en el complejo resultante. Los complejos de polielectrolitos estequiométricos son usualmente insolubles y se precipitan de la solución tras su formación.

II.1.1.1. Quitosano (Qo)

La formación de hidrogeles de Qo por la complejación de polielectrolitos es una alternativa interesante a los hidrogeles reticulados covalentemente. El quitosano es el principal derivado de la quitina, que es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, siendo la celulosa la más abundante; un biopolímero natural obtenido de diversas fuentes naturales, pero principalmente del exoesqueleto de diferentes insectos, crustáceos y hongos, y del endoesqueleto (pluma) del calamar [Kurita, K. *et al.* 1993; Chaussard & Domard 2004; Kurita, K. 2001; Centes, J. F. *et al.* 2007; De la Paz, N. *et al.* 2012; Huerta, A. C. *et al.* 2012].

El Qo es un biopolímero policatiónico, que generalmente se obtiene mediante un proceso de desacetilación alcalina de la quitina. Las principales fuentes comerciales de quitina son los residuos de conchas de camarones, langostas, krills y cangrejos. En el mundo se cosecha anualmente varios millones de toneladas de quitina y, por lo tanto, este biopolímero representa una fuente barata y fácilmente disponible. El proceso de producción de Qo implica un tratamiento ácido (descalcificación), un tratamiento alcalino (desproteínización) y una etapa de decoloración. Posteriormente, se aplica un nuevo tratamiento alcalino para producir la desacetilación de la quitina. En este proceso, existen múltiples factores que pueden variar las propiedades del Qo obtenido, como la concentración alcalina, el tiempo de incubación, la proporción de quitina - álcali, la temperatura, la atmósfera, la fuente de quitina (incluido el polimorfismo), el tamaño de partícula y la heterogeneidad / homogeneidad de desacetilación [Dash, M. *et al.* 2011; De Moura, C. M. *et al.* 2011; Van den Broek *et al.* 2015].

Los principales parámetros que influyen en las características del Qo son su peso molecular (MW) y su grado de acetilación (DA), que representan la proporción de unidades acetiladas. Estos parámetros dependen fuertemente de las condiciones de desacetilación e influyen marcadamente sobre sus propiedades finales. Estrictamente se trata de un copolímero de unidades β -D-glucosamina (unidades desacetiladas) ligada por puentes β -1,4 a β -D-N-acetil-glucosamina (unidades acetiladas) (**Esquema II.1**). El Qo comercial posee grados típicos de desacetilación (DD) entre 70 y 95%, y pesos moleculares entre 10 y 1.000 kDa [Hamman, J. H. 2010; De Moura, C. M. *et al.* 2011]; por lo tanto, los productos disponibles presentan una amplia gama de características, que definen sus aplicaciones e influyen en el rendimiento final del biopolímero. Estudios recientes han revelado que el efecto antimicrobiano del Qo está relacionado con las características de Mw y DA [Kim, I. *et al.* 2008; Chen & Zhao 2012; Arancibia, M. Y. *et al.* 2015]. La actividad antibacteriana del Qo contra las bacterias *gram* negativas aumenta al disminuir el grado de acetilación, MW y pH [Younes, I. *et al.* 2014].

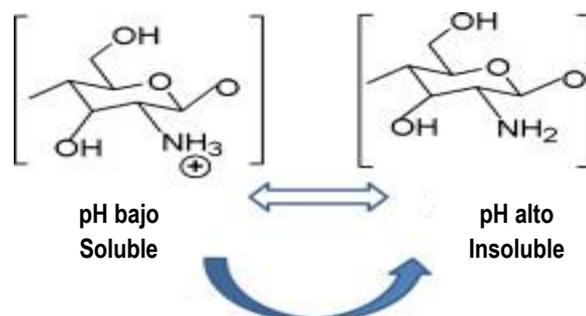


Esquema II.1: Estructura química del quitosano.

La historia del Qo se remonta al siglo XIX, cuando Rouget [Dodane & Vilivalam 1998] analizó las formas desacetiladas del polímero natural de quitina original en 1859. Durante los últimos 20 años, se ha informado una cantidad sustancial de trabajos sobre el Qo y su uso potencial en diversas bioaplicaciones. El Qo ha sido uno de los biopolímeros más populares para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos para diversos usos, debido a sus interesantes propiedades, que incluyen alta biocompatibilidad, excelente biodegradabilidad, baja toxicidad, así como abundante disponibilidad, bajo costo de producción a partir de abundantes fuentes naturales y amigable ecológicamente (*eco-friendly*) [Kim, I. *et al.* 2008; Jayakumar *et al.* 2010; Dash, M. *et al.* 2011; Luo *et al.* 2014].

La quitina original es insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, el Qo es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6.0 debido a la cuaternización de los grupos amino que tienen un valor de pKa de 6.3, haciendo que el Qo sea un polielectrolito catiónico soluble en agua (**Esquema II.2**). Por otro lado, a medida que el pH aumenta por encima de 6.0, los grupos aminos del Qo se desprotonan y el polímero pierde su carga volviéndose insoluble. La transición soluble-insoluble se produce en su valor pKa, alrededor del pH entre 6 y 6.5. Como el valor de pKa depende en gran medida del grado de N-desacetilación, la solubilidad del Qo depende de la DD y del método de desacetilación utilizado.

Los grupos amino primarios activos en la molécula de Qo, son reactivos y proporcionan sitios para una variedad de unión de grupos laterales que emplean condiciones de reacción suaves. La fácil derivación hace que el Qo sea un candidato ideal para la biofabricación. Como el Qo está cargado positivamente a valores de pH bajos (por debajo de su pKa), se asocia espontáneamente con los poli-iones cargados negativamente (poli-anión) en solución para formar complejos polielectrolitos. Estos PEC basados en Qo exhiben propiedades fisicoquímicas favorables con la preservación de las características biocompatibles del Qo [Hamman, *et al.* 2010].



Esquema II.2: Ilustración esquemática de la versatilidad del Qo. A un pH bajo (menos de 6), los grupos aminos están protonados confiriendo comportamiento policatiónico a Qo. A un pH más alto (por encima de aproximadamente 6,5), las aminos están desprotonadas y son reactivas. Adaptado de Dash, M. *et al.* 2011.

Actualmente, entre las aplicaciones médicas y farmacéuticas, se encuentran la aplicación ocular tópica [Dodane & Vilivalam 1998; Felt, O. *et al.* 1999], la utilización como excipiente en la industria farmacéutica [Ilium, L. 1998], la implantación de microesferas de Qo como sistema de liberación de drogas de bifosfonatos [Patashnk *et al.* 1997] o la inyección intra-articular de un complejo de Qo para el tratamiento de la sinovitis de rodilla²⁴ en pacientes con artritis reumatoide [Song, J. *et al.* 2001].

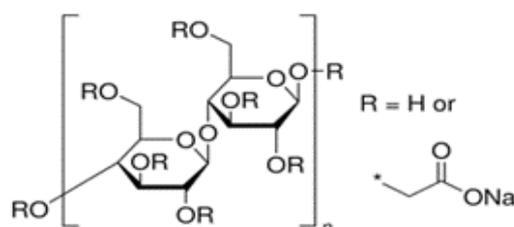
En los últimos años, se ha descubierto que el *electrospinning* es una técnica novedosa para producir nanofibras de quitina y quitosano. Estas nanofibras encuentran aplicaciones novedosas en los campos biomédicos debido a su alta área de superficie y porosidad [Ayakumar *et al.* 2010]. La aplicación de quitosano en el desarrollo de películas en materiales de empaque, recubrimientos y envases, aprovechando su actividad antimicrobiana intrínseca [Doulabi, A. H. *et al.* 2013; Van den Broek, L. A. *et al.* 2015]. El Qo también promueve la cicatrización de heridas, tiene efectos bacteriostáticos y ha sido propuesto como matriz para aplicación en ingeniería de tejido óseo [Berger *et al.* 2004; Seol, Y. J. *et al.* 2004; Niekraszewicz, A. 2005; Berghoff, C. F. *et al.* 2009; Jayakumar *et al.* 2010]. Particularmente, se ha encontrado que es un sustrato adecuado para la adhesión y proliferación de células osteoblásticas, así como para la formación y mineralización de la matriz ósea *in vitro* e *in vivo*²⁵ [Costa-Pinto *et al.* 2011; Seol, Y. J. *et al.* 2004; Levengood & Zhang 2014; Saravanan, S. *et al.* 2016].

²⁴ La **sinovitis** es una inflamación o irritación de la membrana sinovial que reviste las articulaciones.

²⁵ *In vivo*: del latín: dentro de lo vivo

II.1.1.2. Carboximetilcelulosa (CMC)

La preparación del PEC requiere, además del Qo, de un polímero polianiónico. La carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado de la celulosa con grupos carboximetilo unidos a los grupos hidroxilo de la unidad de glucosa (**Esquema II.3**). Forma un hidrocoloide típico medio viscoso, no tóxico y sin efectos alergénico que tiene muchas aplicaciones en formulaciones de alimentos, desarrollo de productos y en diversos procesamientos debido a sus propiedades reológicas específicas. La CMC tiene gran importancia industrial, cuyo uso se ha incrementado, no sólo porque es de bajo costo y su capacidad para reaccionar con moléculas cargadas dentro de rangos de pH específicos, sino porque sus productos de degradación son biocompatibles y biodegradables.



Esquema II.3: Estructura química de la carboximetilcelulosa (CMC, R=CH₂COONa).

Ejemplos de sus aplicaciones industriales se encuentran en la industria alimentaria como espesante, aditivo y aglutinante, y en la industria cosmética como estabilizador y aglutinante [Taghizadeh, M. T. *et al.* 2012]. Se ha reportado que la CMC puede mejorar las propiedades clínicas del sulfato de calcio cuando se usa como aglutinante para partículas en injertos óseos [Reynolds *et al.* 2007; Chen, H., & Fan, M. 2007]. Se ha probado como un material antia-adhesivo para cirugía espinal, la combinación de hialuronato de sodio-carboximetilcelulosa sódica (HA-CMC) [Lee, J. H., & Jeong 2011] y como componentes de las terapias para prevenir las adherencias posquirúrgicas (p. ej., *Genzyme's Seprafilm*) [Lee, J. H. *et al.* 2005; Ito, T. *et al.* 2007]; y se ha aplicado en formulaciones de administración de fármacos [Barbucci, R. *et al.* 2004]. Debido a su falta de toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibilidad, la CMC también se ha investigado ampliamente como un polímero atractivo para su utilización en andamios para injertos óseos [Reeves, R. *et al.* 2010; Mohod *et al.* 2011; Taghizadeh *et al.* 2012; Manjubala, I. *et al.* 2018]. En este área, se ha desarrollado un nuevo andamio nanofibroso basado en fibroína de seda biocética (SF) y carboximetilcelulosa (CMC) mediante el método de *electrospinning* de superficie de líquido libre [Singh, B. N. 2017]. Incluso combinando Qo y CMC, se han reportado varios desarrollos de matrices para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo [Tamburaci, S. *et al.* 2018].

II.1.2 Técnicas de procesamiento: Liofilización

El siguiente paso después de seleccionar el polímero biodegradable adecuado es desarrollar o elegir una técnica de procesamiento adecuada. Para hacerlo, y para asegurarse de que todas las características de los andamios se cumplan, la técnica de procesamiento elegida debe obedecer, en términos generales, a los siguientes criterios:

- ✓ La metodología de procesamiento no debe afectar negativamente las propiedades de los materiales, es decir, su biocompatibilidad o propiedades químicas.
- ✓ La técnica debe ser precisa y consistente, con respecto a la porosidad, el tamaño de los poros, la distribución de los poros y la interconectividad.
- ✓ Los diferentes lotes de andamios deben mostrar variaciones mínimas en sus propiedades cuando se procesan desde el mismo conjunto de parámetros y condiciones de procesamiento.

A través de los años, una serie de técnicas de procesamiento como la fundición de solventes, inversión de fase, unión de fibras, tecnologías basadas en fusión, métodos basados en alta presión, liofilización, y tecnologías de creación rápida de prototipos, se desarrollaron con el objetivo de producir andamios con propiedades adecuadas para la ingeniería del tejido óseo.

Los andamios a base de Qo se preparan a través de varios métodos de fabricación, entre estos, la metodología más común es la *liofilización* [Mao, J. S. *et al.* 2003; Pattnaik, S. *et al.* 2011; Tamburaci, S. *et al.* 2018; Sowjanya, J. A. *et al.* 2013; Sainitya, R. *et al.* 2015]. Esta metodología ha sido utilizada para desarrollar andamios de origen natural y sintético. La congelación de la solución de Qo da como resultado la formación de cristales de hielo a través de la separación de fases y la fase rica en solventes se elimina por sublimación al vacío, el espacio original ocupado por los cristales se vacía y conduce a la formación de poros. Esta técnica requiere una regulación de alta precisión en la temperatura. Las desventajas asociadas con esta técnica son la estabilidad mecánica baja con el posible colapso de la estructura de los poros si la temperatura no está adecuadamente controlada; y la sensibilidad de la técnica (los parámetros de procesamiento deben estar muy bien regulados). Existe la posibilidad de formación de poros más grandes y la elección del disolvente es limitada [Salgado *et al.* 2004; Saravanan, S. *et al.* 2016].

II.1.3. Ultrasonido

Una falencia de los PEC es su baja estabilidad en función del pH, por lo cual con el fin de mejorarla, se han propuesto diferentes estrategias de modificación, tales como la plastificación, la incorporación de rellenos, refuerzos y la mezcla con distintos polímeros. Bajo el término mezcla física entendemos la simple mezcla de materiales poliméricos en estado fundido sin que se produzcan reacciones químicas. Es una ruta conveniente para crear nuevos materiales con la combinación de las propiedades deseadas. La mezcla se puede realizar utilizando maquinaria convencional, es decir, no es necesaria una inversión costosa, lo que es un aspecto importante para la industria. Con este enfoque se podría lograr un rango muy amplio de propiedades para cumplir con los requisitos de la aplicación deseada o maximizar el rendimiento de un material, en un tiempo relativamente corto y a un bajo costo en comparación con el desarrollo de nuevos monómeros y técnicas de polimerización. La mayoría de los pares de biopolímeros son sólo parcialmente miscibles, por lo que forman mezclas con una estructura heterogénea y que en la mayoría de las composiciones exhiben separación de fases. Esta última característica notoriamente va en detrimento de sus propiedades finales.

Para subsanar estos inconvenientes se han propuestos distintas tácticas de compatibilización, como métodos no reactivos, tal como las mezclas incluyendo copolímeros en bloque; o la compatibilización reactiva, por medio de modificaciones químicas de grupos reactivos en los biopolímeros, formando copolímeros injertados o en bloque, la transesterificación y el uso de agentes de acoplamiento reactivos [Imre *et al.* 2013].

Una de las metodologías de compatibilización se basa en el uso de ultrasonido (US). Los efectos del US en los polímeros pueden ser tanto físicos como químicos. La irradiación de líquidos con US puede causar cambios únicamente físicos debido a la transmisión acústica, como la mezcla rápida y el calentamiento a granel. Los ejemplos de cambios físicos inducidos en sistemas de polímeros incluyen la dispersión de cargas y otros componentes en polímeros base (como en la formulación de pinturas), la encapsulación de partículas inorgánicas con polímeros, la modificación del tamaño de partículas en polvos de polímeros y, quizás la más importante, la soldadura y corte de termoplásticos [Van Eldik & Hubbard 1996]. Se sabe que las ondas ultrasónicas de baja frecuencia que funcionan a alta potencia influyen en las reacciones químicas, e inducen cambios estructurales y químicos en los sistemas de polímeros, no por la interacción directa entre la onda y la materia, sino debido a los fenómenos de cavitación. Durante la cavitación, el colapso de las burbujas produce un calentamiento local intenso, presiones altas y tiempos de vida muy cortos; estos “*puntos calientes*” transitorios y localizados provocan reacciones químicas de alta energía [Suslick *et al.* 1999]. En

particular, se observó un notable efecto del US sobre las reacciones de degradación de los polímeros en solución o en fundido [Thomas 1959; Price *et al.* 1993; Marx-Figini, M. 1997; Ávila-Orta *et al.* 2013]. La escisión de cadenas macromoleculares bajo US ocurre cerca del centro de la cadena y da como resultado la formación de macrorradicales, como fue demostrado previamente por Tabata [Tabata *et al.* 1980]. Estos macrorradicales pueden reaccionar mediante procesos de transferencia o por combinación, modificando la distribución inicial del peso molecular. Por lo tanto, en base a la reactividad de estos macrorradicales, el US se empleó como una nueva metodología para mejorar la compatibilidad de dos mezclas de polímeros incompatibles. Se ha demostrado que debido a este proceso, las reacciones inducidas sonoquímicamente pueden conducir a un acoplamiento de radicales entre polímeros de distinta naturaleza, generando copolímeros en bloque, que son útiles para la compatibilización reactiva [Feng *et al.* 2004; Lebovitz *et al.* 2003; Oh *et al.* 2003; Fernández *et al.* 2010].

En este trabajo de tesis, se aplicó una metodología de ultrasonido para mejorar la compatibilidad, la estabilidad, las propiedades mecánicas y las propiedades biológicas de los complejos de polielectrolitos basados en quitosano (Qo) y carboximetilcelulosa (CMC), a través del acoplamiento de macrorradicales interpolímeros producidos por la reacción sonoquímica. Se estudió la cinética de la degradación sonoquímica de cada componente para optimizar las condiciones experimentales para la compatibilización PEC. Se espera que los *scaffolds* obtenidos puedan ser utilizados como andamios con potencial aplicación en la ingeniería de tejidos óseo-cartilaginosa. Con fines comparativos, se preparó una mezcla que no fue sometida a ultrasonido y se analizó la morfología (mediante microscopía electrónica de barrido - SEM), las interacciones entre los polielectrolitos (por FTIR), la estabilidad estructural, el comportamiento de hinchamiento (*swelling*) y las propiedades mecánicas en ambos tipos de andamios. También se evaluó la biocompatibilidad usando células preosteoblásticas *MC3T3E1* y la posible citotoxicidad *in vitro* de los *scaffolds* utilizando células de macrófagos en cultivo.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1. Reactivos y drogas

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

Los polímeros utilizados para obtener las matrices fueron Quitosano (Qo) de alto peso molecular y Carboximetilcelulosa (CMC), de Sigma-Aldrich Argentina.

II.2.2. Caracterización de los polímeros

Se evaluó el grado de acetilación (DA) del quitosano de alto peso molecular mediante FTIR basado en la relación de absorbancia de las bandas a 1320 cm^{-1} y 1456 cm^{-1} , correspondientes a la amida III y $-\text{CH}_2$, respectivamente [Brugnerotto *et al.* 2011].

$$DA(\%) = 31.92(A_{1320}/A_{1456}) - 12.20 \quad \text{Ecuación II.1}$$

La carboximetilcelulosa usada es de grado farmacéutico. El peso molecular promedio viscosimétrico ($M\eta$) de ambos polisacáridos se evaluó mediante viscosimetría capilar usando ácido acético 0,3M / acetato de sodio 0,2M o cloruro de sodio 0,2N como disolvente para quitosano o carboximetilcelulosa, respectivamente. La temperatura de medida se mantuvo a $25,00 \pm 0,02$ ° C. Se evaluó el $M\eta$ a partir de la siguiente ecuación (ecuación de Mark-Houwink-Sakurada):

$$[\eta](\text{ml/g}) = KM_{\eta}^a \quad \text{Ecuación II.2}$$

donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca o índice de viscosidad límite, y k y a son parámetros característicos para cada sistema de polímero-solvente. Los parámetros k y a tienen valores de 0,082 ml/g y 0,76 para Qo respectivamente; y 0,043 ml/g y 0,74 en el caso de CMC [Rinaudo *et al.* 1993, Brown *et al.* 1964].

II.2.3. Degradación por ultrasonido

Se estudió la cinética de la degradación sonoquímica de cada uno de los polímeros utilizados en la formación del complejo, con el fin de optimizar las condiciones experimentales para la compatibilización de los polielectrolitos. Se realizó un ensayo preliminar utilizando separadamente una solución de Carboximetilcelulosa 1% p/v en agua destilada y una solución de Quitosano 1% p/v en ácido acético 0,25% v/v. Se tomaron 20 ml como volumen de líquido en ambos casos y se sometió a sonicación. A distintos tiempos se tomó una alícuota de 1 ml de la solución de reacción, se filtró a través de una membrana de teflón de 0,45 μm y se analizó por viscosimetría capilar siguiendo la metodología descrita [Cortizo M. S. *et al.* 2008]. El equipo de ultrasonido utilizado es un aparato *HD 60 Bandelin SONOPULS* con accesorios de punta plana TT 12 de titanio, que funciona a una frecuencia de 20 kHz. Se usó una potencia de salida de 37 W en todos los experimentos y la temperatura del recipiente de vidrio con camisa de refrigeración se ajustó a $20,00 \pm 0,02$ ° C usando un termostato *MGW Lauda Thermostar RCS6*.

II.2.4. Obtención del biomaterial

El biomaterial se obtuvo mediante entrecruzamiento físico, por interacciones iónicas establecidas entre los dos polisacáridos polielectrolitos que contienen cargas contrarias. Como se indicó previamente, se utilizó un polielectrolito aniónico, CMC, junto con un polielectrolito catiónico, Qo (de alto peso molecular).

Se preparó una solución (1% p/v) de Qo en ácido acético (0,25% v/v; 99,5% *Biopack*) y otra de CMC (1% p/v) en agua destilada, y se llevaron ambas soluciones a pH=5. A partir de estas, se prepararon matrices mediante el goteo de CMC sobre la solución de Qo, bajo agitación constante (150 rpm) y ultrasonido (PEC-US) durante 20 minutos. Se seleccionó este tiempo en base a los resultados de los estudios de degradación por ultrasonido de cada una de las soluciones de polisacáridos que se describió previamente en la *Sección II.2.3*. Con fines comparativos, se preparó una mezcla que no fue sometida a ultrasonido para su posterior análisis (PEC).

Finalmente se aislaron las muestras desechando el medio sobrenadante, se vertieron en placas de cultivo de 24 ó 48 pocillos, dependiendo el tamaño final de la superficie que se deseara obtener y se dejó en el freezer a -20°C durante toda la noche. Luego de este período de tiempo, las matrices se liofilizaron en un equipo de laboratorio modelo *Scientz 10N (Hinodek, China)*, hasta alcanzar peso constante, para determinar la masa inicial antes de realizar las medidas de caracterización.

II.2.5. Caracterización fisicoquímica de las matrices

II.2.5.1. Espectroscopia ATR-FTIR

Con el objetivo de caracterizar la muestra y evaluar las interacciones entre los componentes de la matriz obtenida se utilizó la espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) sobre las matrices obtenidas. Se empleó un espectrómetro *Nicolet Magna IR-560* mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR). Los espectros se recogieron en el rango de 4000-600 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis del espectro se efectuó a través del software *EZ-OMNIC 8.2.0.387* (*Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, USA*).

II.2.5.2. Microscopia SEM

A fin de estudiar la topografía superficial de las matrices, la superficie de las mismas fue cubierta con oro (con un metalizador *Balzers SCD 030*, por el método de *sputtering*) y su morfología de superficie fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), en un equipo *Phillips SEM 505* (The Netherlands), con una aceleración de voltaje de 20 kV. Con el fin de evaluar el tamaño de poro, las imágenes se analizaron mediante el software *ImageJ 1.52a* (*Wayne Rasband National Institutes of Health, USA*).

II.2.5.3. Estudio de hinchamiento

Se determinaron las propiedades de hinchamiento (*swelling*) de la matriz incubando en buffer fosfato estéril (pH=7,4) a 37°C, midiendo el cambio en el peso de la matriz en función del tiempo de inmersión en la solución [Kim, S. J. *et al.* 2004; Pasqualone *et al.* 2013]. Se estudió la cinética de hinchamiento y se interpretaron los resultados en función de las diferencias estructurales entre las matrices. El porcentaje de hinchamiento de la membrana (% S_w) se obtuvo como la diferencia entre el peso de la muestra saturada de agua (w) a distintos tiempos y el peso inicial de la muestra seca (w_0). El porcentaje de hinchamiento de la membrana se determinó a partir de la fórmula:

$$\%S_w = \frac{100(W - W_0)}{W_0} \quad \text{Ecuación II.3}$$

Con el fin de interpretar el mecanismo de transporte de agua a través de la membrana, en relación de sus características estructurales, la cinética de hinchamiento se analizó mediante la siguiente expresión matemática [Ritger *et al.* 1987]:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = kt^n \quad \text{Ecuación II.4}$$

donde k es una constante característica del sistema que depende de las características estructurales del polímero y su interacción con el solvente, n es el exponente de swelling que describe el mecanismo de transporte del agua en la membrana y, W_t y W_∞ representan las cantidades de agua absorbida al tiempo t y en el equilibrio, respectivamente. El valor de n y k puede obtenerse a partir de la pendiente y la intersección de la regresión lineal de la gráfica de $\log (W_t/W_\infty)$ frente a $\log t$, a partir de los datos experimentales adquiridos hasta el 60% de máxima absorción. En la **ecuación II.4** el valor numérico de n proporciona información sobre el mecanismo de transporte del agua. El valor de $n=0,5$ corresponde a una cinética de tipo Fick, donde la velocidad de difusión del agua es el proceso limitante en la cinética de hinchamiento; mientras que un valor de $0,5 < n < 1$ indica un proceso de difusión no Fickiano en el cual la relajación de las cadenas poliméricas es el principal mecanismo en la velocidad de absorción del agua. El caso límite en el cual $n=1$ corresponde a condiciones en las que la velocidad de difusión del agua es superior a la velocidad de relajación de la cadena del polímero, y en esta condición, la tasa de captación de masa es directamente proporcional al tiempo [Ganji *et al.* 2010].

II.2.5.4. Estudios de degradación

Se llevó a cabo un estudio de degradación *in vitro* (acelular, no enzimático) con el fin de investigar la estabilidad estructural de las matrices con respecto al tiempo de almacenamiento. Las muestras fueron previamente secadas a peso constante por liofilización y pesadas, a fin de evaluar la pérdida en masa. Luego fueron sumergidas en 2 ml de buffer fosfato estéril (PBS) (obtenido utilizando un filtro de jeringa de 0,2 μm), en placas de cultivo de 6 pocillos y permanecieron incubadas en estufa de cultivo a 37°C, durante 7 días, simulando las condiciones fisiológicas. Luego del tiempo evaluado, se retiró el PBS de los pocillos, se lavaron las muestras para despegar partículas desprendidas como producto de la degradación y se liofilizaron hasta alcanzar peso constante. Para evaluar la degradación de las muestras se determinó el porcentaje de pérdida de peso, comparando el peso inicial seco (w_0) con el peso final seco (w_f) a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ pérdida de peso} = \frac{w_0 - w_f}{w_0} \times 100 \quad \text{Ecuación II.5}$$

II.2.5.5. Pruebas mecánicas

Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de las matrices, se realizaron ensayos para determinar la resistencia mecánica a la compresión y el módulo de elasticidad de las mismas utilizando una máquina de ensayo universal (*Digimesstc500*), con una celda de carga de fuerza (*'interface'* de Arizona, EE.UU.) de *SM-50 N* de capacidad, a temperatura ambiente. Las muestras fueron obtenidas en placas de cultivo de 24 pocillos, como discos circulares de 13 mm de diámetro y 10 mm de espesor, y liofilizadas hasta alcanzar peso constante. El ensayo se realizó a una velocidad de compresión de 1,3 mm/min hasta alcanzar el 50% de compresión de la matriz. Las mediciones se realizaron siguiendo la norma *ASTM D695* (temperatura ambiente). El módulo elástico (*Módulo de Young*) se calculó en base a las Curvas de Tensión vs. Desplazamiento generadas por el equipo. Los resultados presentados son los valores medios obtenidos a partir de 5 mediciones independientes, en igualdad de condiciones.

II.2.6. Ensayos biológicos

Para los ensayos biológicos, las matrices se cortaron a la medida del pocillo a utilizar, se colocaron en una placa de cultivo de 24 pocillos, se esterilizaron por inmersión en etanol al 70% y se irradiaron con luz UV durante 20 minutos. Luego las membranas se lavaron dos veces con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Media*) (sin suero y sin rojo de fenol).

II.2.6.1. Cultivos de células MC3T3-E1 preosteoblásticas

Las células *MC3T3-E1* preosteoblásticas, corresponden a una línea celular derivada de calvaria de ratón C57BL/6. Su morfología es fibroblástica, crecen en forma adherente a una matriz, y es una línea adecuada para estudios del desarrollo osteogénico *in vitro*. Bajo condiciones de diferenciación osteogénica, expresan marcadores osteoblásticos y llevan a cabo la mineralización de la matriz extracelular [Quarles L. D. *et al.* 1992]. Esta línea celular tiene la característica de poseer dos fenotipos secuenciales [Sudo, H. *et al.* 1983; Quarles L. D. *et al.* 1992; Maeda, T. *et al.* 2004; Wang, D. *et al.* 1999]. Una primera etapa proliferativa, donde las células se dividen exponencialmente en el medio de cultivo antes mencionado, manteniendo su apariencia fusiforme de osteoblasto inmaduro y expresan bajos niveles de fosfatasa alcalina; y un fenotipo osteoblástico cuando se las incubaba en presencia de un medio osteogénico de β -glicerol fosfato y ácido ascórbico, donde los niveles de fosfatasa alcalina aumentan, junto con otros marcadores de diferenciación osteoblásticos.

Las células *MC3T3-E1* se cultivaron en frascos de 75 cm² en DMEM con rojo de fenol suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) en estufa de cultivo a 37°C, en una atmósfera de CO₂ al 5% y humedad controlada. Los cultivos fueron visualizados utilizando un microscopio invertido. Cuando las monocapas celulares llegaron a un 70-80% de confluencia, 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-5% FBS. A partir de la suspensión celular se tomaron alícuotas de modo de mantener la línea celular y de poder llevar a cabo los diferentes experimentos.

II.2.6.1.1 Ensayo de morfología y crecimiento celular

Con el objetivo de estudiar la adhesión de las células a las membranas obtenidas, se cortaron las matrices, se introdujeron a una placa de cultivo de 24 pocillos y se esterilizaron como se describió anteriormente. A continuación se plaquearon las células *MC3T3-E1* con medio de cultivo DMEM 10% FBS y se incubaron durante 72hs a 37°C, en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂. Luego de este período de cultivo, se sacó el medio, se lavaron las matrices con las células con PBS, se fijaron con metanol absoluto durante 5 minutos, y se tiñeron con Giemsa (1:10), durante 10 minutos. El excedente de colorante, se lavó con agua corriente y las células sobre la matriz se observaron en un microscopio óptico invertido (*Nikon Eclipse E400 Nikon Tokio, Japón*). Se tomaron fotografías con una cámara CCD con lente 0.7X DXM adicionada al microscopio, contando el número de células/campo, en 7 campos representativos, con un objetivo de 10X. Los resultados se expresan como el promedio ± SEM.

II.2.6.2 Cultivos de macrófagos murinos RAW 264.7

Se cultivaron células *RAW 264.7*; una línea celular establecida derivada de macrófagos murinos (*Mus musculus*) en frascos de cultivo de 75 cm² en DMEM con rojo de fenol suplementado con 5% v/v de FBS y antibióticos (100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina) en estufa de cultivo a 37°C, atmósfera de CO₂ al 5% y humedad controlada. Para realizar los subcultivos correspondientes en cada ensayo, las células se despegan del frasco en el cual crecen cuando llegan a subconfluencia (~70%) usando PBS/EDTA (1 mM) y se resuspenden en DMEM con 5% FBS. Los cultivos fueron visualizados utilizando un microscopio invertido. Esta línea celular responde a diferentes agentes tóxicos, expresando marcadores de citotoxicidad, como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), inducción de óxido nítrico sintasas (NOS) y poseen la capacidad de diferenciarse hacia macrófagos con alta capacidad fagocítica [Denlinger *et al.* 1996]. Por estas características, representan un modelo biológico adecuado y sensible *in vitro* para estudios de citotoxicidad y se ha usado

ampliamente en nuestro laboratorio y por otros colegas para dichos estudios, [Fernández J. M. *et al.* 2014; Cortizo AM *et al.* 2012].

La morfología y el crecimiento celular de los macrófagos sobre las matrices se evaluaron en forma similar a la descrita previamente para las células *MC3T3-E1*.

II.2.6.2.1 Viabilidad celular

Para estudiar la viabilidad celular sobre las matrices obtenidas se realizaron estudios de adhesión (a 3 horas) y proliferación (72hs) con las células *RAW 264.7*, mediante el ensayo de MTT a diferentes tiempos. Este método fue desarrollado por Mosmann [Mosmann, T. 1983] y modificado por Twentyman y Luscombe [Twentyman & Luscombe 1987]. El MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua y de color amarillo. La actividad metabólica de las células incluye la de las deshidrogenasas mitocondriales, en particular la succinato deshidrogenasa. Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de color violeta e insoluble en agua (formazan). Este ensayo mide la reducción de sal de tetrazolio (MTT) a formazan por las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias intactas en las células vivas. Para cuantificarlo se disuelve en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) y se mide su absorbancia a 570nm (A_{570}). La intensidad de absorbancia es directamente proporcional al número de células viables.

Se sembraron los macrófagos *RAW 264.7* en 10% FBS-DMEM sin rojo de fenol, y se incubaron durante 3 horas en placas de cultivo de 24 pocillos. Después de este periodo, donde las células incubadas se adhirieron a la matriz, se renovó el medio de cultivo, y se incubaron 72hs más, en estufa de cultivo a 37°C en 5% de CO₂ en atmósfera de humedad controlada. Como experimento control, los macrófagos se incubaron en placas de cultivo de plástico que no contenían la membrana. Después del periodo de cultivo, se retiró el medio y se reemplazó por 100 µl de medio conteniendo MTT (0,1 mg/ml) incubando las células durante 1 hora 30 minutos adicional. El medio de cultivo condicionado fue guardado para la determinación de óxido nítrico (NO). Luego de este período se descartó el sobrenadante y se adicionaron 200 µl de DMSO a cada pocillo para la lisis celular agitando durante 10 minutos. Finalmente, se transfirieron 100 µl del extracto a una placa limpia de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570nm usando un lector automático de placa de ELISA (*Infinite® F50, Tecan Trading AG, Switzerland*). Los datos para este ensayo son expresados como porcentaje respecto del basal, tomando como condición basal la cantidad de células adheridas en la superficie control.

II.2.6.2.2. Producción de NO

Para medir la liberación de NO hacia el medio de cultivo por los macrófagos RAW 264.7, se empleó el método de Griess [Fernández J.M. *et al.* 2014]. Para ello se utilizó el medio de cultivo condicionado del ensayo de viabilidad celular (donde se utilizó medio de cultivo DMEM sin rojo de fenol con 10% FBS) de 72hs. El método utiliza como agente de diazotación sulfanilamida (o ácido sulfanílico, 1% p/v en ácido fosfórico al 5%, como REACTIVO A) y como agente de acoplamiento el N-1 naftilendiamina (0,1% p/v en agua destilada, como REACTIVO B). La reacción se lleva a cabo mezclando volúmenes iguales de reactivo A y reactivo B (REACTIVO C) en el momento de la determinación; y luego se mezclan en relación 1:1 el medio condicionado con el reactivo C. Se realizaron 2 controles (blancos) de medio no condicionado (el mismo medio que se utilizó para el cultivo, pero sin células). Se incubó la mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 550nm. Se realizó en paralelo una curva de calibración para los reactivos de Griess utilizando como patrón nitrito de sodio (NaNO_2 , Biopack, Bs. As., Argentina). A partir de esta curva se obtuvo la ecuación de la recta de regresión, con la cual se calcularon los valores de NO para las muestras.

II.2.7. Análisis Estadístico de los datos

Todos los experimentos se repitieron al menos una vez y se realizaron al menos por triplicado (a menos que se indique un valor de muestras específico). Los resultados obtenidos fueron expresados como el valor promedio de las réplicas y su desviación estándar (media \pm SEM). La significancia estadística de las diferencias de los valores medios de los resultados para todos los parámetros estudiados de las distintas muestras fue evaluada utilizando la prueba de Oneway ANOVA empleando el test de Tukey post hoc, con un intervalo de confianza del 95% y las diferencias se consideraron con un nivel de significancia estadística cuando $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa *Graph Pad Instat versión 3.05* (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.3.1. Caracterización de los polímeros

La selección de los polímeros empleados se llevó a cabo por las propiedades mencionadas en la **Sección II.1.1.**, ampliamente reportadas en otros trabajos [Cai, K. *et al.* 2002; Berger, J. *et al.* 2004; Chen & Fan 2007; Reynolds, M. A. *et al.* 2007; Costa-Júnior, E. S. *et al.* 2009; Araujo, J. V. *et al.* 2014] y estudiadas en el grupo Macromoléculas del INIFTA [Cortizo, M. S. *et al.* 2008; Berghoff, C. F. *et al.* 2009; Berghoff, C. F. 2011; Lastra, M. L. *et al.* 2013; Lastra, M. L. *et al.* 2014; Lastra, M. L. *et al.* 2017].

Como se mencionó anteriormente, dependiendo de la fuente y los parámetros utilizados en el procesamiento del Qo se obtienen distintos grados de acetilación (DA) y peso molecular promedio, que podrían influir directamente sobre sus propiedades químicas y biológicas finales. El Qo comercial de Sigma-Aldrich está disponible en tres grados de peso molecular: alto, medio y bajo. Según estudios anteriores, algunas propiedades fisicoquímicas en las películas de Qo con distinto peso molecular, como la apariencia, la estructura y las propiedades mecánicas, se ven afectadas siendo relevantes para su empleo como material biodegradable. Además se encontró que el Qo de mayor peso molecular da lugar a matrices más homogéneas, fuertes y resistentes con altos valores de módulo elástico [Croisier & Jérôme 2013; Bof, M.J. *et al.* 2015].

Basados en estos antecedentes, se evaluó el grado de acetilación y el peso molecular promedio del Qo comercial (*Sigma-Aldrich*, de alto peso molecular) utilizado en este trabajo, a fin de determinar ambos parámetros que no fueron proporcionados por el proveedor. El DA, determinado por FTIR siguiendo la **Ecuación II.1** (Sección Materiales y Métodos) fue de 24,4%. Mientras que el peso molecular promedio viscosimétrico ($M\eta$) fue calculado a partir de la **Ecuación II.2** para ambos polímeros utilizados. El Qo exhibió un $M\eta = 511$ kDa, mientras que el valor correspondiente para CMC fue de 865 kDa.

II.3.2. Degradación por ultrasonido

La degradación de polímeros es un paso importante del proceso que decide la aplicación, especialmente en el caso de dispositivos biomédicos y sistemas de administración de fármacos. La degradación del polímero se refiere a la reducción del peso molecular del polímero sin muchos cambios en la naturaleza química de las unidades monoméricas que lo componen [Gogate & Prajapat, 2015].

La exposición prolongada de soluciones de macromoléculas a ondas ultrasónicas de alta energía produce una reducción permanente de la viscosidad. La degradación

ultrasónica produce escisión más preferentemente cerca de la mitad de la cadena. En el período inicial de sonicación, la fuerza de corte actúa sobre los enlaces intra-intermoleculares no covalentes, desagregando el polímero, resultando en una despolimerización gradual de la conformación compacta. Con un tratamiento ultrasónico prolongado, las cadenas extendidas o flexibles se escinden aún más en cadenas más cortas mediante un mecanismo radicalario. A medida que aumenta el tiempo de tratamiento ultrasónico, los fragmentos de peso molecular relativamente alto se degradan en fragmentos macroradicales de menor peso molecular [Gogate & Prajapat 2015]. Estos macroradicales pueden recombinarse o ser destruidos como tales, dando lugar a cadenas poliméricas de menor tamaño o a combinación entre ellos. Si están presentes especies macromoleculares de distinta naturaleza, estas pueden combinarse dando lugar a copolímeros en bloque. La velocidad y el grado de degradación dependen de varios factores: la intensidad y la duración de la irradiación, la frecuencia, el pH, la temperatura de operación, la concentración de la solución, la naturaleza del polímero y el disolvente. Para determinar las condiciones óptimas de compatibilización de los polisacáridos en la mezcla, se llevó a cabo un ensayo preliminar utilizando una solución de cada polímero (CMC y Qo) en forma independiente, cada una de las cuales se sometió a degradación por ultrasonido en función del tiempo de sonicación. Entonces, la degradación se definió en este caso como una disminución irreversible del peso molecular a través de la escisión en la longitud de la cadena, sin producir un cambio químico en la naturaleza de las cadenas de polímero en solución con posibilidades de intercombinación macroradical [Imre & Pukánszky, 2013; Gogate & Prajapat, 2015].

Además, la degradación ultrasónica se ve afectada no solo por la frecuencia irradiada sino también por la estructura molecular y el estado del polímero disuelto. Por lo tanto, este ensayo también es significativo para interpretar el mecanismo de degradación del polímero en solución acuosa bajo sonicación. El volumen de líquido utilizado durante el ensayo fue de 20 ml por cada solución y la concentración de la muestra fue de 1,0% p/v.

La **Figura II.1** muestra el cambio relativo de la viscosidad intrínseca $[\eta]_t / [\eta]_0$ en función del tiempo de sonicación para CMC y Qo. Para ambas muestras se observó una disminución en la velocidad de degradación después de transcurridos los 20 minutos, tendiendo a un valor de $[\eta]_t / [\eta]_0$ por debajo del cual no tiene lugar ninguna degradación adicional. Este resultado está de acuerdo con otros estudios de sonicación realizados con diferentes muestras [Marx-Figini, M. 1997; Grönroos, A. *et al.* 2004; Czechowska-Biskup, R. *et al.* 2005; Li, Y. *et al.* 2005; Fernandez, J. M. *et al.* 2010].

La cinética del proceso de degradación de los polisacáridos se analizó siguiendo el procedimiento de Li [Li, Y. *et al.* 2005]. Según los autores, la cinética de la degradación ultrasónica se puede expresar como:

$$[\eta]_t = [\eta]_\infty + ([\eta]_0 - [\eta]_\infty)e^{-kt} \quad \text{Ecuación II.3.1}$$

donde $[\eta]_0$, $[\eta]_t$ y $[\eta]_\infty$ son la viscosidad intrínseca al tiempo de sonicación 0 , t y viscosidad intrínseca o índice de viscosidad límite respectivamente; k es la constante de velocidad de la reacción de degradación. De acuerdo con la **Ecuación II.3.1**, la magnitud de la constante de velocidad se puede evaluar conociendo la viscosidad intrínseca inicial y la viscosidad límite de la solución de polímero, mediante la representación de un gráfico de $\ln(A)$ vs tiempo en el que:

$$A = \frac{([\eta]_0 - [\eta]_\infty)}{([\eta]_t - [\eta]_\infty)} \quad \text{Ecuación II.3.2}$$

Para estimar la cinética de degradación, se utilizaron los datos obtenidos antes de los 15 minutos de sonicación. El *insert* en la **Figura II.1** muestra el gráfico en escala logarítmica de la **Ecuación II.3.2** para los sistemas analizados. Las constantes cinéticas de velocidad fueron $0,114 \text{ min}^{-1}$ y $0,082 \text{ min}^{-1}$ para CMC y Qo, respectivamente. Algunos investigadores han explicado las diferencias entre los valores de k en función de la flexibilidad y / o el estado de disolución del polímero en soluciones acuosas [Koda, S. *et al.* 2011]. Los dos parámetros que permiten caracterizar la conformación y el comportamiento en solución de los polímeros son la longitud de persistencia L_p y el exponente α de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, **Ecuación II.2** (*Sección Materiales y Métodos*). L_p refleja la flexibilidad lineal de las cadenas de polímero en solución. Los valores de L_p obtenidos para CMC y Qo son 11nm y 15-17nm, respectivamente [Hoogendam, C. W. 1998, Rinaudo, M. 2006], que son valores similares y característicos para polímeros semiflexibles. Por otro lado, el parámetro α es una función de la conformación del polímero en una solución y, de hecho, nos ayuda a comprender el radio hidrodinámico en solución, ya que es una medida de la interacción polímero-solvente. En este sistema, el valor de α es 0,74 y 0,76 para CMC y Qo, respectivamente, lo que indica que ambos polisacáridos exhibieron un comportamiento similar en solución con una conformación de ovillo expandido en un buen solvente. Por lo tanto, las diferencias observadas para la tasa de degradación no pueden atribuirse al comportamiento conformacional de los polímeros en solución. Teniendo en cuenta que

ambos polisacáridos presentan estructuras similares compuestas por unidades derivadas de glucosa unidas por un enlace β -1,4 glicosídico (grupos carboximetilo en la misma glucopiranososa o D-glucosamina / N-acetil-D-glucosamina en CMC o Qo, respectivamente), se atribuyó la principal diferencia al peso molecular promedio, ya que la CMC que tiene un $M\eta$ más alto que el Qo, es la que exhibió una tasa de degradación más alta. Este resultado está de acuerdo con los de otras publicaciones anteriores, que demostraron que la tasa de degradación disminuye con la disminución del grado inicial de polimerización [Marx-Figini, M. 1997, Li, Y. *et al.* 2005; Antti, G. *et al.* 2008; Koda, S. *et al.* 2011].

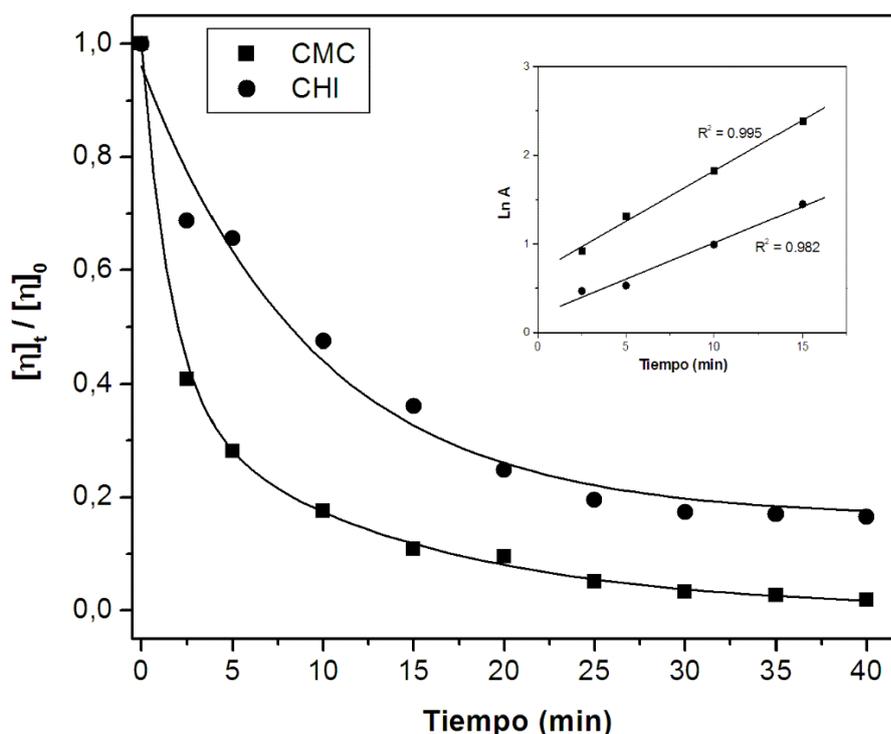


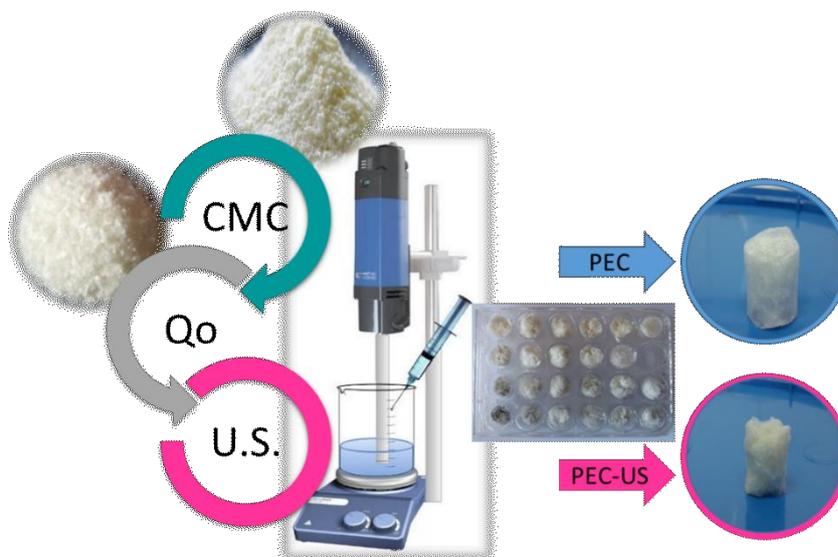
Figura II.1: Evolución de los cambios relativos en la viscosidad intrínseca de las muestras de CMC y Qo estudiadas como una función del tiempo de sonicación. El recuadro presenta el análisis cinético de la degradación: $\ln A = \ln ([\eta]_0 - [\eta]_{\infty}) / ([\eta]_t - [\eta]_{\infty})$ vs Tiempo (min) y el coeficiente de correlación (R^2) (**Ecuación II.2.1**).

En un estudio previo se ha demostrado que una mezcla de polímeros bajo la acción del ultrasonido se degrada a una velocidad similar a la cual cada uno de los componentes lo hace [Fernandez, J. M. *et al.* 2010]. En base a este hecho, se seleccionó el momento óptimo para la compatibilización entre CMC y Qo a los 20 minutos de sonicación.

II.3.3. Obtención del biomaterial

Como se indicó previamente, se utilizó una solución de un polielectrolito aniónico, CMC 1% p/v en agua destilada, junto con una solución de un polielectrolito catiónico, 1% p/v de Qo (de alto peso molecular) en ácido acético (0,25% v/v; 99,5% *Biopack*).

Se prepararon matrices mediante el goteo de CMC sobre la solución de Qo, bajo agitación constante (150 rpm) y ultrasonido (PEC-US) durante 20 minutos. Se aplicó US para mejorar la compatibilidad, la estabilidad, las propiedades mecánicas y las propiedades biológicas de los PEC, a través del acoplamiento de macrorradicales interpolímeros producidos por la reacción sonoquímica. Con fines comparativos, se preparó una mezcla que no fue sometida a ultrasonido para su posterior análisis (PEC). Luego de aislar las muestras desechando el medio sobrenadante, verterlas en placas de cultivo de 24 pocillos, se dejaron en el freezer a -20°C y se liofilizaron hasta alcanzar peso constante. Las matrices elaboradas por este método arrojaron una altura promedio de $15,5 \pm 0,6$ mm y un diámetro promedio de $13,4 \pm 0,6$ mm; medidas obtenidas al azar a partir de 8 matrices, 4 PEC y 4 PEC-US, mostrando una gran reproducibilidad en la formación de las matrices y sin diferencias significativas entre ambos tipos. Este procedimiento puede verse resumido en el **Esquema II.4**.



Esquema II.4: Esquema de la obtención de las matrices PEC y PEC-US

II.3.4. Caracterización fisicoquímica de las matrices

II.3.4.1. Espectroscopia ATR-FTIR

Los espectros FTIR de Qo, CMC y PEC obtenidos con y sin la aplicación de ultrasonido se muestran en la **Figura II.2** (longitud de onda $1900-600\text{ cm}^{-1}$). El espectro de Qo muestra dos bandas típicas a 1640 y 1556 cm^{-1} atribuidas a la amida I y la amida II, respectivamente [Berghoff, C. F. *et al.* 2009]. Además, las bandas a 1152 cm^{-1} y 1377 cm^{-1} se asignan a la vibración de flexión de C-N y a la vibración de flexión de O-H, respectivamente. En el espectro de CMC, se observaron dos picos fuertes a 1590 y 1420 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico y simétrico de los $-\text{COO}^-$. Los espectros FTIR de PEC obtenidos sólo por mezcla de Qo y CMC mostraron una disminución en la intensidad de la banda amida I (1640 cm^{-1}) en relación con la banda de absorción de amida II (1556 cm^{-1}), junto con un desplazamiento de la banda de absorción a 1410 cm^{-1} del grupo $-\text{COO}^-$, lo que sugiere la interacción iónica entre los dos polisacáridos. Esto fue reportado también en algunos trabajos por otros investigadores [Tapia, C. *et al.* 2004; Zhao, Q. *et al.* 2009].

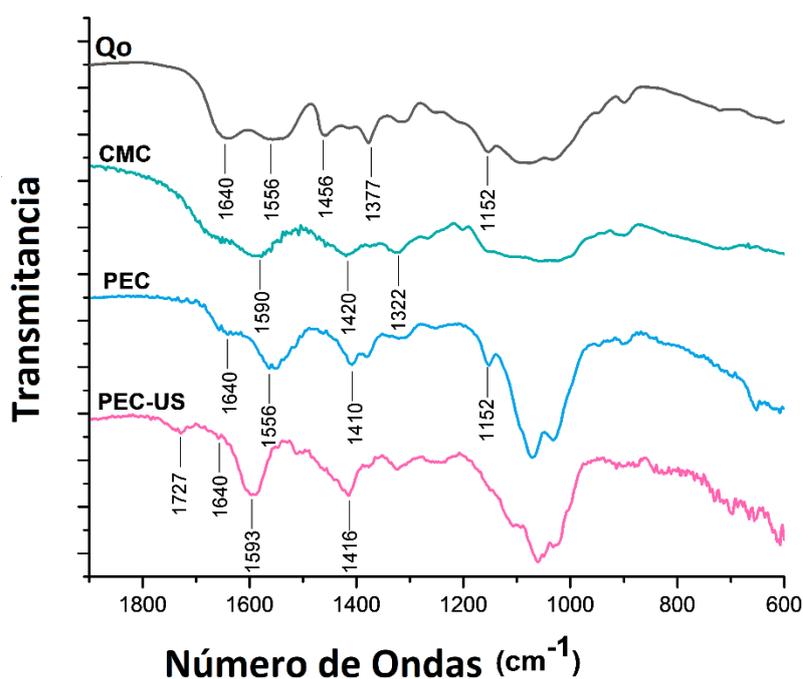


Figura II.2: Espectro FTIR (desde 1800 a 600 cm^{-1}) de quitosano (Qo), carboximetilcelulosa (CMC), complejo polielectrolito (PEC) y complejo polielectrolito sonicado (PEC-US).

Por otro lado, cuando el PEC se obtuvo en condiciones de ultrasonido, el espectro FTIR presentó algunas diferencias: la banda de absorción de amida I a 1640 cm^{-1} se puede ver con un hombro y aparece una banda fuerte a 1593 cm^{-1} , que se asigna a la flexión asimétrica de los grupos $-\text{NH}_3^+$ y grupos carboxilato, mientras que el estiramiento simétrico de los grupos $-\text{COO}^-$ cambia a 1416 cm^{-1} . Además, aparece una nueva banda débil pero visible a 1727 cm^{-1} , asignable a la vibración de estiramiento del grupo éster $>\text{C}=\text{O}$ que podría formarse por reacción sonoquímica, como se demostró anteriormente para otro sistema [Hobuss, C. B. *et al.* 2012; Suprarukmi & Sudrajat 2015]. La **Figura II.2** muestra que esta banda está ausente en el espectro de PEC obtenido sin ultrasonido, lo que sugiere que existen nuevos enlaces covalentes, que mejoran la compatibilidad entre los polisacáridos Qo y CMC.

II.3.4.2. Microscopia SEM

Para evaluar la compatibilidad física de los polímeros se estudió la superficie y una sección transversal. La morfología de los *scaffolds* PEC y PEC-US se analizó mediante SEM, como se muestra en la **Figura II.3**. En ambos casos, se observó una estructura tridimensional altamente esponjosa con buena interconexión entre poros y una porosidad superior al 70%. Se observaron algunas diferencias entre la superficie (*Figura II.3A* y *B* para PEC; y *3E* y *F* para PEC-US) y la estructura interna (*Figura II.3C* y *G* para PEC y PEC-US, respectivamente) de las matrices, siendo más homogéneas y con poros menos abiertos las matrices PEC-US que las PEC.

Para las aplicaciones en ingeniería de tejidos, la existencia de una red porosa interconectada en la estructura polimérica es crucial para la proliferación celular, ya que proporcionan las condiciones adecuadas para la migración celular, así como el transporte eficiente de nutrientes y oxígeno al interior del andamio, y la eliminación de los desechos metabólicos, a fin de garantizar la viabilidad de las células [Coimbra, P. *et al.* 2011, Araujo, J. V. *et al.* 2014; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015]. Las células pueden reconocer fácilmente los cambios sutiles en la MEC, modificando el comportamiento celular. Las propiedades superficiales, tanto químicas como topográficas, pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular [Lange, R. *et al.* 2002; He, W. *et al.* 2003; Bacakova, L. *et al.* 2011; Han, G. *et al.*, 2015; Lastra, M. L. *et al.* 2018]. Las propiedades químicas están relacionadas con la capacidad de las células para adherirse al material e interactuar con él. Las propiedades topográficas son de particular interés cuando consideramos las propiedades de osteoconducción. Anteriormente se ha demostrado [Salgado *et al.* 2004] que una superficie más "rugosa" será capaz de facilitar la migración y adhesión de células osteogénicas a la superficie de los materiales mejor que una superficie lisa, y por lo tanto mejorar la osteoconducción justo después de la implantación del material.

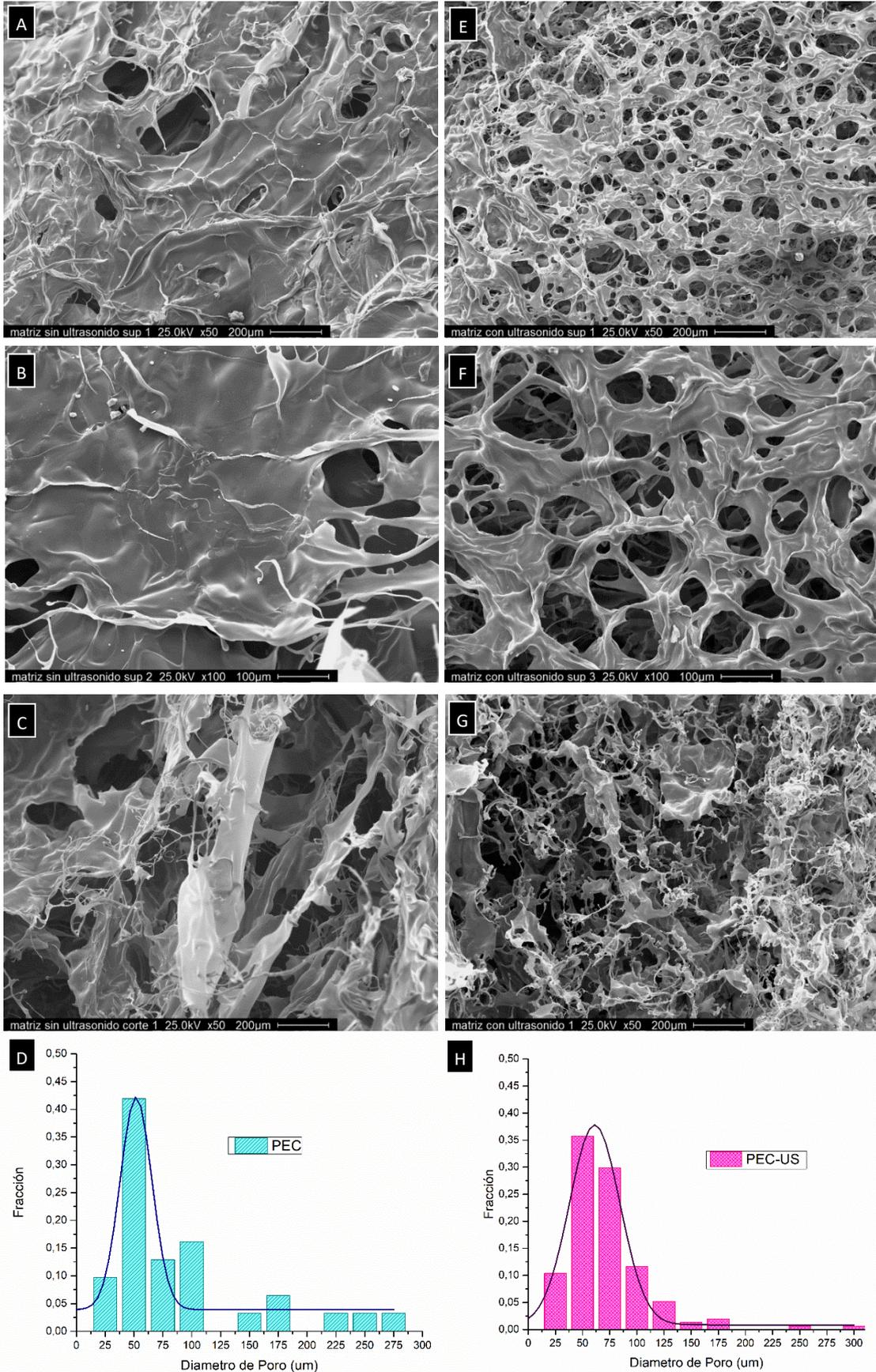


Figura II.3: Micrografías SEM de la superficie y las secciones transversales de PEC (A, B y C) y PEC-US (E, F y G) respectivamente. Distribución del tamaño de poro de los andamios PEC (D) y PEC-US (H).

El tamaño del poro también es una propiedad muy importante, dado que si los poros empleados son pequeños, las células producirán la oclusión de los mismos; y esto evitará la penetración celular, la producción de matriz extracelular y la neovascularización de las áreas internas del andamio. Actualmente, los andamios ideales deben tener una porosidad de 80 a 90% con un tamaño de poro de 50 a 250 μm [Cheung, H. Y. *et al.* 2007; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015]. La determinación cuantitativa del tamaño de poro mostró que el diámetro medio de poro de las matrices es de $82 \pm 7 \mu\text{m}$ y $115 \pm 9 \mu\text{m}$ para PEC-US y PEC, respectivamente. Estos valores están en el rango de 50 a 300 μm como se informa en la literatura para otras matrices liofilizadas [Annabi, N. *et al.* 2010; Araujo, J. V. *et al.* 2014; Vimalraj, S. *et al.* 2016; Beladi, F. *et al.* 2017; Tamburaci, S. *et al.* 2018].

Por otro lado, la distribución del tamaño de poro (*Figura II.3D y H* para PEC y PEC-US, respectivamente) muestra que en el *scaffold* tratado con ultrasonido la distribución de poros es más uniforme y estos están mejor distribuidos entre la superficie y el interior de la estructura, como se observa en las imágenes. Este hecho puede deberse a la mejor interacción entre CMC y Qo en la matriz PEC-US, producida por el proceso que tiene lugar durante la aplicación de ultrasonido, explicada también en la *sección II.2.5.1.* mediante el análisis de FTIR.

El *scaffold* es el factor que otorga el carácter osteoconductor en la **Triada de la Ingeniería de Tejidos**, y esto lo logra a través de una geometría de poros abiertos, totalmente interconectados, en una estructura altamente porosa con grandes relaciones de volumen de superficie por área, que permitan el crecimiento y la distribución celular uniforme en toda la estructura. Además, los andamios también deben exhibir una microporosidad adecuada, para que facilite la neovascularización²⁶ del *scaffold* desde el entorno del tejido. La porosidad y la interconectividad también son importantes para una difusión apropiada de nutrientes, el transporte de metabolitos de bajo peso molecular, gases y otras macromoléculas; y para la eliminación de productos de desechos metabólicos resultantes de la actividad de las células que crecen en el andamio. Esto es de particular importancia con respecto a la ingeniería del tejido óseo porque, debido a las características metabólicas óseas, se espera que ocurran altas tasas de transferencia de masa, incluso bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Sin embargo, el grado de porosidad siempre influye en otras cualidades de los andamios, como su estabilidad y propiedades mecánicas, por lo que, su valor, siempre debe equilibrarse con las necesidades mecánicas del tejido en particular que se va a reemplazar, evitando el uso de matrices muy porosas en áreas que son muy exigentes desde el punto de vista mecánico [Salgado *et al.* 2004; Alvarez Barreto, J. F. 2009; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015]. Por ejemplo, el hueso esponjoso tiene un 75% -85% de porosidad y 300 a 600 μm

²⁶ **Neovascularización:** Crecimiento y desarrollo de capilares y vasos sanguíneos nuevos.

de tamaño de diámetro promedio de poro; comparado con el hueso cortical, que tiene una porosidad del 5% al 10% con poros de 10 a 50 μm de diámetro [Chen, P. Y. & McKittrick, 2011; Beladi, F. *et al.* 2017].

II.3.4.3. Estudio de hinchamiento

La **Figura II.4.A** muestra el porcentaje de *swelling* o hinchamiento de las matrices PEC y PEC-US en PBS a pH 7,4 y 37 °C en función del tiempo. Se puede observar que el comportamiento de ambas muestras es similar: el porcentaje de hinchamiento aumenta rápidamente en un corto período de tiempo, inicialmente en forma lineal y luego se vuelve constante, alcanzando el equilibrio dentro de los 3 minutos para PEC y a 1 minuto para PEC-US, durante el tiempo final analizado (10 minutos). Sin embargo, el porcentaje de *swelling* máximo alcanzado fue muy diferente para las dos matrices estudiadas; llegando a 2066% y 638%, para PEC y PEC-US, respectivamente; resultados que se encuentran dentro de los valores típicos reportados para hidrogeles [Pasparakis & Bouropoulos, 2006; Costa-Júnior, E. S. *et al.* 2009; Chang, C. *et al.* 2010; Doulabi, A. H. *et al.* 2013]. Este resultado demuestra que la capacidad de hinchamiento del *scaffold* se ve fuertemente afectada por el proceso bajo el cual se obtiene y sugiere que la interacción covalente originada durante la compatibilización por ultrasonido en PEC-US podría ser responsable de este efecto, adjudicando la diferencia entre las matrices a una red más rígida que se ha producido formada por las reacciones entre los polímeros, lo que reduce la flexibilidad y es desfavorable para la tasa de hinchamiento.

Los hidrogeles están compuestos por redes de polímeros tridimensionales que pueden absorber grandes cantidades de agua. Cuando un polímero sólido se pone en contacto con un líquido este difunde en el polímero, causando que se hinche. La difusión implica la migración de agua a espacios preexistentes o formados dinámicamente entre las cadenas del hidrogel. En consecuencia, son materiales suaves, flexibles y húmedos con una amplia gama de aplicaciones biomédicas potenciales. Los hidrogeles se utilizan ampliamente en las bioaplicaciones y desempeñan un papel crucial en las estrategias actuales para remediar las disfunciones y lesiones en los sistemas vivos. El alto contenido de agua de los hidrogeles los hace compatibles con la mayoría de los tejidos vivos y su naturaleza viscoelástica minimiza el daño al tejido circundante cuando se implanta en el huésped. El comportamiento de hinchamiento se puede modelar ajustando la concentración y la naturaleza de los componentes utilizados durante el proceso de fabricación. Sin embargo, el número de aplicaciones de hidrogeles de Qo es limitado debido a la débil resistencia mecánica y la disolución descontrolada [Kim, S. J. *et al.* 2004; Dash, M. *et al.* 2011].

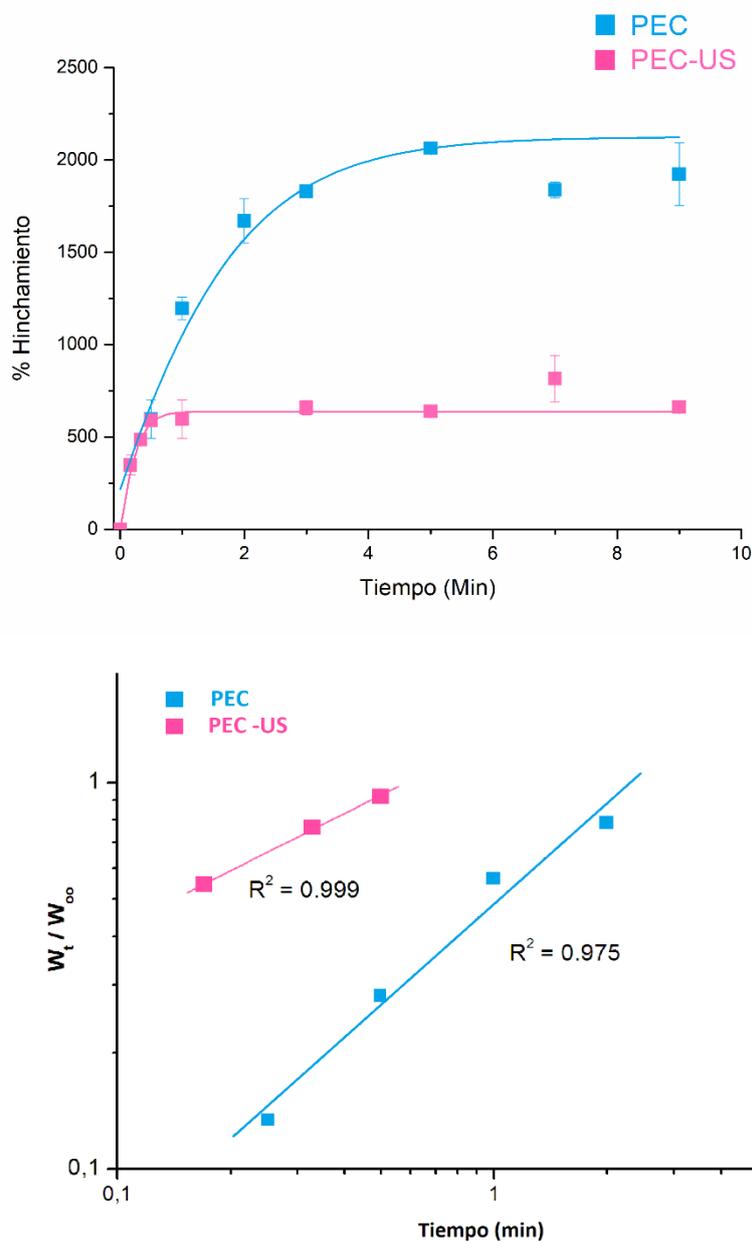


Figura. II.4: A) Cinética de hinchamiento para las matrices PEC y PEC-US. **B)** Gráfico $\log (W_t / W_\infty)$ versus $\log t$ a partir de los datos experimentales obtenidos en la etapa inicial de la figura II.4.A, para PEC y PEC-US.

El mecanismo de hinchamiento del hidrogel se puede interpretar a través de los dos procesos, la velocidad de difusión controlada por gradiente de concentración y la velocidad de hinchamiento controlada por la relajación de las cadenas poliméricas; ambos contribuyen a la velocidad y el grado de absorción del agua en el polímero [Kim,

S. J. *et al.* 2004]. Como se mencionó anteriormente, para determinar el exponente n , la cinética de dicho proceso podría analizarse a través del modelo de Fick (**Ecuación II.4**, de la Sección II.2.5.3. de *Materiales y Métodos*) [Ritger *et al.* 1987]. Por lo tanto, a partir de la pendiente inicial de una gráfica en escala logarítmica en función del tiempo [$\log (W_t / W_\infty)$ versus $\log t$] (**Figura II.4.B**) se permite estimar los valores de n para PEC-US y PEC, siendo estos 0,49 y 0,87, respectivamente. Estos resultados sugieren que en el primer andamio (PEC-US) el mecanismo de transporte de agua está controlado mediante un proceso de difusión tipo Fickiano, mientras que en el andamio PEC, la velocidad de transporte de agua responde a un proceso no Fickiano, que depende de la relajación de las cadenas poliméricas. Estos resultados están de acuerdo con los presentados por Kim [Kim, S. J. *et al.* 2004] para los hidrogeles de complejos polielectrolitos compuestos de Qo y ácido hialurónico; y por Gierszewska-Drużyńska [Gierszewska-Drużyńska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. 2012] para las membranas de Qo-alginato.

II.3.4.4. Estudios de degradación

Se ha comprobado que, independientemente de las circunstancias, cada polímero se degrada, en una cierta escala de tiempo dependiendo de las condiciones ambientales. Sin embargo, se necesita una definición precisa de esta característica para obtener una descripción útil de la degradación del polímero. En particular, en el caso de los hidrogeles, el contenido de agua, así como también la forma y el estado de la superficie del material, aparte de su microestructura afectan la velocidad de degradación.

Con el fin de evaluar la integridad estructural y la posible degradación de las matrices PEC y PEC-US, ambos tipos de muestras se sumergieron en PBS (pH 7,4) a 37°C durante siete días. Luego de este período de incubación, se extrajo el PBS y las muestras se secaron por liofilización hasta alcanzar peso constante. El porcentaje de pérdida de peso fue de $52,8 \pm 4,3\%$ y $24,6 \pm 3,9\%$ para PEC y PEC-US, respectivamente (**Figura II.5**). Este resultado muestra que la matriz PEC-US tiene una mayor estabilidad estructural que la matriz PEC, debido a la mejor compatibilidad entre los dos polielectrolitos sometidos al proceso de ultrasonido. Resultados similares fueron reportados en trabajos previos [Tamburaci, S. *et al.* 2018].

Las propiedades de degradación dependen en gran medida de los materiales del andamio, y la adaptación de la degradación del andamio *in vivo* se puede obtener mediante el ajuste de las propiedades de los materiales [Saravanan, S. *et al.* 2016]. El Qo, por su parte, presenta un proceso de degradación ampliamente estudiado en diversas condiciones [Kim, I. *et al.* 2008; Croisier & Jérôme 2013; Levengood & Zhang 2014]. Para explicar la biodegradabilidad del Qo, es importante recordar que no solo es

un polímero que contiene grupos amino, sino también un polisacárido, que en consecuencia contiene enlaces glicosídicos lábiles. El Qo es degradado *in vivo* por varias proteasas, y principalmente por la lisozima. Hasta ahora, se han identificado ocho quitinasas humanas, tres de ellas con actividad enzimática sobre el Qo [Funkhouser & Aronson, 2007; Dash, M. *et al.* 2011]. La biodegradación del Qo conduce a la formación de oligosacáridos no tóxicos de longitud variable (amino azúcares), que pueden incorporarse en las vías metabólicas o excretarse. La velocidad de degradación del Qo está relacionada principalmente con su grado de desacetilación, el grado de cristalinidad, con la distribución de residuos de glucosamina y con su masa molecular [Croisier & Jérôme, 2013; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015; Saravanan, S. *et al.* 2016].

La carboximetilcelulosa (CMC) es un derivado de celulosa soluble en agua que es degradable por la celulasa. Aunque esta enzima no es sintetizada por células de mamíferos, la celulasa y los fragmentos derivados de la degradación de CMC son biocompatibles [Reeves, R. *et al.* 2010].

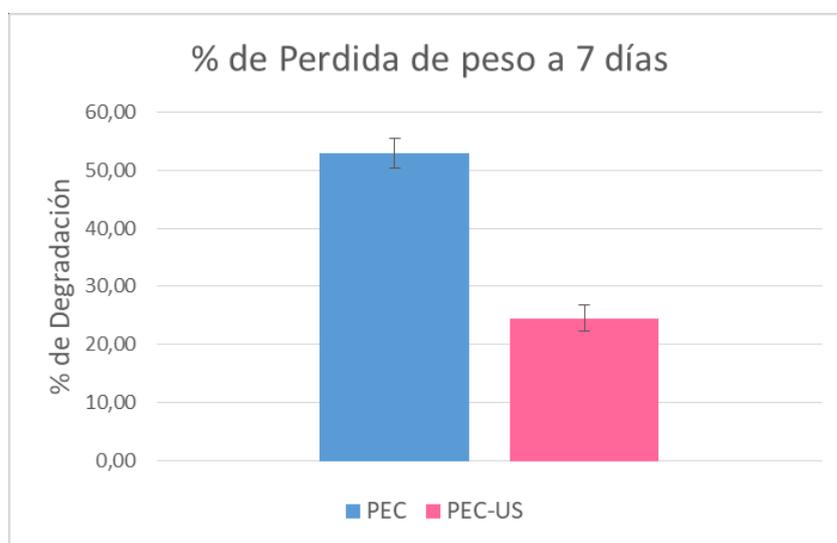


Figura II.5: Porcentaje de degradación de las matrices PEC y PEC-US expresado como porcentaje de pérdida de peso a 7 días, en PBS a 37°C.

Las propiedades mecánicas también están estrechamente relacionadas con la degradación del *scaffold*, donde idealmente, la tasa de degradación debe ser a una velocidad controlada de modo que mientras el tejido se regenera, las cargas que se producen sobre el tejido puedan ser soportadas por la matriz y a su vez esta se pueda ir reemplazando por tejido nuevo [Levengood & Zhang 2014]. La tasa de degradación “ideal” para un *scaffold* varía en función de la zona donde se quiere aplicar el mismo; por ejemplo, para defectos óseos en la región espinal debe ser de 9 meses o más;

mientras que para aplicaciones cráneo-maxilofaciales de 3 a 6 meses [Bose *et al.* 2012]. Sin embargo existen otros factores de morbilidad asociada que pueden requerir tiempos de degradación más prolongados, entre ellos la edad y condición fisiopatológica previa del paciente.

II.3.4.5. Pruebas mecánicas

Las propiedades mecánicas adecuadas que poseen los andamios deciden su lugar de aplicación, incluso en sitios con o sin carga. Las propiedades mecánicas de los andamios deben coincidir con el hueso huésped para una transferencia de carga adecuada a los tejidos adyacentes [Costa-Pinto, A. R. *et al.* 2011; Saravanan, S. *et al.* 2016]. Teniendo en cuenta las propiedades mecánicas apropiadas, podemos afirmar que las membranas de Qo tienen una desventaja cuando se usan en ingeniería de tejidos porque estas membranas son muy rígidas y quebradizas; es decir, tienen baja resistencia mecánica, inferiores a las de los huesos normales [Lizarbe, M. A. 2007; Costa-Júnior, E. S. *et al.* 2009; Doulabi, A. H. *et al.* 2013; Lee, J. S. *et al.* 2014; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015]. Por su parte, la CMC tiene pobres propiedades mecánicas y es necesaria su combinación con otro polímero natural o sintético para proporcionar una arquitectura 3D [Beladi, F. *et al.* 2017].

En vista de sus futuras aplicaciones biomédicas, las características mecánicas de las matrices son una propiedad relevante en la interacción *in vivo* con las células y/o tejidos. Así, con el propósito de evaluar las propiedades mecánicas de los *scaffolds*, se realizaron ensayos de compresión, evaluando la resistencia a la compresión (CS) y el módulo elástico (EM) para las matrices PEC y PEC-US. La **Figura II.6** muestra que las matrices basadas en PEC-US presentaron una mayor resistencia a la compresión y módulo elástico que las obtenidas a partir de PEC. Los valores obtenidos muestran una diferencia en un orden de magnitud para ambos parámetros: $155,7 \pm 44,1$ kPa y 493 ± 117 kPa frente a $27,5 \pm 1,7$ kPa y 42 ± 5 kPa para CS y EM, respectivamente). Estos resultados son consistentes con la morfología de los andamios observados por SEM. La resistencia de los andamios aumenta cuando el diámetro de los poros disminuye y la distribución de los poros es más homogénea, como se obtiene para el andamio basado en PEC-US. Se reportó previamente un valor de resistencia a la compresión similar para otros andamios CMC/Qo (76 a 654 kPa) [Tamburaci, S. *et al.* 2018] y para otros materiales PEC basados en quitosano puro ($4 \pm 0,12$ kPa); alginato /quitosano ($34,5 \pm 5,4$ kPa) [Ceccaldi, C. *et al.* 2014] y quitosano/ gelatina ($3 \pm 0,4$ kPa) [Yin, Y. J. *et al.* 1999].

El andamio debe proporcionar a las células una estructura tridimensional y un soporte mecánico apropiado para su adhesión y proliferación, permitiendo el crecimiento y proliferación en una estructura funcional biomimética adecuada [Little, C. J. *et al.* 2011]. En particular, los biomateriales aplicados a la reparación del tejido óseo-

cartilaginoso deben tener propiedades mecánicas similares a este tipo de tejido. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el andamio PEC-US exhibió un módulo elástico que es apropiado para ser utilizado en esta área.

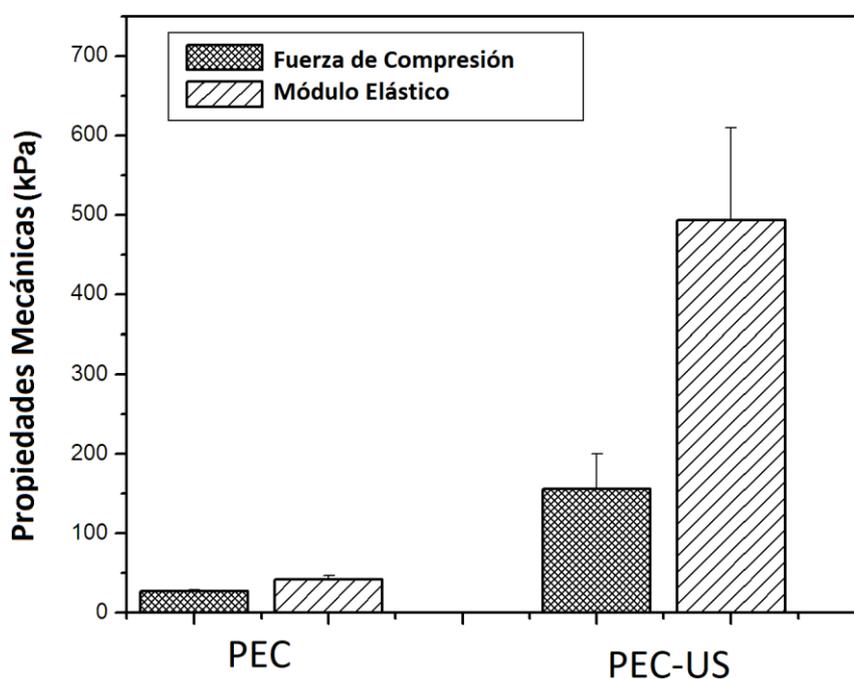


Figura II.6: Fuerza de Compresión y Módulo Elástico de las matrices PEC y PEC-US. Los resultados presentados son los valores promedio obtenidos de 5 ensayos independientes.

Como se mencionó en la introducción general, el tejido óseo se organiza en hueso esponjoso (alrededor del 20% del esqueleto total) y hueso cortical o compacto (alrededor del 80% del esqueleto total). Las proporciones de estas dos formas arquitectónicas difieren en varias ubicaciones en el esqueleto. El hueso cortical es casi sólido, con un 10% de porosidad, en el otro extremo, el hueso trabecular presenta una porosidad entre el 50 al 90%, lo que hace que su módulo y su máxima resistencia a la compresión sean aproximadamente 20 veces inferiores a la del hueso cortical [Salgado *et al.* 2004].

In vitro, los andamios deben tener suficiente resistencia mecánica para soportar las presiones hidrostáticas y para mantener los espacios necesarios para el crecimiento celular y la producción de matriz [Leong, K. F. *et al.* 2003]. *In vivo*, y debido a que el hueso está siempre bajo estrés continuo y remodelamiento, las propiedades mecánicas de la construcción implantada deberían coincidir idealmente con las de los huesos, de

modo que sea posible una movilización temprana del sitio lesionado. Además, la velocidad de degradación de los andamios debe ajustarse de manera adecuada con la tasa de crecimiento del tejido nuevo, de tal manera que cuando el sitio de la lesión esté totalmente regenerado, el andamio se halla degradado totalmente [Salgado *et al.* 2004].

II.3.5 Ensayos biológicos

Como se indicó previamente, una propiedad fundamental de un biomaterial que será empleado como *scaffold* en ingeniería de tejidos es la biocompatibilidad; es decir, que soporte la actividad celular normal sin inducir una respuesta inflamatoria o inmune inadecuada [Williams, D. F. 2008]. Los cultivos celulares *in vitro* son modelos ideales, y son el primer paso antes de los estudios *in vivo*, para la observación y el análisis de las interacciones células-*scaffold* y la influencia de los materiales en el comportamiento celular respecto a su biocompatibilidad y citotoxicidad. Representa un sistema relativamente sencillo y controlado, que permite evaluar la respuesta biológica, mediante el análisis y la observación de las interacciones y/o señales e influencias con un determinado material para adecuarlo a requerimientos de crecimiento y diferenciación celular *in vitro*, con el mantenimiento de un fenotipo y función celular deseados, analizando su biocompatibilidad y posible citotoxicidad [Thompson *et al.* 2015].

Para estos estudios algunos investigadores emplean cultivos de células madres o directamente cultivos celulares propios del tejido que se quiere reparar [Costa-Pinto, A. R. *et al.* 2011; Levenson & Zhang 2014]. Por otro lado, para estudiar la posible citotoxicidad de los biomateriales un buen modelo celular son los macrófagos; estas células son los actores principales del sistema inmune que van a reaccionar frente a cuerpos extraños, aumentando marcadamente los niveles de citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina-1 β (IL1 β) y factor de necrosis tumoral (TNF α), así como la producción de óxido nítrico (NO) [Fernandez *et al.* 2014]. Se ha cultivado con éxito un gran número de células en matrices de Qo 2D y 3D que prevén terapias regenerativas basadas en células, entre ellas queratinocitos, condrocitos, osteoblastos, hepatocitos y células de Schwann [Oliveira, S. M. *et al.* 2008; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015; Zhang, J. *et al.* 2016].

II.3.5.1 Ensayo de morfología y crecimiento de células MC3T3-E1 preosteoblásticas

La evaluación biológica incluye la prueba de células en cultivo *in vitro* (MC-3T3) también reportada en trabajos anteriores [Kong, L. *et al.* 2005; Lee, J. S. *et al.* 2014; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015; Yamaguchi, K. *et al.* 2016]. Cuando las monocapas de células MC3T3-E1 llegaron a un 70% de confluencia, se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos que contenían membranas PEC y PEC-US. Luego de 72hs en estufa de cultivo a 37°C, se extrajo el medio de cultivo de cada set de matrices y se colorearon con Giemsa. Se observaron al microscopio invertido y se fotografiaron (**Figura II.7**). Puede verse que las células presentan una forma redondeada sobre los dos tipos de *scaffolds* analizados. Se evaluó el número de células/ campo, en 7 campos representativos, con un aumento de 10X. Se encontró que en las matrices PEC-US había 36 ± 2 células/ campo, siendo este un valor similar a las células que crecieron sobre las matrices PEC (35 ± 4 células/ campo), es decir que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones. Estos resultados sugieren que las células interactúan igualmente con las matrices de PEC, independientemente del tratamiento de sonicación.

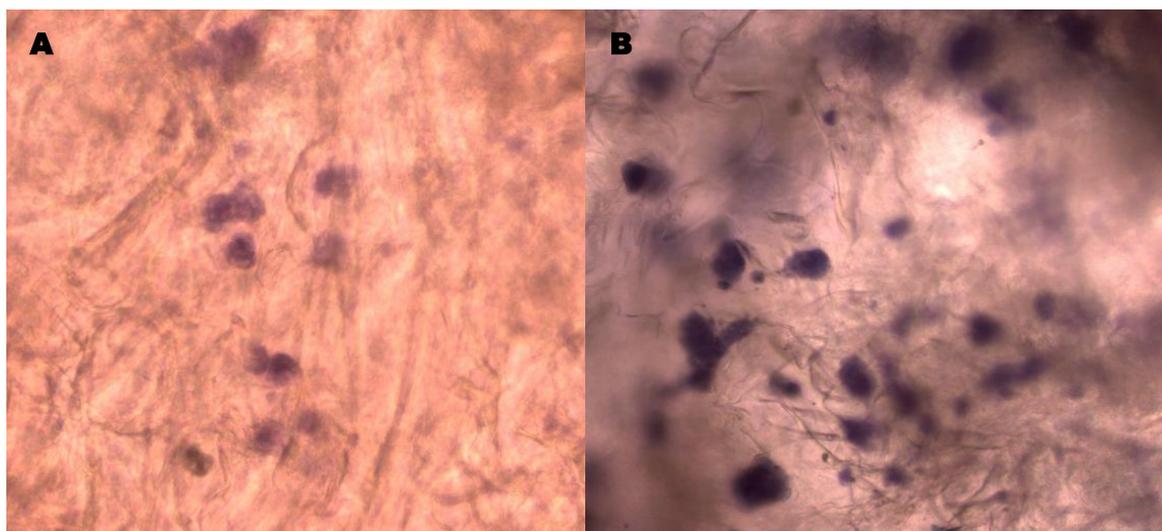


Figura II.7.: Fotografías representativas de células MC3T3-E1 cultivadas sobre matrices PEC (A) y PEC-US (B), durante 72hs. Objetivo 10X.

II.3.5.2 Cultivos de macrófagos murinos RAW264.7

Los macrófagos actúan durante la inflamación de la cicatrización de heridas y contra las infecciones bacterianas, y por lo tanto representan un buen modelo para investigar la citotoxicidad. Para investigar si las matrices podrían generar algún efecto citotóxico se utilizaron cultivos de macrófagos RAW 264.7. La **Figura II.8** muestra la presencia de macrófagos no sólo en la superficie, sino también inmersos en la red polimérica de las matrices PEC y PEC-US (**Fig. II.8 A y B**) independientemente del procedimiento de compatibilización. Luego de 72 horas de cultivo, las células mostraban un aspecto redondeado sin extensiones o procesos citoplasmáticos, sugiriendo que no habría un proceso de activación *in vitro*.

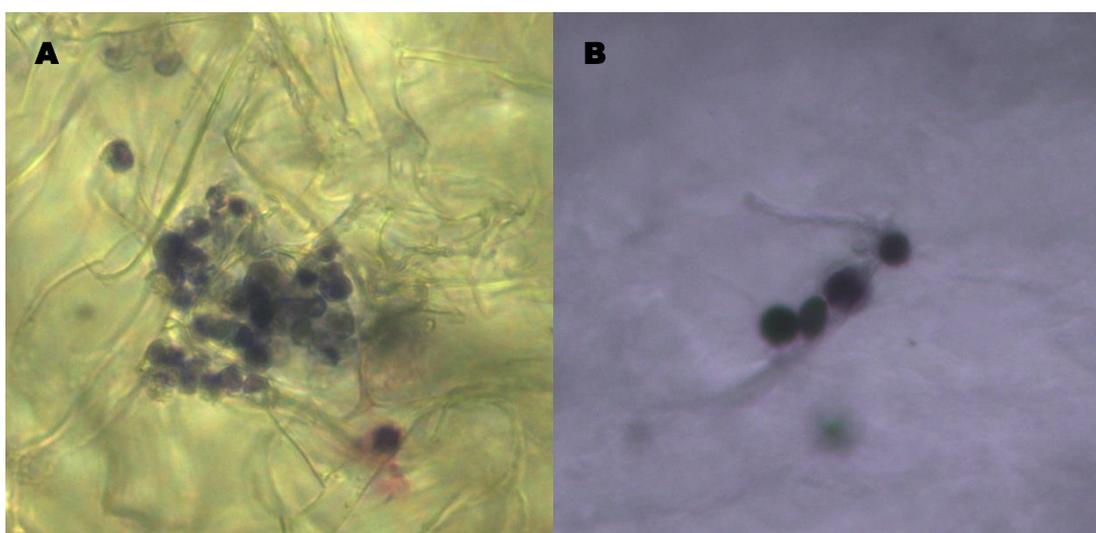


Figura II.8: Morfología de células RAW 264.7 fotografiadas con un aumento de 100X. Células teñidas con Giemsa luego de 72hs de cultivo sobre matrices PEC (A) y PEC-US (B).

II.3.5.2.1 Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular sobre las matrices PEC y PEC-US se estudió la cinética de crecimiento de células RAW 264.7, sembradas sobre los *scaffold* y cultivadas por 72hs, por medio del método de MTT. Este ensayo representa la actividad mitocondrial (enzimática) presentes en una célula viva capaz de reducir el MTT. Las pruebas de citotoxicidad que utilizan cultivos celulares han sido aceptadas como el primer paso para identificar compuestos activos y para pruebas de bioseguridad [Berger, J. *et al.* 2004; Costa-Júnior, E. S. *et al.* 2009]. Se expresaron los datos obtenidos como porcentaje respecto del basal (cantidad de células crecidas sobre la superficie de plástico

control). En la **Figura II. 9** puede observarse que no hubo diferencias significativas en la proliferación celular tanto sobre las matrices PEC como sobre las matrices PEC-US, siendo ambos valores comparables con la condición control, mostrándose biocompatibles en todas las condiciones.

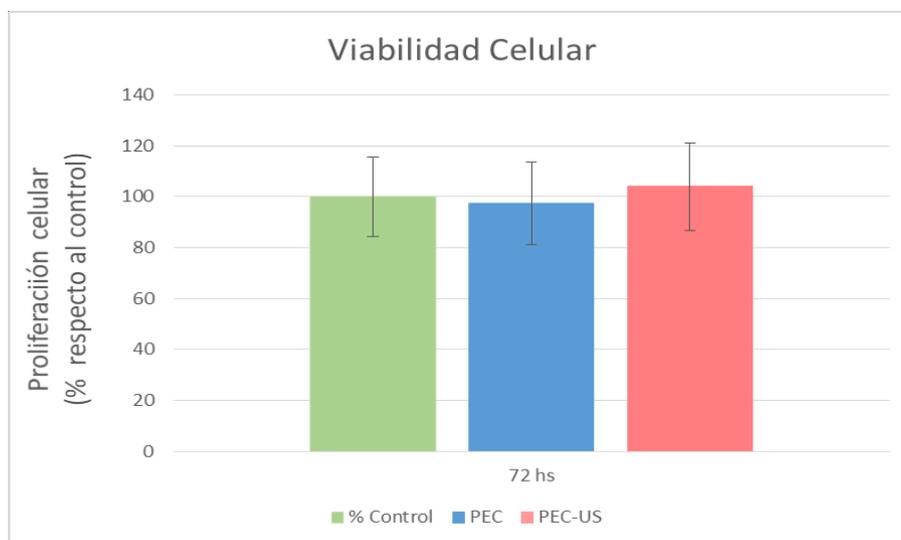


Figura II.9: Proliferación celular de macrófagos *RAW 264.7*, determinado por el ensayo MTT a 72hs, en matrices control, PEC y PEC-US.

II.3.5.2.2 Producción de NO:

Se evaluó la posible citotoxicidad mediante la liberación de óxido nítrico (NO) al medio, empleando el modelo de macrófagos murinos *RAW 264.7*, luego de 72hs de cultivo. La **Tabla II.1** muestra que la producción de NO fue similar tanto cuando las células fueron cultivadas en plástico (en las placas de cultivo control) como cuando fueron cultivadas en las matrices PEC o PEC-US, no encontrando diferencias significativas bajo las diferentes condiciones experimentales.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que ninguno de los *scaffolds*, PEC o PEC-US, ejercen citotoxicidad *in vitro* sobre los macrófagos *RAW 264.7*.

Tabla II.1: Óxido nítrico (NO) producido por macrófagos RAW 264.7 cultivados en placas de cultivo estándar (control), y en matrices PEC y PEC-US. Los resultados se expresan como el promedio de NO (nmol/ml) \pm SEM para n=4

Muestra	NO[nmol/ml]
Control Plástico	3,83 \pm 0,60
PEC	3,73 \pm 0,62
PEC-US	3,98 \pm 0,66

Como se ha comentado previamente, el Qo se considera un polímero no tóxico y biológicamente compatible [Aranaz, I. *et al.* 2009]. Está aprobado para aplicaciones dietéticas en Japón, Italia y Finlandia; y ha sido aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso en vendajes para heridas [Wedmore, I. *et al.* 2006; Croisier & Jérôme, 2013]. Sin embargo, ciertas modificaciones implementadas en el Qo podrían hacerlo más o menos tóxico y cualquier reactivo residual debe eliminarse con cuidado [Dash, M. *et al.* 2011].

Las pruebas clínicas realizadas con biomateriales a base de Qo no informan reacciones inflamatorias o alérgicas después de la implantación, inyección, aplicación tópica o ingestión en el cuerpo humano [Chatelet, C. *et al.* 2001; Dash, M. *et al.* 2011; Rodríguez-Vázquez, M. *et al.* 2015].

II.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este trabajo se logró desarrollar un biomaterial basado en hidrogeles de polisacáridos de origen natural, quitosano y carboximetilcelulosa; con aplicación de ultrasonido durante su síntesis.

Se analizó la degradación ultrasónica de la solución de quitosano y de la solución de carboximetilcelulosa, indicando que ambos polisacáridos exhibieron un comportamiento similar en solución con una conformación de ovillo expandido en un buen solvente; y se determinó que el tiempo óptimo para compatibilizar la mezcla de ambos polisacáridos fue de 20 minutos.

Se caracterizó la morfología de las matrices obtenidas PEC y PEC-US mediante SEM. El análisis de las imágenes de SEM y el método espectroscópico FTIR demostraron que el andamio obtenido aplicando ultrasonido durante su preparación presentaba una distribución de tamaño de poro y superficie más homogénea, en comparación con los obtenidos sin ultrasonido. Este resultado indicó que se logró un enlace covalente entre los dos polisacáridos.

La cinética de hinchamiento se estudió e interpretó en función de las diferencias estructurales, encontrándose mecanismos distintos entre los dos tipos de andamios. PEC-US exhibió un mecanismo de transporte de agua difusivo, mientras que el comportamiento de hinchamiento de PEC es un proceso de difusión no Fickiano, controlado por la relajación de las cadenas de polímero.

Además, se evaluó la posible citotoxicidad *in vitro* de los andamios utilizando cultivos de macrófagos RAW 264.7. Este ensayo no mostró evidencia de citotoxicidad, lo que sugiere que los biomateriales PEC obtenidos en condiciones de ultrasonido podrían ser útiles en el campo de la ingeniería de tejidos óseo-cartilaginoso.

Los resultados obtenidos demuestran que el ultrasonido es una metodología muy eficiente para compatibilizar complejos polielectrolitos, exhibiendo propiedades mejoradas en comparación con la simple mezcla de los dos polisacáridos. La aplicación de esta técnica no parece influir en las propiedades de biocompatibilidad del *scaffold* obtenido.

CAPÍTULO III

Refuerzo nano-cerámico de matrices poliméricas



III.1 INTRODUCCIÓN

III.1.1 Cerámicos

Los cerámicos son compuestos inorgánicos, no metálicos que presentan estructura cristalina. Los más utilizadas en el campo de la ingeniería biomédica y la sustitución / regeneración ósea son las apatitas, siendo la más conocida la hidroxiapatita (HAp), cuya fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, fosfato tricálcico (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y alúmina (Al_2O_3). Las apatitas pueden ser de origen natural (por ejemplo: Hidroxiapatita coralina) o sintéticos (obtenida por vía química); 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 Na^+ , Sr^{2+} o aniones como Cl^- o CO_3^- que interfieran en la estructura cristalina de la apatita [Salgado *et al.* 2004]. El TCP es un biocerámico bioabsorbible, ya que el organismo es capaz de metabolizarlo y degradarlo en compuestos que pueden ser absorbidos, o bien desechados por completo. Su tasa de bioabsorción depende sobre todo del estado cristalino; por ejemplo la tasa de degradación de α -TCP (la forma polimórfica de alta temperatura del TCP) es mayor que la de β -TCP (forma polimórfica de baja temperatura del TCP, estable a temperatura ambiente). Debido a factores que ocurren *in vivo*, como la actividad osteoclástica, las tasas de degradación / disolución de estas cerámicas son difíciles de predecir. Esto podría presentar un problema porque si se degrada demasiado rápido comprometerá la estabilidad mecánica del *scaffold*, que es baja por sí misma. Al mismo tiempo, esto aumentaría dramáticamente las concentraciones de PO_4^{3-} y Ca^{+2} extracelular local, que eventualmente pueden causar la muerte celular, como lo demuestran diversos autores [Adams, C. S. *et al.* 2001; Jones *et al.* 2003; Khan *et al.* 2008; Salgado *et al.* 2004; Rezwan *et al.* 2006, Vallet-Regi 2003]. La alúmina es muy estable ya que no reacciona con el ambiente tisular y por lo tanto presenta gran estabilidad química. Así, ordenados en velocidad de disolución creciente se obtiene el siguiente orden:

HAp cristalina \ll β -TCP \ll α -TCP \ll HAp amorfo.

A pesar de mostrar una buena resistencia a la compresión, las cerámicas son frágiles y poseen una baja resistencia a la tracción, tensión o fractura respecto del hueso, por lo que no pueden ser usadas en sitios donde se manifiestan altos valores de estrés por torsión, flexión o esfuerzo [Salgado *et al.* 2004]. Por estas razones su uso se limita a ciertas aplicaciones como a la odontología, utilizándolas en cirugía dental o en la reconstrucción cráneo-maxilofacial; y en ortopédica para rellenar defectos óseos y recubrir superficies metálicas de implantes, para mejorar la integración de la prótesis con el hueso del huésped, como la fusión espinal, el tratamiento de fracturas y la cirugía

de revisión²⁷ [Lee, J. S. *et al.* 2014]. Varios trabajos [Grynpas, M. D. *et al.* 2002; Salgado *et al.* 2004; Beladi, F. *et al.* 2017] han demostrado que al usar cerámicas con o sin el agregado de células, se podrían obtener buenos resultados con respecto a la regeneración ósea.

Los polímeros biodegradables se han utilizado como aglutinantes para HAp y TCP, con el fin de superar los problemas de fragilidad y la dificultad de dar forma a los materiales cerámicos duros, y para adaptarse a los defectos óseos. La adición de polímeros biodegradables como poli (ácido glicólico), poli (ácido láctico) y poli (D, L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) a las cerámicas de fosfato de calcio permitiría una mejor manipulación y control tanto sobre la macroestructura como sobre la microestructura, en la conformación de materiales compuestos para su aplicación a los defectos óseos. Al mismo tiempo, se ha demostrado que el refuerzo de polímeros con biocerámicos mejora las propiedades mecánicas y la osteoconductividad [Rizzi 2001]. Los compuestos de polímero / biocerámico biodegradables son, por lo tanto, materiales prometedores para el reemplazo de injertos óseos y, como tales, se han investigado intensamente en la última década [Rizzi 2001, Kim *et al.* 2006; Manjubala, I. *et al.* 2018].

El objetivo es encontrar un material que pueda modelarse y simular las propiedades mecánicas y biológicas del hueso, por ello los biocerámicos de fosfato de calcio, como la HAp y el TCP, al tener una similitud química y estructural con la fase mineral del hueso nativo, poseen gran biocompatibilidad. De hecho, el tejido óseo es un compuesto de cristales aciculares de apatita que miden unos 40 nm de largo y 1,5-3 nm de ancho [Welsch & Sobotta 2008]. Los cristales de nano-hidroxiapatita (nHAp) se encuentran inmersos en una matriz proteica de colágeno (tipo I) y de proteínas no colágenas (proteoglicanos, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, sialoproteínas, fibronectina, trombospondina, vitronectina y factores de crecimiento). Las interacciones de las células osteogénicas con los biocerámicos son importantes para la regeneración ósea. Se sabe que las cerámicas bioactivas mejoran la diferenciación así como el crecimiento de los osteoblastos [Ambrosio *et al.* 2001, Kim *et al.* 2006].

III.1.2 Hidroxiapatita

Debido a las propiedades interesantes de la hidroxiapatita, como se mencionó anteriormente, el hecho de ser un biomaterial osteoconductor, osteoinductivo, osteogénico y su capacidad de unión ósea [LeGeros, R. Z. 2002; Rodríguez-Vázquez, M.

²⁷ Una cirugía de revisión consiste en un intercambio de los componentes desgastados de una prótesis por componentes nuevos.

et al. 2015; Beladi, F. *et al.* 2017; Manjubala, I. *et al.* 2018], se ha considerado para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo.

Micro-HAp (mHAp) y nano-HAp (nHAp) pueden fabricarse sintéticamente [Bezzi, G. *et al.* 2003] o aislarse de fuentes naturales [Cortizo, M. S. *et al.* 2008; Berghoff, C. F. 2011]. Se han utilizado diferentes tipos de métodos para obtener HAp a partir de hueso natural, como la calcinación térmica, la hidrólisis alcalina y el método de agua subcrítica. El método de calcinación térmica generalmente produce mHAp [Lee, J. S. *et al.* 2014].

La HAp se ha aplicado ampliamente para crear andamios compuestos para la regeneración del tejido óseo, utilizada clínicamente solo como material bioactivo en forma de polvo, estructura porosa o cuerpo denso [Wang, M. 2003; Salgado *et al.* 2004; Beladi, F. *et al.* 2017]. Estudios anteriores han indicado que la HAp, cuando se combina con polímeros naturales, forma plantillas adecuadas para que las células crezcan y proliferen en ellas. El colágeno, el Qo, la gelatina y la celulosa son polímeros naturales utilizados con HAp para la aplicación de la regeneración ósea [Zhou & Wu 2011; Yamaguchi, K. *et al.* 2016; Beladi, F. *et al.* 2017; Manjubala, I. *et al.* 2018]. Sin embargo, estos materiales tienen algunos inconvenientes importantes y sus aplicaciones clínicas han sido limitadas debido a que su inclusión en los andamios poliméricos aumenta su fragilidad y presentan una baja estabilidad mecánica y el hueso nuevo formado en una red de HAp porosa no puede sostener la carga mecánica necesaria para la remodelación [Kim *et al.* 2007; Wang 2003; Salgado *et al.* 2004], lo que impide su uso en la regeneración de grandes defectos óseos. Además, dificulta y limita el modelado de los andamios poliméricos; y disminuye la tasa de degradación, haciéndola en algunos casos extremadamente lenta.

III.1.3. Bionanocompuestos

Los materiales denominados bionanocompuestos parecen muy prometedores para usos en matrices de polímeros reforzadas con un nanomaterial. Por ejemplo, bionanocompuestos formados por ácido poliláctico (PLA) y nanohidroxiapatita (nHAp) permiten emular la naturaleza del hueso combinando la tenacidad de la fase polimérica la alta resistencia a la compresión de la HAp, generando un material bioactivo con propiedades mecánicas mejoradas y amplio rango de degradación [Ferraz *et al.* 2004, Armentano *et al.* 2010]. Otro de los desarrollos son los nanocompuestos de Policaprolactona (PCL)/nHAp o gelatina/nHAp donde se combina la osteoconductividad y la biocompatibilidad de la HAp con las propiedades de la PCL y la gelatina [Okamoto & John 2013]. Bionanocompuestos poliméricos también se han reforzado con nanopartículas de metales (oro, plata, platino, entre otros) para diferentes aplicaciones biomédicas tales como microscopía electrónica (preparación de muestras), liberación

de drogas (vehículo para entrega de drogas, proteínas, péptidos, plásmidos, etc.), efecto antimicrobiano, detección, diagnóstico y terapia [Gansel *et al.* 2009]. Sin embargo, las propiedades biológicas de nanopartículas metálicas son aún un campo de estudio e investigación. Materiales compuestos con nanoestructuras de carbono también tienen amplia aplicación biomédica, especialmente reforzando matrices de polímeros, con una potencial aplicación en el refuerzo estructural de andamios biomédicos o para ingeniería de tejidos [Harrison & Atala 2007, Vasco *et al.* 2016].

Los compuestos de Qo / nHAp han sido más relevantes para la ingeniería de tejidos, debido a su capacidad para aumentar la adhesión celular, inducir una buena respuesta proliferativa en los osteoblastos, la resistencia mecánica, la actividad de la fosfatasa alcalina, la adsorción de proteínas, la producción de colágeno tipo I y la expresión de otros marcadores de diferenciación osteogénicos. Entre otros casos exitosos publicados, en un defecto tibial de un conejo se mostró una buena regeneración ósea, a las 8 semanas, observada mediante tomografía microcomputarizada [Lee, J. S. *et al.* 2014]

Por lo tanto, el objetivo de esta parte del trabajo de tesis fue obtener un nuevo compuesto degradable, que combine nHAp con un complejo polielectrolito (PEC) obtenido a partir de quitosano (Qo - polielectrolito catiónico) y carboximetilcelulosa (CMC - polielectrolito aniónico), utilizando la metodología de ultrasonido (US) descrita en el *Capítulo II*, para su compatibilización. Además, se espera comprobar si el contenido de nHAp ejercería un efecto sobre las propiedades del nanoreforzamiento cerámico.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1. Reactivos y drogas

Los polímeros utilizados para obtener las matrices fueron Quitosano (Qo) de medio peso molecular y Carboximetilcelulosa (CMC), adquiridos en Sigma-Aldrich Argentina.

La hidroxiapatita utilizada de dimensiones nanométricas (aproximadamente 200 nm), se obtuvo a partir de hueso bovino siguiendo un protocolo prediseñado en nuestros laboratorios [Fernandez *et al.* 2011].

III.2.2. Caracterización de los polímeros

Al igual que con el quitosano de alto peso molecular (*Sección II.2.2.*), se evaluó el grado de acetilación (DA) mediante FTIR [Brugnerotto *et al.* 2011]. El Qo de medio peso molecular exhibió un $M\eta = 258$ kDa. Se utilizó la misma CMC de grado farmacéutico que fue descrita en el *Capítulo II*.

III.2.3. Obtención de nano-hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAp) se obtuvo por calcinación de hueso de fémur bovino adulto. El mismo se adquirió en un matadero local y se limpió exhaustivamente para eliminar los tejidos blandos visibles en la superficie del hueso. Luego se cortó y trituró en trozos más pequeños. Las piezas se colocaron en un crisol e incineraron primero con un quemador (mechero tipo Bunsen) en triángulo de pipa, bajo campana de extracción. Cuando las piezas se convirtieron en cenizas blancas, se transportó a una mufla eléctrica (u horno eléctrico) para eliminar la materia orgánica, a 900 ° C, en condiciones de atmósfera normal, utilizando una velocidad de calentamiento de 5 ° C / min con 2 h de tiempo de mantenimiento [Ooi *et al.* 2007], dejándose enfriar luego en un desecador.

Las cenizas de HAp así obtenidas fueron trituradas en un mortero y se tamizaron utilizando un tamiz número 200, con un tamaño de poro 75 μm [*Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition*], obteniendo un tamaño de partículas más homogéneo. Posteriormente se realizó una suspensión de las mismas en cloroformo a una concentración de 0,7% p/v, la cual fue sometida a disgregación mecánica utilizando un equipo ULTRA-TURRAX - T25 (UT). El procedimiento se realizó 3 veces durante 10 minutos a 20.500 rpm, luego 3 veces durante 5 minutos a una potencia de 24.000 rpm, manteniendo la muestra en un baño de hielo, y dejando un período de 1 minuto entre cada ciclo para estabilizar la temperatura del sistema. A continuación, la mezcla (HAp-UT) se transfirió a un cristalizador y se dejó evaporar el solvente bajo campana, hasta

secarse y obtener un peso constante [Fernandez *et al.* 2011]. La muestra HAp-UT fue analizada por SEM.

Con el fin de obtener un tamaño de partícula menor, se agregó agua destilada a la muestra anterior preparando una suspensión con una concentración de 0,1 % p/v de HAp-UT y se sometió a ultrasonido (US) con un equipo HD 60 *Bandelin SONOPULS*, con una frecuencia de 20 KHz y máxima potencia (55 watts) durante 2 minutos utilizando un sonotrodo de 6 mm de diámetro (KE - 66) manteniéndolo en baño de hielo. Nuevamente el material obtenido fue secado, dejando la suspensión obtenida en una cápsula de porcelana sobre platina de calentamiento a 100°C, hasta la evaporación del agua y alcanzar peso constante. La muestra final se analizó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las imágenes obtenidas por SEM y TEM fueron procesadas utilizando el programa **Image - J 1.52a** (*Wayne Rasband National Institutes of Health, USA*), y se determinaron los respectivos tamaños promedio de partícula (*d*). Además, la nano-hidroxiapatita (nHAp) obtenida se analizó por FTIR para estudiar su estructura.

III.2.4. Obtención del biomaterial

El biomaterial aditivado con nHAp se obtuvo mediante un procedimiento similar al descrito en la *sección II.2.4*. Se preparó una solución (1 % p/v) de Qo de peso molecular medio en ácido acético (0,25 % v/v) y otra solución de CMC (1 % p/v) en agua destilada, y se llevaron ambas soluciones a pH = 5. A la solución de Qo se le agregaron distintas cantidades de nHAp (0,5 %; 1 %; 3 %; 5 %; 10 %; y 20 %) a fin de poder compararlas y elegir la concentración más adecuada. Se sometió la mezcla Qo-nHAp a 2 minutos de ultrasonido a potencia máxima utilizando un aparato *HD 60 Bandelin SONOPULS* que trabaja a una frecuencia de 20 kHz, equipado con punta plana KE - 66 de titanio. Se utilizó en esta dispersión de partículas una potencia de salida de 55 W y se ajustó la temperatura del recipiente de vidrio con camisa de refrigeración a $20,00 \pm 0,02$ °C usando un termostato *MGW Lauda RCS6*.

Se prepararon matrices mediante el goteo de la solución de CMC cargada en una jeringa de plástico estándar de 20 ml, utilizando una bomba de infusión a jeringa *ADOX ActIVA A22* (*ADOX S.A., Argentina*) para controlar el caudal, sobre la solución de Qo-nHAp, bajo agitación constante (150 rpm), durante 20 minutos, y se utilizó un aparato *HD 60 Bandelin SONOPULS* a una frecuencia de 20 kHz, equipado con punta plana TT - 12 de titanio. Con fines comparativos, se preparó una mezcla que no contenía adición de nHAp (PEC-US). Se utilizó para compatibilización de los polímeros, una potencia de salida de 37 W y se ajustó la temperatura del recipiente de vidrio con camisa de refrigeración a $20,00 \pm 0,02$ °C usando un *termostato MGW Lauda RCS6*.

Finalmente se aislaron las muestras desechando el medio sobrenadante, se vertieron en placas de 24 ó 48 pocillos, dependiendo el tamaño final que se deseara obtener y se dejó en el freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Luego las matrices se liofilizaron en un equipo de laboratorio modelo *Scientz 10N* (*Hinotek*, China), hasta alcanzar peso constante, para determinar la masa inicial antes de realizar las medidas de caracterización.

III.2.5. Caracterización fisicoquímica de las matrices

III.2.5.1. Espectroscopia ATR-FTIR

Con el objetivo de caracterizar la muestra y evaluar las interacciones entre los componentes de la matriz obtenida, se realizó una espectrometría infrarroja con transformadas de Fourier (FTIR) sobre las matrices con y sin nHAp. Se utilizó un espectrómetro *Nicolet Magna IR-560* mediante la técnica de reflexión total atenuada (ATR). Los espectros se recogieron en el rango de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 4 cm^{-1} . El análisis del espectro se efectuó a través del software *EZ-OMNIC 8.2.0.387* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Madison, WI, USA).

III.2.5.2. Microscopia SEM

A fin de estudiar la topografía superficial de las matrices aditivadas con nHAp, la superficie de las mismas fue cubierta con oro (con un metalizador *Balzers SCD 030*, por el método de *sputtering*) y su morfología de superficie fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), en un equipo *Phillips SEM 505* (*The Netherlands*), con una aceleración de voltaje de 20 kV.

III.2.5.3. Microtomografía computarizada (Micro-CT)

Para estudiar la microestructura de las matrices obtenidas con una técnica no destructiva y complementaria a la microscopía electrónica de barrido (SEM), se utilizó la microtomografía computarizada con un escáner Micro-CT de escritorio. Alternativamente, las muestras se analizaron mediante microtomografía de rayos X (*MicroCT Bruker SkyScan 1173*, Aartselaar, Bélgica). El escáner se ajustó a un voltaje de 50 kV y una corriente de 800 mA; la muestra fue escaneada por rotación ($0\text{--}180$) a una resolución de 7.55 mm del píxel. El tiempo de exposición por proyección fue de 2300 ms y no se utilizó filtro. La muestra tenía un tamaño cilíndrico de 13 mm de diámetro y 14 mm de altura y no se utilizaron agentes de contraste. La reconstrucción de la muestra en una imagen 3D se realizó utilizando el software volumétrico de reconstrucción *NRecon* de *SkyScan*. El programa utiliza un algoritmo FDK

(Feldkamp²⁸) modificado con adaptación automática a la geometría de escaneo en cada escáner micro-CT. Se cuantificaron los parámetros microestructurales de los volúmenes reconstruidos de las exploraciones de Micro-CT haciendo uso del *software CT-Analyzer*, después la binarización de las imágenes tomográficas 2D ("segmentos") para una visualización realista en 3D de los objetos escaneados. Los niveles de umbral de las imágenes en escala de grises se ajustaron por igual para todas las muestras permitiendo una medición y comparación fiables de la porosidad.

III.2.5.4. Estudio de hinchamiento

Se determinaron las propiedades de hinchamiento (*swelling*) de las matrices siguiendo el mismo procedimiento descrito en la *sección II.2.5.3.*, incubando las muestras en agua estéril (pH = 7,4) a 37 °C, midiendo el cambio en el peso de la matriz en función del tiempo de inmersión en la solución [Kim, S. J. *et al.* 2004; Pasqualone *et al.* 2013]. Se estudió la cinética de hinchamiento y se interpretaron los resultados en función de las diferencias estructurales entre las matrices utilizando las *ecuaciones II.3* y *II.4* de la sección antes mencionada.

III.2.5.5. Estudios de degradación

Al igual que en la *sección II.2.5.4.*, se llevó a cabo un estudio de degradación *in vitro* (acelular, no enzimático) con el fin de investigar la estabilidad estructural de las matrices con respecto al tiempo de almacenamiento. Las muestras previamente secadas a peso constante por liofilización y pesadas, fueron sumergidas en 2 ml de agua estéril (obtenida utilizando un filtro de jeringa de 0,2 µm), en placas de cultivo de 24 pocillos. Se las incubó en estufa de cultivo a 37 °C, con una atmósfera de humedad controlada conteniendo 5 % de CO₂ durante 7, 14 y 21 días. Luego del tiempo evaluado, se retiró el agua de los pocillos, se lavaron las muestras para desprender partículas desprendidas producto de la degradación y se liofilizaron hasta alcanzar peso constante. Para evaluar la degradación de las muestras se utilizó la *ecuación II.5.*

III.2.5.6. Pruebas mecánicas

Con el fin de evaluar las propiedades mecánicas de las matrices, se realizaron ensayos para determinar la resistencia mecánica a la compresión y el módulo de elasticidad de las mismas, según la metodología previamente descrita en la *sección II.2.5.5.* Las muestras fueron realizadas en placas de cultivo de 24 pocillos, obteniendo discos circulares de 13 mm de diámetro y 14 mm de espesor, y liofilizadas hasta alcanzar

²⁸ Feldkamp, L. A., Davis, L. C., & Kress, J. W. (1984). El algoritmo FDK es una fórmula de retroproyección por convolución para la reconstrucción directa de una función de densidad tridimensional a partir de un conjunto de proyecciones bidimensionales.

peso constante. El ensayo se realizó a una velocidad de 5 mm/min hasta alcanzar el 50 % de compresión de la matriz. Las determinaciones se realizaron siguiendo la norma *ASTM D695* (temperatura ambiente). El módulo elástico (*Módulo de Young*) se calculó en base a las Curvas de Tensión vs. desplazamiento generadas por el equipo. Los resultados presentados son los valores medios obtenidos a partir de 9 determinaciones independientes, bajo idénticas condiciones.

III.2.6. Ensayos biológicos

Para los ensayos biológicos, las matrices se elaboraron a medida del pocillo a utilizar. Luego de alcanzar el peso constante se colocaron en placa de cultivo de 24 pocillos y se esterilizaron por exposición a luz UV durante 20 minutos. Luego se lavaron las membranas dos veces con DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagles Media*) (sin suero y sin rojo de fenol).

III.2.6.1 Cultivos de macrófagos murinos RAW264.7

Los estudios con macrófagos así como la posible citotoxicidad de las matrices con HAp, se realizaron según la metodología descrita en el *Capítulo II, sección 2.6.2*.

La única diferencia en el protocolo mencionado anteriormente es que en estos cultivos se utilizó DMEM suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (FBS), en vez de 5% v/v para una mejora en la adhesión y proliferación celular.

Para evaluar la interacción celular con las matrices PEC-US y PEC-US con 1 % y 5 % de nHAp aditivado, las células *RAW264.7* se cultivaron sobre las matrices durante 24 hs. Luego se lavaron con PBS, se fijaron con p-formaldehído 10 % durante 10 minutos, se deshidrataron con metanol durante 5 minutos, se secaron e inmediatamente después se metalizaron con oro para su observación por SEM en un equipo *Phillips 505* (Holanda)

III.2.6.2 Viabilidad celular

A diferencia de la metodología descrita en el *Capítulo II, sección 2.6.3*. se evaluó el ensayo de viabilidad celular con cultivos a 24 y 48hs.

III.2.6.3 Evaluación de la citotoxicidad

La eventual citotoxicidad de las matrices PEC-US y PEC-US aditivadas (1% y 5%) con nHAp se evaluó empleando macrófagos *RAW264.7*. El medio condicionado fue retirado a 24 y 48 hs para analizar la producción de óxido nítrico (NO) como se describió anteriormente en el *Capítulo II, sección 2.6.2.2.*; y para la medición de interleuquina-1 β (IL1 β), evaluada mediante la técnica de ELISA. Para la medida se utilizó un kit comercial: *Mouse IL-1 β ELISA kit para IL1 β (BD Biosciences OptEIATM)*. La liberación de citoquinas se midió en los medios de cultivo de 48 hs de cultivo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se midieron empleando un lector de placas de ELISA automático (*Infinite[®] F50, Tecan Trading AG, Suiza*).

III.3 RESULTADOS

III.3.1. Obtención y caracterización de nano-hidroxiapatita

Se caracterizó la HAp obtenida en tamaños micro y nanométricos. Se pueden observar en la **Figura III.1 A y C**, las imágenes de SEM y TEM de las partículas de nHAp obtenidas luego de cada uno de los tratamientos aplicados. Es evidente la forma esférica y la diferencia de tamaño de partículas entre las tratadas con UT y las tratadas con la combinación de UT y US.

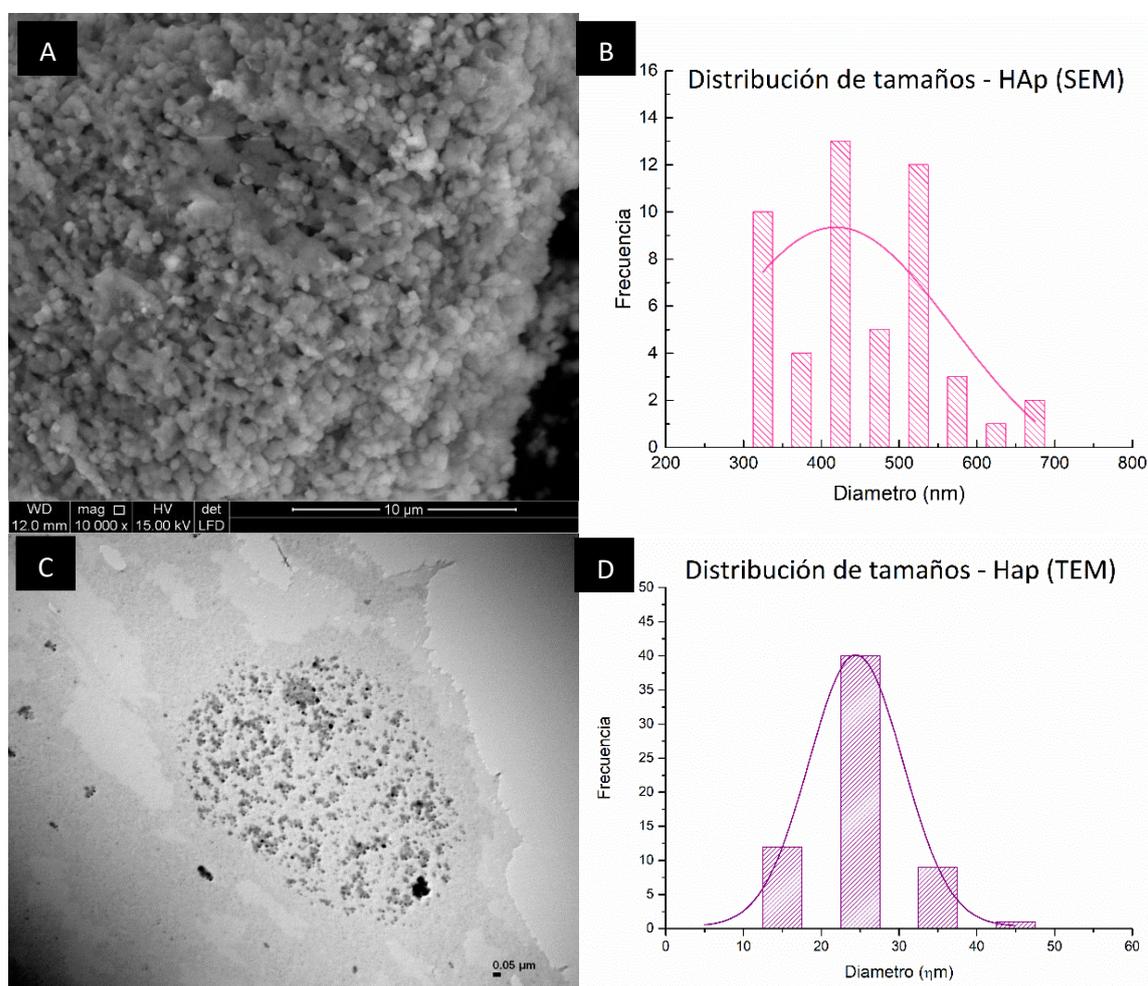


Figura III.1: **A)** Imagen de SEM de HAp procesada mecánicamente. **B)** Gráfico de distribución del diámetro de partícula de HAp procesada por UT. **C)** Imagen de TEM de nHAp procesada por US. **D)** Gráfico de distribución del diámetro de partícula de nHAp procesada por US.

En la **Figura III.1 B y D** se encuentran representados los histogramas de distribución de tamaño de partículas y la dispersidad de las mismas. Las partículas obtenidas luego del procesado mecánico por UT exhiben un tamaño promedio de $d = 418,7 \pm 49$ nm, el cual disminuye a $24,5 \pm 0,2$ nm luego de ser sometidas a US, obteniéndose una reducción de 94% aproximadamente en el tamaño final. Este resultado demuestra que es posible disminuir el tamaño de la partícula hasta dimensiones nanométricas utilizando la combinación de los procedimientos descriptos. El tamaño final alcanzado se considera adecuado para actuar como nano-refuerzo en *scaffolds* para ingeniería de tejidos.

El desarrollo de la nanotecnología, junto con la necesidad de biomateriales sintéticos bioactivos y biodegradables, ha llevado al uso de polvos de HAp de tamaño nanométrico para producir nanocompuestos para la regeneración ósea. Los materiales nanocompuestos se pueden preparar añadiendo nanopartículas inorgánicas o nanofibras en diferentes matrices de polímeros. El tamaño de las partículas de relleno es un parámetro importante, ya que cuando estos son de tamaño nanométrico tienen un gran área de superficie, en comparación con los rellenos convencionales (tamaño micro) [Allo *et al.* 2012].

Price & Smith estudiaron el efecto de la irradiación con ultrasonido en diferentes polvos de polímeros sólidos insolubles suspendidos en un líquido de soporte, como agua, usando ultrasonido de alta intensidad [Price & Smith 1993]. Se informó que solo se observan cambios físicos, la irradiación con US dio como resultado cambios en los tamaños de partícula con la fragmentación de las mismas, la desaglomeración y la modificación de la morfología de la superficie en lugar de provocar la despolimerización, como se ha reportado también en otros trabajos [Gogate & Prajapat, 2015]. En nuestro laboratorio se pre diseñó un protocolo donde se logró con éxito reducir el tamaño de partículas de HAp hasta tamaños de 200 nm [Fernández *et al.* 2011].

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). A partir de este se pudo analizar el espectro infrarrojo de la nHAp observado en la **Figura III.2**, donde se señalan las bandas principales características. Entre ellas, las bandas a 3572 , 3409 y 632 cm^{-1} corresponden a la frecuencia de estiramiento de los grupos OH estructurales (libre y asociado) en los cristales de HAp. Las bandas a 1090 , 1047 , 602 y 570 cm^{-1} indican la presencia de los grupos PO_4^{3-} . Además se observan dos bandas en 1456 y 1412 cm^{-1} que corresponden al componente CO_3^{2-} [Ooi *et al.* 2007; Cox *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2016].

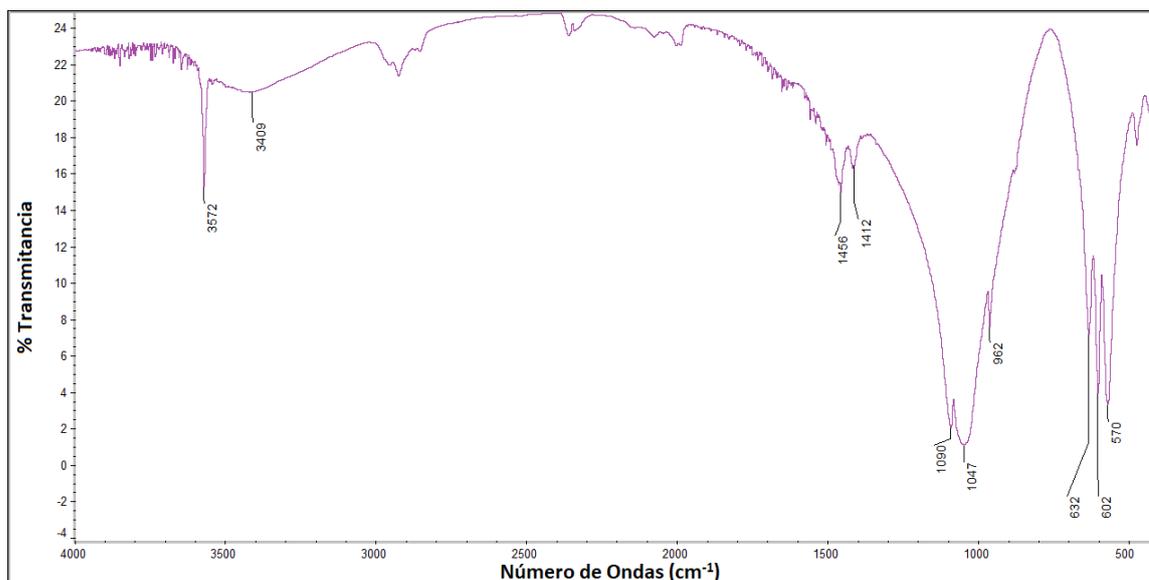


Figura III.2: Espectro FTIR de HAp

III.3.2. Caracterización fisicoquímica de las matrices

III.3.2.1. Espectroscopia ATR-FTIR

Además del espectro de la nHAp, se realizaron los espectros FTIR de las matrices PEC-US, con y sin el agregado de nHAp con el fin de ser comparados y poder observar la presencia de las nanopartículas en los *scaffolds* (Figura III.3). Los espectros muestran a 3450 cm^{-1} la banda ancha característica correspondiente a la vibración de estiramiento del grupo -OH de la nHAp y los polisacáridos componentes. La banda a 1090 cm^{-1} indica la presencia de un grupo PO_4^{3-} [Ooi *et al.* 2007; Cox *et al.* 2015; Sharma *et al.* 2016]. Además, los espectros de las matrices muestran dos bandas importantes, la primera relacionada con una banda ester (1727 cm^{-1}) y la segunda relacionada con una banda de amida (1382 cm^{-1}), debido a la unión covalente en la estructura 0% PEC-US (CMC-Qo sin aditivado de nHAp) y 5% PEC-US (CMC-Qo con 5% de adición de nHAp) [Hobuss *et al.* 2012; Suprarukmi & Sudrajat 2015; Belluzo, M. S. *et al.* 2016].

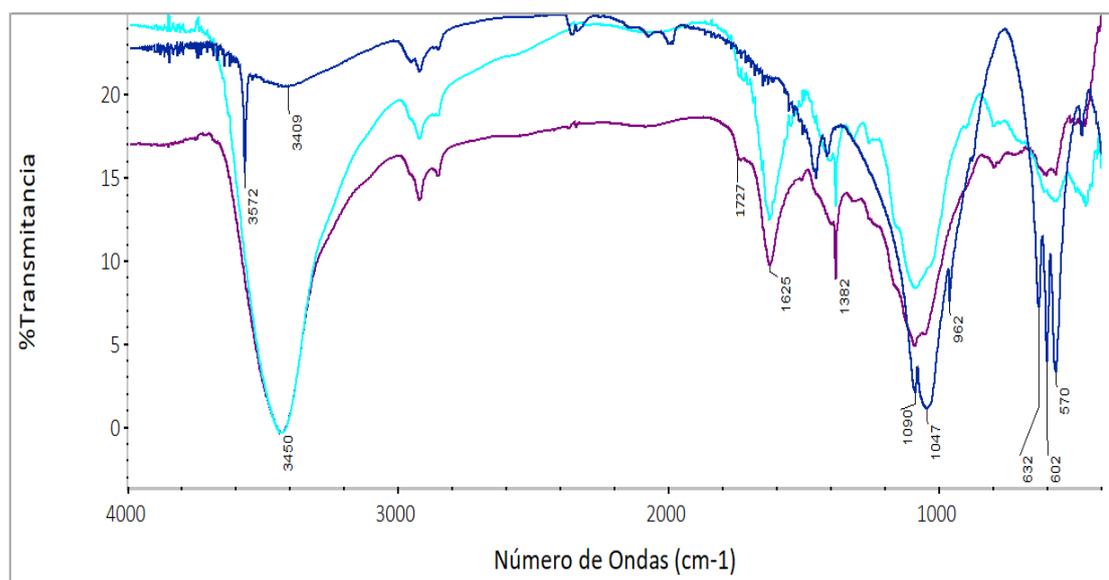


Figura III.3: Espectro FTIR de HAp (en color AZUL), de las matrices sin agregado de n-HAp (0% PEC-US; en color turquesa); y de las matrices aditivadas con 5% de nHAp (5% PEC-US; en color violeta).

III.3.2.2. Microscopia SEM

En las imágenes de SEM (**Figura III.4**) se observó la topografía de los *scaffolds* y la estructura 3D de los poros obtenidos con y sin el agregado de nHAp. La adición de nanopartículas a matrices compuestas puede tener un efecto en la arquitectura porosa de los andamios, por ejemplo disminuyendo el tamaño de los poros [Lima, P. A. *et al.* 2013; Teimouri, A. *et al.* 2015] o puede no tener ningún efecto en las dimensiones de los poros pero sí en su interconexión [Kim, H. L. *et al.* 2015; Saravanan, S. *et al.* 2016].

En todos los casos, se observó una estructura altamente porosa tridimensional con buena interconexión entre los poros, con porosidades que exceden el 70%. En el Capítulo II, *sección 3.4.2.* se mencionó la importancia de la existencia de poros en la estructura polimérica y que esta es crucial para la adecuada proliferación celular.

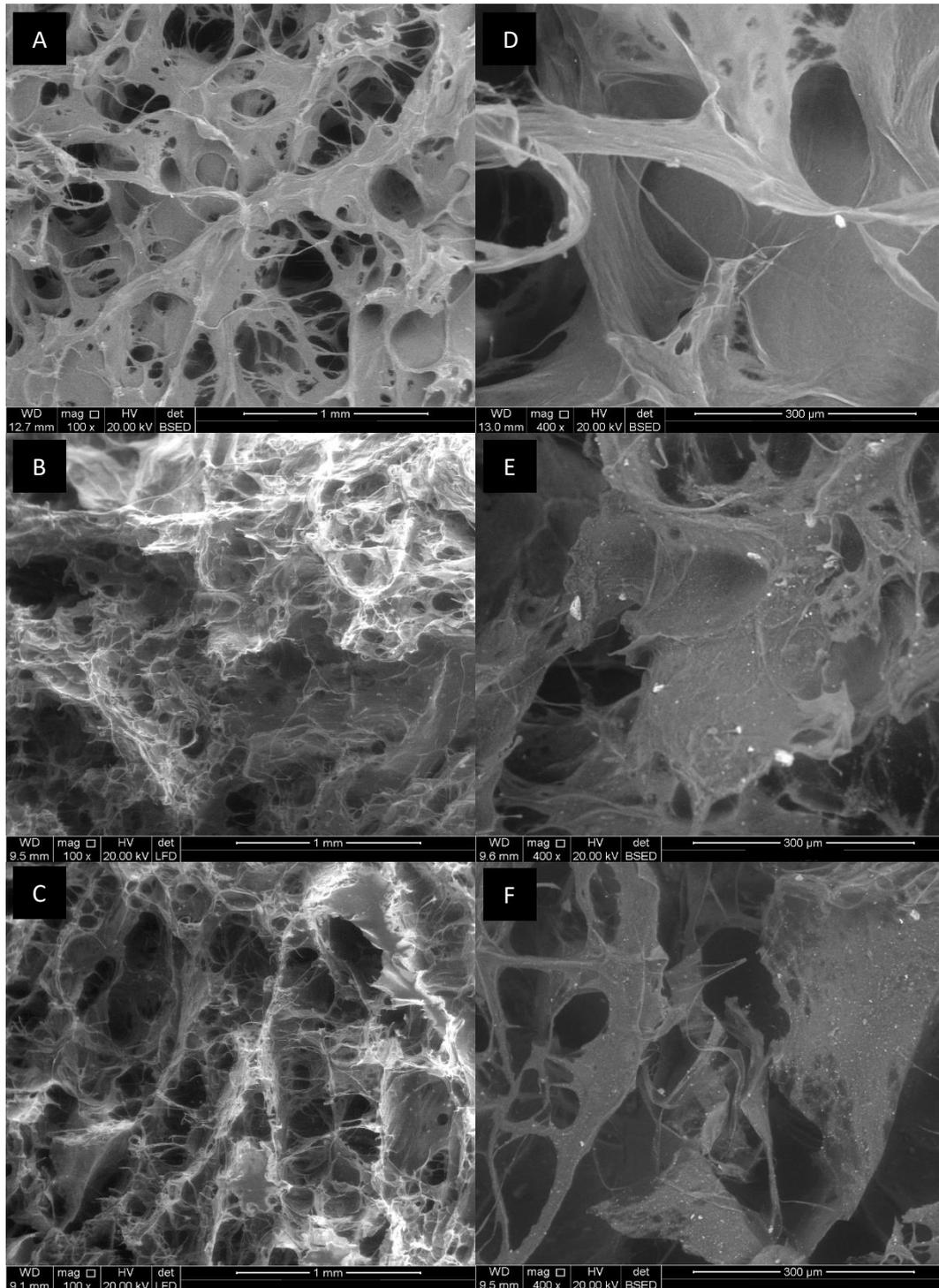


Figura III.4: Micrografías SEM de la superficie de las matrices sin nHAp (A y D); y con 5% (B y E) y 10% (C y F) de nHAp aditivado, obtenidas con un objetivo 100X y 400X, respectivamente.

III.3.2.3. Tomografía micro-computada (Micro-CT)

La micro-CT es una imagen de rayos X en 3D, por el mismo método utilizado en las exploraciones por TAC en el hospital (o "CAT"), pero a pequeña escala con una resolución masiva. Realmente representa la microscopía 3D, donde la estructura interna de objetos a escala muy fina se crea de forma no destructiva. En líneas generales, el proceso consiste en la adquisición sucesiva de imágenes generadas por la absorción parcial de Rayos X, donde la absorción de la radiación es proporcional a la densidad del material. Con las imágenes adquiridas se reconstruye un volumen tridimensional de la probeta. También es posible diferenciar fases de distinta densidad debido a que se representan por diferentes niveles de grises. Mediante la aplicación de sucesivas binarizaciones es posible cuantificar volumétricamente las distintas regiones. Esta técnica novedosa puede ser utilizada como complemento de las imágenes SEM [Faraj *et al.* 2009]. Es por ello que los escáneres microtomográficos (micro-CT o μ CT) permiten la caracterización 3D de este tipo de andamios poliméricos, así como su interacción con tejidos no mineralizados [Guldberg *et al.* 2003]. La reconstrucción 3D de secciones en serie de las imágenes escaneadas puede determinar la porosidad, el tamaño de los poros, la interconectividad de los mismos y la microarquitectura 3D en general. Por ello que la microtomografía surge como una herramienta poderosa para abordar este tipo de estudios y está siendo ampliamente utilizada [Darling & Sun 2004; Shearer *et al.* 2016; Ramandi *et al.* 2016].

El equipo Micro-CT está compuesto por varios componentes principales: tubo de rayos X, filtro de radiación y colimador (que enfoca la geometría del haz a una proyección de haz de abanico o cono), soporte de muestras y cámara de dispositivo de detección de fósforo / carga acoplada (**Figura III.5**). La reconstrucción de una imagen 3D se realiza rotando la muestra (para sistemas de escritorio) para generar una serie de proyecciones 2D que se transformarán en una representación 3D utilizando un proceso digital llamado *back-projection* [Boerckel, J. D *et al.* 2014]. Esta modalidad de imagen no destructiva puede producir imágenes en 3D y mapas 2D con *voxels*²⁹ que se acercan a 1 μ m, lo que le otorga una resolución superior a otras técnicas como la ecografía y la resonancia magnética (RMN).

En la **Figura III.6** se observan las imágenes obtenidas a través del análisis tomográfico no destructivo del Micro-CT, pudiéndose observar imágenes 2D de los planos de análisis [xy] de la parte superior de la longitud de los andamios PEC-US sin nHAp (*figura III.6 A*) y con 1, 3 y 5% de nHAp aditivada (*figura III.6 C, E y G*, respectivamente), e imágenes de los planos [yz] en la longitud media de los andamios

²⁹ *Voxels*: del inglés *volumetric pixel*

PEC-US sin nHAp (figura III.6 B) y con 1, 3 y 5% de nHAp aditivada (figura III.6 D, F y H, respectivamente).

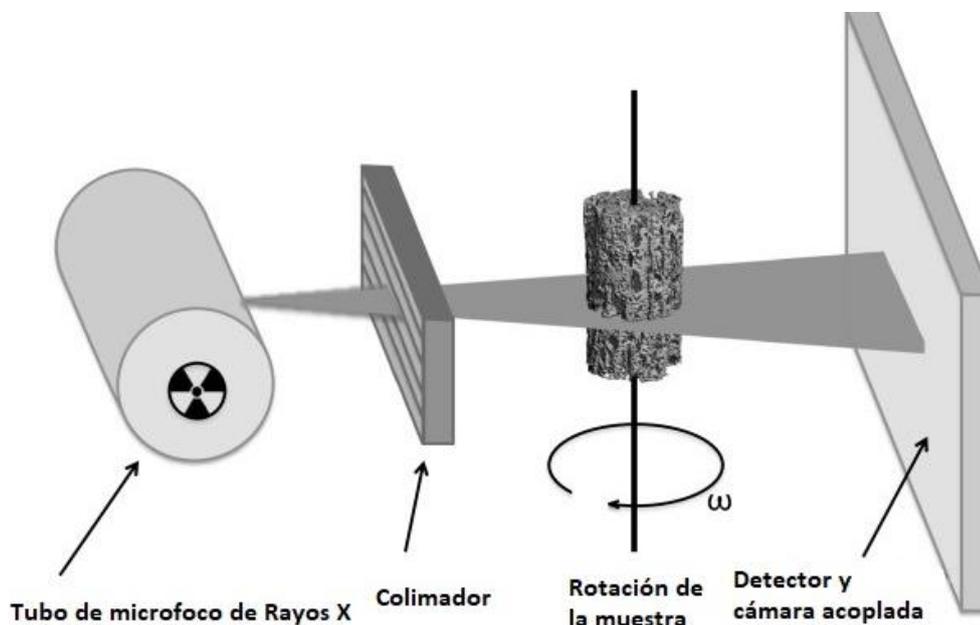


Figura III.5: Principales componentes de un escáner de tomografía microcomputada. Adaptada de [Boerckel, J. D *et al.* 2014].

La técnica permitió caracterizar la porosidad, observar su disposición y morfología en el volumen estudiado, comprobando la distribución espacial de los poros y su interconectividad, encontrándose isotropía en todo el *scaffold*, demostrando el correcto procesamiento del material y su homogeneidad.

A través del software volumétrico de reconstrucción **NRecon** de **SkyScan** se pudieron componer los cortes transversales de las proyecciones angulares del Micro-CT adquiridas a través de las matrices. Los cortes reconstruidos se pueden observar en la **Figura III. 7.** para los andamios PEC-US sin nHAp (figura III.7 A) y con 1, 3 y 5% de nHAp aditivada (figura III.7 C, E y G, respectivamente). En todos ellos se puede observar que la porosidad de los andamios no es sólo superficial, sino que los poros están distribuidos homogéneamente a lo largo y ancho de todo el *scaffold*, así como se evidencia la interconectividad de los poros, confirmando los resultados obtenidos a través de las imágenes SEM. Además se puede observar que la adición de la nanocerámica al andamio no produce un efecto visible en el tamaño de los poros ni en su microarquitectura.

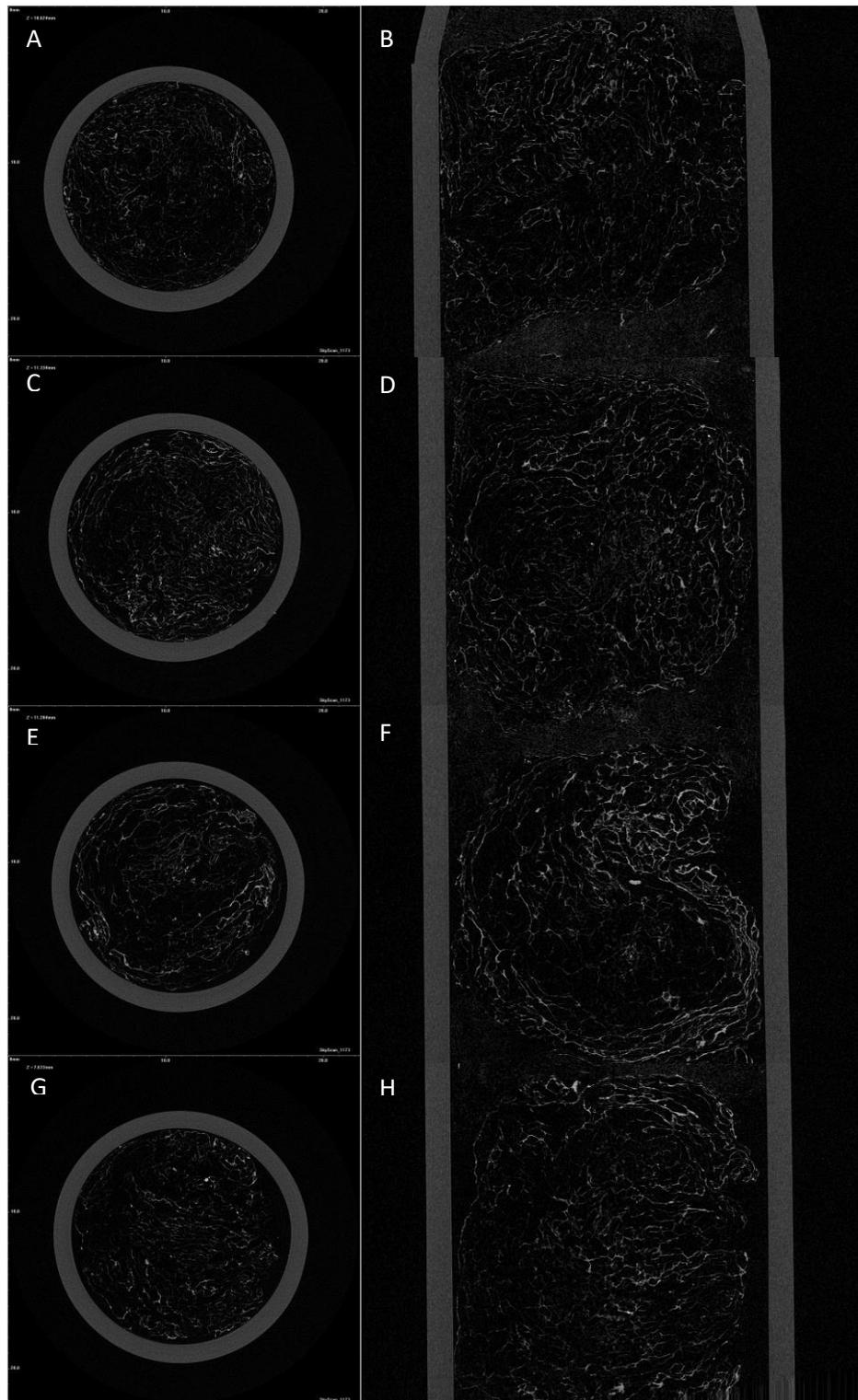


Figura III.6: Análisis tomográfico no destructivo en Micro-CT. Imágenes 2D de los andamios PEC-US sin nHAp (A y B) y PEC-US con 1, 3 y 5 % de nHAp aditivada (C-H), obtenidos al colocar los planos de análisis [xy] de la parte superior de la longitud del andamio (imágenes A, C, E y G) e [yz] en la longitud media del andamio (imágenes B, D, F y H).

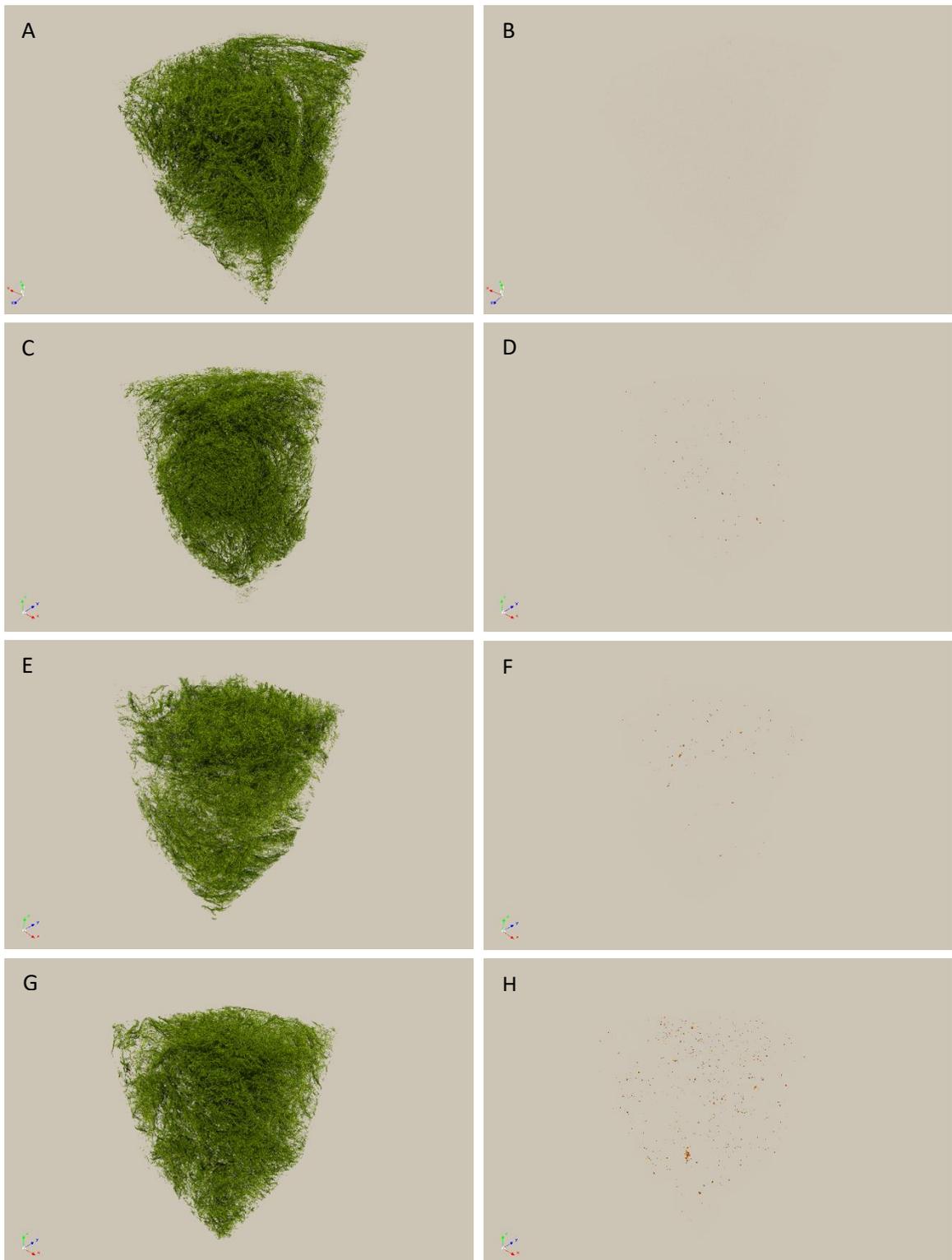


Figura III.7: Reconstrucción 3D a lo largo de los planos ortogonales [xy], [xz] e [yz], a través del software volumétrico de reconstrucción *NRecon* de *SkyScan*, de las imágenes obtenidas por Micro-CT de las matrices PEC-US sin nHAp (A) y con 1, 3 y 5% de nHAp aditivada (C, E y G, respectivamente). Evidencia de nanopartículas aglomeradas en las matrices (B, D, F y H).

El *software* también permite identificar con distintos colores diferentes fases dentro del *scaffold*, por medio de las diferentes densidades obtenidas en los cortes realizados, por lo cual se coloreó en tonos naranjas la nHAp, encontrándose algunas partículas de tamaños no nanométricos en los andamios con 1, 3 y 5% de nHAp aditivada (que se muestran en las *figuras III.7 D, F y H* respectivamente), incrementándose la cantidad de las mismas a medida que aumenta el porcentaje de carga de la nHAp. El análisis tomográfico revela una distribución uniforme de las partículas cerámicas en la matriz. Estas partículas de mayor tamaño pueden deberse a aglomeraciones de las nanopartículas que no pudieron desglosarse eficientemente con el tratamiento inicial de US aplicado a la mezcla Qo-nHAp. A su vez, se muestra que no hay partículas de nHAp en el andamio PEC-US que no tiene aditivada las nanopartículas (*figura III.7 B*).

A través de este estudio, se evidenció la potencialidad de la técnica para el diseño, desarrollo, control de calidad y distribución de fases de este tipo de materiales, así como para la caracterización estructural de biomateriales. La técnica permitió la visualización de las nanopartículas aglomeradas, no visibles con los métodos de imagen convencionales. A medida que los sistemas de Micro-CT de mayor resolución y más velocidad estén disponibles para los estudios *in vitro* e *in vivo*, surgirán nuevas aplicaciones relacionadas con la ingeniería de tejidos.

III.3.2.4. Estudio de hinchamiento

La *Figura III.8* muestra el porcentaje de *swelling* o hinchamiento de las matrices PEC-US y PEC-US con 0,5; 1; 3 y 5% de nHAp en función del tiempo. Se puede observar que el comportamiento de todas las matrices es similar, alcanzando un máximo entre 1 y 2 minutos en todos los casos, hasta los 6 minutos de incubación, con un valor de hinchamiento máximo entre 450 y 600%. Estos resultados se encuentran dentro de los valores típicos reportados para otros hidrogeles, como la mezcla quitosano/ PEGF, que adquirió un porcentaje de *swelling* en el rango de 250-370% [Doulabi *et al.* 2013], la muestra quitosano/PVA, obtuvo un porcentaje de hinchamiento entre 400 y 700% [Costa-Júnior *et al.* 2009], o matrices con distintas composiciones de CMC que reportan valores entre 200 y 1000% [Chang *et al.* 2010].

Algunos reportes indican que la capacidad de hinchamiento se redujo significativamente mediante la adición de nanopartículas a matrices con Qo diseñadas para regeneración ósea [Peter, M. *et al.* 2010; Pattnaik *et al.* 2011; Saravanan *et al.* 2016]; o por el contrario, se indicó un aumento en la capacidad de absorción de agua [Teimouri *et al.* 2015]. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre las distintas curvas, correspondientes a las matrices con y sin el agregado de nHAp, ni tampoco entre los distintos porcentajes de nHAp aditivado. Este resultado puede ser atribuido al bajo porcentaje de nHAp incorporada y a la homogénea dispersión obtenida.

Por otro lado, el tamaño de poro similar, obtenido para los diferentes *scaffold*, podría también ser responsable del comportamiento de *swelling* observado.

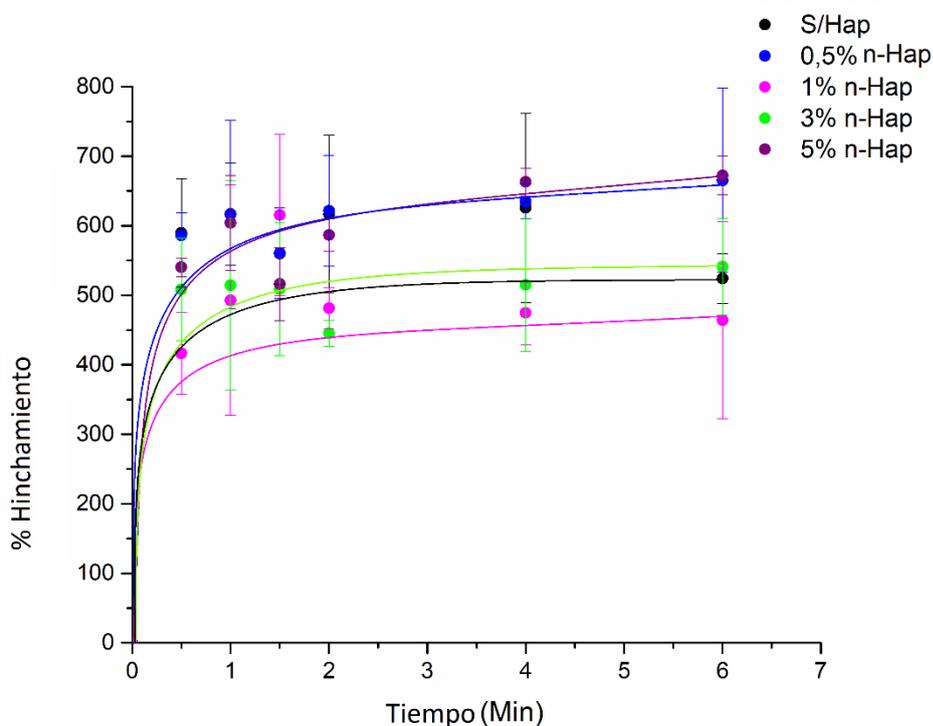


Figura III.8: Cinética de hinchamiento para las matrices PEC-US, sin el agregado de nHAp, y con 0,5; 1; 3; y 5% de nHAp aditivada.

III.3.2.5. Estudios de degradación

Con el objetivo de analizar la estabilidad y el grado de degradación de las membranas, se realizó un ensayo de degradación a 7, 14 y 21 días. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y fueron obtenidos a partir de un experimento realizado por cuadruplicado para cada tipo de *scaffold*. Se tomó como dato basal los valores obtenidos a 7 días.

Cómo se mencionó anteriormente, el agregado de nanopartículas a las matrices puede llegar a producir un cambio significativo en las propiedades fisicoquímicas y en la degradación del material. Se ha reportado una disminución de la degradación de los andamios [Peter, M. *et al.* 2010]

Como se observa en la **Figura III.9**, se encontró un aumento en la pérdida de peso para cada tipo de *scaffold* analizado, en función del tiempo de degradación, siendo la diferencia estadísticamente significativa a los 21 días de ensayo. Por otro lado, no se

encontraron demasiadas diferencias entre las matrices, es decir el agregado de nHAp no influenció demasiado sobre la degradación de las mismas, aunque parece haber una tendencia a disminuir con el agregado de nHAp. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas luego de 21 días de degradación para el caso de los *scaffolds* que contenían 0,5 y 5% de nHAp agregada.

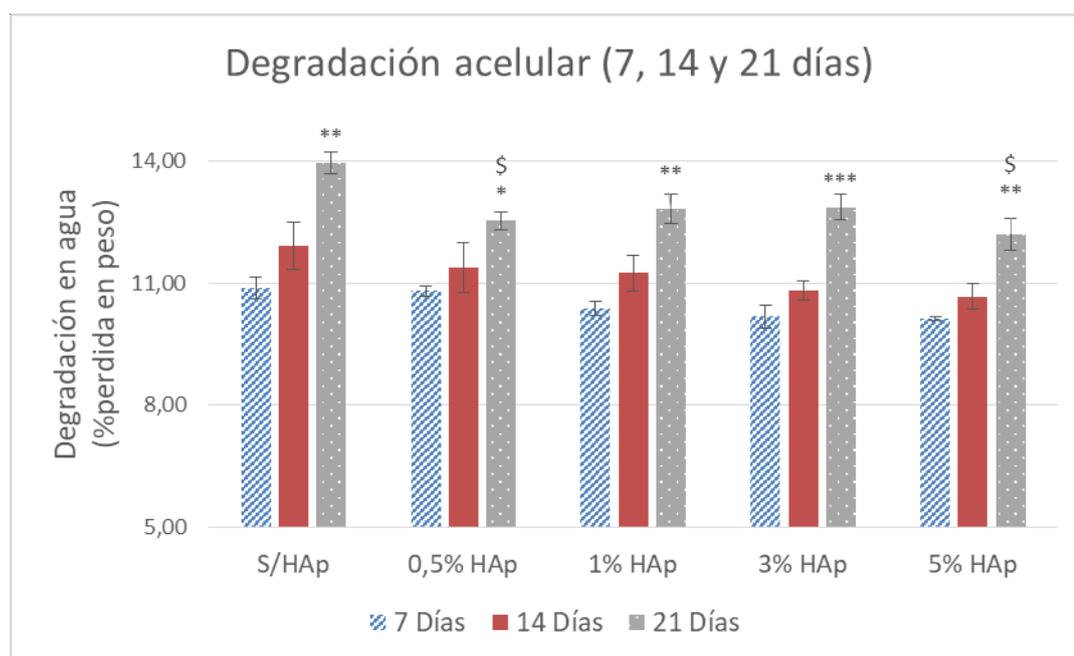


Figura III.9: Gráfico de degradación celular a 7, 14 y 21 días, expresado como % de pérdida en peso para las distintas matrices PEC-US, con y sin el agregado de nHAp, con n=4. Diferencias vs 7 días: * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. Diferencia vs S/HAp: \$ p<0.05

Es de esperar que la tasa de degradación de la matriz *in vivo* ocurra a una velocidad controlada, de modo que mientras el tejido se regenera, las cargas que se producen sobre el mismo puedan ser soportadas por el *scaffold*, y a su vez este pueda ir siendo reemplazado por nuevo tejido [Levengood & Zhang 2014]. En este caso, realizando una proyección (**Figura III.10**), las matrices obtenidas se degradarían completamente luego de 4,4 meses (para PEC-US sin la inclusión de nHAp); de 5,3 meses (para las matrices PEC-US con agregado de 1% de nHAp), o de 6,1 meses aproximadamente (para las matrices PEC-US con agregado de 5% de nHAp), valores compatibles con la regeneración del tejido óseo. Según bibliografía la tasa de degradación “adecuada” para una matriz varía según que función cumpla en la zona donde se quiera aplicar. Por ejemplo, para defectos óseos en la región espinal debe ser de 9 meses o más; mientras que para aplicaciones cráneo-maxilofaciales, debe ser de 3 a 6 meses [Bose et al. 2012], debido a la diferencia de carga que soportan. Sin embargo,

existen otros factores, asociados con la morbilidad, que pueden requerir tiempos de degradación más prolongados, entre ellos la edad y la condición fisiopatológica previa del paciente receptor [Wang, M. 2003].

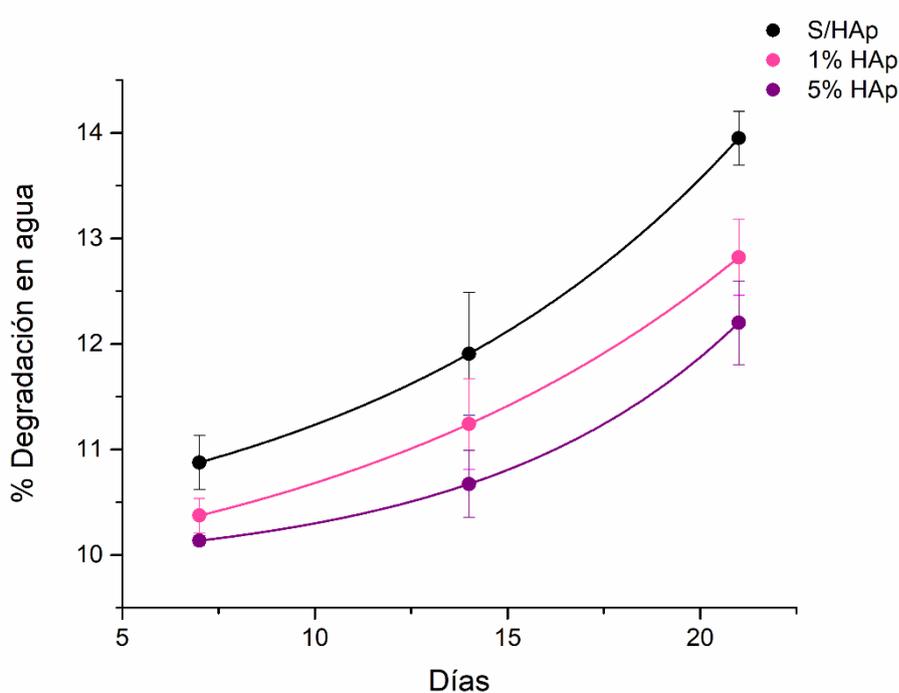


Figura III.10: Gráfico de proyección de degradación de las matrices PEC-US sin agregado de nHAP (negro), y PEC-US con agregado de 1% nHAP (rosa) y 5% nHAP (violeta).

III.3.2.6. Pruebas mecánicas

Una preocupación importante son las propiedades mecánicas de los *scaffolds*. Se ha informado que las características mecánicas pueden influir significativamente en la osteointegración entre los implantes y los tejidos circundantes, así como en los comportamientos celulares. El hueso natural exhibe propiedades biomecánicas superelásticas con un valor de módulo de Young en el rango de 1 a 27 GPa, dependiendo de qué tipo de hueso se trate, si es un hueso cortical o uno esponjoso, así como de distintos factores (edad, enfermedades previas del paciente, etc.). El hueso cortical posee un módulo de Young y una resistencia a la compresión de 15-20 GPa y 100-200 MPa, mientras que el hueso trabecular posee un rango de 0.1-2 GPa y 2-20 MPa, respectivamente [Saravanan *et al.* 2016]. Los andamios ideales deberían imitar la

resistencia, la flexibilidad y las propiedades mecánicas, a fin de evitar posibles efectos que inducen la reabsorción ósea y la consiguiente falla del implante [Wu et al. 2014].

El comportamiento mecánico de las diferentes matrices se estudió mediante el ensayo de compresión, analizando las curvas tensión vs deformación, obtenidas a partir de las medidas realizadas. La **Figura III.11** presenta los valores obtenidos para el módulo elástico (en MPa) expresados como el promedio \pm SEM, a partir de 9 determinaciones independientes para cada *scaffold*.

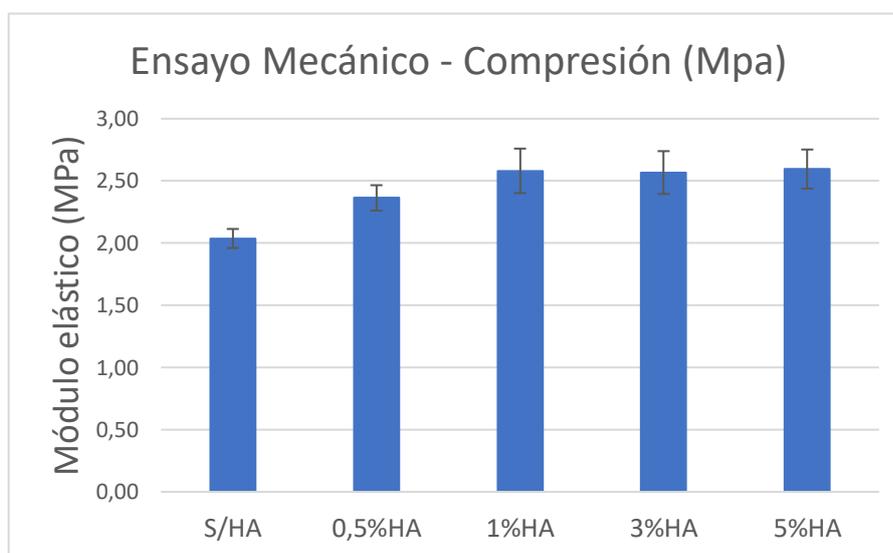


Figura III.11: Módulo elástico (en MPa) obtenido en el ensayo mecánico de compresión para los distintos *scaffolds*.

El Qo tiene propiedades mecánicas de bajas a moderadas, lo que limita su uso en aplicaciones de carga [Costa-Júnior *et al.* 2009; Zhang, Y. *et al.* 2003]. Sin embargo, se esperaba que la adición de nanopartículas mejore las propiedades mecánicas, como se ha reportado en otros trabajos [Shokri *et al.* 2015; Teimouri *et al.* 2015; Saravanan *et al.* 2016]. A su vez, la fragilidad de la cerámica de HAp se puede minimizar mediante la incorporación de Qo, evitando la posibilidad de migración de partículas de HAp [Lima *et al.* 2013; Kim, H. L. *et al.* 2015].

Los rellenos de tamaño nanométrico pueden formar una interfaz más estrecha con la matriz de polímero en los compuestos, y por lo tanto, se espera un alto rendimiento en las propiedades mecánicas. Además, las propiedades intrínsecas de los rellenos de tamaño nanométrico contribuyen a las diferentes interacciones entre las partículas de relleno y la matriz de polímero. Esto conduce a un aumento en la

resistencia mecánica y la rigidez del material final en comparación con las propiedades del polímero sin relleno y de los compuestos con refuerzo de tamaño micrométrico. En particular, el tamaño de partícula y la morfología tienen influencias apreciables sobre la capacidad de la HAp para reforzar materiales, siendo aquellas con diámetros más pequeños y relaciones de aspecto más grandes (longitud / diámetro) las que evidencian el efecto más profundo en las propiedades mecánicas [Allo *et al.* 2012]. Sin embargo, en este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas. Este resultado podría ser consecuencia del bajo contenido de nHAp ensayado y de la homogénea distribución de las partículas en el *scaffold*.

III.3.3. Ensayos biológicos

La biocompatibilidad y citotoxicidad de las matrices obtenidas fue evaluada a través de su capacidad para soportar la adhesión y el crecimiento de las células *Raw 264.7*.

III.3.3.1 Interacción de macrófagos murinos RAW264.7 con las matrices

El número de células viables en un andamio 3D es indicativo de compatibilidad e idoneidad celular para la aplicación de tejido óseo [Lima *et al.* 2013]. Las células *RAW264.7* se cultivaron durante 24hs sobre las membranas de PEC-US sin agregado de nHAp y de las matrices PEC-US que contenían 1 o 5% de nHAp. La interacción con las matrices se estudió a partir de la observación de las imágenes de SEM (**Figura III.12**). Los resultados indicaron que las células fueron capaces de adherirse a los andamios 3D luego de 24hs, mostrando una forma redondeada y proliferando en forma de ramilletes. Como hemos informado anteriormente, cuando estas células se exponen a citotoxicidad, muestran un citoplasma expandido y vacuolado con varias extensiones, lo que sugiere la activación de los macrófagos [Fernández *et al.* 2014].

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

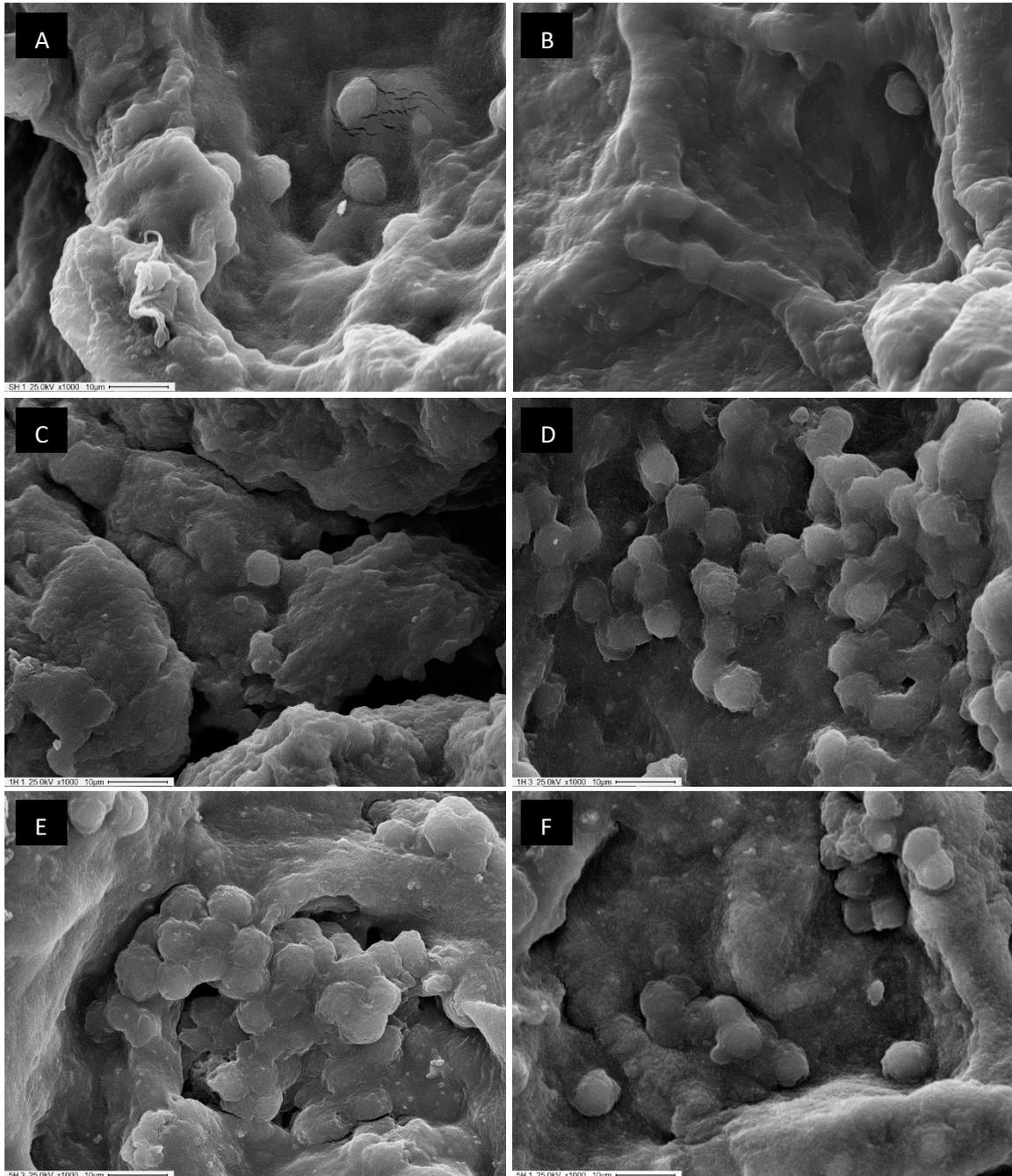


Figura III.12: Micrografías obtenidas por SEM de las células RAW 264.7 crecidas sobre las matrices PEC-US sin nHAp (A y B), con 1% (C y D) o con 5% (E y F) de nHAp, durante 24hs.

III.3.3.2 Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular sobre los *scaffolds* se estudió la cinética de crecimiento de las células RAW264.7 sembradas sobre las matrices PEC-US sin agregado de nHAp y PEC-US con 0,5; 1; 3 o 5% de nHAp agregada.

En la **figura III.13**, se puede observar el gráfico de viabilidad celular evaluado a través del ensayo de MTT, luego de 24 y 48hs de cultivo. Puede verse que tanto las células crecidas sobre la matriz PEC-US, como las crecidas sobre las matrices PEC-US aditivadas con nHAp, tuvieron el mismo comportamiento y son comparables con la condición control, sin mostrar diferencias significativas con este. Estos resultados sugieren, junto con las imágenes de SEM, que el biomaterial obtenido presenta una buena biocompatibilidad y podría ser utilizado en la regeneración de tejidos.

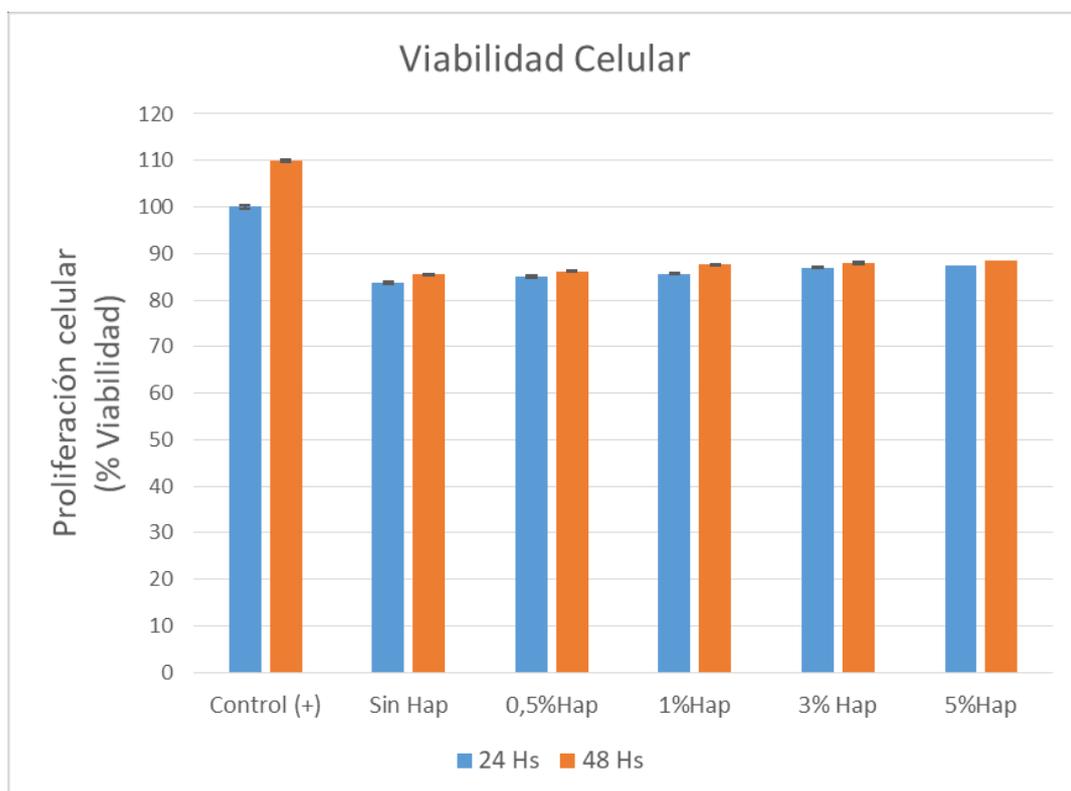


Figura III.13: Viabilidad celular de RAW 264.7, por MTT a 24 y 48hs vs. Control (Cultivo sobre placas de cultivo estándar).

III.3.3.3. Evaluación de la citotoxicidad

Finalmente, se estudió si las matrices podían generar algún efecto citotóxico, empleando el modelo de macrófagos murinos *RAW264.7* en cultivo y su capacidad para liberar óxido nítrico (NO) al medio en respuesta a agentes citotóxicos, luego de 24 y 48hs de cultivo. No se encontraron diferencias significativas en la producción de NO entre los macrófagos crecidos en las distintas matrices; tanto PEC-US sin nHAp, como PEC-US aditivados con nHAp (0,5%; 1%; 3% y 5%) y la condición control. En la **figura III.14** se muestran los valores obtenidos a partir estos ensayos.

Se obtuvieron resultados similares para los niveles de citoquinas (IL-1 β) liberadas al medio a las 48 hs de cultivo mediante la técnica de *ELISA* (**figura III.15**). De modo tal, que con este estudio y en los tiempos estudiados, los niveles liberados al medio para los distintos marcadores (IL-1 β y NO) no presentaron diferencias significativas cuando los macrófagos crecen sobre las matrices comparadas con los crecidos sobre la placa de cultivo. Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el caso de los *scaffolds* que no contenían nHAp agregada y para las que contenían 0,5 % de nHAp agregada, pudiendo evidenciarse que las matrices no mostraban efectos citotóxicos.

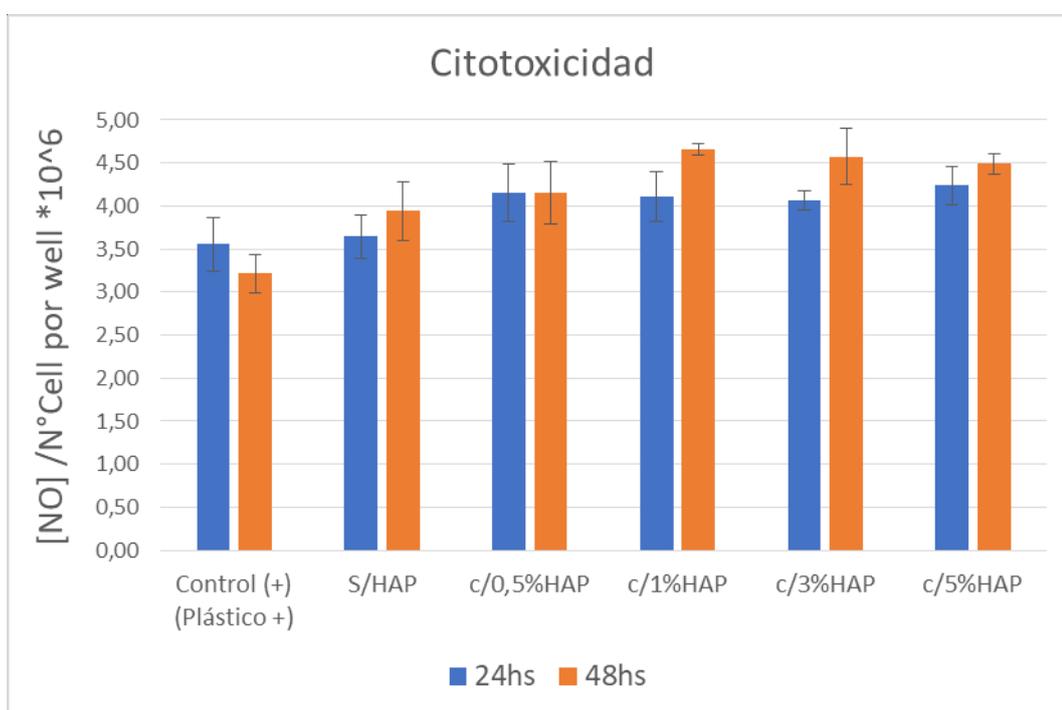


Figura III.14: Producción de NO de *RAW 264.7*, luego de 24 y 48hs de cultivo vs. Control.

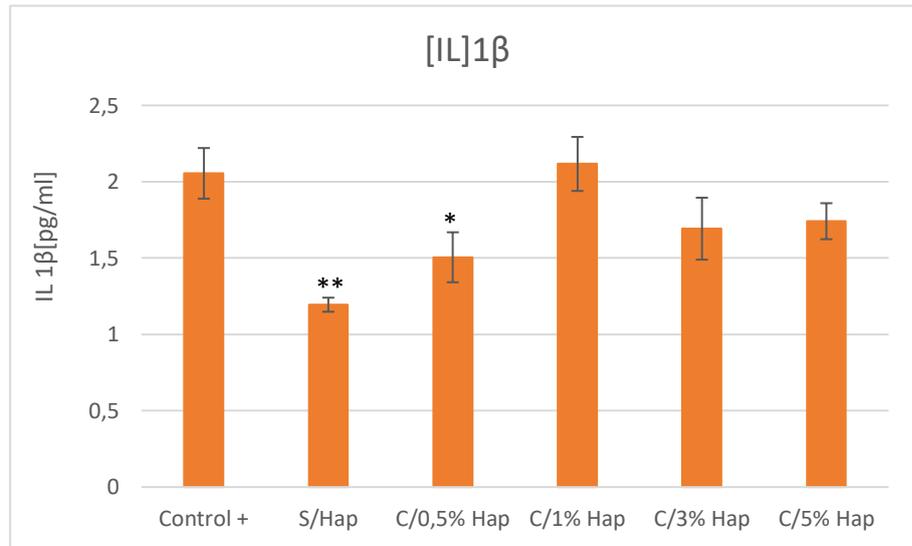


Figura III.15: Producción de IL1 β de RAW 264.7, luego de 48hs de cultivo vs. Control. Con n=4. Diferencias vs control +: * p<0.05; ** p<0.01.

III.4 CONCLUSIONES PARCIALES

En este capítulo del trabajo se presentaron los resultados de la caracterización de la nanohidroxiapatita (nHAp) extraída de hueso bovino y procesada por dos técnicas (mecánica y ultrasonido). Las muestras fueron evaluadas mediante SEM o TEM, y las imágenes analizadas para obtener los respectivos tamaños promedio (d). El tamaño final alcanzado luego del procesado mecánico fue de $d = 418,7 \pm 49$ nm, el cual disminuyó a $24,5 \pm 0,2$ nm, luego de ser sometido a US. El resultado obtenido demuestra que es posible disminuir el tamaño de partícula hasta dimensiones nanométricas utilizando los procedimientos descritos. Las partículas de nHAp obtenidas se consideran adecuados para actuar como nanorefuerzos en *scaffolds* para ingeniería de tejidos. Adicionalmente, el tratamiento por US no sólo disminuye el tamaño de partícula sino que mejora la dispersión de los componentes.

Los resultados de SEM muestran la estructura porosa tridimensional de los andamios PEC-US-nHAp, adecuados para la proliferación celular. El análisis FTIR mostró interacciones específicas entre los componentes del andamio y la presencia de HAp en la estructura. Los estudios de hinchamiento y las pruebas mecánicas indican que el *scaffold* tiene propiedades de hidrogel con buenas propiedades mecánicas. Finalmente, no se encontraron efectos de citotoxicidad para ningún andamio.

Estos resultados nos permitieron concluir que el compuesto PEC-US con agregado de nHAp es un candidato prometedor para inducir la regeneración del tejido ósea-cartilaginosa.

CAPÍTULO IV:

Conclusiones generales



CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis doctoral se logró desarrollar un biomaterial compuesto biodegradable, combinando nano hidroxapatita (nHAp) con complejos polielectrolíticos formados por quitosano (Qo – polielectrolito catiónico) y carboximetilcelulosa (CMC – polielectrolito aniónico) para su aplicación en medicina regenerativa. Se analizó la degradación ultrasónica de ambos polisacáridos para encontrar las condiciones óptimas para compatibilizar la mezcla.

El análisis de las imágenes SEM demostró que el andamio obtenido aplicando ultrasonido durante su preparación presentó una distribución de tamaño de poro y una superficie más homogénea, en comparación con los obtenidos sin el proceso de ultrasonido. Por otra parte, el análisis del resultado de FTIR sugiere que se logró un nuevo enlace covalente entre los dos polisacáridos mejorando la compatibilidad entre ambos. Las diferencias estructurales entre los andamios PEC y PEC-US nos permiten explicar las diferencias entre los módulos elásticos más altos y la estabilidad más fuerte a pH = 7.4 de PEC-US. Además, el porcentaje de hinchamiento máximo obtenido fue diferente para los andamios, como resultado de las diferencias estructurales. Por este motivo, se eligió continuar trabajando con esta estrategia de compatibilización ultrasónica en la segunda parte del trabajo.

La hidroxapatita de dimensiones nanométricas fue obtenida a partir de la incineración de hueso bovino, mediante un procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio. La reducción de tamaño promedio de las partículas de HAp obtenidas, fue analizada mediante imágenes de SEM y TEM, demostrando que es posible disminuir el tamaño de las partículas hasta dimensiones nanométricas, utilizando la combinación de los procedimientos descritos. El tamaño final alcanzado (del orden de los 25nm), fue utilizado en la segunda parte del trabajo como nano-refuerzo del *scaffold* desarrollado (PEC-US). Además la reducción del tamaño promedio de partículas resultó importante porque mejoró la integración de las mismas en la matriz polimérica.

Todas las matrices obtenidas con el complejo polielectrolito, con y sin el agregado de nHAp, fueron evaluadas por medio de un modelo *in vitro*, y demostraron no ejercer efectos citotóxicos sobre los macrófagos RAW 264.7. Las células fueron capaces de adherirse y proliferar, indicando que los *scaffolds* obtenidos generan un ambiente adecuado para el crecimiento celular y una buena biocompatibilidad, lo que sugiere que estos materiales podrían ser útiles en la regeneración de tejido óseo-cartilaginoso.

Hasta el momento, no se conocen ensayos clínicos de implantes óseos obtenidos a través de las técnicas planteadas en este trabajo, como los hay para otros tejidos como la piel, donde se han obtenido patentes con posibilidades de éxito de los implantes de

en dichos tejidos. Sin embargo, se han empleado terapias regenerativas basadas en células madres mesenquimáticas y otras con factores de crecimiento que han favorecido efectivamente la formación de nuevo tejido óseo humano. La investigación sobre la regeneración de huesos debe orientarse hacia el intercambio fructífero entre las disciplinas que cooperan con la ingeniería de tejidos, que está muy cerca de allanar los problemas de implantación y restauración de la funcionalidad del tejido óseo. Superar el reto redundaría en el beneficio de una gran parte de la población y en una enorme mejoría de su calidad de vida.

REFERENCIAS |

Standing on the shoulders of giants¹



¹ Atribuida a Isaac Newton pero con varios precedentes

REFERENCIAS

A

- Adams, C. S., Mansfield, K., Perlot, R. L., & Shapiro, I. M. (2001). Matrix regulation of skeletal cell apoptosis role of calcium and phosphate ions. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20316-20322.
- Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., Mequanint, K., & Rizkalla, A. S. (2012). Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration. *Journal of functional biomaterials*, 3(2), 432-463.
- Alvarez Barreto, J. F. (2009). Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2).
- Ambrosio, A. M., Sahota, J. S., Khan, Y., & Laurencin, C. T. (2001). A novel amorphous calcium phosphate polymer ceramic for bone repair: I. Synthesis and characterization. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 58(3), 295-301.
- Amini, A. R., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 40(5).
- Annabi, N., Nichol, J. W., Zhong, X., Ji, C., Koshy, S., Khademhosseini, A., & Dehghani, F. (2010). Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(4), 371-383.
- Antti, G., Pentti, P., & Hanna, K. (2008). Ultrasonic degradation of aqueous carboxymethylcellulose: effect of viscosity, molecular mass, and concentration. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(4), 644-648.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., ... & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current chemical biology*, 3(2), 203-230.
- Arancibia, M. Y., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Fernández-García, M., Fernández-Martín, F., & Montero, P. (2015). Antimicrobial and rheological properties of chitosan as affected by extracting conditions and humidity exposure. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 802-810.
- Araujo, J. V., Davidenko, N., Danner, M., Cameron, R. E., & Best, S. M. (2014). Novel porous scaffolds of pH responsive chitosan/carrageenan-based polyelectrolyte complexes for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(12), 4415-4426.
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., & Kenny, J. M. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: a review. *Polymer degradation and stability*, 95(11), 2126-2146.
- Arnett, T. (2015). Basics of bone biology. *Osteoporos Rev*, 23(2), 12-6.
- Ávila-Orta, C., Espinoza-González, C., Martínez-Colunga, G., Bueno-Baqués, D., Maffezzoli, A., & Lionetto, F. (2013). An overview of progress and current challenges in ultrasonic treatment of polymer melts. *Advances in Polymer Technology*, 32(S1), E582-E602.

B

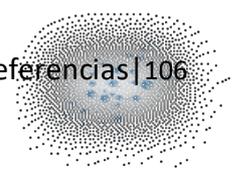
- Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., & Svorcik, V. (2011). Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances*, 29(6), 739-767.
- Barbucci, R., Leone, G., & Vecchiullo, A. (2004). Novel carboxymethylcellulose-based microporous hydrogels suitable for drug delivery. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(5), 607-619.
- Beladi, F., Saber-Samandari, S., & Saber-Samandari, S. (2017). Cellular compatibility of nanocomposite scaffolds based on hydroxyapatite entrapped in cellulose network for bone repair. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 385-392.



- Belluzo, M. S., Medina, L. F., Cortizo, A. M., & Cortizo, M. S. (2016). Ultrasonic compatibilization of polyelectrolyte complex based on polysaccharides for biomedical applications. *Ultrasonics sonochemistry*, 30, 1-8.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 35-52.
- Berghoff, C. F., Cortizo, M. S., & Cortizo, A. M. (2009). Interaction studies of mixed matrices of Chitosanpoly-ε-Caprolactone and Alendronate for bone tissue engineering. In *Proceedings of the 9th International Conference of the European Chitin Society*.
- Berghoff, C. F. (2011). *Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas).
- Bezzi, G., Celotti, G., Landi, E., La Torretta, T. M. G., Sopyan, I., & Tampieri, A. (2003). A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. *Materials Chemistry and Physics*, 78(3), 816-824.
- Billström, G. H., Blom, A. W., Larsson, S., & Beswick, A. D. (2013). Application of scaffolds for bone regeneration strategies: current trends and future directions. *Injury*, 44, S28-S33.
- Boerckel, J. D., Mason, D. E., McDermott, A. M., & Alsberg, E. (2014). Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. *Stem cell research & therapy*, 5(6), 144.
- Bof, M. J., Bordagaray, V. C., Locaso, D. E., & García, M. A. (2015). Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food hydrocolloids*, 51, 281-294.
- Bonfield, W., Grynpas, M. D., Tully, A. E., Bowman, J., & Abram, J. (1981). Hydroxyapatite reinforced polyethylene--a mechanically compatible implant material for bone replacement. *Biomaterials*, 2(3), 185-186.
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 30(10), 546-554.
- Bostrom, R. D., & Mikos, A. G. (1997). Tissue engineering of bone. In *Synthetic biodegradable polymer scaffolds* (pp. 215-234). Birkhäuser Boston.
- Brown, W., & Henley, D. (1964). Studies on cellulose derivatives. Part IV. The configuration of the polyelectrolyte sodium carboxymethyl cellulose in aqueous sodium chloride solutions. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 79(1), 68-88.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Argüelles-Monal, W., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42(8), 3569-3580.
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1995). Bone biology. Part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *JBJS*, 77(8), 1256-1275.
- Burdick, J. A., & Anseth, K. S. (2002). Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 23(22), 4315-4323.
- Butler, M. J., & Sefton, M. V. (2007). Poly (butyl methacrylate-co-methacrylic acid) tissue engineering scaffold with pro-angiogenic potential in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 82(2), 265-273.
- C**
- Cai, K., Yao, K., Cui, Y., Lin, S., Yang, Z., Li, X., ... & Luo, J. (2002). Surface modification of poly (d, l-lactic acid) with chitosan and its effects on the culture of osteoblasts in vitro. *Journal of biomedical materials research*, 60(3), 398-404.



- Campana, V., Milano, G. I. U. S. E. P. P. E., Pagano, E., Barba, M., Cicione, C., Salonna, G., ... & Logroscino, G. (2014). Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), 2445-2461.
- Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine*, 7(6), 259-264.
- Cascalho, M., Ogle, B. M., & Platt, J. L. (2006). The future of organ transplantation. *Annals of transplantation*, 11(2), 44-47.
- Ceccaldi, C., Bushkalova, R., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Bourin, P., ... & Sallerin, B. (2014). Evaluation of polyelectrolyte complex-based scaffolds for mesenchymal stem cell therapy in cardiac ischemia treatment. *Acta biomaterialia*, 10(2), 901-911.
- Cediél, J. F., Cárdenas, M. H., & García, A. (2009). *Manual de histología: Tejidos fundamentales*. Universidad del Rosario.
- Centes, J. F. L., Zimeri, L. A. M., Navarro, M. A., & Posadas, Á. A. (2007). Obtención Y Uso De Quitosano Para Tratamientos Dérmicos A Partir De Exoesqueleto De Camarón. *Boletín Electrónico. Guatemala*.
- Chang, C., Duan, B., Cai, J., & Zhang, L. (2010). Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. *European polymer journal*, 46(1), 92-100.
- Chatelet, C., Damour, O., & Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, 22(3), 261-268.
- Chaussard, G., & Domard, A. (2004). New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules*, 5(2), 559-564.
- Chen, G., Ushida, T., & Tateishi, T. (2002). Scaffold design for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, 2(2), 67-77.
- Chen, H., & Fan, M. (2007). Chitosan/carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex scaffolds for pulp cells regeneration. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 22(5), 475-491.
- Chen, J. L., & Zhao, Y. (2012). Effect of molecular weight, acid, and plasticizer on the physicochemical and antibacterial properties of β -chitosan based films. *Journal of food science*, 77(5), E127-E136.
- Chen, P. Y., & McKittrick, J. (2011). Compressive mechanical properties of demineralized and deproteinized cancellous bone. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 4(7), 961-973.
- Chen, Q. Z., Thompson, I. D., & Boccaccini, A. R. (2006). 45S5 Bioglass[®]-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(11), 2414-2425.
- Cheung, H. Y., Lau, K. T., Lu, T. P., & Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3), 291-300.
- Chuang, H. C., Cho, D. Y., Chang, C. S., Lee, W. Y., Jung-Chung, C., Lee, H. C., & Chen, C. C. (2006). Efficacy and safety of the use of titanium mesh cages and anterior cervical plates for interbody fusion after anterior cervical corpectomy. *Surgical neurology*, 65(5), 464-471.
- Cifani, N., Chronopoulou, L., Pompili, B., Di Martino, A., Bordi, F., Sennato, S., ... & Ascenzioni, F. (2015). Improved stability and efficacy of chitosan/pDNA complexes for gene delivery. *Biotechnology letters*, 37(3), 557-565.
- Coimbra, P., Alves, P., Valente, T. A. M., Santos, R., Correia, I. J., & Ferreira, P. (2011). Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization. *International journal of biological macromolecules*, 49(4), 573-579.
- Cortizo AM, Ruderman G, Correa G, Mogilner IG, Tolosa EJ, Effect of surface topography of collagen scaffolds on cytotoxicity and osteoblast differentiation, *J. Biomater. Tissue Eng.* 2 (2012) 125–132.



- Cortizo, M. S., Berghoff, C. F., & Alessandrini, J. L. (2008). Characterization of chitin from *Illex argentinus* squid pen. *Carbohydrate polymers*, 74(1), 10-15.
- Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472-481.
- Costa-Pinto, A. R., Reis, R. L., & Neves, N. M. (2011). Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(5), 331-347.
- Cox, S. C., Thornby, J. A., Gibbons, G. J., Williams, M. A., & Mallick, K. K. (2015). 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 47, 237-247.
- CRC Handbook of Chemistry and Physics, 67th edition. CRC Press, pag F110.
- Cristino, S., Grassi, F., Toneguzzi, S., Piacentini, A., Grigolo, B., Santi, S., ... & Lisignoli, G. (2005). Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11®-based prototype ligament scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 73(3), 275-283.
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792.
- Czechowska-Biskup, R., Rokita, B., Lotfy, S., Ulanski, P., & Rosiak, J. M. (2005). Degradation of chitosan and starch by 360-kHz ultrasound. *Carbohydrate Polymers*, 60(2), 175-184.

D

- Darling, A. L., & Sun, W. (2004). 3D microtomographic characterization of precision extruded poly-ε-caprolactone scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 70(2), 311-317.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*, 61(5), 577-587.
- De la Paz, N., Fernández, M., López, O. D., Nogueira, A., García, C. M., Pérez, D., ... & Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 13(3), 103-116.
- De Oliveira, H. C. L., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2008). Chitosan-poly (acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes: preparation, characterization and permeability studies. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(2), 143-160.
- De Moura, C. M., de Moura, J. M., Soares, N. M., & de Almeida Pinto, L. A. (2011). Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction: used to produce biofilm. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(4), 351-355.
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Garis, K. A., Kwon, G., Vazquez-Torres, A., Simon, A. D., ... & Corbett, J. A. (1996). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 271(1), 337-342.
- Depan, D. (2015). *Biodegradable polymeric nanocomposites: advances in biomedical applications*. CRC Press.
- Deville, S., Saiz, E., & Tomsia, A. P. (2006). Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(32), 5480-5489.



Discher, D. E., Mooney, D. J., & Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 324(5935), 1673-1677.

Dodane, V., & Vilivalam, V. D. (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(6), 246-253.

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

Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.

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

E

Eingartner, C. (2007). Current trends in total hip arthroplasty. *Ortop Traumatol Rehabil*, 9(1), 8-14.

F

Faraj, K. A., Cuijpers, V. M., Wismans, R. G., Walboomers, X. F., Jansen, J. A., van Kuppevelt, T. H., & Daamen, W. F. (2009). Micro-computed tomographical imaging of soft biological materials using contrast techniques. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 15(3), 493-499.

Feldkamp, L. A., Davis, L. C., & Kress, J. W. (1984). Practical cone-beam algorithm. *Josa a*, 1(6), 612-619.

Felt, O., Furrer, P., Mayer, J. M., Plazonnet, B., Buri, P., & Gurny, R. (1999). Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of precorneal retention. *International journal of pharmaceutics*, 180(2), 185-193.

Feng, W., & Isayev, A. I. (2004). In situ compatibilization of PP/EPDM blends during ultrasound aided extrusion. *Polymer*, 45(4), 1207-1216.

Feng, Z., Yamato, M., Akutsu, T., Nakamura, T., Okano, T., & Umezue, M. (2003). Investigation on the mechanical properties of contracted collagen gels as a scaffold for tissue engineering. *Artificial organs*, 27(1), 84-91.

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

Fernandez, J. M., Molinuevo, M. S., Cortizo, M. S., & Cortizo, A. M. (2011). Development of an osteoconductive PCL-PDIPF-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(6), e126-e135.

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

Ferraz, M. P., Monteiro, F. J., & Manuel, C. M. (2004). Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2(2), 74-80.

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

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

Fukumoto, S., & Martin, T. J. (2009). Bone as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(5), 230-236.



Funkhouser, J. D., & Aronson, N. N. (2007). Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 96.

G

Ganji, F., VASHEGHANI, F. S., & VASHEGHANI, F. E. (2010). Theoretical description of hydrogel swelling: a review.

Gansel, J. K., Thiel, M., Rill, M. S., Decker, M., Bade, K., Saile, V., ... & Wegener, M. (2009). Gold helix photonic metamaterial as broadband circular polarizer. *Science*, 325(5947), 1513-1515.

Giannoudis, Peter V., Haralambos Dinopoulos, and Eleftherios Tsiridis. "Bone substitutes: an update." *Injury* 36.3 (2005): S20-S27.

Gierszewska-Drużyńska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. (2012). Mechanism of water diffusion into noncrosslinked and ionically crosslinked chitosan membranes. *Prog Chem Appl Chitin Deriv*, 17, 59-66.

Giussi, J. M., Allegretti, P. E., & Cortizo, M. S. (2012). New copolymers of a tautomerizable β -ketonitrile monomer: Synthesis, characterization and solution tautomerism. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(20), 4161-4169.

Godbey, W. T., & Atala, A. (2002). In vitro systems for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961(1), 10-26.

Gogate, P. R., & Prajapat, A. L. (2015). Depolymerization using sonochemical reactors: a critical review. *Ultrasonics sonochemistry*, 27, 480-494.

Grönroos, A., Pirkonen, P., & Ruppert, O. (2004). Ultrasonic depolymerization of aqueous carboxymethylcellulose. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(1), 9-12.

Grynepas, M. D., Pilliar, R. M., Kandel, R. A., Renlund, R., Filiaggi, M., & Dumitriu, M. (2002). Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications in vivo studies. *Biomaterials*, 23(9), 2063-2070.

Guldberg, R. E., Ballock, R. T., Boyan, B. D., Duvall, C. L., Lin, A. S., Nagaraja, S., ... & Taylor, W. R. (2003). Analyzing bone, blood vessels, and biomaterials with microcomputed tomography. *IEEE engineering in medicine and biology magazine*, 22(5), 77-83.

Guntur, A., & Rosen, C. (2012). Bone as an endocrine organ. *Endocrine Practice*, 18(5), 758-762.

H

Han, G., Müller, W. E., Wang, X., Lilja, L., & Shen, Z. (2015). Porous titania surfaces on titanium with hierarchical macro-and mesoporosities for enhancing cell adhesion, proliferation and mineralization. *Materials Science and Engineering: C*, 47, 376-383.

Hamman, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine drugs*, 8(4), 1305-1322.

Harrison, B. S., & Atala, A. (2007). Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(2), 344-353.

He, W., Gonsalves, K. E., Batina, N., Poker, D. B., Alexander, E., & Hudson, M. (2003). Micro/nanomachining of polymer surface for promoting osteoblast cell adhesion. *Biomedical Microdevices*, 5(2), 101-108.

Hobuss, C. B., Venzke, D., Pacheco, B. S., Souza, A. O., Santos, M. A., Moura, S., ... & Pereira, C. M. (2012). Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), 387-389.

Hoogendam, C. W., De Keizer, A., Cohen Stuart, M. A., Bijsterbosch, B. H., Smit, J. A. M., Van Dijk, J. A. P. P., ... & Batelaan, J. G. (1998). Persistence length of carboxymethyl cellulose as evaluated from size exclusion chromatography and potentiometric titrations. *Macromolecules*, 31(18), 6297-6309.



Hou, F., Fan, L., Ma, X., Wang, D., Wang, W., Ding, T., ... & Liu, D. (2018). Degradation of carboxymethylcellulose using ultrasound and β -glucanase: Pathways, kinetics and hydrolysates' properties. *Carbohydrate polymers*, 201, 514-521.

Huerta, A. C., Rincón, M. C., Inciarte, A. C., & López, A. (2012). Obtención y caracterización de películas de quitosano elaborado a partir de los desechos de la industria cangrejera. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(3), 77-88.

Hull, D., & Clyne, T. (1996). Strength of composites. In *An Introduction to Composite Materials* (Cambridge Solid State Science Series, pp. 158-207). Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9781139170130.010

I

Il'ina, A. V., & Varlamov, V. P. (2005). Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(1), 5-11.

Ilium, L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical research*, 15(9), 1326-1331.

Imre, B., & Pukánszky, B. (2013). Compatibilization in bio-based and biodegradable polymer blends. *European Polymer Journal*, 49(6), 1215-1233.

Ishaug, S. L., Crane, G. M., Miller, M. J., Yasko, A. W., Yaszemski, M. J., & Mikos, A. G. (1997). Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *Journal of biomedical materials research*, 36(1), 17-28.

Ito, T., Yeo, Y., Highley, C. B., Bellas, E., Benitez, C. A., & Kohane, D. S. (2007). The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives. *Biomaterials*, 28(6), 975-983.

J

Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 227-232.

Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. V., & Tamura, H. (2010). Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology advances*, 28(1), 142-150.

Jones, J. R., & Hench, L. L. (2003). Regeneration of trabecular bone using porous ceramics. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7(4-5), 301-307.

K

Kara, F., Demirel, G., & Tümtürk, H. (2006). Immobilization of urease by using chitosan–alginate and poly (acrylamide-co-acrylic acid)/ κ -carrageenan supports. *Bioprocess and biosystems engineering*, 29(3), 207-211.

Karsenty, G. (2014). Bone as an endocrine organ. In *Cellular Endocrinology in Health and Disease* (pp. 193-205).

Kenley, R. A., Yim, K., Abrams, J., Ron, E., Turek, T., Marden, L. J., & Hollinger, J. O. (1993). Biotechnology and bone graft substitutes. *Pharmaceutical Research*, 10(10), 1393-1401.

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

Kim, H. L., Jung, G. Y., Yoon, J. H., Han, J. S., Park, Y. J., Kim, D. G., ... & Kim, D. J. (2015). Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 54, 20-25.



- Kim, S. J., Lee, K. J., & Kim, S. I. (2004). Swelling behavior of polyelectrolyte complex hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of applied polymer science*, 93(3), 1097-1101.
- Kim, S. S., Park, M. S., Jeon, O., Choi, C. Y., & Kim, B. S. (2006). Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(8), 1399-1409.
- Kim, S. S., Ahn, K. M., Park, M. S., Lee, J. H., Choi, C. Y., & Kim, B. S. (2007). A poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 80(1), 206-215.
- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*, 26(1), 1-21.
- Koda, S., Taguchi, K., & Futamura, K. (2011). Effects of frequency and a radical scavenger on ultrasonic degradation of water-soluble polymers. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(1), 276-281.
- Kong, L., Gao, Y., Cao, W., Gong, Y., Zhao, N., & Zhang, X. (2005). Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(2), 275-282.
- Kretlow, J. D., Klouda, L., & Mikos, A. G. (2007). Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 59(4-5), 263-273.
- Kurita, K., Tomita, K., Tada, T., Ishii, S., Nishimura, S. I., & Shimoda, K. (1993). Squid chitin as a potential alternative chitin source: deacetylation behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(2), 485-491.
- Kurita, K. (2001). Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer science*, 26(9), 1921-1971.
- L**
- Lange, R., Lüthen, F., Beck, U., Rychly, J., Baumann, A., & Nebe, B. (2002). Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. *Biomolecular engineering*, 19(2-6), 255-261.
- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., & Cortizo, M. S. (2013). DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE INGENIERÍA DE TEJIDOS PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO CARTILAGINOSO. *The Journal of the Argentine Chemical Society*, 100, 96-98.
- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., & Cortizo, M. S. (2014). Biocompatibilidad de matrices basadas en polifumaratos para regeneración del tejido ósteo-cartilaginoso. In *Investigación Joven* (Vol. 1).
- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Cortizo, A. M., & Cortizo, M. S. (2017). Fumarate Copolymer–Chitosan Cross-Linked Scaffold Directed to Osteochondrogenic Tissue Engineering. *Macromolecular bioscience*, 17(5).
- Lastra, M. L., Molinuevo, M. S., Blaszczyk-Lezak, I., Mijangos, C., & Cortizo, M. S. (2018). Nanostructured fumarate copolymer-chitosan crosslinked scaffold: An in vitro osteochondrogenesis regeneration study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(2), 570-579.
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M. A., Borden, M. D., & Cooper Jr, J. A. (1999). Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering*, 1(1), 19-46.
- Laurienzo, P., Fernandes, J. C., Collic-Jouault, S., & Fitton, J. H. (2015). The use of natural polysaccharides as biomaterials. *BioMed research international*, 2015.
- Lebovitz, A. H., Gray, M. K., Chen, A. C., & Torkelson, J. M. (2003). Interpolymer radical coupling reactions during sonication of polymer solutions. *Polymer*, 44(10), 2823-2828.



- Lee, J. H., Nho, Y. C., Lim, Y. M., & Son, T. I. (2005). Prevention of surgical adhesions with barriers of carboxymethylcellulose and poly (ethylene glycol) hydrogels synthesized by irradiation. *Journal of applied polymer science*, 96(4), 1138-1145.
- Lee, J. H., & Jeong, B. O. (2011). The effect of hyaluronate-carboxymethyl cellulose on bone graft substitute healing in a rat spinal fusion model. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 50(5), 409.
- Lee, J. S., Baek, S. D., Venkatesan, J., Bhatnagar, I., Chang, H. K., Kim, H. T., & Kim, S. K. (2014). In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 67, 360-366.
- Lee, J. Y., Kim, K. H., Shin, S. Y., Rhyu, I. C., Lee, Y. M., Park, Y. J., ... & Lee, S. J. (2006). Enhanced bone formation by transforming growth factor- β 1-releasing collagen/chitosan microgranules. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 76(3), 530-539.
- LeGeros, R. Z. (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 395, 81-98.
- Leong, K. F., Cheah, C. M., & Chua, C. K. (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24(13), 2363-2378.
- Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2014). Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- Li, Y., Li, J., Guo, S., & Li, H. (2005). Mechanochemical degradation kinetics of high-density polyethylene melt and its mechanism in the presence of ultrasonic irradiation. *Ultrasonics sonochemistry*, 12(3), 183-189.
- Lima, P. A. L., Resende, C. X., de Almeida Soares, G. D., Anselme, K., & Almeida, L. E. (2013). Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 33(6), 3389-3395.
- Lind, M., & Büniger, C. (2001). Factors stimulating bone formation. *European Spine Journal*, 10(2), S102-S109.
- Little, C. J., Bawolin, N. K., & Chen, X. (2011). Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 17(4), 213-227.
- Lizarbe, M. A. (2007). Sustitutivos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular. *Rev R Acad Cienc Exact Fís Nat (Esp)*, 101(1), 227-249.
- Luo, Y., & Wang, Q. (2014). Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International journal of biological macromolecules*, 64, 353-367.

M

- Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H., & Horiuchi, N. (2004). Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 92(3), 458-471.
- Manjubala, I., Basu, P., & Narendrakumar, U. (2018). In situ synthesis of hydroxyapatite/carboxymethyl cellulose composites for bone regeneration applications. *Colloid and Polymer Science*, 296(10), 1729-1737.
- Manolagas, S. C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 21(2), 115-137.
- Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., & De Yao, K. (2003). Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074.



Mapili, G., Lu, Y., Chen, S., & Roy, K. (2005). Laser-layered microfabrication of spatially patterned functionalized tissue-engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 75(2), 414-424.

Marx-Figini, M. (1997). Studies on the ultrasonic degradation of cellulose macromolecular properties. *Die Angewandte Makromolekulare Chemie: Applied Macromolecular Chemistry and Physics*, 250(1), 85-92.

Mikos, A. G., Bao, Y., Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1993). Preparation of poly (glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of biomedical materials research*, 27(2), 183-189.

Mikos, A. G., Lyman, M. D., Freed, L. E., & Langer, R. (1994). Wetting of poly (L-lactic acid) and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. *Biomaterials*, 15(1), 55-58.

Mohammadi, Y., Soleimani, M., Fallahi-Sichani, M., Gazme, A., Haddadi-Asl, V., Arefian, E., ... & Ahmadbeigi, N. (2007). Nanofibrous poly (ϵ -caprolactone)/poly (vinyl alcohol)/chitosan hybrid scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *The International journal of artificial organs*, 30(3), 204-211.

Mohod, A. V., & Gogate, P. R. (2011). Ultrasonic degradation of polymers: effect of operating parameters and intensification using additives for carboxymethyl cellulose (CMC) and polyvinyl alcohol (PVA). *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(3), 727-734.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Muzzarelli, R. A., El Mehtedi, M., Bottegoni, C., Aquili, A., & Gigante, A. (2015). Genipin-crosslinked chitosan gels and scaffolds for tissue engineering and regeneration of cartilage and bone. *Marine drugs*, 13(12), 7314-7338.

N

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2005). Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. In *Tissue engineering I* (pp. 47-90). Springer, Berlin, Heidelberg.

Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.

Niekraszewicz, A. (2005). Chitosan medical dressings. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 13(6), 54.

O

Oatis, C. A. (2004). *Kinesiology: the mechanics and pathomechanics of human movement* (pp. 688-9). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Oh, J. S., Isayev, A. I., & Rogunova, M. A. (2003). Continuous ultrasonic process for in situ compatibilization of polypropylene/natural rubber blends. *Polymer*, 44(8), 2337-2349.

Okamoto, M., & John, B. (2013). Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1487-1503.

Oliveira, J. M., Rodrigues, M. T., Silva, S. S., Malafaya, P. B., Gomes, M. E., Viegas, C. A., ... & Reis, R. L. (2006). Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 27(36), 6123-6137.

Oliveira, S. M., Mijares, D. Q., Turner, G., Amaral, I. F., Barbosa, M. A., & Teixeira, C. C. (2008). Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Engineering Part A*, 15(3), 635-643.



Ooi, C. Y., Hamdi, M., & Ramesh, S. (2007). Properties of hydroxyapatite produced by annealing of bovine bone. *Ceramics international*, 33(7), 1171-1177.

P

Pasparakis, G., & Bouropoulos, N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *International journal of pharmaceutics*, 323(1-2), 34-42.

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

Patashnk, S., Rabinovich, L., & Golomb, G. (1997). Preparation and evaluation of chitosan microspheres containing bisphosphonates. *Journal of drug targeting*, 4(6), 371-380.

Pattnaik, S., Nethala, S., Tripathi, A., Saravanan, S., Moorthi, A., & Selvamurugan, N. (2011). Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 49(5), 1167-1172.

Perez, R. A., Won, J. E., Knowles, J. C., & Kim, H. W. (2013). Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 65(4), 471-496.

Perka, C., Schultz, O., Spitzer, R. S., Lindenhayn, K., Burmester, G. R., & Sittinger, M. (2000). Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits. *Biomaterials*, 21(11), 1145-1153.

Peter, M., Binulal, N. S., Nair, S. V., Selvamurugan, N., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 158(2), 353-361.

Price, G. J., & Smith, P. F. (1993). Ultrasonic degradation of polymer solutions—III. The effect of changing solvent and solution concentration. *European polymer journal*, 29(2-3), 419-424.

Q

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

R

Ramandi, H. L., Mostaghimi, P., Armstrong, R. T., Saadatfar, M., & Pinczewski, W. V. (2016). Porosity and permeability characterization of coal: a micro-computed tomography study. *International Journal of Coal Geology*, 154, 57-68.

Rebelo, R., Fernandes, M., & Figueiro, R. (2017). Biopolymers in medical implants: a brief review. *Procedia Engineering*, 200, 236-243.

Reeves, R., Ribeiro, A., Lombardo, L., Boyer, R., & Leach, J. B. (2010). Synthesis and characterization of carboxymethylcellulose-methacrylate hydrogel cell scaffolds. *Polymers*, 2(3), 252-264.

Reynolds, M. A., Aichelmann-Reidy, M. E., Kassolis, J. D., Prasad, H. S., & Rohrer, M. D. (2007). Calcium sulfate–carboxymethylcellulose bone graft binder: Histologic and morphometric evaluation in a critical size defect. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 83(2), 451-458.

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

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



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

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

Rizzi, S. C., Heath, D. J., Coombes, A. G. A., Bock, N., Textor, M., & Downes, S. (2001). Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 55(4), 475-486.

Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D. A., & Quiñones-Olvera, L. F. (2015). Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine. *BioMed research international*, 2015.

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

S

Sagnella, S., Anderson, E., Sanabria, N., Marchant, R. E., & Kottke-Marchant, K. (2005). Human endothelial cell interaction with biomimetic surfactant polymers containing peptide ligands from the heparin binding domain of fibronectin. *Tissue engineering*, 11(1-2), 226-236.

Sainitya, R., Sriram, M., Kalyanaraman, V., Dhivya, S., Saravanan, S., Vairamani, M., ... & Selvamurugan, N. (2015). Scaffolds containing chitosan/carboxymethyl cellulose/mesoporous wollastonite for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 80, 481-488.

Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular bioscience*, 4(8), 743-765.

Saravanan, S., Leena, R. S., & Selvamurugan, N. (2016). Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1354-1365.

Sato, M., Asada, N., Kawano, Y., Wakahashi, K., Minagawa, K., Kawano, H., ... & Katayama, Y. (2013). Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell metabolism*, 18(5), 749-758.

Seol, Y. J., Lee, J. Y., Park, Y. J., Lee, Y. M., Rhyu, I. C., Lee, S. J., ... & Chung, C. P. (2004). Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology letters*, 26(13), 1037-1041.

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

Sharma, C., Dinda, A. K., Potdar, P. D., Chou, C. F., & Mishra, N. C. (2016). Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 64, 416-427.

Shearer, T., Bradley, R. S., Hidalgo-Bastida, L. A., Sherratt, M. J., & Cartmell, S. H. (2016). Three-dimensional visualisation of soft biological structures by X-ray computed micro-tomography. *J Cell Sci*, 129(13), 2483-2492.

Shelke, N. B., James, R., Laurencin, C. T., & Kumbar, S. G. (2014). Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(5), 448-460.

Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., & Cheng, T. (2006). Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine1. *Journal of Surgical research*, 133(2), 185-192.

Shin, H., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, 24(24), 4353-4364.



- Shin, H., Ruhe, P. Q., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2003). In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *Biomaterials*, 24(19), 3201-3211.
- Shokri, S., Movahedi, B., Rafieinia, M., & Salehi, H. (2015). A new approach to fabrication of Cs/BG/CNT nanocomposite scaffold towards bone tissue engineering and evaluation of its properties. *Applied Surface Science*, 357, 1758-1764.
- Shung, A. K., Behraves, E., Jo, S., & Mikos, A. G. (2003). Crosslinking characteristics of and cell adhesion to an injectable poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogel using a water-soluble crosslinking system. *Tissue engineering*, 9(2), 243-254.
- Singh, B. N. (2017). *Development of Novel Silk Fibroin/Carboxymethyl Cellulose Based Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Bone Tissue Engineering Application* (Doctoral dissertation).
- Song, J., Suh, C. H., Park, Y. B., Lee, S. H., Yoo, N. C., Lee, J. D., ... & Lee, S. K. (2001). A phase I/IIa study on intra-articular injection of holmium-166-chitosan complex for the treatment of knee synovitis of rheumatoid arthritis. *European journal of nuclear medicine*, 28(4), 489-497.
- Sowjanya, J. A., Singh, J., Mohita, T., Sarvanan, S., Moorthi, A., Srinivasan, N., & Selvamurugan, N. (2013). Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109, 294-300.
- Strong, D. M., Friedlaender, G. E., Tomford, W. W., Springfield, D. S., Shives, T. C., Burchardt, H., ... & Mankin, H. J. (1996). Immunologic responses in human recipients of osseous and osteochondral allografts. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 326, 107-114.
- Sudo, H., Kodama, H. A., Amagai, Y., Yamamoto, S., & Kasai, S. (1983). In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology*, 96(1), 191-198.
- Suprarakmi, D. D., & Sudrajat, B. A. (2015). Kinetic study on esterification of oleic acid with ultrasound assisted. *Procedia Environmental Sciences*, 23, 78-85.
- Suslick, K. S., & Price, G. J. (1999). Applications of ultrasound to materials chemistry. *Annual Review of Materials Science*, 29(1), 295-326.
- T**
- Tabata, M., Miyazawa, T., Kobayashi, O., & Sohma, J. (1980). Direct evidence of main-chain scissions induced by ultrasonic irradiation of benzene solutions of polymers. *Chemical Physics Letters*, 73(1), 178-180.
- Taghizadeh, M. T., Rad, H., & Abdollahi, R. (2012). A kinetic study of ultrasonic degradation of carboxymethyl cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(3), 1896-1904.
- Tamburaci, S., Kimna, C., & Tihminioglu, F. (2018). Novel phytochemical *Cissus quadrangularis* extract-loaded chitosan/Na-carboxymethyl cellulose-based scaffolds for bone regeneration. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(6), 629-646.
- Tapia, C., Escobar, Z., Costa, E., Sapag-Hagar, J., Valenzuela, F., Basualto, C., ... & Yazdani-Pedram, M. (2004). Comparative studies on polyelectrolyte complexes and mixtures of chitosan-alginate and chitosan-carrageenan as prolonged diltiazem clorhydrate release systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 57(1), 65-75.
- Tarafder, S., Balla, V. K., Davies, N. M., Bandyopadhyay, A., & Bose, S. (2013). Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 7(8), 631-641.
- Teimouri, A., Ebrahimi, R., Emadi, R., Beni, B. H., & Chermahini, A. N. (2015). Nano-composite of silk fibroin-chitosan/Nano ZrO₂ for tissue engineering applications: Fabrication and morphology. *International journal of biological macromolecules*, 76, 292-302.



Thomas, J. R. (1959). Sonic degradation of high polymers in solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 63(10), 1725-1729.

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

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana.

Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British journal of cancer*, 56(3), 279.

V

Vallet-Regí, M. (2003). Biocerámicas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 2, pp. 167-175). Real Sociedad Española de Química.

Van Eldik, R., & Hubbard, C. D. (Eds.). (1996). *Chemistry under extreme and non-classical conditions*. John Wiley & Sons.

Van den Broek, L. A., Knoop, R. J., Kappen, F. H., & Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate polymers*, 116, 237-242.

Vasco, S. R., Isaza, C. A. V., Suaza, M. L. M., Giraldo, J. Z., & Acevedo, M. E. M. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Instituto Tecnológico Metropolitano.

Vimalraj, S., Saravanan, S., Vairamani, M., Gopalakrishnan, C., Sastry, T. P., & Selvamurugan, N. (2016). A combinatorial effect of carboxymethyl cellulose based scaffold and microRNA-15b on osteoblast differentiation. *International journal of biological macromolecules*, 93, 1457-1464.

W

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., & Franceschi, R. T. (1999). Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(6), 893-903

Wang, M. (2003). Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*, 24(13), 2133-2151.

Welsch, U., & Sobotta, J. (2008). *Histología*. Ed. Médica Panamericana.

Wen, Y., Grøndahl, L., Gallego, M. R., Jorgensen, L., Møller, E. H., & Nielsen, H. M. (2012). Delivery of dermatan sulfate from polyelectrolyte complex-containing alginate composite microspheres for tissue regeneration. *Biomacromolecules*, 13(3), 905-917

Wedmore, I., McManus, J. G., Pusateri, A. E., & Holcomb, J. B. (2006). A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 60(3), 655-658.

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

Wu, S., Liu, X., Yeung, K. W., Liu, C., & Yang, X. (2014). Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, 1-36.

X

Xu, H., Ma, L., Shi, H., Gao, C., & Han, C. (2007). Chitosan-hyaluronic acid hybrid film as a novel wound dressing: in vitro and in vivo studies. *Polymers for advanced technologies*, 18(11), 869-875.



Y

Yamaguchi, K., Prabakaran, M., Ke, M., Gang, X., Chung, I. M., Um, I. C., ... & Kim, I. S. (2016). Highly dispersed nanoscale hydroxyapatite on cellulose nanofibers for bone regeneration. *Materials Letters*, *168*, 56-61.

Yang, M., Yang, Y., Liu, B., Shen, G., y Yu, R. (2004). Biosensor de glucosa amperométrico basado en quitosano con selectividad y estabilidad mejoradas. *Sensores y actuadores B: Chemical*, *101* (3), 269-276.

Yang, Y. G., & Sykes, M. (2007). Xenotransplantation: current status and a perspective on the future. *Nature Reviews Immunology*, *7*(7), 519.

Yang, X., Chen, X., & Wang, H. (2009). Acceleration of osteogenic differentiation of preosteoblastic cells by chitosan containing nanofibrous scaffolds. *Biomacromolecules*, *10*(10), 2772-2778

Yin, Y. J., Yao, K. D., Cheng, G. X., & Ma, J. B. (1999). Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polymer international*, *48*(6), 429-432.

Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International journal of food microbiology*, *185*, 57-63.

Z

Zhang, Y., Ni, M., Zhang, M., & Ratner, B. (2003). Calcium phosphate—chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Tissue engineering*, *9*(2), 337-345.

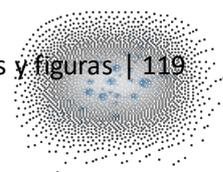
Zhang, J., Lu, X., Feng, G., Gu, Z., Sun, Y., Bao, G., ... & Feng, X. (2016). Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell and tissue research*, *366*(1), 129-142.

Zhao, Q., Qian, J., An, Q., Gao, C., Gui, Z., & Jin, H. (2009). Synthesis and characterization of soluble chitosan/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complexes and the pervaporation dehydration of their homogeneous membranes. *Journal of Membrane Science*, *333*(1-2), 68-78.

Zhou, C., & Wu, Q. (2011). A novel polyacrylamide nanocomposite hydrogel reinforced with natural chitosan nanofibers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *84*(1), 155-162.



INDICE DE FIGURAS, ESQUEMAS Y TABLAS



INDICE DE FIGURAS

Figura I.1: Representación esquemática de las células asociadas con el hueso.	12
Figura I.2: Estructura de un hueso largo.	16
Figura I.3: Triada de la Ingeniería de Tejidos Óseos.	24
Figura II.1: Evolución de los cambios relativos en la viscosidad intrínseca de las muestras de CMC y Qo estudiadas como una función del tiempo de sonicación.	51
Figura II.2: Espectro FTIR (desde 1800 a 600cm ⁻¹) de Qo, CMC, PEC y PEC-US.	53
Figura II.3: Micrografías SEM de la superficie y las secciones transversales de PEC-US y PEC. Distribución del tamaño de poro de los andamios PEC y PEC-US.	55
Figura II.4: A) Cinética de hinchamiento para las matrices PEC y PEC-US. B) Gráfico log (W t / W [∞]) versus log t a partir de los datos experimentales obtenidos en la etapa inicial de la figura II.4.A, para PEC y PEC-U.	58
Figura II.5: Porcentaje de degradación de las matrices PEC y PEC-US expresado como porcentaje de pérdida de peso a 7 días, en PBS a 37°C.	60
Figura II.6: Fuerza de Compresión y Módulo Elástico de las matrices PEC y PEC-US.	62
Figura II.7.: Fotografías representativas de células MC3T3-E1 cultivadas sobre matrices PEC (A) y PEC-US (B), durante 72hs. Objetivo 10X.	64
Figura II.8: Morfología de células RAW 264.7 fotografiadas con un aumento de 100X.	65
Figura II.9: Proliferación celular de macrófagos RAW 264.7, determinado por el ensayo MTT a 72hs, en matrices PEC y PEC-US.	66
Figura III.1: A) Imagen de SEM de HAp procesada mecánicamente. B) Gráfico de distribución del diámetro de partícula de HAp procesada por UT. C) Imagen de TEM de nHAp procesada por US. D) Gráfico de distribución del diámetro de partícula de nHAp procesada por US.	80
Figura III.2: Espectro FTIR de HAp.	82
Figura III.3: Espectro FTIR de HAp, de las matrices 0% PEC-US y de las matrices 5% PEC-US.	83

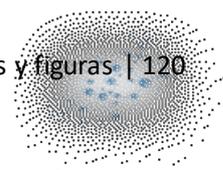
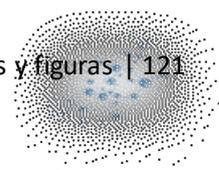


Figura III.4: Micrografías SEM de la superficie de las matrices sin nHAp y con 5 y 10% de nHAp aditivado.	84
Figura III.5: Principales componentes de un escáner de Micro-CT.	86
Figura III.6: Análisis tomográfico no destructivo en Micro-CT. Imágenes 2D de los andamios PEC-US sin nHAp; y PEC-US con 1, 3 y 5 % de nHAp aditivada.	87
Figura III.7: Reconstrucción 3D a través del software volumétrico de reconstrucción, de las imágenes obtenidas por Micro-CT de las matrices.	88
Figura III.8: Cinética de hinchamiento para las matrices PEC-US, sin el agregado de nHAp, y con 0,5; 1; 3; y 5% de nHAp aditivada	90
Figura III.9: Gráfico de degradación acelular a 7, 14 y 21 días, expresado como % de pérdida en peso para las distintas matrices PEC-US, con y sin el agregado de nHAp.	91
Figura III.10: Gráfico de proyección de degradación de las matrices PEC-US sin agregado de nHAP, y PEC-US con agregado de 1 y 5% nHAp.	92
Figura III.11: Módulo elástico (en MPa) obtenido en el ensayo mecánico de compresión para los distintos <i>scaffolds</i> .	93
Figura III.12: Micrografías obtenidas por SEM de las células RAW 264.7 crecidas sobre las matrices PEC-US sin nHAp, con 1% o con 5% de nHAp, durante 24hs.	95
Figura III.13: Viabilidad celular de RAW 264.7, por MTT a 24 y 48hs vs. Control.	96
Figura III.14: Producción de NO de RAW 264.7, luego de 24 y 48hs de cultivo vs. Control.	97
Figura III.15: Producción de IL1 β de RAW 264.7, luego de 48hs de cultivo vs. Control.	98

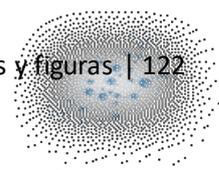


INDICE DE ESQUEMAS

Esquema II.1: Estructura química del quitosano.	34
Esquema II.2: Ilustración esquemática de la versatilidad del Qo.	35
Esquema II.3: Estructura química de la carboximetilcelulosa.	36
Esquema II.4: Esquema de la obtención de las matrices PEC y PEC-US.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Andamios osteoconductores.	21
Tabla II.1: Óxido nítrico (NO) producido por macrófagos <i>RAW 264.7</i> cultivados en placas de cultivo estándar (control), y en matrices PEC y PEC-US.	67



ABREVIATURAS:

BMA: Aspirado de médula ósea
BMPs: Proteínas morfogénicas del hueso (del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*)
BMU: Unidad multicelular básica
CFU-GM: Precursores hematopoyéticos mononucleares (del inglés *colony forming unit-granulocyte-macrophage*)
CMC: Carboximetilcelulosa
DA: Grado de acetilación
DBM: Matriz ósea desmineralizada
DMEM: Medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagles Media*
DMSO: Dimetilsulfóxido
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
FAL: Fosfatasa alcalina (Enzima)
FBS: Suero fetal bovino
FGF: Factores de crecimiento de fibroblastos
FT-IR: Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
GABA: Ácido gamma-aminobutírico
HAp: Hidroxiapatita
IGF I / II: Factor de crecimiento de insulina I y II
MEC: Matriz extracelular
MSCs: Células madre mesenquimales (del inglés *mesenchymal stem cells*)
MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
MW: Peso molecular (del inglés *Molecular weight*)
nHAp: Nano hidroxiapatita
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasas
PBS: Buffer fosfato estéril
PCL: Policaprolactona
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEC: Complejo polielectrolito
PEG: Polietilenglicol
PGA: Ácido poliglicólico
PLA: Ácido poliláctico
PMMA: Poli-metil metacrilato
Qo: Quitosano
SEM: Microscopía electrónica de barrido
TAC: Tomografía axial computarizada
TCP: Fosfato Tricálcico
TEM: Microscopía electrónica de transmisión
TGF- β : Factor de crecimiento transformante Beta
US: Ultrasonido

