



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN
METALURGIA Y MATERIALES**

PROGRAMA DE MAestrÍA EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES

“PREPARACIÓN DE ANDAMIOS DE PLA/ BIOGLASS® 45S5 OBTENIDOS POR EL
MÉTODO MODIFICADO DE SEPARACIÓN DE FASES INDUCIDO TÉRMICAMENTE
PARA APLICACIONES EN INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO”

TESIS

que para obtener el grado de
Maestro en Metalurgia y Ciencias de los Materiales presenta:

I.Q. NORA JANETH LÚA GÓMEZ

Director de Tesis:
Dra. ENA ATHENEA AGUILAR REYES

Co-asesor:
Dr. ROBIN A. L. DREW

Morelia, Michoacán, Febrero del 2017.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora de tesis la Dr. Ena Athenea Aguilar Reyes por la sugerencia del tema de tesis, por su apoyo con información invaluable, por su orientación durante todos estos meses y sobre todo por su paciencia y motivación.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico proporcionado para la realización de este proyecto de maestría.

Agradezco también a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales por las facilidades para la utilización de equipo e instalaciones, y sobre todo por el apoyo del cuerpo técnico, académico y administrativo.

Al Dr. Robin Drew por el apoyo y conocimientos brindados, además por facilitarme las instalaciones y equipos necesarios para la realización de la estancia de investigación en la Universidad de Concordia en Montreal, Canadá.

A los miembros de la mesa sinodal por brindarme su colaboración y apoyo para la culminación de este proyecto.

A todas las personas que no me es posible mencionar y que hicieron posible este trabajo.

El presente trabajo de Tesis se realizó en el IIMM de la UMSNH, que participa del financiamiento institucional de recursos del PFCE 2016.

El proyecto es parcialmente financiado con recursos del Proyecto CB-2013-C01-222262 “ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR IN VITRO DE ANDAMIOS DE BIOVIDRIO BIOACTIVO PRODUCIDOS POR TECNOLOGÍA DE POLVOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO”, aprobado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y hermano, por su gran apoyo durante toda mi vida, por todo lo que de ellos he aprendido, los valores que me han inculcado, y por haber sido un ejemplo a seguir en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	3
1.1.1 Objetivo general	3
1.1.2 Objetivos particulares	3
1.2 Justificación	3
1.3 Hipótesis	4
CAPÍTULO 2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE	5
2.1 Ingeniería de Tejidos	5
2.2 Composición y estructura del hueso	7
2.3 Andamios óseos	10
2.4 Materiales para andamios óseos	12
2.4.1 Bioglass® 45S5	14
2.4.1.1 Técnicas de fabricación de Vidrios Bioactivos	16
2.4.2 Polímeros sintéticos	17
2.5 Métodos de fabricación de andamios poliméricos	20
2.5.1 Colada y lixiviación de partículas	23
2.5.2 Liofilización de una emulsión	23
2.5.3 Electrospinning	23
2.5.4 Impresión 3D	24
2.5.5 Separación de fases	24
2.6 Andamios compuestos	27
2.7 Ensayos in vitro	30
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	36
3.1 Obtención de Bioglass® 45S5 mediante técnica de fusión y temple	37
3.2 Obtención de andamios PLA/ Bioglass® 45S5	38
3.3 Pruebas in vitro	40
3.4 Caracterización	42
3.4.1 Bioglass® 45S5	42

3.4.2 Andamios de PLA/ Bioglass® 45S5	43
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	46
4.1 Bioglass 45S5.....	46
4.1.1 Tamaño y distribución de partícula	46
4.1.2 Morfología	47
4.1.3 Difracción de rayos X y fluorescencia de rayos X.....	48
4.1.4 DSC, área superficial y densidad	49
4.2 Andamios porosos PLA/Bioglass® 45S5.....	51
4.2.1 Temple del PLA	51
4.2.2 Morfología	52
4.2.3 Tamaño de poro.....	54
4.2.4 Cristalinidad	56
4.2.5 Porosidad y densidad aparente	58
4.2.6 Área superficial	59
4.2.7 Ensayos de compresión.....	60
4.2.8 Estudios in vitro.....	66
5. CONCLUSIONES	75
TRABAJO A FUTURO O RECOMENDACIONES	77
REFERENCIAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 2.1	Sección transversal de un fémur humano ilustrando el hueso trabecular y cortical.....	9
Figura 2.2	Organización jerárquica del tejido óseo a través de las diferentes escalas de longitud	10
Figura 2.3	Diagrama composicional $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$	15
Figura 2.4	Micrografía de la típica forma de “coliflor” de la hidroxiapatita	17
Figura 2.5	Rutas de polimerización para obtención del ácido poliláctico	19
Figura 2.6	Morfologías típicas de andamios porosos preparados por diversos métodos..	21
Figura 2.7	Representación esquemática de un diagrama de fases ternario polímero-solvente-no solvente.....	26
Figura 2.8	Micrografías MEB de andamios de poliuretano-Hidroxiapatita desde una estructura anisotrópica obtenida por método TIPS a una estructura isotrópica por la adición de agua destilada como no solvente (Método TIPS modificado)	29
Figura 2.9	Panel A: Imágenes MEB de compósitos de PLA/TCP	34
Figura 2.10	Micrografía MEB de espuma compuesta de PDLLA/Bioglass (40 wt% Bioglass) después de 28 días de inmersión en SBF	35

CAPÍTULO 3

Figura 3.1	Diagrama esquematizado del procedimiento experimental	36
Figura 3.2	Ciclo térmico para la obtención de Bioglass® 45S5	37
Figura 3.3	Imágenes de las etapas de obtención de andamios PLA/ Bioglass® 45S5 mediante NTIPS	40

CAPÍTULO 4

Figura 4.1	Tamaño y distribución de partícula del Bioglass® 45S5.....	47
Figura 4.2	Micrografías por MEB del polvo triturado de Bioglass® 45S5 (a) 500x y (b) 2500x	48

Figura 4.3	Patrón de DRX del Bioglass® 45S5	49
Figura 4.4	Termograma DSC del Bioglass 45S5 después de la fusión y temple	50
Figura 4.5	Curvas DSC para el PLA antes y después del proceso de fusión y temple.....	51
Figura 4.6	Imágenes por MEB de los andamios porosos PLA/Bioglass® 45S5 con varios contenidos de PLA: (a) 18% PLA 1000x, (b) 13% PLA 500x, y (c) 13% PLA 1500x.....	53
Figura 4.7	Micrografía mostrando las partículas de Bioglass® 45S5 embebidas en la matriz polimérica de andamios con 13% PLA., (a) 2500x, (b) 1000x, y (c) 500x	54
Figura 4.8	Gráfica de los valores de cristalinidad calculados para cada composición	57
Figura 4.9	Patrón de difracción de rayos X del andamio 13% PLA-10% Bioglass	58
Figura 4.10	Curvas esfuerzo deformación para los andamios de PLA sin partículas de Bioglass	60
Figura 4.11	Curvas esfuerzo deformación para andamios de 23% PLA con 10% y 5% de Bioglass adicionado	61
Figura 4.12	Módulo de compresión de andamios PLA obtenidos por NTIPS a diferentes composiciones de Bioglass 45S5	64
Figura 4.13	Porcentaje de absorción de agua de los andamios con composición 13%PLA-5% Bioglass y 13%PLA-10% Bioglass a los diferentes periodos de incubación	67
Figura 4.14	Porcentaje de pérdida de peso de andamios con 13 % PLA-5 % Bioglass y 13 % PLA- 10% Bioglass a diferentes tiempos de inmersión	68
Figura 4.15	Gráfica del cambio en el pH de la solución SBF durante los primeros 10 días de incubación	71
Figura 4.16	Imágenes por MEB a 10000x de la formación y evolución de la HA en andamios de 13% PLA-5% Bioglass a tiempos de (a) 3 días y (b) 28 días de incubación en SBF	73
Figura 4.17	Imágenes por MEB de la formación de HA en la superficie de los andamios de 13% PLA-10% Bioglass después de 28 días de incubación en SBF. (a) 850x, (b) 1000x, (c) 2500x, y (d) 4000x	74

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 2

Tabla 2.1	Propiedades físicas del PLA	19
Tabla 2.2	Tecnologías de fabricación de andamios tridimensionales	22
Tabla 2.3	Ventajas y desventajas de algunas rutas de fabricación de andamios 3D con alta interconectividad	22
Tabla 2.4	Concentración iónica del plasma sanguíneo y SBF	30

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1	Reactivos y cantidades necesarios para la síntesis de 100 g de Bioglass® 45S5.....	37
Tabla 3.2	Composiciones de los andamios fabricados para su estudio	39
Tabla 3.3	Reactivos y cantidades necesarias para preparar 1 L de SBF	41

CAPÍTULO 4

Tabla 4.1	Composición química del Bioglass® 45S5 obtenida por XRF (% en peso)	49
Tabla 4.2	Tamaño de poro medio de los andamios	54
Tabla 4.3	Densidad y porosidad de los andamios PLA/Bioglass	59
Tabla 4.4	Área superficial de los andamios PLA/Bioglass® 45S5 (m ² /g)	59
Tabla 4.5	Esfuerzo máximo de andamios PLA/Bioglass 45S5, comprimidos hasta un 60 %	61
Tabla 4.6	Esfuerzo máximo de andamios PLA/Bioglass 45S5, comprimidos hasta un 80 %	65
Tabla 4.7	Valores promedio del módulo y esfuerzo último de hueso trabecular para varios sitios anatómicos	65
Tabla 4.8	Comparación entre pérdida de peso y absorción de agua de los andamios porosos de composición 13% PLA inmersos en SBF durante 28 días	69
Tabla 4.9	Esfuerzo máximo de andamios 13 % PLA con 5 % y 10 % de Bioglass antes y después de inmersión en SBF	72

RESUMEN

En el presente proyecto se han desarrollado estructuras tridimensionales altamente porosas de PLA/Bioglass® 45S5 para su uso en ingeniería de tejido óseo. Las partículas bioactivas de Bioglass® 45S5 fueron obtenidas por el método tradicional de fusión y temple, se obtuvieron partículas totalmente amorfas con un tamaño promedio de $9.7 \pm 2.8 \mu\text{m}$. La síntesis de los andamios se efectuó mediante la técnica de separación de fases térmicamente inducida por no sovente (NTIPS – *nonsolvent thermally-induced phase separation*), también conocida como método TIPS modificado. Se prepararon soluciones poliméricas con diversas concentraciones iniciales de ácido poliláctico (PLA) (13, 18 y 23 % en peso) y Bioglass® 45S5 (5 y 10 % en peso) en diclorometano con adición de hexano como no solvente, posteriormente se llevó a cabo la separación de fases por disminución de la temperatura del sistema hasta -20°C .

La separación de fases dio como resultado estructuras semicristalinas altamente porosas (>83%) con meso y macroporos (de hasta $120 \mu\text{m}$ para el sistema 13% PLA) interconectados observados mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Se realizaron pruebas de compresión para determinar el módulo y esfuerzo máximo a la compresión, el mayor esfuerzo a la compresión fue registrado para el andamio de 23% PLA con un valor de 24.17 MPa. Finalmente se realizaron estudios *in vitro* en fluido corporal simulado (SBF – *simulated body fluid*) para evaluar la degradación y bioactividad de los andamios con respecto al contenido de Bioglass®. Se monitoreó el cambio en pH del medio de incubación, así como la pérdida de peso y capacidad de absorción de agua de los andamios a 3, 7, 14 y 28 días de incubación. Se realizaron pruebas de compresión después de 28 días de incubación en SBF para evaluar el cambio en la resistencia. La formación de hidroxiapatita en la superficie de las espumas se observó mediante MEB.

Palabras clave: Ingeniería de tejidos, andamios para regeneración ósea, ácido poliláctico, Bioglass 45S5, separación de fases inducida térmicamente.

ABSTRACT

In the present study three-dimensional highly porous PLA/Bioglass® 45S5 structures have been developed to be used in bone tissue engineering. The bioactive Bioglass® 45S5 particles were synthesized by traditional melt-quench method, totally amorphous particles with a mean particle size of $9.7 \pm 2.8 \mu\text{m}$. The synthesis of the scaffolds was carried out by the nonsolvent thermally-induced phase separation also known as modified TIPS technique. Polymeric solutions with various initial concentrations of polylactic acid (PLA) (13, 18 and 23, wt%) and Bioglass® 45S5 (5 and 10, wt%) were prepared in dichloromethane with addition of hexane as a non-solvent, subsequently phase separation was carried out by lowering the system temperature to -20°C .

Phase separation resulted in highly porous ($> 83\%$) semicrystalline structures with meso and macropores (up to $120 \mu\text{m}$ for the 13% PLA system) observed by scanning electron microscopy (SEM). Compression tests were performed to determine the elastic modulus and maximum compressive stress, the largest compressive stress was recorded for the 23% PLA scaffold with a value of 24.17 MPa. Finally, in vitro studies were performed on simulated body fluid (SBF) to evaluate the degradation and bioactivity of the scaffolds based on the content of Bioglass. The change in pH of the incubation medium, as well as the weight loss and water absorption capacity of scaffolds at 3, 7, 14 and 28 days of incubation were monitored. Compression tests were performed after 28 days of incubation in SBF to evaluate the change in resistance. The formation of hydroxyapatite on the surface of the foams was observed by MEB.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Diariamente se realizan miles de intervenciones quirúrgicas para reparar o reemplazar tejido óseo que ha sido dañado por causas asociadas a enfermedades o accidentes, debido al importante papel que el tejido óseo juega en la locomoción, soporte y protección de los órganos vitales. Las técnicas actuales que involucran el autoinjerto (el receptor y el donante son el mismo individuo) o aloinjerto (el tejido se trasplanta de una persona a otra) son costosas, dolorosas y se puede llegar a presentar morbilidad del sitio donante o el rechazo del tejido. Es por ello la necesidad de encontrar alternativas a dichos procedimientos. El hueso puede regenerarse por sí mismo cuando se trata de defectos pequeños, pero en el caso de grandes zonas de tejido dañadas es necesario una estructura de soporte para lograr la regeneración. La ingeniería de tejidos que se ha definido como la aplicación de principios científicos para el diseño, construcción, modificación y crecimiento de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y factores, solos o en combinación es una alternativa prometedora en la regeneración de tejido dañado que involucra el desarrollo de estructuras sólidas porosas conocidas como andamios (*scaffolds*) que favorezcan y permitan la restauración o reparación del tejido evitando los problemas de los métodos convencionales antes mencionados [1].

Los andamios utilizados para la regeneración de tejido óseo deben cumplir con ciertos requerimientos: deben proveer de soporte mecánico temporal, tener una arquitectura porosa, una capacidad de degradación controlada, osteoconductividad para guiar el crecimiento del tejido natural y biocompatibilidad por sí mismos y de los productos que liberan durante su degradación de manera que no desencadene una respuesta inmunológica en el organismo. El reto científico abarca entender la fisiología de las propias células, sus necesidades de transporte de masa y entorno biológico, así como el desarrollo de materiales para andamios porosos adecuados, que actúen como plantillas para la adhesión celular, el crecimiento y la proliferación [2].

Desde su descubrimiento en 1969 por Hench [3] el Bioglass® 45S5 es uno de los materiales más utilizado para regeneración en ingeniería de tejido óseo debido a su biactividad clase A lo que le confiere la propiedad de formar uniones tanto con tejido blando como tejido duro en ambientes *in*

vivo. Varios tipos de polímeros sintéticos, entre ellos, el ácido poliláctico (PLA) y sus isómeros (PLLA, PDLA, PDLLA) han sido utilizados para fabricación de andamios en ingeniería de tejido óseo debido a sus propiedades mecánicas, reproducibilidad y biodegradabilidad.

Materiales compuestos de polímeros biodegradables con fases inorgánicas bioactivas como lo son los andamios de PLA/Bioglass® 45S5 son de gran interés para la ingeniería de tejidos ya que combinan las ventajas que presentan los polímeros sintéticos, entre las cuales se encuentran su gran flexibilidad y fácil procesamiento en diferentes tamaños y formas, y mediante la adición de Bioglass® 45S5 no solo le confiere bioactividad al andamio promoviendo la degradación y proliferación celular sino que se mejoran además las propiedades mecánicas debido a la naturaleza rígida del biovidrio [2].

Una de las características principales que debe mostrar un andamio para regeneración ósea es una alta porosidad. Andamios poliméricos obtenidos por el método de separación de fases tanto térmicamente inducida como por no solvente, han mostrado altas porosidades (~ 97%) con estructuras porosas altamente interconectadas [4].

Los estudios *in vitro* en medios con características similares a las de los fluidos fisiológicos y cultivos celulares constituyen la primera etapa que se suele realizar para ensayar la biocompatibilidad y bioactividad de los materiales. A través de pruebas de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) se puede evaluar la bioactividad del material mediante la formación de una capa de apatita en la superficie de éste lo cual indica que podría crear enlaces directos con el hueso a través de esta capa de apatita en un ambiente *in vivo*, por ello el recurrir a estos métodos permite obtener información preliminar sin la necesidad de sacrificar innecesariamente animales.

En el presente proyecto de investigación se desarrollaron estructuras porosas compuestas de ácido poliláctico (PLA)/Bioglass® 45S5 obtenidos por el método modificado de separación de fases térmicamente inducido por no solvente (NTIPS) y se realizaron las correspondientes caracterizaciones y pruebas *in vitro* bajo diferentes tiempos de inmersión en fluido corporal simulado (SBF) acelular con el fin de evaluar las propiedades morfológicas y estructurales de los

andamios así como su biodegradabilidad, y bioactividad, y de esta manera poder determinar la aptitud de dichas estructuras como futuros andamios para regeneración ósea.

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

El objetivo del proyecto es la obtención de estructuras altamente porosas compuestas de PLA/ Bioglass® 45S5 mediante el método NTIPS, así como el estudio de la morfología, propiedades mecánicas, biodegradabilidad y bioactividad *in vitro* en solución fisiológica simulada acelular (SBF) de éstas, para determinar su aplicación potencial como sustitutos óseos.

1.1.2 Objetivos particulares

- Obtención del vidrio bioactivo 45S5® mediante la técnica de fusión
- Obtención de estructuras porosas compuestas de PLA/ Bioglass® 45S5 mediante el proceso de separación de fases inducida por no solvente y cambio de temperatura (NTIPS).
- Evaluar la morfología, porosidad y área superficial de los andamios obtenidos.
- Realizar pruebas de inmersión *in vitro* a varios tiempos de permanencia para estudiar la biodegradabilidad y reactividad de las estructuras porosas, mediante el monitoreo de la pérdida de peso y el cambio en pH en función del tiempo de inmersión en SBF acelular.
- Comprobar la bioactividad de los andamios mediante la formación de hidroxiapatita en su superficie después de su incubación en SBF.
- Evaluar mediante ensayos mecánicos de compresión las espumas de PLA/ Bioglass® 45S5 antes y después de las pruebas de inmersión.

1.2 Justificación

Debido a la gran importancia del tejido óseo y a la alta tasa de procesos quirúrgicos realizados anualmente para remplazo o reparación de tejido óseo afectado debido a lesiones o malformaciones propias de la edad, y a la limitación de los procesos actuales diversas disciplinas han centrado su atención en la regeneración de tejido óseo.

En el presente trabajo se crearán andamios óseos con la capacidad de crear tejidos completamente naturales dejando a un lado los problemas de infección, rechazo, poca disponibilidad de tejido

donante y reabsorción de tejido óseo generados por los autoinjertos, aloinjertos e implantes metálicos comúnmente utilizados. Los andamios de polímeros biodegradable y Bioglass 45S5 han mostrado la capacidad de estimular y guiar la formación de nuevo tejido a medida que estos se degradan por procesos metabólicos sin liberar productos tóxicos que generen reacciones adversas, ya que los productos de degradación de estos son generalmente metabolitos naturales del cuerpo.

1.3 Hipótesis

La combinación de un polímero sintético biocompatible como el ácido poliláctico (PLA) y una fase inorgánica bioactiva (Bioglass[®] 45S5) para la fabricación de estructuras tridimensionales, resultará en la obtención de andamios no tóxicos, bioreabsorbibles y bioactivos con propiedades mecánicas adecuadas para su uso en ingeniería de tejido óseo.

Mediante la técnica de separación de fases inducida por no solvente y cambio de temperatura se obtendrán estructuras porosas que cumplan con las condiciones necesarias para andamios óseos como son alta porosidad, estructura interconectada, macroporosidad, mesoporosidad y tamaño de poro adecuado para la adhesión celular, vascularización y crecimiento del nuevo tejido óseo.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

2.1 Ingeniería de Tejidos

Los defectos óseos causados por trauma, degeneración patológica o deformidad congénita son uno de los mayores desafíos en los tratamientos ortopédicos [5]. Actualmente, la osteoporosis afecta a 10 millones de personas y se espera que esta cifra incremente a 14 millones para el año 2020, generando costos superiores a los 25 billones de dólares anuales [6]. Mundialmente se estima que se realizan 2.2 millones de procedimientos de injertos óseos anualmente para promover la reparación de fracturas, relleno de defectos o reparación de lesiones espinales [6,7,8]. La reparación ósea, en general, es considerada como un proceso biológico óptimo ya que la mayoría de las fracturas y defectos pequeños en este tejido sanan espontáneamente con un tratamiento mínimo. En contraste, el tratamiento clínico de grandes defectos óseos es un desafío para la cirugía reconstructiva debido a que los mecanismos regenerativos son generalmente insuficientes en conseguir la regeneración completa del tejido óseo. Actualmente, el hueso es el segundo tejido más trasplantado sólo por detrás de las transfusiones sanguíneas [9]. Los injertos autólogos (hueso de la cosecha del propio cuerpo del paciente) son el estándar principal en el tratamiento de los defectos óseos, a pesar de los problemas significativos de los autoinjertos como lo son la necesidad de dos procedimientos quirúrgicos para la extracción e implantación, limitada disponibilidad y morbilidad del sitio donante [10]. Una alternativa a los autoinjertos son los llamados aloinjertos en los cuales se utiliza tejido óseo de otro humano (generalmente cadáveres), los cuales presentan inconvenientes como un costo elevado, transmisión de enfermedades y respuesta inmune adversa del huésped.

Por otro lado, metales como el hierro, cobalto y titanio pueden ser implantados de manera permanente en el tejido óseo para llenar un defecto y brindar fijación interna; sin embargo, la fatiga, la corrosión, la infección de los tejidos y la pobre interface que se crea entre el tejido y el implante generan muchos problemas a los pacientes. Adicionalmente, el módulo elástico de los metales es significativamente mayor al del hueso natural, esto hace que ellos absorban la mayor parte de los estímulos mecánicos necesarios para la correcta formación del nuevo tejido óseo. Esta atenuación de los estímulos mecánicos puede generar la reabsorción del hueso alrededor del implante, haciendo necesaria su remoción [5].

Estos inconvenientes han motivado el desarrollo de una amplia variedad de complejos sustitutos de injerto óseo sintéticos para la reparación de defectos óseos. Algunas de las ventajas de utilizar estos andamios sintéticos son: la eliminación del riesgo de transmisión de enfermedades, menos procedimientos quirúrgicos, se disminuye el riesgo de infección o respuesta inmune adversa, además de la extensa disponibilidad de los materiales para fabricación de andamios sintéticos.

El término “ingeniería de tejidos” se utilizó por primera vez en la *National Science Foundation* (N.S.F) en Washington D.C., en 1987 y fue definido como “la aplicación de principios y métodos de ingenierías y ciencias de la vida, para obtener un entendimiento fundamental de las relaciones estructurales y funcionales en los tejidos mamífero patológicos, y el desarrollo de sustitutos biológicos para reparar, mantener o mejorar las funciones tisulares”.

El principio general de la ingeniería tisular es combinar células vivas con un soporte natural y/o sintético también conocido como andamio (*scaffold*) de naturaleza biodegradable para establecer una estructura tridimensional que sea funcional, estructural y mecánicamente igual o mejor que el tejido a remplazar [11]. Los cuatro componentes principales necesarios para crear tal estructura son: 1) andamio, 2) los factores de crecimiento, 3) la matriz extracelular (ECM), y 4) las células. Los andamios son estructuras tisulares tridimensionales que guían la organización, crecimiento y diferenciación de las células. Los andamios deben ser biocompatibles y diseñados para cumplir con las necesidades biológicas y nutricionales para la población específica de células. Los factores de crecimiento son péptidos solubles capaces de unirse a los receptores celulares y producir ya sea una respuesta permisiva o preventiva hacia la diferenciación y/o proliferación del tejido. La ECM debe ser capaz de proveer las condiciones óptimas para la adhesión, crecimiento y diferenciación celular dentro de la estructura mediante la creación de un sistema capaz de controlar los factores ambientales tales como el pH, temperatura y las resistencias mecánicas. Estas condiciones están determinadas por la línea celular y las propiedades del scaffold. Finalmente, el desarrollo de una estructura viable involucra un suministro adecuado de células que son idealmente no inmunogénicas (no producen respuesta inmune), altamente proliferativas, fáciles de cultivar, y que tienen la capacidad de diferenciar hacia variedades de tipos de células con funciones especializadas [12,13].

El concepto fundamental detrás de la ingeniería de tejidos es utilizar la respuesta biológica natural del cuerpo ante el daño tisular en combinación con principios de ingeniería [14]. El propósito de la ingeniería de tejidos es el de restituir la estructura y función de un defecto por medio de la utilización de la respuesta natural de cura del cuerpo humano, conjuntamente con un tratamiento que utilice uno o más de los siguientes tres elementos: células, moléculas de señalización y andamios. Entonces, un defecto óseo puede ser reemplazado potencialmente por tejido óseo natural con una completa unión y restauración, sin el uso de implantes permanentes [15].

2.2 Composición y estructura del hueso

El hueso es un tejido dinámico altamente vascularizado que continúa remodelándose a lo largo de la vida de un individuo. Desempeña un papel integral en la locomoción, asegura una capacidad de carga adecuada del esqueleto, y actúa como una cubierta protectora para los delicados órganos internos. Adicionalmente a estas funciones estructurales, el hueso está íntimamente relacionado a la homeóstasis a través de su capacidad de almacenar iones Ca y P, además de regular las concentraciones de electrolitos clave en la sangre [16].

Las distintas condiciones de carga influyen en el desarrollo de estructuras óseas macroscópicamente diversas con formas, distribuciones espaciales y propiedades mecánicas cuidadosamente adaptadas. Más de 206 huesos conforman el esqueleto, yendo desde los huesos largos que se encuentran en nuestras extremidades, huesos cortos en las muñecas y tobillos, los huesos planos en el esternón y el cráneo, hasta los huesos irregulares tales como la pelvis y las vértebras. El tejido óseo se encuentra organizado ya sea en un patrón compacto (hueso cortical) o en un patrón trabecular (hueso trabecular) [17].

El hueso contiene varios tipos de células especiales que incluyen los osteocitos (células especializadas), osteoblastos (células formadoras de hueso), células madre mesenquimales (MSCs) (osteoprogenitoras) y osteoclastos (células reabsorbedoras de hueso). Cada uno de estos tipos de células participan ya sea en la formación, remodelación o reabsorción del tejido óseo.

En términos de la matriz extracelular, el hueso está compuesto de una fase inorgánica (mineral), y una fase orgánica [18,19]. La fase mineral o inorgánica principalmente consta de calcio y fósforo,

análoga a la hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). También se encuentran asociados a la fase mineral iones como sodio, magnesio, carbonato de calcio, citrato y fluoruro. La fase orgánica del hueso consiste principalmente de colágeno tipo I, proteínas no colágenas, agua y lípidos.

Desde el punto de vista estructural, el hueso es un material poroso con porosidad interconectada. Esta característica clasifica el hueso en dos tipos: hueso cortical o compacto y hueso trabecular o esponjoso, figura 2.1. El hueso cortical es la capa dura externa de hueso mientras que el hueso trabecular se encuentra en el centro de los huesos vertebrales en la espina dorsal y dentro de los extremos de los huesos largos. La mayor diferencia entre el hueso cortical y el trabecular es el tamaño de poro (que va de 1 a 10 y de 200 a 400 μm , respectivamente) y la porosidad (que es de 5-30% y 50-90%, respectivamente). El tamaño e interconexión de los poros son críticos para la difusión de oxígeno, nutrientes, adhesión celular, migración, diferenciación y demás funciones celulares necesarias para la formación de nuevo tejido. Desde el punto de vista mecánico, la porosidad es responsable de la resistencia del tejido, que se encuentra en los rangos de 1-12 MPa y 150-200 MPa para el hueso trabecular y cortical, respectivamente [20].

Disminuciones sustanciales en las propiedades mecánicas ocurren con la edad, por ejemplo, la resistencia última del fémur y espina dorsal se reduce casi un 7 y 11 %, respectivamente, por década, desde los 20 a los 100 años. La resistencia no decrece de manera significativa hasta después de los 30 años, o incluso después dependiendo del sitio. Debido a la heterogeneidad del hueso trabecular, los factores como la edad y la localización del defecto son conceptos clave de relevancia directa en la ingeniería de tejidos, donde el objetivo sea el remplazo de hueso trabecular dañado con un sustituto que tenga las características mecánicas apropiadas para ese sitio.

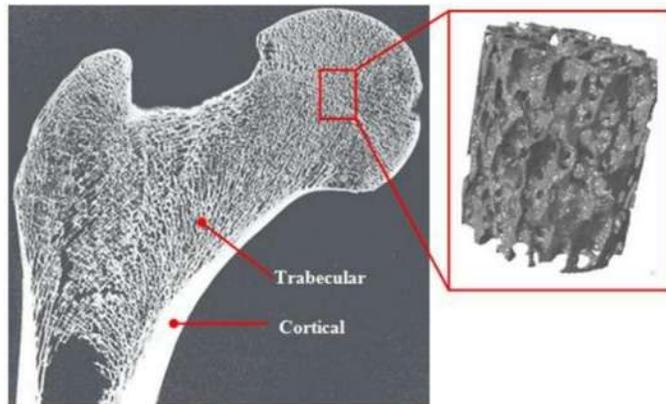


Figura 2.1 Sección transversal de un fémur humano ilustrando el hueso trabecular y cortical [21].

Como en todos los órganos en el cuerpo, el tejido óseo tiene una organización jerárquica en cuanto a escalas de longitud que va desde varios ordenes de magnitud de la macro escala (centímetros) hasta los componentes nanoestructurados (matriz extracelular), figura 2.2. La matriz extracelular comprende tanto componentes no mineralizados orgánicos (colágeno tipo I principalmente) así como componentes inorgánicos mineralizados (apatita carbonatada). Además, más de 200 tipos diferentes de proteínas no colágenas de la matriz contribuyen a la abundancia de señales en el entorno extracelular inmediato. La estructura de nanocompuestos (fibras de colágeno duras y flexibles reforzadas con cristales de hidroxiapatita) es fundamental para la resistencia a la compresión requerida y la alta resistencia a la fractura del hueso [22].

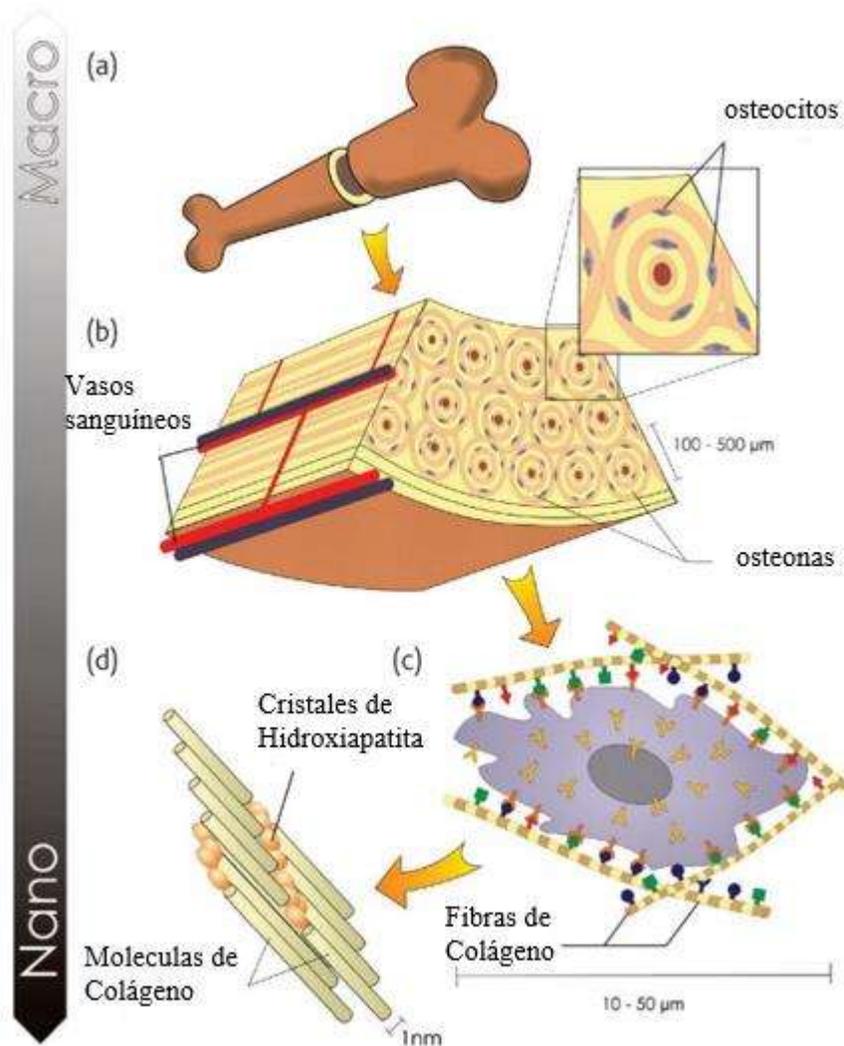


Figura 2.2 Organización jerárquica del tejido óseo a través de las diferentes escalas de longitud. El hueso tiene una fuerte capa compacta calcificada (a), que comprende varios sistemas de Haver cilíndricos u osteonas (b). las células residentes están recubiertas por un bosque de receptores de membrana celular que responden a sitios específicos de unión (c) y la bien definida nanoarquitectura de la matriz extracelular circundante (d) [17].

2.3 Andamios óseos

En la práctica clínica, los injertos autólogos de hueso trabecular son los más efectivos para promover la recuperación, los autoinjertos poseen todas las características necesarias para el crecimiento de nuevo tejido óseo ya que son osteoconductivos, osteoinductivos, osteogénicos y compatibles [23]; además los autoinjertos implantados no producen respuesta inmune ni transmisión de enfermedades. La *osteoconductividad* se refiere a cuando el material de injerto

permite la adhesión de las células formadoras de hueso (como lo son los osteoblastos y células osteoprogenitoras), y actúa como un andamio en el cual las células óseas pueden subsecuentemente migrar, proliferar, y depositar matriz extracelular; lo cual resulta en la formación de nuevo tejido óseo [23]. La *osteoinductividad* es el proceso en el cual se da la proliferación y diferenciación hacia osteoblastos de las células no diferenciadas. La *osteogenicidad* se refiere a la presencia de células madres y progenitoras cuyas funciones resultan en la formación de nuevo tejido [23]. En algunos pacientes, sin embargo, los autoinjertos pueden ser asociados con pérdida de sangre, dolencias post-operatorias, riesgo de infecciones y fractura de la zona donante, o pueden estar limitados a la disponibilidad del material de injerto cuando son necesarios varios procesos quirúrgicos de injerto [24]. Además, los autoinjertos incrementan los tiempos de cirugía, estancias en el hospital y costos asociados, y frecuentemente no promueven la unión ósea en segmentos de hueso mayores a 60 mm de longitud [25].

Debido a las desventajas mencionadas se han desarrollado métodos alternativos para la regeneración de tejido óseo como el uso de sustitutos óseos ya sea naturales o artificiales como reemplazo de los autoinjertos.

Los andamios son fundamentales para la ingeniería de tejido óseo, y estos son estructuras porosas que idealmente son diseñadas para guiar la formación de nuevo tejido al proporcionar una matriz con porosidad interconectada y con química superficial adaptada para el crecimiento y proliferación celular, y el transporte de nutrientes y desechos metabólicos [6]. Los andamios sintéticos ideales deben ser capaces de presentar un ambiente fisiológico biomimético mientras se biodegradan conforme el tejido nativo se integra y deben promover o prevenir respuestas fisiológicas deseadas y no deseadas respectivamente. Para hacer frente a estos requisitos un andamio óseo sintético debe [14]:

1. Proveer soporte mecánico temporal al área afectada.
2. Actuar como sustrato para el depósito de la matriz orgánica.
3. Poseer una estructura porosa para permitir la vascularización y el crecimiento del hueso.
4. Fomentar la migración de células óseas en el andamio.
5. Promover la diferenciación osteogénica en el andamio sintético no óseo (osteoinducción).

6. Mejorar la actividad celular para la integración del andamio y tejido huésped (osteointegración).
7. Degradarse de manera controlada para facilitar la transferencia de carga al hueso en desarrollo.
8. No debe producir productos tóxicos en su degradación ya que puede producir una respuesta inflamatoria.
9. Poder ser esterilizado sin perder bioactividad.
10. Liberar moléculas bioactivas o fármacos para acelerar la curación.

Los andamios deben poseer poros abiertos e interconectados. Esto es necesario para la difusión de nutrientes y la remoción de desechos que son resultado de los procesos metabólicos celulares. Los poros no deben ser demasiado grandes ya que sí lo son afectan drásticamente las propiedades mecánicas del andamio, además hay una disminución en el área superficial específica disponible lo que limita la adhesión celular, por el contrario, si son demasiado pequeños las células no puede migrar hacia el centro del andamio limitando la difusión de nutrientes y la eliminación de productos de desecho.

2.4 Materiales para andamios óseos

Un biomaterial utilizado para implante debe poseer algunas propiedades importantes para el uso a largo plazo en el cuerpo sin rechazo. Antes de considerar las características deseadas de los materiales posibles de ingeniería de tejidos, es importante entender algunos conceptos de la regeneración ósea para construcciones de ingeniería de tejidos:

La *osteoinducción* se define como la capacidad de causar que las células puedan diferenciarse para formar osteoblastos activos lo que culmina en la formación de hueso. Un material osteoinductivo permite la reparación en un lugar que normalmente no sanaría sin tratamiento. La osteoconducción soporta el crecimiento interno de capilares y células del huésped en una estructura tridimensional para formar hueso. Un material osteoinductivo guía la reparación en un lugar donde normalmente no se produciría la curación de no ser tratado.

La *bioactividad* se define como la capacidad de formar un enlace directo con el hueso, la cual por lo general se puede evaluar con la formación de una capa de apatita en la superficie del material.

Un *material biorreabsorbible* es aquel capaz de degradarse químicamente, absorbiéndose de forma controlada mientras es reemplazado por nuevo tejido.

Biocompatibilidad es la capacidad de un material de existir en contacto con los tejidos del cuerpo humano sin causar un grado inaceptable de daño. No sólo se asocia a la toxicidad, sino a todos los efectos adversos de un material en un sistema biológico [26,27].

Uno de los objetivos principales en la ingeniería de tejido óseo es imitar el tejido óseo nativo, y el primer desafío es la selección del material a utilizar. La composición del material juega un papel crítico en el éxito del andamio. El material seleccionado debe ser biocompatible, biodegradable y tener propiedades mecánicas apropiadas para aplicaciones de soporte de carga. Una gran variedad de materiales ha sido estudiada para su aplicación en andamios sintéticos óseos, incluyendo metales, cerámicos, polímeros y materiales compuestos.

Los metales tales como titanio, acero inoxidable, y cobalto-cromo son biocompatibles, resistentes, procesables, y algunos de ellos relativamente baratos. Sin embargo, los metales tienen un módulo de elasticidad más alto que el hueso, lo que puede inducir la reabsorción del hueso e impedir el crecimiento de tejido nativo y además no son biodegradables, lo que requiere de una cirugía adicional para su remoción [28-30].

Trabajos previos de investigación han demostrado que un andamio óseo sintético debe mantener sus propiedades mecánicas por lo menos de 1 a 3 meses después de su implantación y después debe ser totalmente reabsorbido a través de procesos metabólicos después de 12 a 18 meses de modo que no impida el crecimiento y regeneración del tejido [31].

Considerando la limitada utilidad de los andamios óseos no degradables o instrumentos de fijación, la única opción realista para la selección de materiales son los cerámicos y los polímeros. Cerámicos de calcio-fosfato son una opción obvia y han demostrado consistentemente excelentes

respuestas celulares *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de cerámicos fueron descubiertos hace más de 40 años como sustitutos óseos [3]. Son considerados como bioactivos ya que forman una unión con el hueso y promueven la formación de tejido óseo. La bioactividad de estos cerámicos ha sido atribuida a la similaridad de su composición y estructura con la fase mineral del hueso [31]. Los tipos más comunes de materiales a base de calcio-fosfato utilizados para la construcción de andamios son: hidroxiapatita, fosfato tricálcico (TCP), fosfatos de calcio bifásicos y vidrios bioactivos [32].

2.4.1 Bioglass® 45S5

El primer vidrio bioactivo estudiado fue el Bioglass® 45S5, introducido por Hench en 1969 [3] y aún permanece como el más usado en aplicaciones clínicas. El Bioglass® 45S5 posee una composición de 45% SiO₂, 24,5% CaO, 24,5% Na₂O, 6% P₂O₅ (porcentaje en peso). De acuerdo al diagrama de fases del sistema ternario Na₂O–CaO–SiO₂ con 6 % P₂O₅, Figura 2.3, pocas composiciones exhiben bioactividad clase A (materiales capaces de formar unión tanto con tejido blando como duro), dentro de las cuales el Bioglass® 45S5 tiene el mayor índice de bioactividad.

A inicios de los años 90, Li y colaboradores [33] sintetizaron algunos vidrios bioactivos por técnica sol-gel. Esta nueva clase de vidrios bioactivos mostraron un rango composicional más alto de bioactividad, con un elevado contenido de silicio, ya que vidrios en el sistema SiO₂–CaO–P₂O₅, luego de ser sumergidos en un fluido corporal simulado, pudieron formar una capa de hidroxiapatita (HA), con un contenido de sílice mayor al 90%. Gran aumento, considerando que los vidrios bioactivos tradicionales tiene como máximo un 60% de sílice.

Una de las principales diferencias entre los vidrios sintetizados por sol-gel y por fusión yace en el área superficial. Con el método sol-gel propiedades estructurales y superficiales, como área superficial y porosidad, pueden ser reguladas dependiendo de la composición y las condiciones de síntesis, pudiéndose obtener materiales nanoestructurados controlados. Los vidrios de silicio obtenidos por método sol-gel poseen una alta área superficial y una alta concentración de grupos silanol (Si-OH) superficiales, dando lugar a una hidrólisis más rápida y bioactividad aumentada. Tradicionalmente se utilizan nitratos de calcio y sodio, así como ácido nítrico como catalizadores para la obtención de vidrios bioactivos mediante técnica sol-gel debido a su alta solubilidad, bajo

costo y facilidad de descomposición térmica. Sin embargo, para esto es necesario recurrir a tratamientos térmicos con temperaturas por arriba de 600 °C para la remoción de los subproductos de nitratos los cuales son peligrosos para las células vivas, tales temperaturas resultan en la formación de una fase cristalina (la mayoría de las veces $\text{Na}_2\text{CaSi}_2\text{O}_6$ o $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$) lo cual disminuye la bioactividad de este tipo de vidrios.

Los vidrios bioactivos son utilizados para aplicaciones en ingeniería de tejidos principalmente por su habilidad de promover la revascularización, adhesión de osteoblastos y la diferenciación de las células mesenquimales [34]. Además, también se pueden utilizar como relleno o recubrimiento en materiales poliméricos para la obtención de andamios compuestos [35]. Al utilizar vidrios bioactivos para el diseño de andamios porosos, materiales dentales o de relleno, se deben considerar las propiedades de éstos en base a la forma y tamaño de las partículas utilizadas.

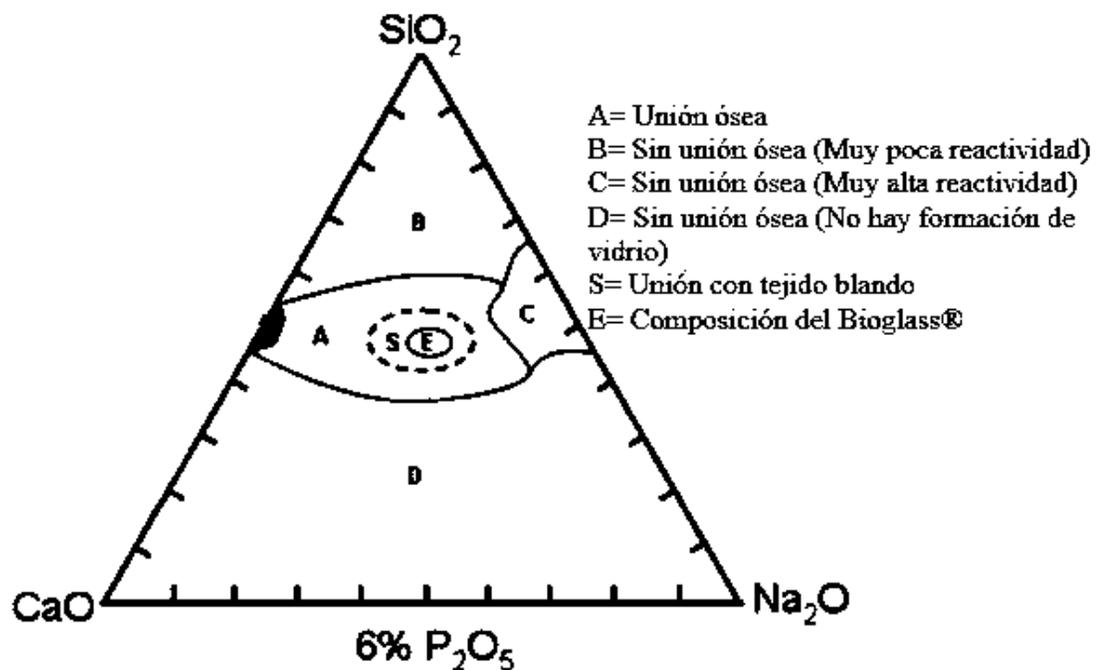


Figura 2.3 Diagrama composicional Na_2O - CaO - SiO_2 . Se muestran las regiones composicionales en base a su habilidad para formar unión con el tejido óseo. La región S es la región de bioactividad de clase A donde los vidrios bioactivos tienen capacidad de unión tanto al tejido duro como al suave [3].

2.4.1.1 Técnicas de fabricación de Vidrios Bioactivos

Las técnicas más comúnmente utilizadas para la producción de vidrios bioactivos son las técnicas sol-gel y la ruta de fusión y temple. En la técnica de fusión y temple, el vidrio se prepara tomando las cantidades estequiométricas requeridas de los diferentes óxidos o carbonatos de alta pureza (99.9%). Los componentes son primero mezclados en un molino de bolas, el polvo resultante después de la molienda es fundido a altas temperaturas en un horno de alta resistencia dependiendo de la composición elegida. La masa fundida se vacía en moldes para obtener barras o cualquier otra forma deseada. También se puede templar en agua para obtener fritas o en aire sobre placas metálicas, de cobre o acero, para obtener piezas planas.

Generalmente el contenido de sílice debe ser menor a un 60 % mol para que el vidrio pueda adherirse al hueso si el método de fabricación es el de fusión y temple. Mientras que, si se utiliza el método sol-gel para la obtención del vidrio, la formación de la capa de HA y la unión de hueso se puede obtener con vidrios que tienen hasta 90% mol de sílice [36]. El proceso sol-gel involucra los procesos de hidrólisis, polimerización, gelación y secado. Una solución evoluciona hacia la formación de un sistema bifásico similar a un gel que contiene tanto una fase líquida como una fase sólida. Nanoporos presentes en el vidrio preparado a partir del método sol-gel proporcionan un área superficial elevada. En consecuencia, esto conduce a una degradación y formación de HA más rápida que los vidrios preparados por fusión con la misma composición. Además, se requiere una temperatura de procesamiento más baja. Sin embargo, los andamios derivados mediante este método tienen baja resistencia (2 a 3 MPa) y, en consecuencia, son adecuados para sustituir defectos solamente en sitios de baja carga.

La capacidad bioactiva de los vidrios es evaluada mediante la hidroxiapatita que es una capa superficial de fosfato carbonatado, figura 2.4, que se desarrolla sobre la superficie del vidrio bioactivo cuando está en contacto con fluido corporal simulado (SBF) a través de reacciones interfaciales. Esta capa imita las características químicas y cristalográficas del hueso, lo que le permite unirse químicamente al tejido óseo huésped [3]. De hecho, casi dos terceras partes del hueso están formadas por hidroxiapatita.

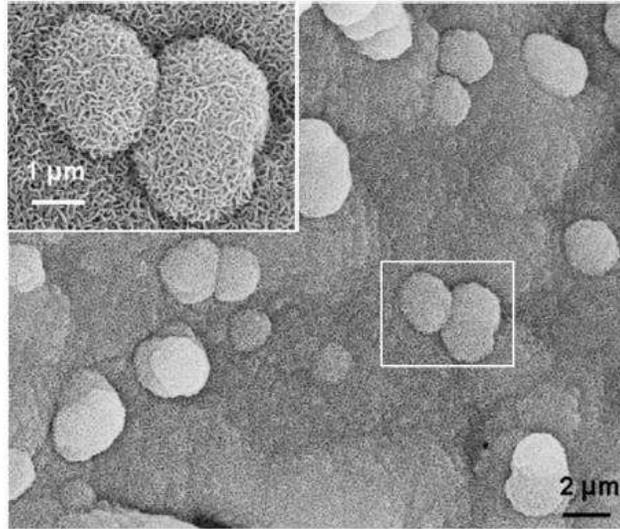


Figura 2.4 Micrografía por MEB de la típica morfología en forma de “coliflor” de la hidroxiapatita formada sobre la superficie de una espuma de Bioglass® 45S5 después de inmersión en SBF por 28 días [4].

2.4.2 Polímeros sintéticos

Varios tipos de polímeros han sido utilizados en la ingeniería de tejidos, los cuales pueden ser clasificados de manera simple en polímeros sintéticos y naturales. Los polímeros naturales tienen la ventaja potencial de reconocimiento biológico lo que podría beneficiar a la adhesión y funcionamiento celular. Sin embargo, pueden provocar inmunogenicidad y contener impurezas patogénicas. También, existe menor control sobre sus propiedades mecánicas, biodegradabilidad, y consistencia entre lotes. La mayoría de ellos tienen un suministro limitado y por lo tanto pueden resultar costosos. Una ventaja de los polímeros sintéticos es la reproducibilidad a gran escala con propiedades controladas de resistencia, degradación y microestructura. Debido a esto, los polímeros sintéticos biodegradables han sido ampliamente utilizados en ingeniería celular como vehículos para trasplante celular y andamios. Los α -hidroxiácidos, que incluyen al ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y su copolímero ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), se encuentran dentro de los polímeros sintéticos más utilizados en ingeniería de tejido óseo. Los enlaces éster en dichos polímeros son fácil de desestabilizar hidrolíticamente, y se degradan mediante hidrólisis no enzimática. Los productos de degradación del PGA, PLA y PLGA son no tóxicos, metabolitos naturales, y eventualmente son eliminados por el cuerpo en forma de dióxido de carbono y agua.

Un gran esfuerzo de investigación ha sido el desarrollo de polímeros sintéticos para su aplicación como andamios de ingeniería de tejidos. Los polímeros sintéticos tienen numerosas ventajas, como excelentes características de procesamiento, lo que puede garantizar la disponibilidad del andamio, además de ser biocompatible y biodegradable a velocidades que pueden ser adaptadas para la aplicación deseada [37]. Además, los polímeros sintéticos poseen propiedades mecánicas y físicas predecibles y reproducibles (por ejemplo, resistencia a la tracción, módulo elástico, y velocidad de degradación) y se pueden fabricar con gran precisión [38].

Principalmente se tienen dos tipos de polímeros sintéticos, biodegradables y de superficie bioerosionable, los primeros son más prometedores teniendo en cuenta que uno de los requisitos de un andamio, en la ingeniería de tejidos, es que tiene que ser sustituido por tejido óseo recién formado *in vivo*. Entre los polímeros degradables, el DL-ácido poliláctico (PDLA) amorfo es uno de los materiales más populares considerados para la producción de andamios, al igual que su mezcla con vidrios bioactivos, ya que se pueden combinar con biomoléculas, tales como factores de crecimiento [38] y antibióticos [39] para establecer un sistema de administración de fármacos de acción localizada. Se espera que un andamio con una función de administración de fármacos controlado promueva la regeneración ósea y elimine posibles respuestas inflamatorias tras la degradación del andamio.

El ácido poliláctico (PLA) es un polímero comercialmente disponible utilizado en una gran variedad de aplicaciones debido a su alta resistencia, módulo y biodegradabilidad. El PLA es un polímero termoplástico que se obtiene como un producto de la fermentación del almidón de algunas plantas como maíz, caña, papas, remolachas, etc. El polímero es sintetizado por condensación directa de ácido láctico o bien por polimerización tras la apertura del anillo del dímero láctido mediante el uso de un catalizador adecuado (Figura 2.5) [40].

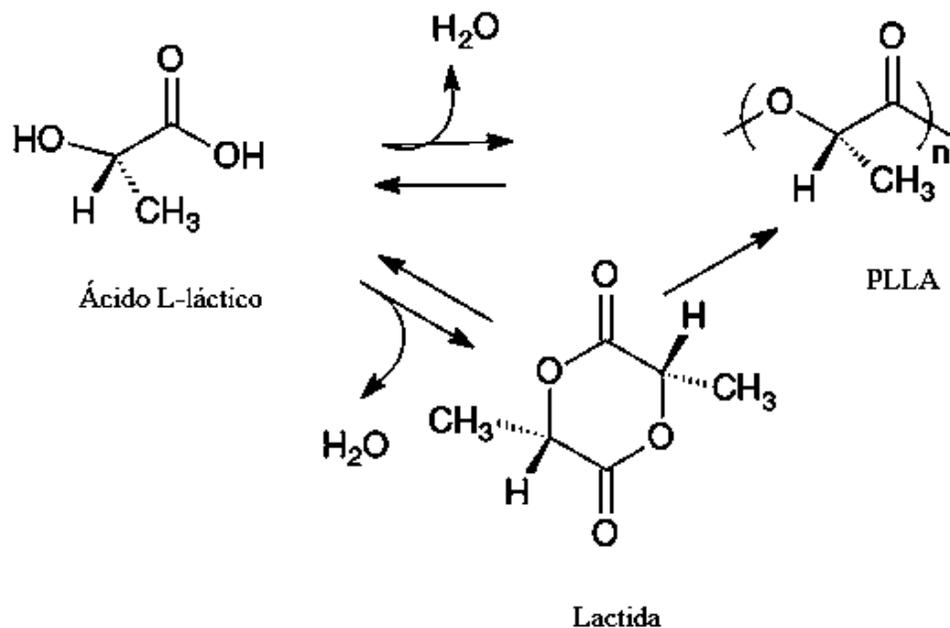


Figura 2.5 Rutas de polimerización para obtención del ácido poliláctico [40].

Debido a la presencia de dos estereoisómeros del ácido láctico, el PLA puede ser sintetizado como PLLA, PDLA o PDLLA. Los dos homopolímeros puros (PLLA y PDLA) y la mezcla racémica polimérica PDLLA con proporciones variantes de los monómeros D y L presentan un rango de propiedades físicas. Además, las propiedades mecánicas y térmicas del PLA varían también con el peso molecular [41]. En la tabla 2.1 se enlistan algunas propiedades físicas de los polímeros de PLA [42].

Tabla 2.1 Propiedades físicas del PLA [42].

Cristalinidad	Semicristalino (PDLA)
	0-37% (PLLA)
	Amorfo (PDLLA)
Temperatura de transición vítrea, T_g	50-64 °C
Temperatura de fusión	145-186 °C
Resistencia a la tracción	28-50 MPa
Módulo de Young	1.2-3 GPa
Elongación de rotura	2-6 %
Densidad	1.21-1.43 g/cm ³

El PLA presenta velocidades de degradación lentas debido a que el grupo metil extra en el PLA (en comparación al PGA) hace que éste sea más hidrofóbico, lo que reduce la afinidad molecular hacia el agua, y disminuye la velocidad de hidrólisis. Toma varios meses o incluso años para que un implante de PLA pierda sus propiedades mecánicas *in vitro* o *in vivo* [43].

Para lograr velocidades de degradación intermedias se utilizan varias relaciones de PGA y PLA para sintetizar PLGAs. Estos polímeros (PLA, PGA, y PLGAs) se encuentran entre los pocos polímeros sintéticos aprobados por la FDA (*US Food and Drug Administration*).

Los polímeros naturales como proteínas y polisacáridos también han sido utilizados para aplicaciones en ingeniería de tejidos, el colágeno es una proteína fibrosa y un componente en gran medida de la matriz extracelular y ha sido utilizado para aplicaciones de regeneración tisular, especialmente para tejido blando. El colágeno como componente natural de la matriz extracelular tiene propiedades biológicas útiles deseables en aplicaciones de ingeniería tisular. Por otro lado, existe preocupación sobre su uso debido a la potencial transmisión de patógenos, reacción inmune, propiedades mecánicas bajas y biodegradabilidad poco controlada.

2.5 Métodos de fabricación de andamios poliméricos

Se ha desarrollado una variedad de tecnologías para la fabricación de andamios porosos 3D para la regeneración ósea, las cuales incluyen principalmente colada y lixiviación de partículas, liofilización de una emulsión, electrospinning, impresión 3D y separación de fases inducida térmicamente. En la Figura 2.6 se muestran algunas de las morfologías características de cada técnica.

En la Tabla 2.2 y 2.3 se resumen algunas técnicas de producción de andamios poliméricos porosos, así como las principales ventajas y desventajas de algunas de ellas.

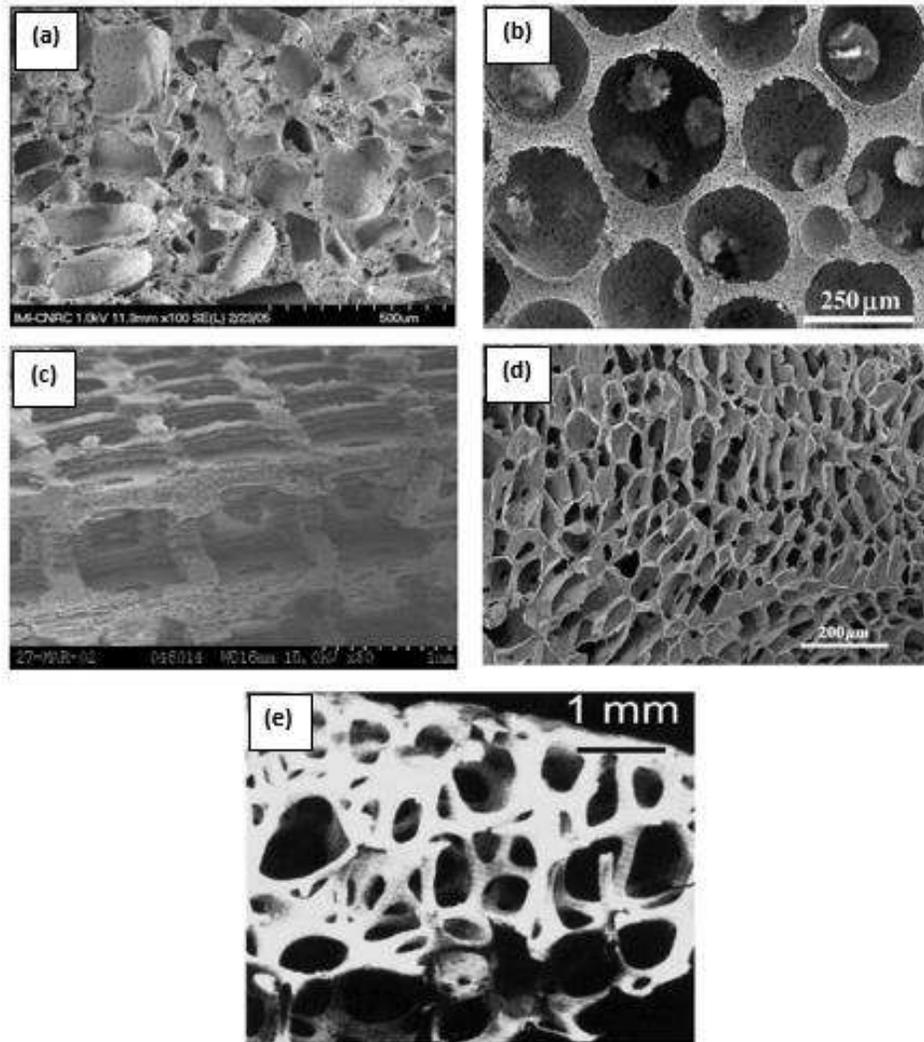


Figura 2.6 Morfologías típicas de andamios porosos preparados por diversos métodos y la estructura del hueso trabecular. (a) Andamios porosos de policaprolactona generados por la extracción de 50% de NaCl mediante colada y lixiviación de partículas [44]. (b) Andamios de PLLA fabricados por el método de separación de fases [45]. (c) Método de prototipado rápido (impresión 3D) [46]. (d) Andamio polimérico preparado mediante esferas de parafina (porogen) [47]. (e) Hueso trabecular [48].

Tabla 2.2 Tecnologías de fabricación de andamios tridimensionales [49].

Método de fabricación	Procesamiento	Tamaño de poro μm	% Porosidad	Arquitectura
Colada de solvente y lixiviación de partículas	Colada	30-300	20-50	Poros esféricos, algunas partículas de sal permanecen en la matriz
Laminación de membranas	Unión por solvente	30-300	< 85	Estructura porosa irregular
Emulsión freeze drying	Colada	< 200	< 97	Estructura porosa con gran interconectividad
Separación de fases inducida térmicamente	Colada	< 200	< 97	Estructura porosa con gran interconectividad
Tecnología de fluido supercrítico	Colada	< 100	10-30	Estructura porosa con pobre interconectividad
Impresión 3D en combinación con lixiviación de partículas	Forma libre	45-150	< 60	Estructura porosa con macroporos totalmente interconectados, diseñados y fabricados capa por capa

Tabla 2.3 Ventajas y desventajas de algunas rutas de fabricación de andamios 3D con alta interconectividad [4].

Ruta de Fabricación	Ventajas	Desventajas
Separación de fases térmicamente inducida (TIPS)	Alta porosidad (~95%), Estructuras altamente interconectadas, se pueden obtener poros anisotrópicos tubulares	Producción a pequeña escala, uso de solventes orgánicos
Colada de solvente y lixiviación de partículas	Porosidad controlada	Uso de solventes orgánicos
Forma libre sólida (impresión 3D)	La estructura porosa puede ser adaptada al tejido huésped	Es necesario el mejoramiento de la resolución a micro escala, algunos métodos utilizan solventes orgánicos
Sinterización de microesferas	Porosidad controlada	Uso de solventes orgánicos, dificultad para lograr interconectividad

2.5.1 Colada y lixiviación de partículas

El método consiste en mezclar partículas de una sal soluble en agua (cloruro de sodio, citrato de sodio, etc.) dentro de una solución de polímero biodegradable. La mezcla es entonces colada en el molde con la forma deseada y después el solvente es eliminado por evaporación o liofilización, las partículas de sal son posteriormente lixiviadas para obtener una estructura porosa. Las ventajas de este método incluyen la simpleza, control adecuado del tamaño de poro y porosidad mediante el tamaño de partícula de la sal añadida y la relación sal/polímero. No obstante, la forma del poro está condicionada por la forma cúbica de los cristales de la sal. La dificultad de remover las partículas solubles del interior de la matriz limita la fabricación de andamios 3D muy gruesos, la mayoría de los materiales porosos obtenidos por colada de solvente y lixiviación de partículas está limitado a un rango de 0.5 a 2 mm de espesor [50]. Además, la limitada conectividad entre poros es una desventaja para el cultivo celular uniforme y crecimiento tisular [51].

2.5.2 Liofilización de una emulsión

La técnica de liofilización consiste en crear una emulsión mediante la homogeneización de una solución de polímero (en solvente orgánico) y agua, posteriormente la emulsión se enfría rápidamente para mantener la estructura del estado líquido, después mediante liofilización se remueven el solvente y el agua. Mediante este proceso se obtiene andamios con porosidades mayores al 90% y con tamaño de poro desde 20 a 200 μm , una de sus desventajas es que la estructura resultante presenta porosidad cerrada [51].

2.5.3 Electrospinning

La técnica de electrospinning es un proceso en el cual se utiliza un campo eléctrico para controlar la formación y depositación de fibras poliméricas en un sustrato seleccionado. A una solución polimérica se le suministra un potencial eléctrico para crear una diferencia de carga, a un voltaje crítico el desbalance de carga comienza a superar a la tensión superficial de la solución para formar un hilo eléctricamente cargado. El hilo dentro del campo eléctrico es dirigido hacia el sustrato, durante este tiempo el solvente se evapora y se forman fibras de polímero. La técnica de electrospinning puede generar andamios con fibras de diámetros que comprenden desde varias micras hasta varios cientos de nanómetros [51].

2.5.4 Impresión 3D

Esta tecnología está basada en el desarrollo avanzado de la informática y la industria manufacturera. La principal ventaja de esta técnica es la habilidad de producir formas complejas rápidamente mediante un modelo de diseño asistido por computadora. La impresión 3D genera componentes por medio de la impresión por chorro de tinta de un aglutinante a capas de polvo sucesivas. Los parámetros del proceso como la velocidad de operación, posición de caída del aglutinante y velocidad de flujo pueden ser controladas por medio de computadora para la producción de andamios poliméricos 3D complejos. Agentes biológicos como factores de crecimiento, pueden también ser incorporados en los andamios durante el proceso de impresión. La porosidad de los andamios fabricados mediante este proceso es baja y sus propiedades mecánicas tienen que ser mejoradas significativamente. Además, solo una cantidad limitada de polímeros pueden ser utilizados en este método debido a que involucra altas temperaturas [51].

2.5.5 Separación de fases

La separación de fases es una de las técnicas más utilizadas para la preparación de materiales poliméricos porosos. Esta técnica consiste en lograr la inestabilidad de una solución polimérica, lo cual se puede lograr mediante la modificación de la temperatura (TIPS), la adición de un no solvente (NIPS) o una combinación de ambas (NTIPS) a la solución polimérica. Con el fin de disminuir la energía libre de la mezcla, la separación de fases puede ocurrir y un nuevo estado de equilibrio es alcanzado.

En resumen, el polímero se disuelve en un solvente (o mezcla de solvente y no solvente) y se agita durante el tiempo necesario para obtener una solución homogénea. Una cantidad determinada de vidrio o polvo cerámico se puede añadir a la solución polimérica. La mezcla se transfiere a un matraz y es sonificada. Después la solución se enfría y posteriormente el solvente es sublimado, después el andamio resultante se seca a temperatura ambiente al vacío hasta que el peso sea constante [4]. El método de separación de fases también ha sido utilizado para la fabricación de membranas para separación y filtración [52].

La transferencia de masa entre las dos fases hace que la nueva fase dispersa crezca, hasta que los efectos de la viscosidad característicos de los sistemas poliméricos detengan el proceso.

Dependiendo de la naturaleza fisicoquímica del sistema, pueden ocurrir diferentes fenómenos como la cristalización, gelación o vitrificación del sistema.

En el método de separación de fases inducido por no solvente y cambio de temperatura (NTIPS) los sistemas de fases ternarios polímero-solvente-no solvente son utilizados, figura 2.7, para la representación del fenómeno de separación de fase y mecanismos en el equilibrio para sistemas a varias composiciones, dichos diagramas ternarios pueden ser determinados analíticamente mediante el modelo de Flory Huggins [53] o experimentalmente. En este diagrama, la curva binodal divide en dos regiones al diagrama ternario: una región homogénea estable donde todos los componentes forman una sola fase, y una región de dos fases donde el sistema es dividido en una fase rica en polímero y una fase deficiente en polímero que se encuentran en equilibrio termodinámico. La curva espinodal separa las regiones de inestabilidad y metaestabilidad. En los diagramas experimentales la curva binodal es generalmente determinada mediante el punto de turbidez (“cloud point”) de la solución. El área debajo de la curva espinodal es la región inestable, y el área localizada entre la curva binodal y espinodal se identifica como la región metaestable. El punto máximo en el cual la curva binodal y espinodal se unen se conoce como punto crítico del sistema [51,54].

La morfología final depende del estado termodinámico de la solución sometida al temple. Cuando una solución polimérica es templada hasta la zona metaestable se obtiene una morfología de baja interconectividad en forma granulada o fibrosa como resultado de un proceso de nucleación y crecimiento. Cuando la temperatura de temple se encuentra en la zona inestable, se obtiene una estructura de poros uniformes interconectados debido a la separación de fase espinodal [55].

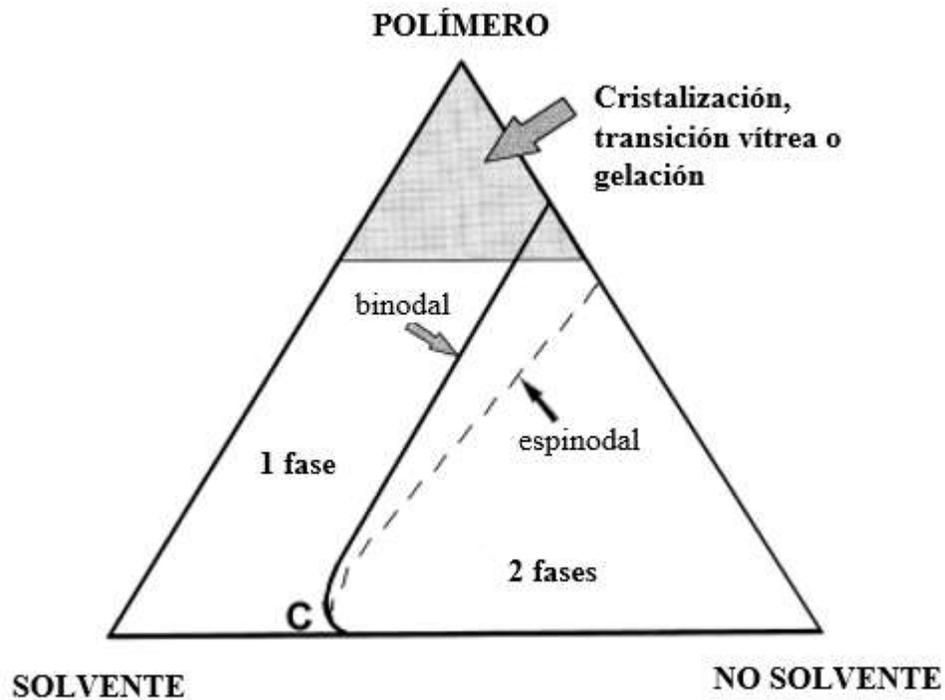


Figura 2.7 Representación esquemática de un diagrama de fases ternario polímero-solvente-no solvente [54].

Existen dos tipos principales de separación de fases para polímeros cristalinos: líquido-líquido y sólido-líquido. El factor principal que determina si existe separación de fases líquido-líquido o sólido-líquido en un sistema que involucra un polímero semicristalino es la miscibilidad de dicho sistema, que se cuantifica como el parámetro de interacción entre el polímero cristalino y el solvente del sistema. Si la interacción entre el polímero y el diluyente es fuerte, la mezcla presenta una separación de fases sólido-líquido cuando es enfriada. Si por el contrario se tiene una interacción débil entre el polímero y el solvente, la mezcla se vuelve inestable y se da la separación líquido-líquido cuando se disminuye la temperatura. En muchos sistemas de polímeros semicristalinos, la mezcla presenta separación de fases líquido-líquido con la subsecuente cristalización del polímero a bajas concentraciones iniciales de polímero, y separación de fases sólido-líquido a altas concentraciones iniciales de polímero [56].

Al manipular las condiciones de separación de fases, se pueden obtener diversas estructuras porosas. Por ejemplo, varios tejidos (como nervios, músculos, tendones, ligamentos, dentina, etc.) tienen una arquitectura con orientación tubular o fibrosa. Para facilitar la regeneración de dichos

tejidos, un andamio con alta porosidad y un arreglo abierto de micro túbulos orientados es necesario.

La relación de solvente – no solvente afecta directamente al comportamiento de la separación de fases del sistema. Chen y colaboradores [57] mostraron que la estructura de los poros está ampliamente influenciada por la cantidad de polímero y no solvente añadidos. Al cambiar de un método de separación de fases de dos componentes a un sistema ternario al añadir agua a un sistema PLA-dioxano, la morfología cambia de una estructura tubular anisotrópica a una arquitectura de poros circulares isotrópicos por el cambio de mecanismo de sólido-líquido a líquido-líquido debido al no solvente. También se mostró que la temperatura de turbidez depende en gran medida del contenido de no solvente en el sistema. Con un pequeño cambio en la relación de dioxano/agua de 90/10 a 85/15 la temperatura de enturbiamiento aumenta de 40-50°C. El tamaño de poro también aumenta drásticamente al aumentar la concentración de agua en relación de dioxano/agua.

2.6 Andamios compuestos

Desde un punto de vista biológico, tiene sentido combinar polímeros y materiales biocerámicos para fabricar andamios para ingeniería de tejido óseo porque el hueso es la combinación de un polímero de origen natural (colágeno) y apatita biológica. Desde el punto de vista de la ciencia de materiales, un solo tipo de material no suele proporcionar las propiedades mecánicas necesarias y/o químicas requeridas, por tanto, las propiedades de dos o más materiales pueden combinarse en un material compuesto. Polímeros, cerámicos y vidrios que tienen la capacidad de degradarse gradualmente *in vivo* mientras se forma nuevo tejido son candidatos ideales para los andamios compuestos.

Mientras la liberación masiva de productos ácidos por la degradación de los polímeros puede causar reacciones inflamatorias, la degradación básica del fosfato de calcio o de vidrios bioactivos puede amortiguar los subproductos ácidos de los polímeros contribuyendo así a evitar la formación de un ambiente desfavorable para las células debido a los bajos valores de pH. Mecánicamente, biocerámicos y vidrios son más resistentes que los polímeros y juegan un papel crítico proporcionando estabilidad mecánica a los andamios antes de la síntesis de la nueva matriz ósea

por las células. Sin embargo, los cerámicos y vidrios son muy frágiles y propensos a la falla catastrófica debido a su intrínseca fragilidad [38].

De este modo la formación de compuestos aprovecha las ventajas de ambos tipos de materiales y minimiza sus defectos. Un grupo importante de andamios compuestos reportados en la literatura comprende combinaciones de partículas de Bioglass® 45S5 y polímeros biodegradables, que han mostrado un alto potencial de aplicación. Estos compuestos tienen una estructura porosa bien definida, al mismo tiempo sus propiedades mecánicas son similares a las del hueso esponjoso [58] y una alta bioactividad es conferida por las partículas de Bioglass® 45S5. Andamios compuestos con mayor resistencia pueden ser desarrollados mediante el aumento de la unión interfacial orgánica/inorgánica con el uso de por ejemplo partículas cuya superficie ha sido funcionalizada.

Se ha observado que materiales compuestos de vidrio bioactivo y PLA pueden formar capas de fosfato de calcio en sus superficies y favorecer un crecimiento rápido y abundante de los osteoblastos humanos y células similares a los osteoblastos cuando se cultivan *in vitro*, hasta ahora, los mejores andamios compuesto a base de termoplásticos reportados en la literatura parecen ser los hechos de combinaciones de Bioglass® 45S5 y PLLA o PDLLA [39].

El método de separación de fases se ha utilizado para producir andamios compuestos poliméricos con partículas bioactivas como hidroxiapatita (HA) y vidrios bioactivos. Andamios poliméricos compuestos tridimensionales, reabsorbibles y con altas porosidades pueden obtenerse utilizando el método TIPS y NTIPS. La microporosidad, morfología de los poros, propiedades mecánicas, bioactividad y velocidad de degradación pueden controlarse mediante la variación de la concentración del polímero y no solvente en la solución, el polímero, no solvente y solvente utilizados, y la temperatura de enfriamiento [4]. Una de las ventajas principales es que en la mayoría de los casos se obtienen andamios con buenas propiedades mecánicas y porosidad mayor a 90% [51].

Mi y colaboradores [59] prepararon andamios de poliuretano/hidroxiapatita mediante el método de separación fases inducido por temperatura y estudiaron el efecto del solvente y la adición de una pequeña cantidad de no solvente en la morfología resultante de los andamios. Los andamios

preparados utilizando solamente dioxano como solvente mostraron una estructura con poros orientados con muy poca interconectividad a diferencia de los andamios en los cuales se incorporó agua desionizada como no solvente, figura 2.8, en el cual los poros formados mostraron estructura esférica y mayor interconectividad, esto debido a que el mecanismo de separación de fases cambia de sólido-líquido a líquido-líquido. También se analizó el efecto de la adición de la fase de HA la cual mejora la interconectividad y aumenta el tamaño de poro. Los andamios preparados sólo con dioxano muestran también una menor porosidad que los preparados con agua desionizada. Las estructuras preparadas con agua desionizada tiene poros redondos más uniformes y pequeños por lo cual presenta mayor resistencia a la compresión. También demostraron tener la capacidad de producir HA en su superficie y biocompatibilidad en los análisis de toxicidad.

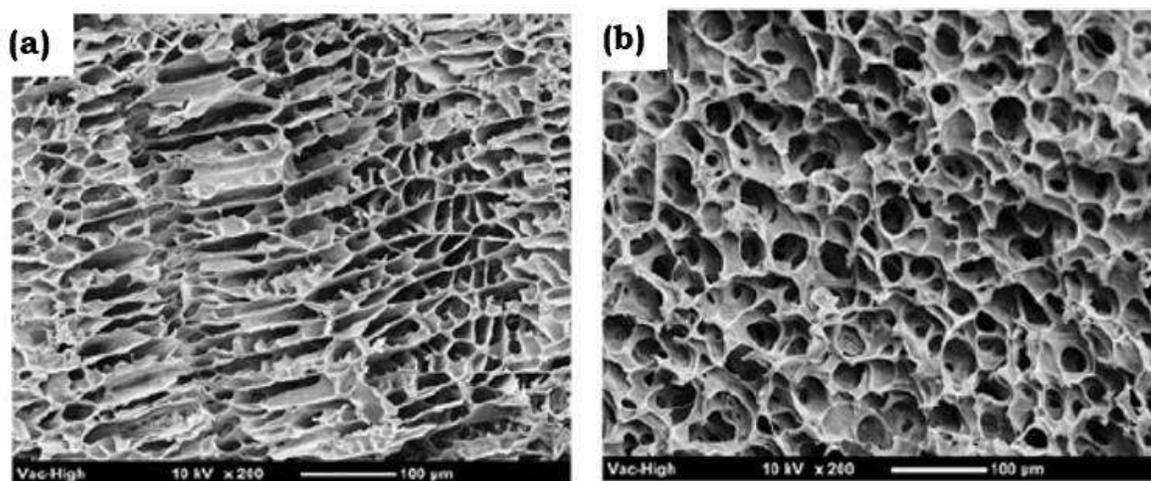


Figura 2.8 Micrografías por MEB de andamios de poliuretano-hidroxiapatita desde una estructura anisotrópica obtenida por el método TIPS (a) a una estructura isotrópica interconectada por la adición de agua destilada como no solvente (método TIPS modificado) (b). [59]

En estudios realizados por Hong y colaboradores [60] para la fabricación de andamios compuestos de PLLA y partículas nanométricas de vidrio bioactivo mediante el método de TIPS, utilizando dioxano como solvente se analizó la influencia sobre las propiedades mecánicas, morfología y bioactividad de la cantidad de partículas bioactivas. La adición de hasta 20 % en peso de vidrio no afectó la morfología y porosidad de los andamios. Ensayos de compresión fueron realizados a 5 especímenes cúbicos de 10mm x 10mm x 10mm a una velocidad de 1 mm/min, y se encontró que el módulo de compresión aumentó de 5.5 hasta 8 MPa, y la resistencia a la compresión varió de

0.28 a 0.35 MPa al incrementar el porcentaje de vidrio de 0 a 30 % en peso. Al ser sumergidos en SBF los andamios mostraron buena mineralización, también se mostró que la adición de partículas de vidrio mejoraba la absorción de agua y por lo tanto aceleraba la degradación *in vitro* de los andamios.

2.7 Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitro* constituyen una alternativa para obtener datos preliminares sobre la biocompatibilidad y bioactividad de los materiales con el fin de evitar el alto costo de la experimentación *in vivo*. Actualmente, dos métodos se han utilizado para el ensayo de la bioactividad *in vitro* de biomateriales. Uno de éstos método consiste en evaluar la capacidad de formación de apatita de Materiales biocerámicos en fluidos corporales simulados (SBF) [61]. Kokubo y col. [62] desarrollaron en 1991 un método para predecir la bioactividad *in vitro* de los materiales a través de la capacidad de éstos de formar una capa de hidroxiapatita cuando son sumergidos en fluido corporal simulado SBF por sus siglas en inglés (*simulated body fluid*) el cual es un fluido fisiológico acelular con concentraciones iónicas casi iguales a las del plasma sanguíneo (Tabla 2.4) [62].

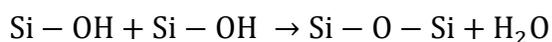
Tabla 2.4 Concentraciones iónica del plasma sanguíneo y SBF [26].

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5

Desde entonces éste método de inmersión en SBF ha sido ampliamente utilizado para realizar experimentos de bioactividad ósea *in vitro*. Biocerámicos a base de silicatos forman un enlace con el hueso huésped a través de la formación de capas de apatita similar a la que se encuentra en el hueso debido a la disolución de iones de Ca²⁺ o de otro metal. Estos biocerámicos a base de silicato, incluyendo al Bioglass® 45S5 han demostrado tener una excelente capacidad de formación de apatita en SBF. Otros estudios también demostraron que estos cerámicos de silicato poseen una buena bioactividad *in vivo*, que indica que las pruebas en SBF son un método eficiente para evaluar la bioactividad de un material *in vitro*.

Las reacciones complejas que ocurren en la superficie del vidrio bioactivo durante el proceso de formación de la capa de apatita pueden ser resumidas de la siguiente manera [63]:

1. Intercambio de iones Ca^{2+} , Na^+ o K^+ del vidrio por H^+ y H_3O^+ de la solución.
2. Pérdida de sílice soluble desde el vidrio hacia la solución. Esto es debido a la disolución de la red de sílice como consecuencia del ataque de los iones hidroxilo, es decir por el rompimiento de los enlaces Si-O-Si y la formación de grupos Si-OH y $\text{Si}(\text{OH})_4$ en la superficie del biovidrio. Este proceso depende del contenido de sílice del vidrio y del pH de la solución; para vidrios bioactivos los cuales tienen bajo contenido de sílice, SiOH se forman rápidamente en un ambiente *in vivo*.
3. Condensación y repolimerización. Esto resulta en una capa rica en SiO_2 en la superficie del biovidrio de acuerdo a la siguiente reacción:



4. Migración de iones Ca^{2+} y grupos PO_4^{3-} a través de la capa rica en SiO_2 .
5. Formación de una capa rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ en la superficie de la capa rica en sílice.
6. Crecimiento de una capa de SiO_2 por un proceso de intercambio de iones alcalinos e hidronio controlado por difusión.
7. Crecimiento de la capa amorfa rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, por la incorporación de fosfato de calcio desde la solución.
8. Cristalización de la capa amorfa rica en $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$. La cristalización de la capa de apatita se da por la incorporación de OH^- , CO_3^{2-} o F^- desde la solución.

9. Incorporación de los componentes orgánicos lo que involucra la aglomeración y enlace químico de los cristales de apatita alrededor de las fibras de colágeno y proteínas producidas por osteoblastos o fibroblastos.

Por varios años se asumió que la formación de la capa biológicamente activa de hidroxiapatita era el requerimiento crítico para el comportamiento bioactivo. Estudios recientes han mostrado que la formación de una capa de hidroxiapatita es una etapa útil pero no crítica para la regeneración ósea. El fenómeno clave es la liberación controlada de productos iónicos de disolución, especialmente iones solubles de sílice y óxido de calcio.

En los huesos de las personas mayores existen muy pocas células con la capacidad de división para la formación de nuevo tejido óseo. Las células osteoprogenitoras presentes deben recibir el estímulo químico adecuado del medio local de manera que se genere el ciclo de división celular. Los materiales bioinertes o materiales bioactivos clase B no producen el estímulo químico necesario para permitir la activación del ciclo celular a las pocas células osteoprogenitoras. Solo los materiales Clase A como lo es el Bioglass® 45S5 producen una rápida formación de tejido óseo *in vivo*, un proceso denominado como osteoproducción. El rol del vidrio bioactivo es principalmente la liberación de las concentraciones críticas de iones biológicamente activos a la velocidad necesaria para la proliferación y diferenciación celular. Estudios anteriores indican que vidrios bioactivos clase A promueven la formación de nuevo tejido óseo (osteogénesis) a través de un control directo sobre los genes que regulan la inducción y progresión del ciclo celular [3].

El segundo método consiste en investigar la respuesta *in vitro* de células óseas. Los cultivos celulares son sistemas ideales para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, dado que estos sistemas no presentan la complejidad que un sistema *in vivo* conlleva. Los ensayos pueden ser por contacto directo de las células y el material o indirecto, adicionando un extracto del material al cultivo celular. Los experimentos de células se han usado ampliamente para observar si los materiales promueven la adhesión, la proliferación y la diferenciación de células óseas. Dicha evaluación se realiza después de un apropiado tiempo de exposición, normalmente de 24 a 72 horas. Un parámetro clave es la adhesión celular, que implica

el reconocimiento molecular de las proteínas adsorbidas en la superficie del biomaterial por los receptores de la membrana plasmática.

La combinación de experimentación en SBF y cultivos celulares para evaluar la bioactividad *in vitro* de biomateriales puede ser la mejor opción. Ya que sí tal material presenta no sólo la capacidad de inducir la formación de hidroxiapatita mediante la inmersión en SBF acelular, sino que además estimula una respuesta celular *in vitro*, lo más probable es que tal material posea una excelente bioactividad *in vivo* también [61].

La bioactividad de andamios de polímeros degradables–partículas bioactivas ha sido evaluada mediante la formación de apatita al ser sumergidos en fluido corporal simulado (SBF) y/o por la evaluación *in vitro* de la respuesta celular de células sembradas en los compósitos. Andamios producidos mediante electro hilado de ácido poliláctico (PLA)/fosfato tricálcico (TCP) con concentraciones crecientes de TCP (0%, 5%, 10% y 20%) promovieron la proliferación celular y diferenciación osteogénica de células madre humanas de tejido adiposo (Figura 2.9) [64].

Espumas compuestas altamente porosas de ácido DL-poliláctico (PDLLA) con Bioglass® 45S5 a diferentes concentraciones de Bioglass® 45S5 (5 y 40 %) mostraron migración celular a través de la red porosa y formación de una capa de hidroxiapatita cuando fueron sometidos a inmersión en SBF, con una distribución más uniforme de apatita al incrementar la concentración de Bioglass® 45S5 [2].

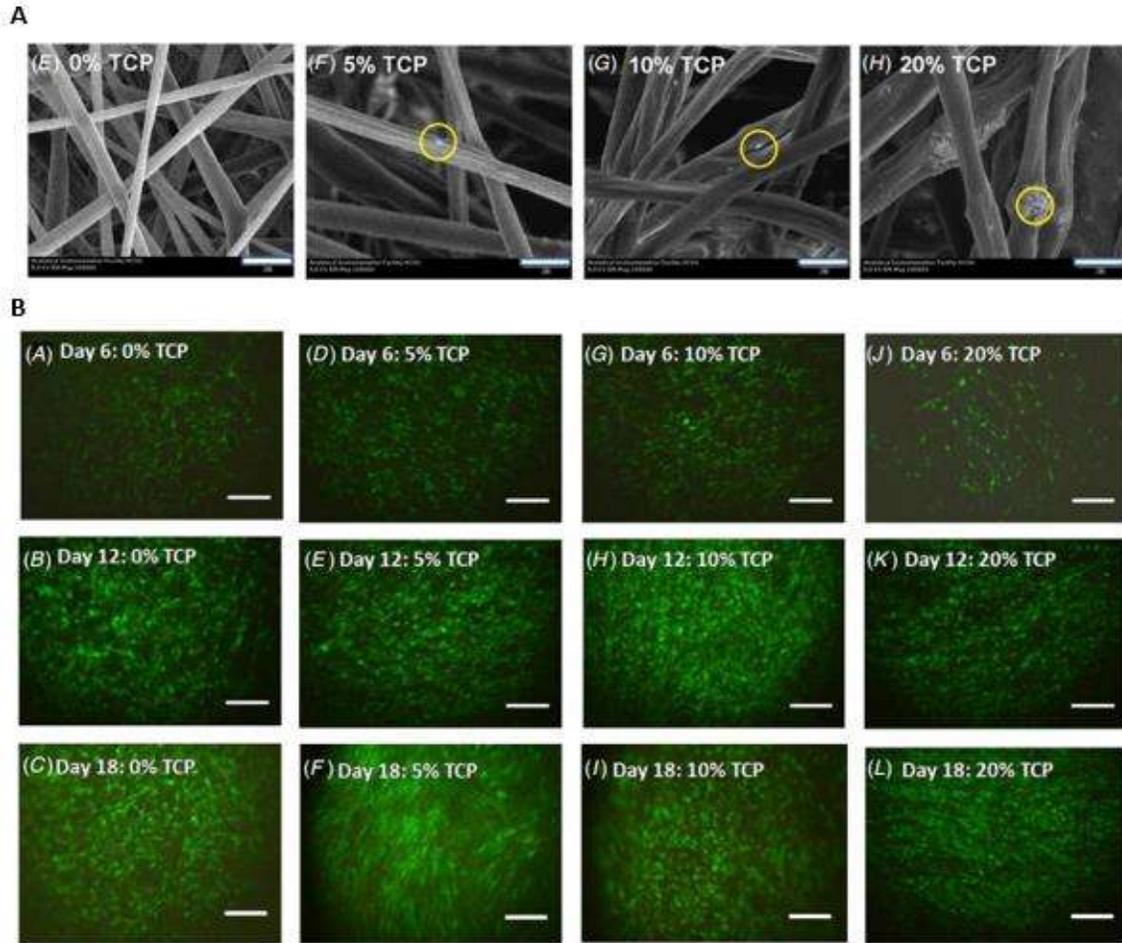


Figura 2.9 Panel A: Imágenes por MEB de compósitos de PLA/TCP con incremento de TCP, los círculos amarillos indican los cristales de TCP embebidos en la matriz. Panel B: imágenes de la viabilidad de células madre de tejido adiposo sembradas en los compósitos de PLA/TCP a 6, 12 y 18 días. En verde las células viables y rojo las células muertas. Las células fueron altamente viables con un mínimo de células muertas presentes [64].

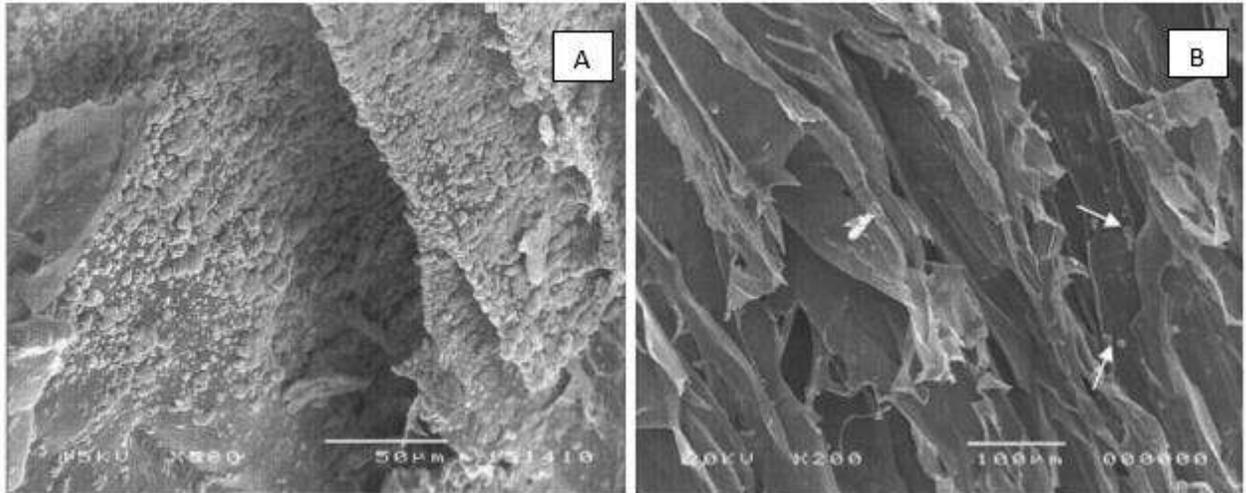


Figura 2.10 (a) Micrografía por MEB de una espuma compuesta de PDLLA/Bioglass (40 % en peso de Bioglass) después de 28 días de inmersión en SBF, la micrografía revela la formación progresiva de cristales de Hidroxiapatita. (b) Micrografía por MEB de una espuma compuesta de PDLLA/Bioglass (5 % en peso de Bioglass) después de 28 días de inmersión en SBF, en ésta se muestra la formación localizada de hidroxiapatita [2].

CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Los métodos para la obtención de andamios PLA/ Bioglass® 45S5, así como la caracterización realizada son descritos a continuación. En la Figura 3.1 se muestra de manera resumida la metodología seguida para la preparación y caracterización de los andamios de PLA/Bioglass® 45S5.

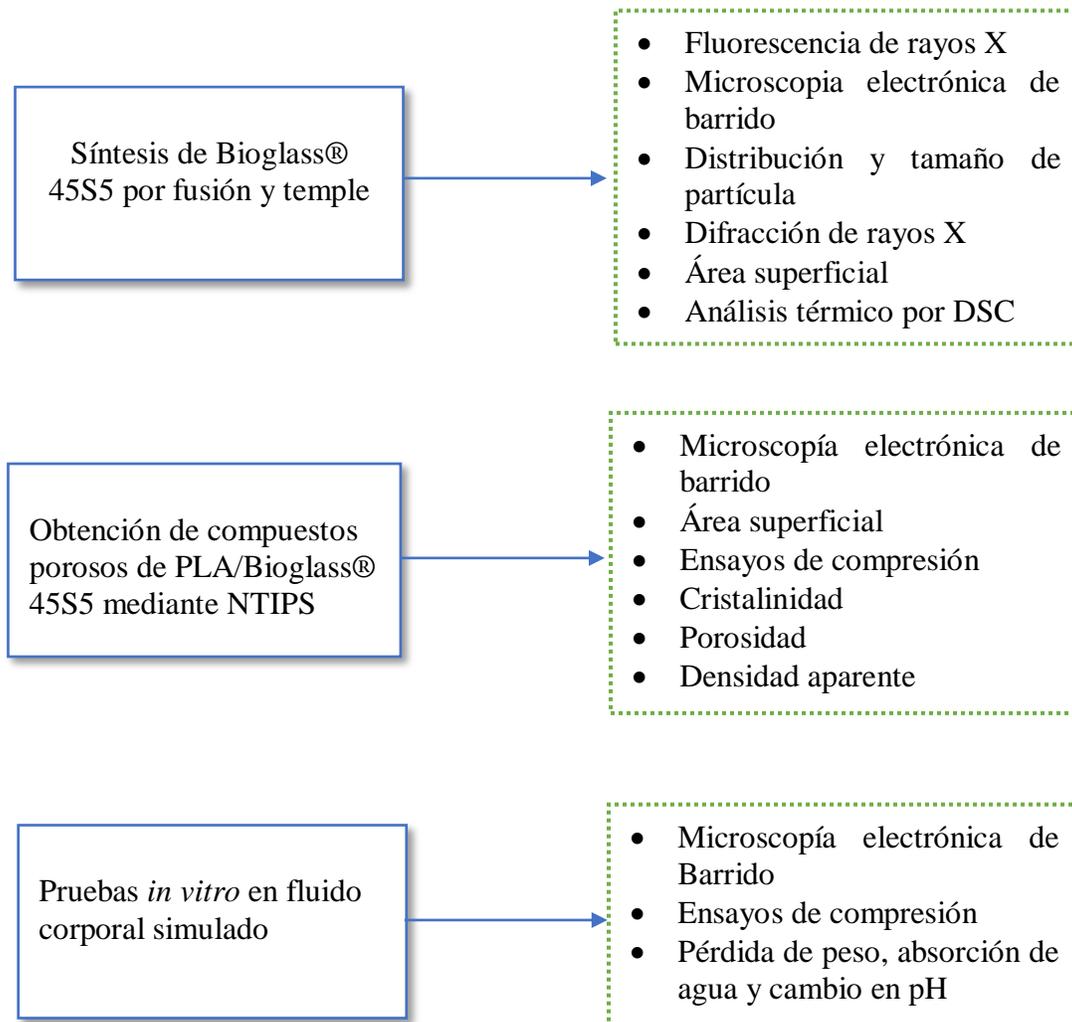


Figura 3.1 Diagrama esquematizado del procedimiento experimental.

3.1 Obtención de Bioglass® 45S5 mediante técnica de fusión y temple

El Bioglass® 45S5 fue obtenido mediante el método tradicional de fusión y temple. Todos los polvos de alta pureza se obtuvieron de *Sigma-Aldrich*. Los polvos antes mencionados se mezclaron en un contenedor de polietileno por un periodo de 30 min en cantidades estequiométricas (Tabla 3.1) para obtener una composición final en el biovidrio de $24.5\text{Na}_2\text{O}-24.5\text{CaO}-6\text{P}_2\text{O}_5-45\text{SiO}_2$ (% en peso). Posteriormente la fusión de los elementos se llevó a cabo en un horno *Carbolite HTF-1700* dentro de un crisol de sílice fundida. El ciclo térmico diseñado se muestra en la Figura 3.2. El material fundido fue entonces inmediatamente vertido en agua fría para obtener una frita y facilitar la molienda. Por último, el vidrio fue secado y posteriormente fue triturado en un molino vibratorio de discos *Retsch Modelo RS 200*.

Tabla 3.1 Reactivos y cantidades necesarios para la síntesis de 100 g de Bioglass® 45S5.

Reactivo	Cantidad (g)
SiO ₂	45
Na ₂ CO ₃	41.89
CaO	24.5
P ₂ O ₅	6

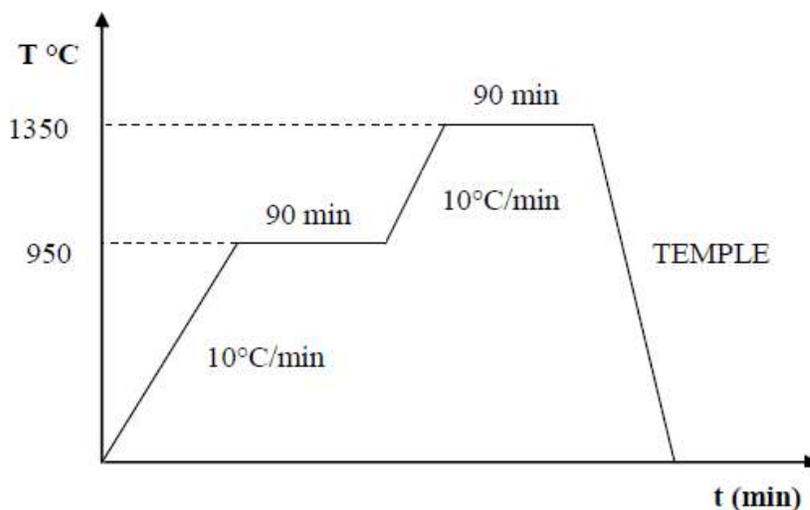


Figura 3.2 Ciclo térmico para la obtención de Bioglass® 45S5.

3.2 Obtención de andamios PLA/ Bioglass® 45S5

El proceso utilizado para los andamios de PLA/ Bioglass® 45S5 es una colaboración en base al procedimiento desarrollado por Rezabeigi y colaboradores [65,66] para la fabricación de monolitos porosos de PLA mediante el método de separación de fases inducida térmicamente y por no solvente (NTIPS) para un sistema PLA-diclorometano-hexano.

La metodología seguida se explica a continuación:

Reactivos a utilizar:

- PLA con 1.6% de D-Lactato obtenido de *Nature Works Ingeo™ Biopolymer 4032D*, ($\rho = 1.24 \text{ g/cm}^3$)
- Diclorometano (*J.T. BAKER*, DCM: > 95.5, $\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$)
- Hexano (*J.T. BAKER*, > 95 %, $\rho = 0.65 \text{ g/cm}^3$)
- Metanol (*J.T. BAKER*, 99.9 %, $\rho = 0.7918 \text{ g/cm}^3$)

El PLA recibido fue primero sometido a un tratamiento térmico de fusión y temple en un horno horizontal *Lindergerg/Blue STF55433C* en un tubo de mullita bajo atmósfera de argón, se calentó hasta 190 °C con un paso de 10 °C/min y una permanencia de 25 min e inmediatamente después se llevó a almacenar en un congelador a -20°C, todo con el fin de eliminar la cristalinidad del polímero para facilitar la disolución de éste en diclorometano.

La preparación de los andamios se realizó mediante la técnica de NTIPS, primero se llevó a cabo la disolución de PLA en diclorometano (DCM), las cantidades tanto de PLA como DCM se mezclaron de forma tal que se obtuvieron soluciones con una concentración de PLA de 13, 18 y 23 % en peso. La mezcla se agitó vigorosamente por el tiempo necesario para obtener una solución polimérica totalmente homogénea, este proceso se llevó a cabo en un recipiente hermético y a una temperatura menor a 30 °C para evitar la evaporación del DCM, una vez que el polímero se disolvió totalmente se añadieron las partículas de biovidrio a la solución en cantidades necesarias para obtener sistemas con 5 y 10 % en peso con respecto a la mezcla final de PLA/ Bioglass® 45S5, y se homogeneizó por algunos minutos, después el recipiente con la mezcla se llevó a un baño ultrasónico por 5 min para que el vidrio quedara totalmente distribuido en la solución, posteriormente se agregó el hexano (no solvente) en una cantidad volumétrica igual a la del DCM

usado para la disolución, este paso se realizó bajo agitación vigorosa y añadiendo el hexano en cantidades pequeñas con el fin de evitar la precipitación del polímero.

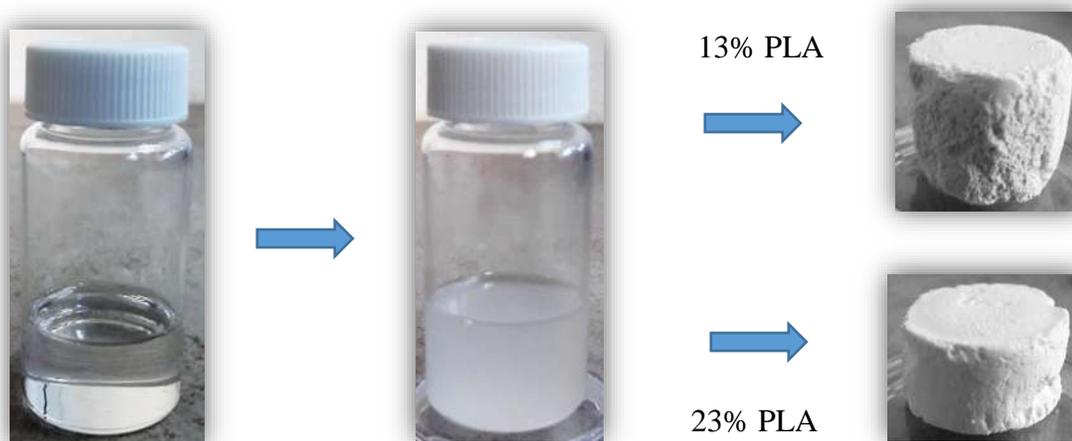
Una vez diluido completamente el hexano en la solución la mezcla se llevó rápidamente a un congelador a -20°C donde se almacenaron las soluciones herméticamente cerradas por al menos 48 horas para que la gelación del sistema se llevara a cabo. Después de transcurridas las 48 horas el gel formado se sumergió bajo agitación en aproximadamente 200 mL de metanol para llevar a cabo el intercambio de solvente, este proceso se realizó por otras 48 horas y en el transcurso de este tiempo el metanol se reemplazó completamente una vez. Después del intercambio de solvente las espumas se dejaron secar al aire por un día, por último, las espumas se secaron a vacío y temperatura ambiente por el tiempo necesario hasta que éstas registraron un peso constante. Una vez secas, las espumas fueron almacenadas en un desecador hasta su posterior caracterización. En la Figura 3.3 se muestran fotografías de algunas de las etapas del proceso NTIPS, así como la apariencia final de los andamios producidos. Las composiciones de los sistemas preparados y estudiados se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Composiciones de los andamios fabricados para su estudio.

Abreviación	Contenido de PLA (% en peso)¹	Contenido de Bioglass (% en peso)²	Relación volumen DCM/hexano
13PLA	13	0	1/1
13PLA-5BG	13	5	1/1
13PLA-10BG	13	10	1/1
18PLA	18	0	1/1
18PLA-5BG	18	5	1/1
18PLA-10BG	18	10	1/1
23PLA	23	0	1/1
23PLA-5BG	23	5	1/1
23PLA-10BG	23	10	1/1

¹La cantidad de PLA se calculó en base a la solución de PLA-Bioglass-DCM, no se tomó en cuenta el hexano usado.

²La cantidad de Bioglass se calculó sólo en base al peso de la mezcla de PLA-Bioglass.



Solución polimérica homogénea PLA-DCM-hexano.

Gel formado después del proceso de separación de fases.

Andamios finales, después del proceso de intercambio de solvente y secado.

Figura 3.3 Imágenes de las etapas de obtención de los andamios PLA/ Bioglass® 45S5 mediante NTIPS.

3.3 Pruebas *in vitro*

Las pruebas de bioactividad en SBF se realizaron para evaluar la capacidad de formación de la capa de hidroxiapatita en los andamios PLA/Bioglass® 45S5. Se utilizó el protocolo establecido por Kokubo y Takadama [62] para la preparación de la solución fisiológica simulada (SBF). Los reactivos de la Tabla 3.3 se añadieron uno a uno en el orden mostrado y bajo agitación continua en 700 mL de agua desionizada previamente calentada a 36.5 °C, con la restricción de disolver completamente cada uno de los reactivos antes de agregar el siguiente.

Tabla 3.3 Reactivos y cantidades necesarias para preparar 1 L de SBF.

Orden	Reactivo	Cantidad	Pureza (%)
1	NaCl	8.035 g	99.5
2	NHCO ₃	0.355 g	99.5
3	KCl	0.225 g	99.5
4	K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O	0.231 g	99
5	MgCl ₂ -6H ₂ O	0.311 g	98
6	HCl-1M	39 mL	–
7	CaCl ₂	0.292 g	95
8	Na ₂ SO ₄	0.072 g	99
9	Tris	6.118 g	99
10	HCl-1M	1 mL	–

Después de la disolución de los reactivos se llevó nuevamente la solución a 36.5 °C y se ajustó el pH a 7.4 mediante la adición de HCl 1M. Se vació la solución en un matraz aforado de 1000 mL, y se ajustó el volumen a 1000 mL una vez que la solución se enfrió a 20 °C añadiendo agua desionizada. Se colocó la solución en una botella plástica y se almacenó a una temperatura de 5°C, esta solución puede ser almacenada hasta por un mes, sí se advierte la presencia de precipitados debe ser desechada y realizar el procedimiento nuevamente.

Antes de realizar la inmersión de las muestras en el SBF fue necesario filtrar la solución con filtros estériles de 0.22 µm y llevar hasta 36.5 °C. Las espumas de composición 13PLA-5BG y 13PLA-10BG fueron sumergidas en fluido corporal simulado (SBF) para determinar la capacidad de formación de HA en su superficie. Se sumergieron especímenes de ~5 mm³ en 15 mL de fluido simulado durante tiempos de inmersión de 3, 7, 14 y 28 días para ambas composiciones, las muestras se colocaron en recipientes cónicos de polietileno de alta densidad y fueron llevados a incubación a 36.5° durante el tiempo requerido. Al final de cada tiempo las muestras fueron retiradas y enjuagadas con agua desionizada para posteriormente secarlas por 24 horas a 37 °C. También se evaluó el porcentaje de pérdida de peso de las muestras y el porcentaje de absorción de agua durante los tiempos de inmersión, así como el cambio en el pH de la solución durante los primeros 10 días.

3.4 Caracterización

3.4.1 Bioglass® 45S5

Los ensayos de caracterización al Bioglass® 45S5 se llevaron a cabo en el polvo blanco resultante triturado previamente.

Se llevaron a cabo pruebas de tamaño y distribución de tamaño de partícula en un equipo *BECKMAN COULTER LS100Q* cuyo fundamento está basado en la medición del tamaño de las partículas por la difracción de un haz de luz láser que es analizado mediante un detector que utiliza esta información para la construcción de gráficas y datos de distribución de tamaños. Los resultados son presentados como funciones distributivas acumulativas, que representan la cantidad en masa de partículas pertenecientes a un tamaño dado.

La morfología y composición se estudiaron utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (MEB) *JEOL JSM 7600F* y en un microscopio electrónico de barrido convencional *JEOL JSM-6400*. Para el análisis se usó el polvo obtenido después de la molienda y no fue necesario realizar recubrimiento para su observación.

Con el fin de comprobar la naturaleza amorfa del vidrio se realizó un análisis mediante difracción de rayos X (XRD) en un equipo *Bruker D8 ADVANCE DAVINCI* utilizando radiación monocromática de cobre con longitud de onda $\lambda_{Cu} = 1.5418 \text{ \AA}$, el rango de barrido utilizado fue de 20 a 70 °, con 3 s por paso y a un paso de 0.02°. La composición química del biovidrio se obtuvo mediante análisis por fluorescencia de rayos X en un equipo *Bruker S8 TIGER*.

Se realizó también un análisis térmico para determinar las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión. El análisis se llevó a cabo en 30 mg de polvo con un paso de 20 °C/min desde temperatura ambiente hasta 1300 °C en un equipo *SDT Q600 TA Instruments*, se utilizó un crisol de alúmina y atmósfera de argón.

La medición del área superficial de las partículas de vidrio se llevó a cabo empleando la técnica BET de adsorción de una monocapa de nitrógeno gas, mediante un equipo *HORIBA 9600*.

La densidad real del Bioglass 45S5 se obtuvo mediante un picnómetro de helio *Micromeritics AccuPyc 1330*, para la medición se utilizaron 8.2402 g del vidrio. Los datos reportados son el promedio de 10 repeticiones las cuales se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25 °C).

3.4.2 Andamios de PLA/ Bioglass® 45S5

La morfología de los andamios fue analizada mediante MEB utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo *JEOL JSM 7600F* y un microscopio de barrido convencional *JEOL JSM-6400*.

Con el propósito de obtener la cristalinidad de los andamios se realizó un análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la entalpía de fusión de los andamios en un equipo *DSC Q200 TA Instruments*. El análisis se llevó a cabo desde temperatura ambiente hasta 250 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en crisoles desechables de aluminio y atmósfera de argón.

El grado de cristalinidad (X_c) de las espumas fue determinada mediante la ecuación [67,68]:

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^0} \times \left(\frac{1}{w}\right)$$

Donde:

ΔH_m = es el calor de fusión de las muestras determinado experimentalmente mediante DSC.

ΔH^0 = el calor de fusión del PLA completamente cristalino (93.6 J/g) [68].

w = fracción en peso de PLA en el compósito.

Para el cálculo de la densidad aparente se pesaron 3 especímenes para cada composición diferente de aproximadamente 5 mm³. La densidad aparente se calculó simplemente dividiendo la masa de cada andamio entre su volumen. La porosidad de los andamios (P) de PLA/Bioglass 45S5 fue calculada mediante la fórmula [65,69]:

$$P = \left[1 - \rho \left(\frac{W_g}{\rho_g} + \frac{W_{PLA}}{X_c(\rho_c - \rho_a) + \rho_a} \right) \right]$$

Donde:

ρ = densidad aparente de la espuma.

W_g = fracción en peso del vidrio.

W_{PLA} = fracción en peso de PLA.

X_c = es la fracción cristalina de la matriz de PLA.

ρ_g = densidad del vidrio (2.6895 g/cm³, determinado experimentalmente).

ρ_c y ρ_a = densidad del PLA completamente cristalino (1.290 g/cm³) y completamente amorfo (1.248 g/cm³), respectivamente.

También se realizaron pruebas para determinar el área superficial de las espumas en un equipo *HORIBA 9600* mediante absorción de nitrógeno. Previamente al análisis se realizó una degasificación de las muestras.

Se realizaron pruebas de compresión en los andamios para obtener curvas de esfuerzo deformación antes y después de su inmersión en SBF. Las propiedades de compresión de los andamios de PLA y PLA/Bioglass 45S5 se llevaron a cabo en una máquina universal MTS *Zwick-Roell* de acuerdo a lo descrito en la norma ASTM D695 para ensayos de compresión a plásticos rígidos. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente en prismas rectangulares de 5 mm² × 10mm a una velocidad de 1 mm/min. Las espumas fueron comprimidas hasta un 60% de su longitud original. Los resultados estadísticos fueron el promedio de 3 muestras.

La evolución de la morfología en la superficie fue analizada mediante microscopía de barrido una vez que las muestras fueron retiradas del fluido corporal simulado y secadas. Se monitoreó el cambio en el pH durante los primeros 10 días de inmersión para ambas composiciones. También se registró la absorción de agua y pérdida de peso de las espumas. Para la absorción de agua las muestras fueron secadas superficialmente al ser retiradas de la solución SBF y se registró éste peso, posteriormente se realizó el proceso de secado por 24 horas al vacío y se registró el peso final de

las espumas después de su incubación. El porcentaje de absorción de agua (%WA) se determinó mediante la ecuación:

$$\%WA = \frac{M_{wet} - M_{dry}}{M_{dry}} \times 100$$

Donde:

M_{wet} = masa del andamio mojado después de su inmersión en SBF.

M_{dry} = masa final del andamio.

Para el cálculo de la pérdida de peso (%WL), la relación utilizada fue:

$$\%WL = \frac{M_0 - M_{dry}}{M_0}$$

Donde:

M_0 = masa inicial del andamio.

M_{dry} = masa final del andamio.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Bioglass 45S5

Los resultados de las caracterizaciones realizadas al Bioglass 45S5 se muestran a continuación.

4.1.1 Tamaño y distribución de partícula

El tamaño de partícula es un factor importante a considerar ya que un mayor tamaño de las partículas bioactivas disminuye las propiedades mecánicas del andamio polimérico compuesto, así como su velocidad de disolución *in vitro* y por lo tanto su bioactividad, ya que las partículas con menor tamaño presentan una mayor superficie expuesta al momento de estar en contacto con el SBF [70].

Como se observa en la Figura 4.1, la curva de % volumen muestra una distribución multimodal con un tamaño de partícula promedio de $9.706 \mu\text{m}$ y una desviación estándar de 2.822 ($d_{10} = 1.642 \mu\text{m}$, $d_{50} = 13.24 \mu\text{m}$, $d_{90} = 26.56 \mu\text{m}$), la gráfica presenta una amplitud considerable lo que indica que existe un amplio rango de distribución en el tamaño de las partículas obtenidas después de la molienda, el cual va desde 0.375 a $36.24 \mu\text{m}$. Como se observa de la curva de volumen acumulativo existe un 50% de partículas por debajo del tamaño de $13.24 \mu\text{m}$ lo cual es favorable para el propósito de obtener andamios con alta bioactividad y buenas propiedades mecánicas.

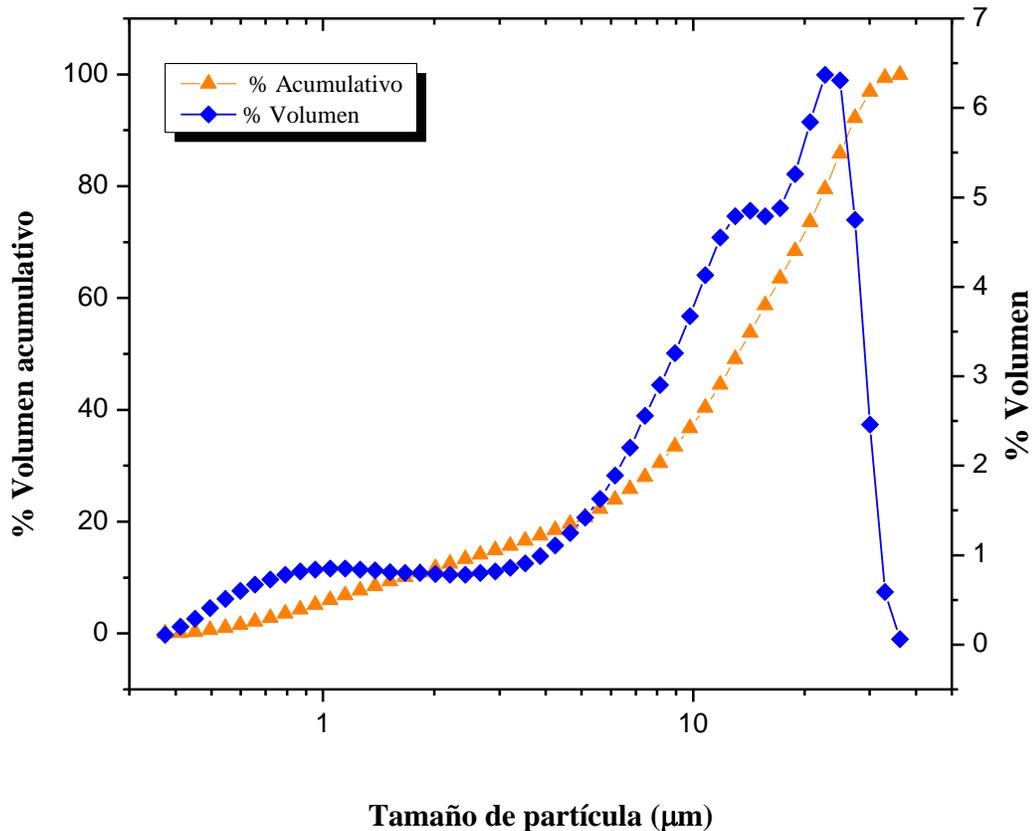


Figura 4.1 Tamaño y distribución de partícula del Bioglass 45S5.

4.1.2 Morfología

Acorde a los resultados de distribución de tamaño de partícula, en las micrografías mostradas en la Figura 4.2 se puede observar la diferencia en rango de tamaños de las partículas del polvo analizado, tanto las partículas pequeñas como las grandes muestran bordes angulares afilados, presentan forma irregular no esférica debido al proceso de molienda al que fue sometido el vidrio. En las partículas de mayor tamaño se puede observar con mayor facilidad que éstas poseen una textura superficial lisa sin porosidad y con algunos pequeños defectos, también se aprecia que las partículas más pequeñas tienden a aglomerarse (Fig. 4.2[b]) lo cual se puede atribuir a atracciones débiles debidas a las fuerzas de Van der Waals.

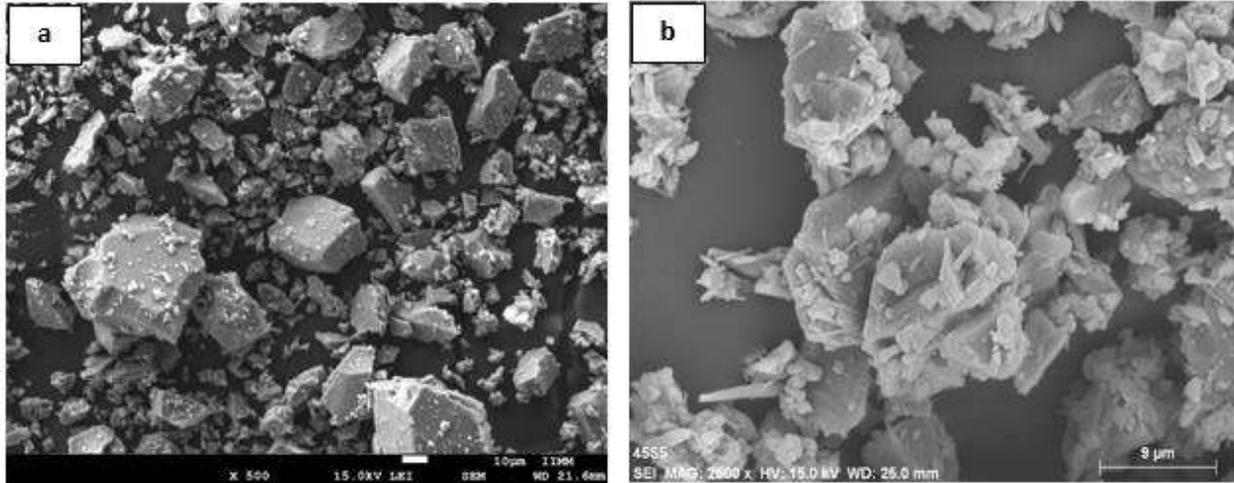


Figura 4.2 Micrografías por MEB del polvo triturado de Bioglass® 45S5 (a) 500x y (b) 2500x.

4.1.3 Difracción de rayos X y fluorescencia de rayos X

Como se observa en el patrón de difracción obtenido del análisis de rayos X realizado al biovidrio (Figura 4.3), se tiene un pico amplio no bien definido y de baja intensidad en $2\theta \approx 32^\circ$ lo cual indica que el proceso de temple llevado a cabo fue lo suficientemente rápido para mantener la morfología amorfa del vidrio fundido, lo cual asegura una mayor bioactividad *in vitro*, ya que como ha sido reportado la cristalización en vidrios bioactivos puede afectar la integración entre las interfaces del material y el tejido óseo ya que disminuye la velocidad de formación de la capa mineral de HA [71,72], incluso la cristalización puede llegar a convertir al Bioglass® 45S5 en un material inerte debido a que una fase cristalina impide la liberación de iones Ca^{2+} y Na^+ desde la superficie del vidrio [73].

La Tabla 4.1 presenta los resultados de la composición química del biovidrio que se obtuvo a partir del análisis de fluorescencia de rayos X. Se puede observar que las proporciones de los 4 componentes principales del Bioglass® 45S5, SiO_2 , CaO , Na_2O y P_2O_5 , son próximas a los valores teóricos, siendo el contenido de Na_2O es más alejado de estos valores muy probablemente debido a la evaporación del componente por las temperaturas empleadas durante la fusión, con algunas proporciones de compuestos de impurezas provenientes del crisol de sílice fundida utilizado durante la fabricación del biovidrio.

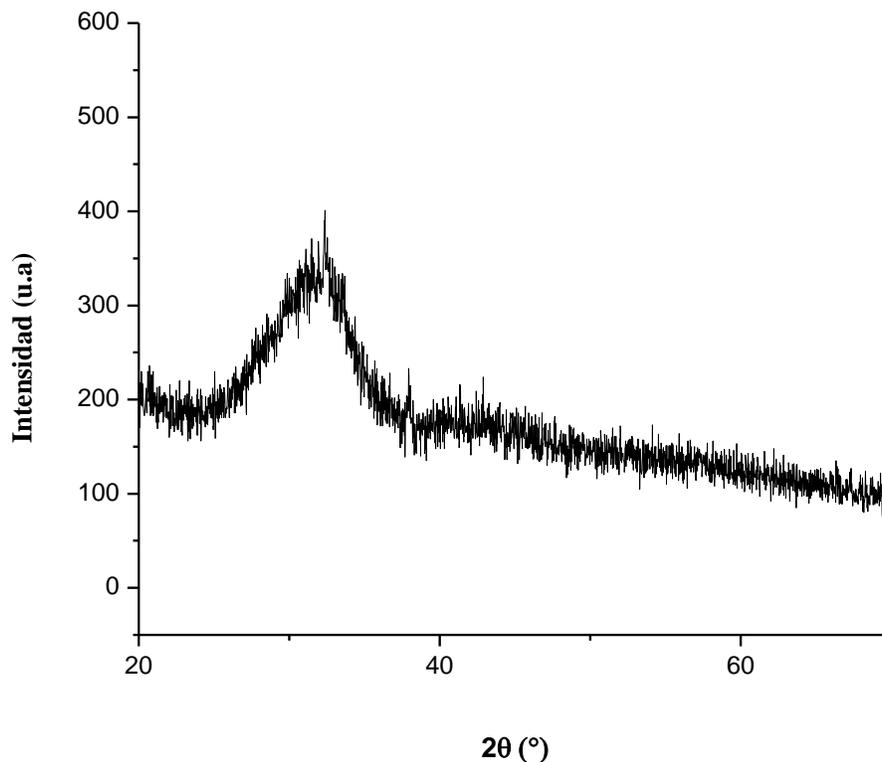


Figura 4.3 Patrón de DRX del Bioglass® 45S5.

Tabla 4.1 Composición química del Bioglass® 45S5 obtenida por XRF (% en peso).

SiO₂	CaO	Na₂O	P₂O₅	Al₂O₃	K₂O	Fe₂O₃
44.8	26.0	21.6	5.53	1.64	0.220	0.147

4.1.4 DSC, área superficial y densidad

En la Figura 4. 4 se muestra el termograma obtenido del análisis térmico, de la curva DSC se observa un pico endotérmico y otro exotérmico a 1157 °C y 678°C los cuales corresponden a las temperaturas de fusión (T_m) y cristalización (T_c), respectivamente. Los picos no se encuentran bien definidos debido a la mezcla de componentes que forman el vidrio. Antes del pico correspondiente a la cristalización se observa un cambio de pendiente en 561 °C el cual corresponde a la transición vítrea (T_g).

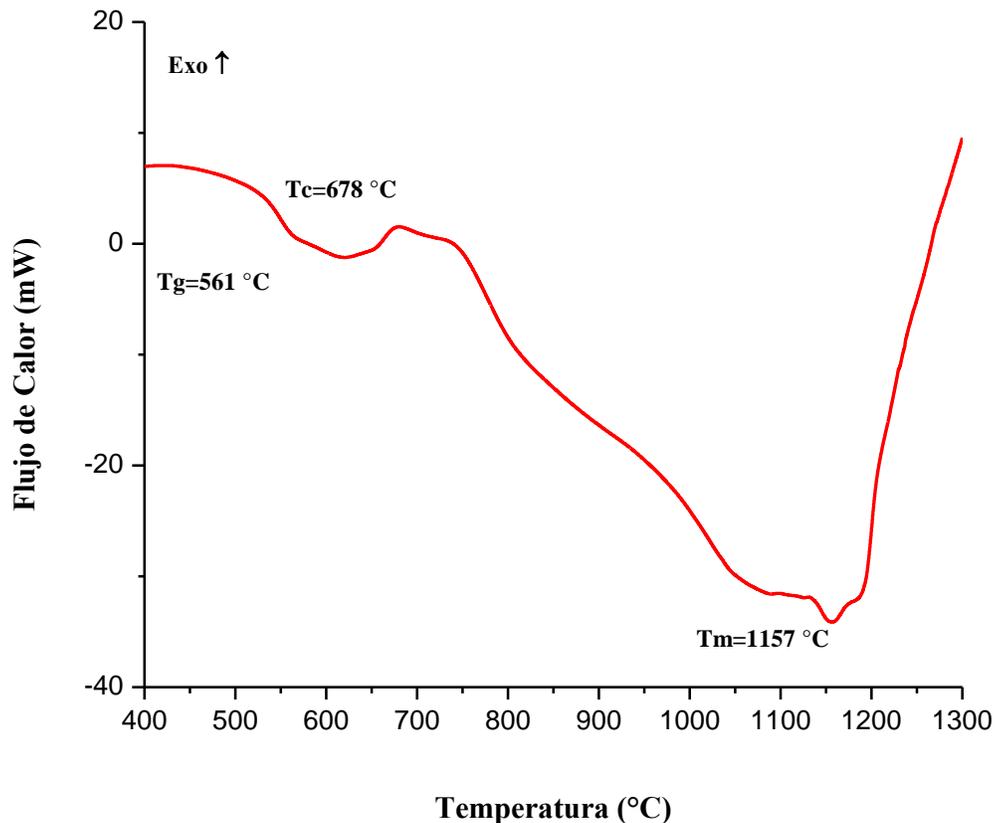


Figura 4.4 Termograma DSC del Bioglass 45S5 obtenido después de la fusión y temple

El área superficial obtenida mediante absorción de nitrógeno fue de $0.22 \text{ m}^2/\text{g}$. El vidrio presenta un área superficial relativamente pequeña debido a la superficie lisa característica de los vidrios obtenidos por fusión y temple y al tamaño micrométrico del polvo final. El resultado de las pruebas realizadas en el picnómetro de helio para la densidad real fue de $2.6895 \text{ g}/\text{cm}^3 \pm 0.0019$. Existe una pequeña variación en cuanto al valor reportado en la literatura ($2.825 \text{ g}/\text{cm}^3$ [69]) lo cual puede ser debido a ligeras variaciones en la composición final del vidrio obtenido, también dicha variación se puede atribuir a las partículas más pequeñas que se aglomeran en la superficie de las partículas mayores como se observa en las imágenes MEB (Figura 4.2[b]), lo cual genera regiones similares a poros cerrados, por lo cual en la medición se considera un volumen mayor al real.

4.2 Andamios porosos PLA/Bioglass® 45S5

4.2.1 Temple del PLA

Antes de utilizar el PLA para la fabricación de los andamios primero se sometió a un tratamiento térmico de fusión y temple con el fin de eliminar la cristalinidad del polímero para facilitar la disolución de éste en diclorometano. La Figura 4.5 muestra las curvas obtenidas de los análisis de calorimetría diferencial de barrido del ácido poliláctico antes y después del tratamiento térmico. Como se observa en las gráficas, el proceso de temple fue efectivo para lograr disminuir la cristalinidad del PLA, como se puede ver la curva DSC del polímero después del temple presenta un pico exotérmico de cristalización (113.30 °C), mientras que en el polímero tal como fue recibido del proveedor no se observa dicho pico, en base a las entalpías de cristalización y fusión obtenidas de ambas curvas, se calculó el porcentaje de cristalinidad el cual resultó ser de ~31% para el polímero antes del temple y de ~8% para el polímero después del temple lo que indica que se tiene un polímero casi completamente amorfo después del proceso de fusión y temple.

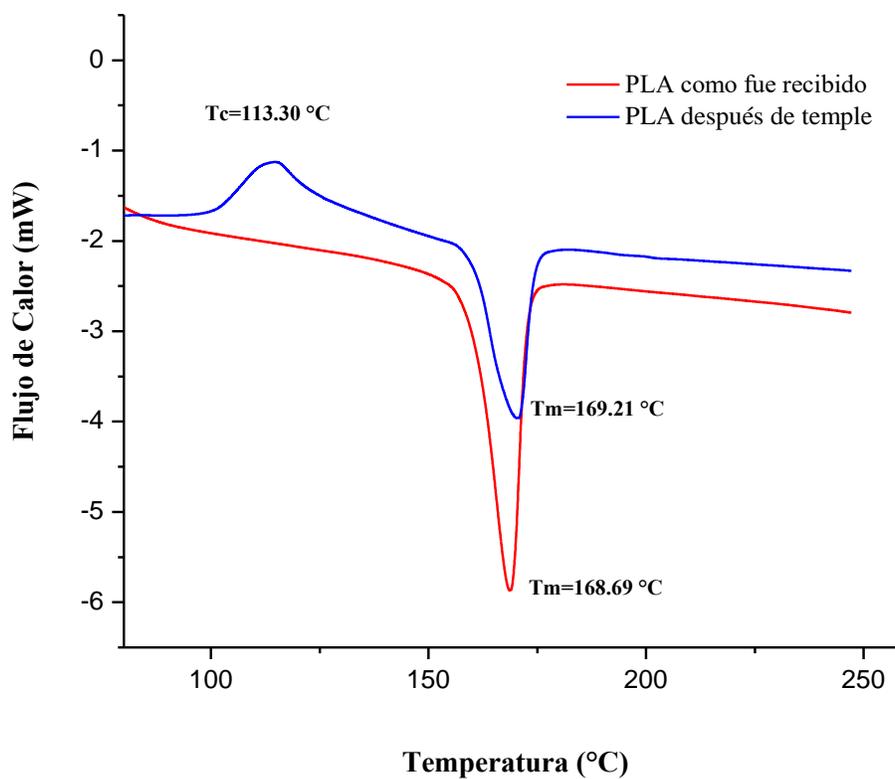


Figura 4.5 Curvas de DSC para el PLA antes y después del proceso de fusión y temple.

4.2.2 Morfología

Las Figuras 4.6 y 4.7 presentan imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de los andamios porosos de PLA/Bioglass® 45S5 a diferentes aumentos para observar detalles de su morfología.

Como se ve en las Figuras 4.6 y 4.7, los andamios consisten de macro y mesoporos característicos que se encontraron en todas las composiciones analizadas; la formación de los macroporos se atribuye a la coalescencia de las gotas de la solución hexano-DCM, mientras que los mesoporos fueron creados por los cristales de PLA que se formaron durante el proceso de separación de fases por descomposición espinodal del polímero. La adición de partículas de Bioglass no tuvo gran efecto sobre la morfología de los andamios (Figura 4.7). La combinación de estas dos estructuras porosas en la morfología final de los andamios resulta en una mayor porosidad y de igual forma confiere las propiedades necesarias a los andamios para su uso en regeneración de tejido óseo ya que una estructura mesoporosa ayuda a la adhesión celular mientras que los macroporos son necesarios para que las células puedan penetrar hacia el interior del andamio [74].

En las imágenes por MEB representativas de los andamios, se observa que los andamios presentan macroporos con interconectividad entre ellos, debido tanto a la estructura mesoporosa formada por la cristalización del PLA como a defectos de la red polimérica formados durante la separación de fases (Figura 4.6) lo que los hace adecuados para su uso en ingeniería de tejidos, ya que este es uno de los requisitos fundamentales para el intercambio de nutrientes y desecho de productos metabólicos de las células que se encuentran dentro del andamio [74,75,4].

Las partículas de Bioglass se observan principalmente en las paredes y dentro de los poros de los andamios compuestos (Figura 4.7), como se ve éstas se encuentran totalmente embebidas en las estructuras poliméricas, ya que los cristales de PLA en forma de agujas formados en el proceso de separación de fases comienzan a entrelazarse unos a otros alrededor de las partículas de vidrio envolviéndolas completamente. Debido a la forma de la estructura mesoporosa de las espumas las partículas de Bioglass pueden estar en contacto directo con los fluidos corporales, y de igual forma esto ayuda a que al momento de su exposición las partículas de Bioglass se mantengan fijas en el andamio.

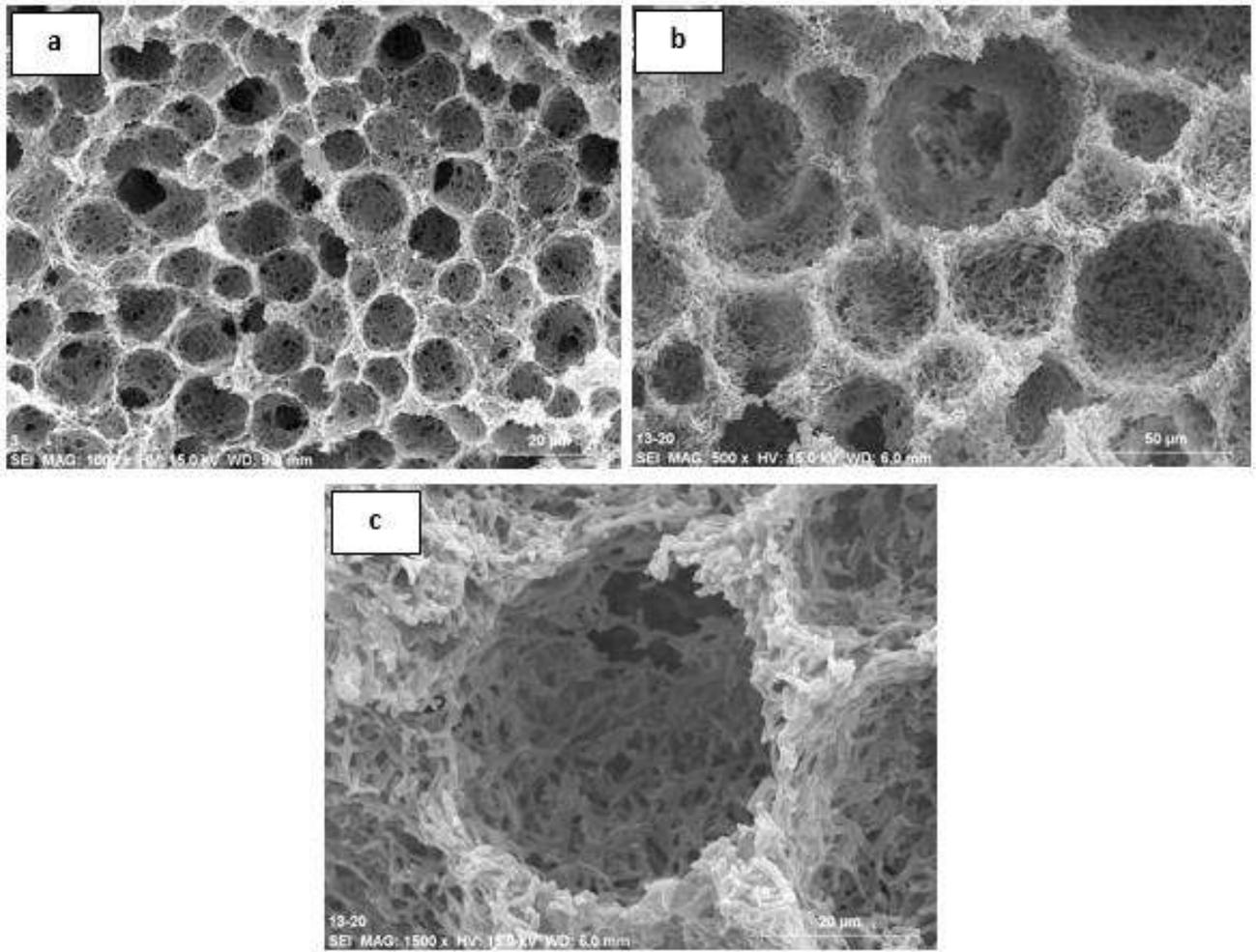


Figura 4.6 Imágenes por MEB de los andamios porosos PLA/Bioglass® 45S5 con varios contenidos de PLA: (a) 18% PLA 1000x, (b) 13% PLA 500x, y (c) 13% PLA 1500x.

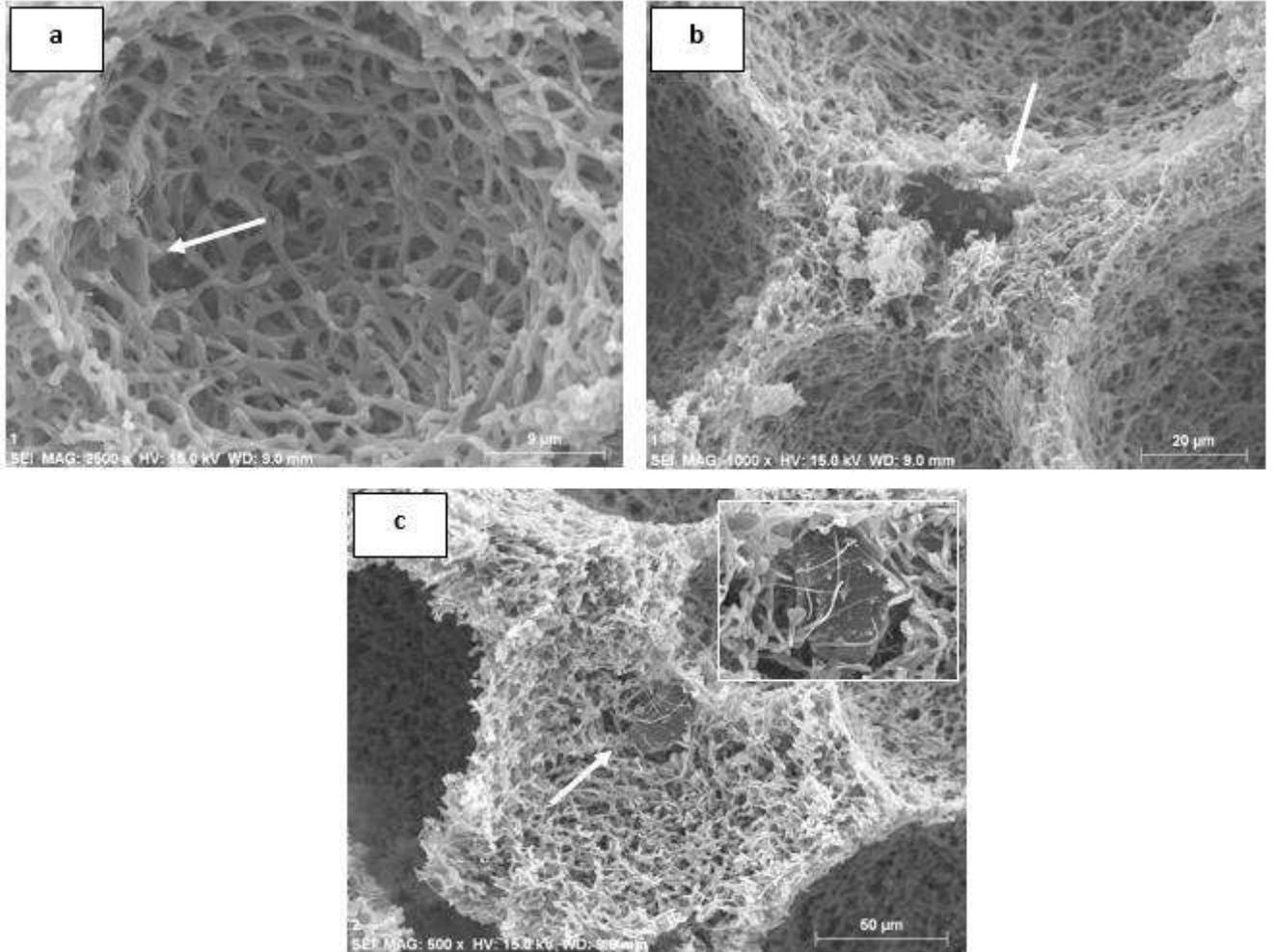


Figura 4.7 Micrografía mostrando las partículas de Bioglass® 45S5 embebidas en la matriz polimérica de andamios con 13% PLA., (a) 2500x, (b) 1000x, y (c) 500x.

4.2.3 Tamaño de poro

En la Tabla 4.2 se resumen los tamaños promedio de macroporo obtenidos mediante imágenes MEB de los sistemas estudiados.

Tabla 4.2 Tamaño de poro medio de los andamios ($n = 100$).

Contenido de Bioglass	13% PLA	18% PLA	23% PLA
Sin BG	119.50 ± 69.6	35.24 ± 9.58	14.03 ± 2.47
5% BG	107.17 ± 44.55	21.99 ± 4.36	13.13 ± 2.25
10% BG	105.14 ± 18.48	15.26 ± 2.77	9.53 ± 1.97

Las espumas presentan macroporos esféricos que van desde las $\sim 10 \mu\text{m}$ a $\sim 120 \mu\text{m}$. Claramente se observa que el tamaño de los macroporos aumenta con la disminución del contenido de PLA, ya que el tamaño de los macroporos es mucho mayor en los andamios con 13 % PLA los cuales presentan macroporos de más de $100 \mu\text{m}$, por lo cual en este sentido sería la mejor composición para su uso en ingeniería de tejido óseo ya que como se ha reportado para la migración celular y vascularización del nuevo tejido se requieren tamaños de poro de por lo menos $100 \mu\text{m}$ [4].

Aunque contrario a lo anterior también se han utilizado andamios con tamaño de poro desde $20 \mu\text{m}$ a $1500 \mu\text{m}$ como sustitutos óseos [76-79]. Akay y col. [80] estudiaron el comportamiento de osteoblastos en un andamio polimérico poroso de poliéster tipo poliHIPE. Los osteoblastos mostraron mayor población en andamios con tamaño de poro menor ($40 \mu\text{m}$), pero a mayores tamaños de poro ($100 \mu\text{m}$) se facilitaba la migración celular, además el tamaño de poro no mostró ningún efecto en la mineralización ni la profundidad de penetración de las células. Teniendo en cuenta esto los andamios de 18 % PLA también podrían ser considerados, aunque presentan tamaño de poro menor a las $100 \mu\text{m}$.

Durante el temple, la solución de PLA-hexano-DCM se divide en dos fases: una rica en polímero y otra deficiente en polímero. En la fase deficiente en polímero comienzan a formarse gotas del solvente-no solvente que con el tiempo comienzan a coalescer ya que son capaces de moverse a través de la fase rica en polímero con el fin de minimizar la energía superficial entre las dos fases, estas gotas de solvente-no solvente son las que forman los macroporos en los andamios al ser posteriormente removidas en los procesos de intercambio de solvente y secado. Por otro lado, un polímero semicristalino como el PLA, al ser sometido al temple, comienza a cristalizar debido a la separación de fases [81], estos cristales formados comienzan a interconectarse lo cual produce la gelación del sistema lo que impide que el proceso de separación de fases continúe, esta interconexión entre cristales es lo que produce la red mesoporosa del andamio.

Cuando la concentración de polímero en la solución disminuye, la separación de fases es más lenta y por lo tanto la gelación del sistema tarda más en llevarse a cabo, lo que produce que haya más tiempo para que se dé el proceso de coalescencia entre las gotas formadas por el proceso de separación de fases y se generen poros de mayor tamaño.

Por otro lado, la disminución en la concentración de polímero en la solución inicial disminuye la viscosidad de ésta lo que también contribuye a incrementar el tiempo de gelación de sistema ya que la movilidad de las gotas es mayor y es más fácil la coalescencia lo que resulta en poros más grandes.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 4.2, también hay un efecto sobre el tamaño de los poros dependiendo del contenido de Bioglass. La adición de partículas de Bioglass disminuyó el tamaño de poro, aunque no en gran medida, esto debido a que las partículas del biovidrio aumentan la viscosidad de la solución y hacen que la gelación del sistema sea más rápida. Se observó a través de las imágenes por MEB que la adición de partículas bioactivas hace que el tamaño de poro sea más homogéneo.

4.2.4 Cristalinidad

La cristalización del PLA hace que la velocidad de degradación *in vitro* disminuya por lo cual es un factor importante a analizar [4].

Debido a la cristalización que se da en el polímero por la separación de fases durante el temple, todas las composiciones estudiadas resultan en andamios semicristalinos. En la Figura 4.8 se ilustran los valores de cristalinidad calculados.

La cristalinidad de los andamios aumenta en ~3 % a medida que el porcentaje de PLA disminuye desde 23% a 13 % (55.7% a 59%), debido a que la velocidad de separación de fases y gelación son más lentas por la mayor cantidad de solvente disponible lo que da más tiempo para que las cadenas de PLA se reordenen. Entre los andamios de 13 %PLA y 18% PLA los valores de cristalinidad son prácticamente iguales al añadir 5% de partículas de Bioglass. Una disminución más notoria en la cristalinidad se observa en los tres sistemas al aumentar la concentración de Bioglass a 10%, lo cual se debe a que las partículas de Bioglass aumentan la viscosidad del sistema y hace que la gelación del sistema se de en menor tiempo que en los sistemas de PLA puro, lo que da menor tiempo para la cristalización del polímero.

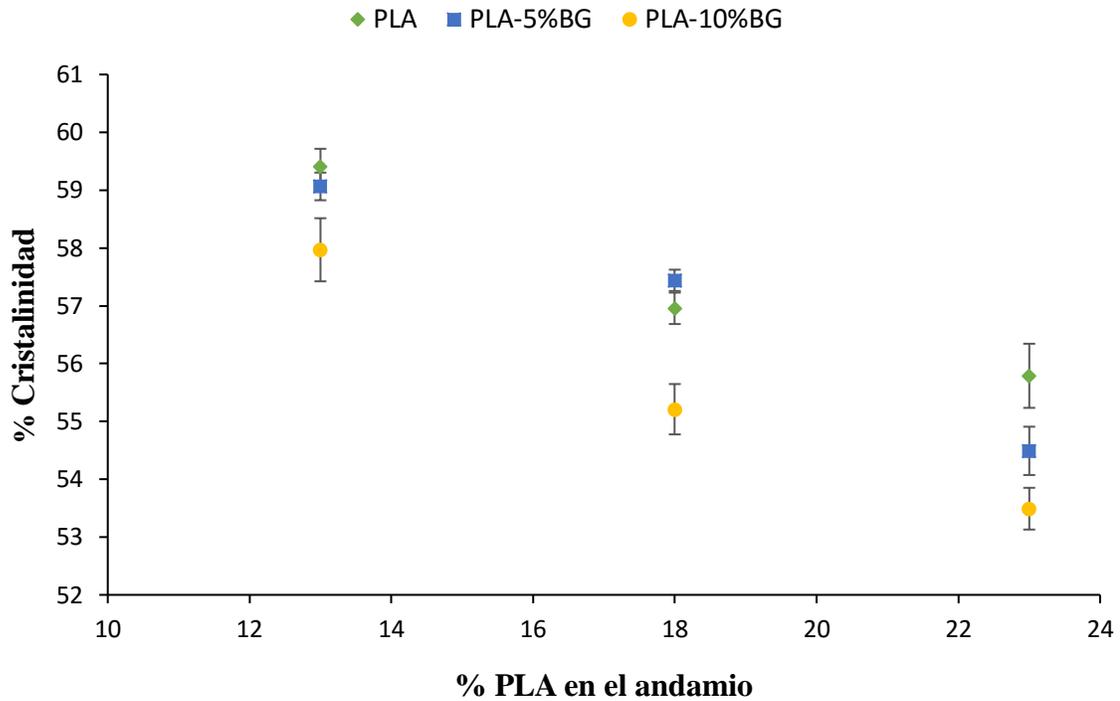


Figura 4.8 Gráfica de los valores de cristalinidad calculados para cada composición ($n = 3$).

Esto concuerda con estudios realizados por Xing y col. [82] sobre membranas de PLLA en los cuales se muestra que a mayores velocidades de separación de fase las cadenas de polímero tienen menor tiempo para formar lamelas lo que resulta en una menor cristalinidad.

La cristalinidad de los andamios fue comprobada mediante difracción de rayos X (Figura 4.9). En el difractograma se muestran picos estrechos lo que confirma la cristalinidad de los andamios, los valores 2θ en los cuales se definen los picos corresponden a una estructura cristalina del PLA identificada como α' (JCPDS No 00-054-1917), que se ha reportado como un “cristal desordenado” de red ortorrómbica, con un empaquetamiento más holgado que el de la forma α del PLA. La formación de esta estructura puede ser producto de la baja temperatura de cristalización y la presencia de hexano como no solvente, lo que da menor movilidad a las cadenas de PLA y dificulta el arreglo de estas [83,84].

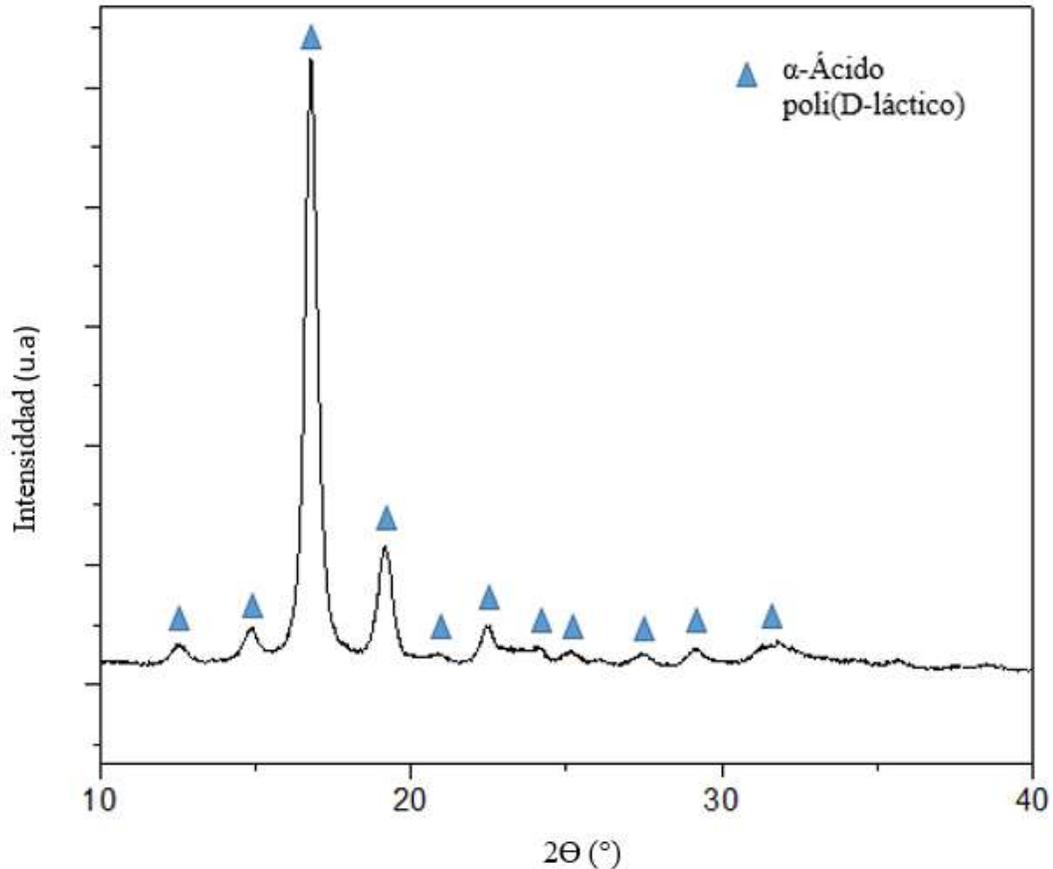


Figura 4.9 Patrón de difracción de rayos X del andamio 13% PLA-10% Bioglass.

4.2.5 Porosidad y densidad aparente

En la Tabla 4.3 se resumen las densidades y porosidades obtenidas de los andamios de PLA/Bioglass® 45S5. Al analizar estos valores se observa que la densidad aparente de los andamios aumenta a medida que aumenta la cantidad de vidrio añadido y el contenido de PLA en la solución inicial debido a la menor cantidad de solvente para formar poros, por lo que las espumas resultan más compactas. Por esta misma razón los andamios de 13 % PLA resultan ser los de mayor porosidad y los de 23% PLA exhiben la menor porosidad de las 3 composiciones; por otro lado, como los poros de las espumas de 13% PLA son de mayor tamaño pueden resistir mejor el proceso de secado sin colapsar lo cual también contribuye a la porosidad final.

En todo el rango de composiciones estudiadas, la adición de Bioglass no tiene gran influencia sobre la porosidad de los andamios, las porosidades son prácticamente las mismas incluso al añadir 10 %

de Bioglass, sin embargo, la adición de Bioglass si aumenta la densidad de los andamios debido a la mayor densidad de éste con respecto al PLA (2.6895 g/cm³ y 1.24 g/cm³, respectivamente). Esto concuerda con el estudio realizado por Hong y col. [60] donde la adición de hasta 20 % de partículas bioactivas no modifica significativamente la morfología o porosidad de espumas de PLA obtenidas mediante TIPS.

Tabla 4.3 Densidad y porosidad de los andamios PLA/Bioglass® 45S5 ($n = 3$).

Composición	Densidad aparente (g/cm ³)	Porosidad (%)
13PLA	0.1162 ± 0.009	90.87 ± 0.72
13PLA-5BG	0.1229 ± 0.025	90.66 ± 1.42
13PLA-10BG	0.1311 ± 0.014	89.98 ± 1.07
18PLA	0.1585 ± 0.011	86.93 ± 1.92
18PLA-5BG	0.1758 ± 0.019	86.56 ± 0.78
18PLA-10BG	0.1867 ± 0.023	86.12 ± 1.69
23PLA	0.2090 ± 0.010	83.56 ± 0.84
23PLA-5BG	0.2219 ± 0.021	83.02 ± 1.61
23PLA-10BG	0.2311 ± 0.013	83.15 ± 0.99

4.2.6 Área superficial

La Tabla 4.4 muestra los resultados de las áreas superficiales de los andamios compuestos obtenidas mediante BET.

Tabla 4.4 Área superficial de los andamios PLA/Bioglass® 45S5 (m²/g).

Contenido de Bioglass	13% PLA	18% PLA	23% PLA
Sin BG	49.40	69.87	61.67
5% BG	51.43	70.99	62.56
10% BG	50.69	71.98	62.24

Las composiciones de 18% PLA y 23% PLA resultaron con mayor área superficial lo que no concuerda con las porosidades antes mostradas donde los andamios de 13 % PLA son los que exhiben la máxima porosidad (~90 %), esto indica que los andamios de 13 % PLA seguramente presentan porosidad cerrada, el método BET de adsorción de una monocapa de N₂ no es capaz de

detectar estos poros cerrados por lo cual el área superficial resulta menor con respecto a las otras composiciones de PLA.

La adición de partículas de Bioglass aumenta ligeramente el área superficial pero no en gran medida, en general este factor no resulta tener gran influencia sobre el área superficial.

4.2.7 Ensayos de compresión

Las curvas esfuerzo-deformación de los andamios de PLA con y sin adición de Bioglass se muestran en las Figuras 4.10 y 4.11.

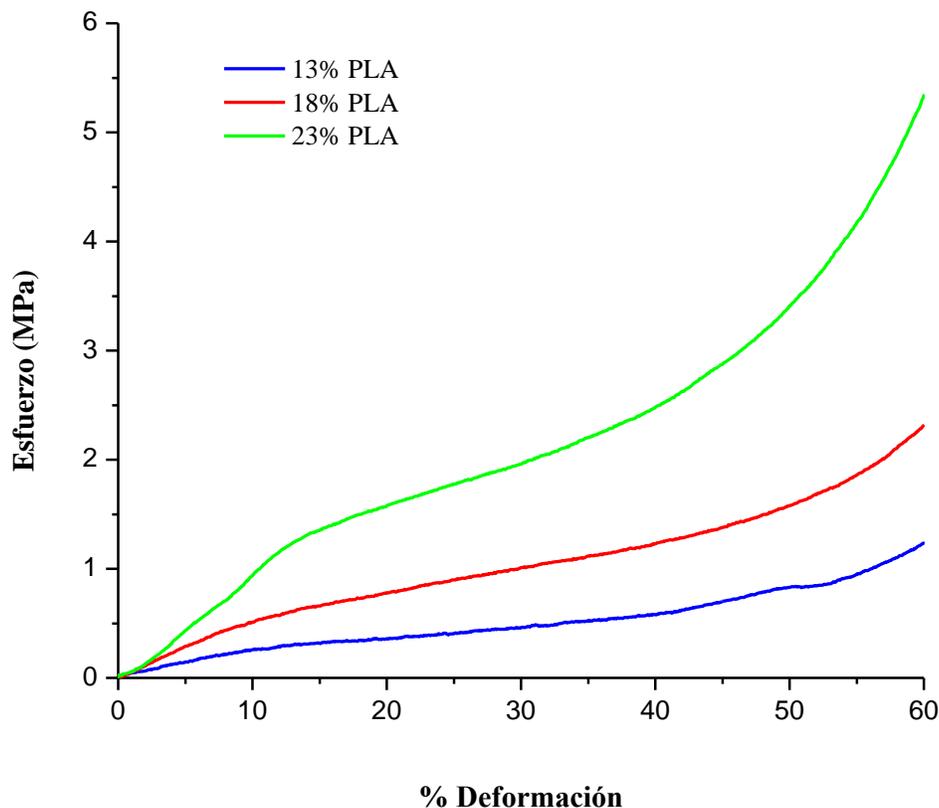


Figura 4.10 Curvas esfuerzo deformación para los andamios de PLA sin partículas de Bioglass.

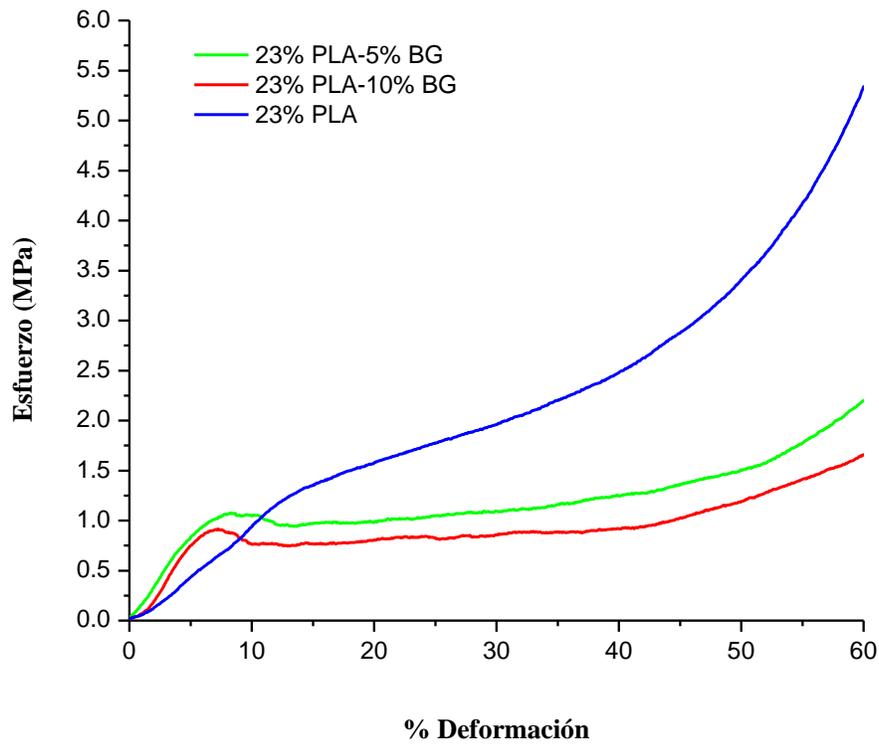


Figura 4.11 Curvas esfuerzo deformación para andamios de 23% PLA con 10% y 5% de Bioglass adicionado.

En la Tabla 4.5 se muestran los resultados de esfuerzo máximo obtenidos para cada composición de PLA y PLA-Bioglass.

Tabla 4.5 Esfuerzo máximo de andamios PLA/Bioglass 45S5 comprimidos hasta un 60 %, ($n = 3$).

Composición	Esfuerzo Máximo (MPa)
13PLA	1.02 ± 0.33
13PLA-5BG	0.39 ± 0.10
13PLA-10BG	0.23 ± 0.04
18PLA	2.27 ± 0.10
18PLA-5BG	0.84 ± 0.31
18PLA-10BG	0.81 ± 0.08
23PLA	4.81 ± 0.48
23PLA-5BG	1.93 ± 0.29
23PLA-10BG	1.74 ± 0.02

De las gráficas y los valores de la tabla se puede observar que un aumento en la concentración de PLA incrementa el esfuerzo máximo a la compresión, este comportamiento es debido a que a mayores concentraciones de PLA se tienen poros más pequeños y uniformes, de igual forma como se mencionó anteriormente las composiciones de mayor concentración en PLA son las que presentan menor porosidad, todo esto contribuye a un aumento en las propiedades mecánicas de compresión. Debido a que la porosidad es el factor dominante en la resistencia, los andamios de 13 % de PLA muestran la menor resistencia a la compresión ya que tienen la mayor porosidad y tamaño de poro.

De la figura 4.10 y figura 4.11 se observa que las curvas de las composiciones con Bioglass muestran un pico de fluencia en aproximadamente 8 % de deformación, lo que indica un comportamiento de deformación elástica antes de dicho punto, a diferencia de las curvas de polímero puro las cuales muestran comportamiento plástico, esto indica que inicialmente las composiciones con Bioglass soportan esfuerzos de compresión altos a deformaciones pequeñas, lo cual es atribuido a la naturaleza frágil del vidrio agregado.

En la Figura 4.12 se muestran los módulos de compresión calculados para las diferentes formulaciones de los andamios estudiados, el módulo fue calculado de la parte lineal de las curvas esfuerzo-deformación. De esta gráfica de barras se observa que hubo un aumento en el módulo de compresión a medida que la concentración de Bioglass se incrementa debido a la mayor rigidez de esta fase con un módulo de 35 GPa [85], aunque no muy notorio en comparación con el aumento del módulo respecto al incremento en PLA. El aumento en la concentración de PLA contribuye a que aumente el módulo debido a que concentraciones mayores de PLA presentan menor porosidad, tamaño de poro más homogéneo y menor tamaño de poro. En general los módulos calculados son bajos debido al comportamiento de elastómero que se observa en las gráficas de esfuerzo-deformación de los andamios por la naturaleza polimérica de la matriz.

En algunos casos se observan grandes desviaciones estándar lo cual puede ser atribuido a que los especímenes cortados para los estudios son porciones pequeñas en los cuales pueden presentarse variaciones entre uno y otro en los tamaños de poro, porosidad, contenido de Bioglass y tamaño de

las partículas de Bioglass. Los especímenes con partículas de Bioglass de menor tamaño, mayor contenido de Bioglass, menor porosidad y menor tamaño de poro resultan en un mayor módulo.

La adición de partículas de Bioglass no mejoró la resistencia a la compresión, sino que por el contrario esta disminuyó en gran medida, todas las composiciones de PLA-Bioglass mostraron un esfuerzo máximo a la compresión menor que los andamios de PLA puro. Resultados similares han sido reportados anteriormente donde las propiedades mecánicas de compósitos disminuyen con el incremento del contenido de vidrio bioactivo [86-88].

La disminución en las propiedades mecánicas puede ser el resultado de una pobre interface entre polímero y vidrio debido a la naturaleza hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente, por lo cual el polímero y el vidrio no interactúan químicamente lo que causa el debilitamiento de la estructura polimérica formada. Por otra parte, los andamios con mayor contenido de Bioglass presentan una menor cristalinidad lo que también contribuye a la disminución en las propiedades de compresión.

Las propiedades mecánicas de los andamios pueden mejorarse mediante la funcionalización de la superficie de las partículas de Bioglass o disminuyendo el tamaño de partícula hasta un tamaño nanométrico, lo cual podría mejorar también la interacción entre el polímero y el vidrio. Misra y col. [89] demostraron que la adición de partículas de Bioglass con tamaño nanométrico tienen mayor efecto sobre las propiedades mecánicas que partículas micrométricas.

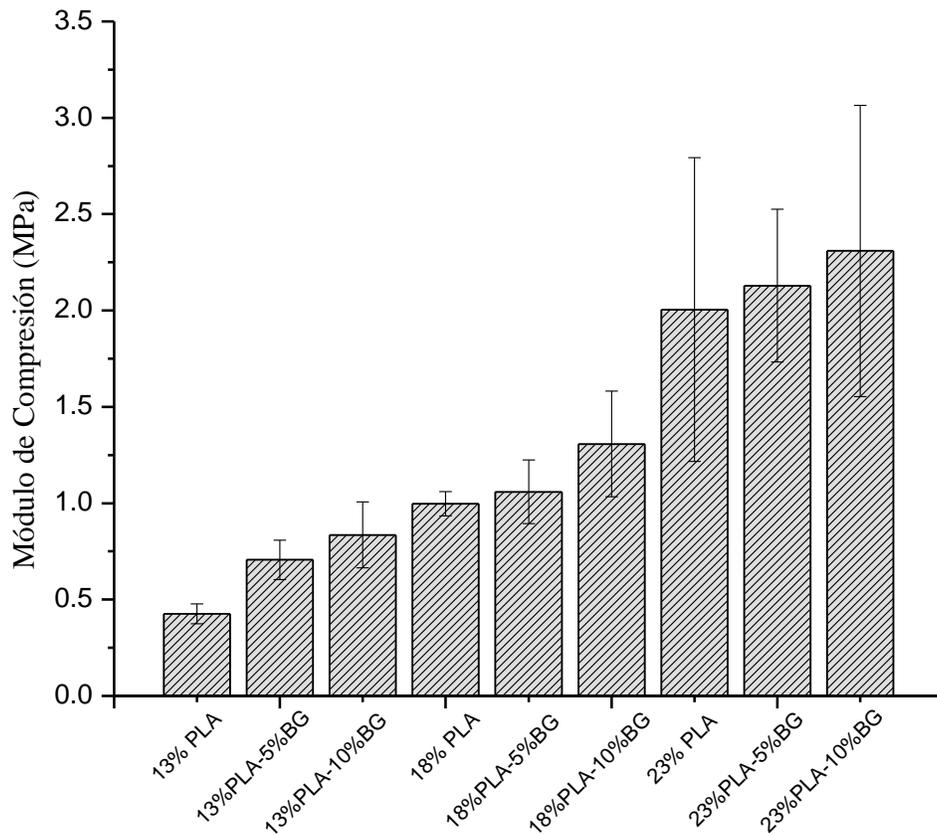


Figura 4.12 Módulo de compresión de andamios PLA obtenidos por NTIPS a diferentes composiciones de Bioglass 45S5 ($n = 3$).

El refuerzo de las partículas de Bioglass puede ser más evidente a mayores deformaciones donde la porosidad no sea un factor determinante en el comportamiento mecánico de los andamios, y en los monolitos compactos las propiedades mecánicas a la compresión del Bioglass tomen mayor relevancia. Por esta razón la resistencia a la compresión se evaluó a diferentes niveles de deformación (60% y 80%).

Los andamios se llevaron a una deformación de hasta 80 % de su longitud original y las resistencias a la compresión aumentaron considerablemente, los resultados se muestran en la Tabla 4.5

Tabla 4.6 Esfuerzo máximo de andamios PLA/Bioglass® 45S5, comprimidos hasta un 80 % de su longitud original ($n = 3$).

Composición	Esfuerzo Máximo (MPa)
13PLA	7.84 ± 0.78
13PLA-5BG	1.95 ± 0.38
13PLA-10BG	1.31 ± 0.22
18PLA	12.03 ± 0.60
18PLA-5BG	9.70 ± 1.04
18PLA-10BG	3.25 ± 0.78
23PLA	24.17 ± 3.63
23PLA-5BG	9.70 ± 1.04
23PLA-10BG	9.07 ± 2.76

Como se esperaba, el esfuerzo máximo de compresión aumentó al compactar en mayor medida los andamios, ya que la porosidad comienza a pasar a segundo plano como uno de los factores determinantes en el comportamiento mecánico. En los andamios de 13% PLA-10% Bioglass, que son los que presentaron menor resistencia, hubo un aumento de poco más del 600 % en el esfuerzo máximo. En las espumas con menor porosidad inicial (23% PLA) incluso la tendencia de disminución en el esfuerzo máximo de compresión con respecto al aumento en el contenido de Bioglass comienza a no ser tan evidente.

Ningún andamio presentó falla bajo las condiciones a las cuales los ensayos de compresión fueron llevados a cabo.

En la Tabla 4.7 se enlistan las propiedades mecánicas del hueso trabecular en ciertas zonas y para un rango dado de edad [90].

Tabla 4.7 Valores promedio del módulo y esfuerzo último de hueso trabecular para varios sitios anatómicos [90].

Sitio	Rango de edad	Módulo (MPa)	Esfuerzo último (MPa)
Vertebra	15-87	67 ± 45	2.4 ± 1.6
Tibia proximal	59-82	445 ± 257	5.3 ± 2.9
Fémur proximal	58-85	441 ± 271	6.8 ± 4.8
Calcáneo	No reportado	68 ± 84	1.4 ± 1.3

Comparando las Tablas 4.6 y 4.7 se observa que todos los valores de resistencia a la compresión de los andamios se encuentran dentro del rango o muy cercanos a los valores de esfuerzo último reportados, por lo cual en este sentido resultarían compatibles como sustitutos óseos.

Diversos valores de esfuerzos a la compresión han sido reportados en la literatura para andamios poliméricos con porosidades mayores a 75 %, los cuales van desde ~0.075 a ~4 MPa [4]. Por lo cual es posible afirmar en base a estos valores reportados que todos los andamios presentados en este estudio poseen propiedades adecuadas para su uso como andamios en ingeniería de tejidos.

4.2.8 Estudios *in vitro*

Los análisis *in vitro* se realizaron en los andamios con composición 13% PLA, 13% PLA-5% Bioglass, 13% PLA-10% Bioglass. En las Figuras 4.13 y 4.14 se muestran las gráficas de absorción de agua y pérdida de peso de los andamios a través de los tiempos de inmersión fijados de 3, 7, 14, y 28 días.

La degradación del PLA se da por la hidrólisis en un proceso que es autocatalítico debido a la producción de ácido láctico [91]. La adición de partículas de Bioglass en los andamios además de conferir carácter bioactivo a los andamios también acelera la degradación del PLA debido a la disminución del carácter hidrofóbico de éste, aunque por otro lado se ha reportado que cuando estas partículas bioactivas reaccionan con los fluidos corporales, se crea un ambiente alcalino por la liberación de iones Na^+ y Ca^{2+} , lo cual neutraliza al ácido láctico formado de manera que se disminuye la velocidad de degradación del polímero, lo que permite que el andamio conserve su integridad por más tiempo [92].

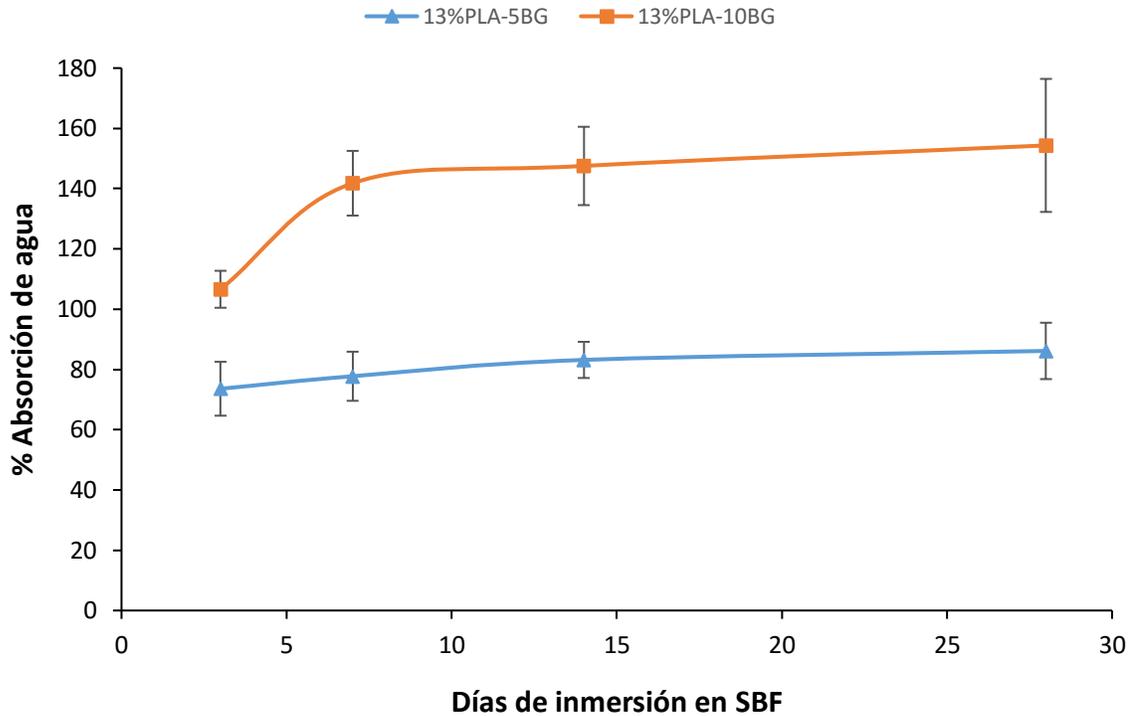


Figura 4.13 Porcentaje de absorción de agua de los andamios con composición 13% PLA-5% Bioglass y 13%PLA-10% Bioglass a los diferentes periodos de incubación ($n = 3$).

La absorción de agua es otro factor a considerar debido a que la mayor absorción de agua tiene un efecto directo en la degradación *in vitro* del polímero ya que la hidrólisis sería más rápida.

Ya que el PLA es relativamente hidrofóbico y absorbe pocas cantidades de agua por sí sólo, como era de esperarse, a medida que el contenido de Bioglass aumenta, también aumenta la capacidad de absorción de agua de las espumas, como se observa en la Figura 4.13, un aumento de sólo 5 % en el contenido de Bioglass eleva la capacidad de absorción de agua desde ~85 % hasta un ~150% a los 28 días. Desde los primeros 3 días de incubación los andamios muestran una gran afinidad hacia el fluido simulado ya que presentan porcentajes de absorción de hasta más del 100 % en el caso del andamio con 15 % de Bioglass.

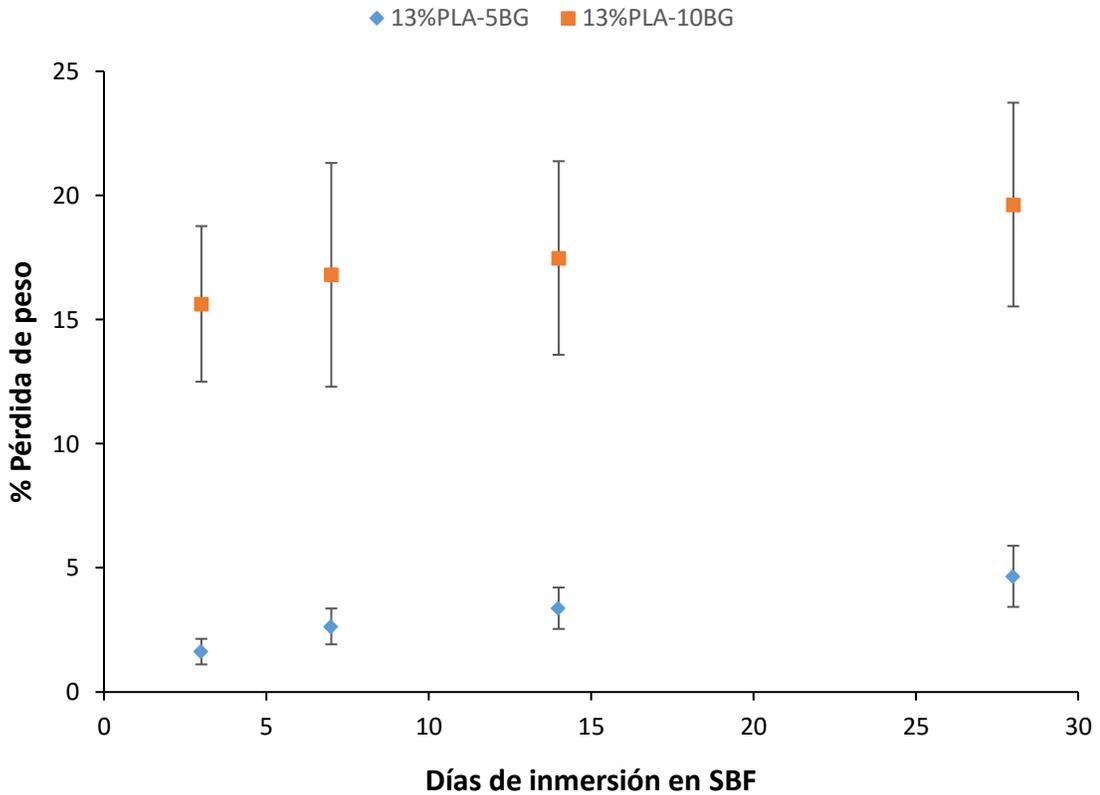


Figura 4.14 Porcentaje de pérdida de peso de andamios con 13 % PLA-5 % Bioglass y 13 % PLA- 10% Bioglass a diferentes tiempos de inmersión ($n = 3$).

Debido a la mayor afinidad del andamio hacia el medio de incubación y la gran absorción de agua, los andamios con 10 % de Bioglass presentan una pérdida de peso mucho mayor que la de las partículas con solo 5 % de Bioglass. En el caso de los andamios con mayor contenido de vidrio se tiene una pérdida de peso de hasta ~19 % al final de los 28 día de incubación mientras que para los de menor contenido sólo se obtuvo un ~4 %.

En la Tabla 4.8 se muestra una comparación entre los resultados de degradación *in vitro* (al final de 28 días) entre los andamios de PLA con y sin Bioglass añadido.

Tabla 4.8 Comparación entre pérdida de peso y absorción de agua de los andamios porosos de composición 13% PLA inmersos en SBF durante 28 días.

Andamio	% Pérdida de peso	% Absorción de agua
13PLA	0.41 ± 0.28	28.9 ± 6.8
13PLA-5BG	4.66 ± 1.23	86.14 ± 9.35
13PLA-10BG	19.63 ± 4.10	154.34 ± 22.07

Los andamios a los cuales no se les añadió partículas de Bioglass no presentaron gran cambio con respecto al peso inicial, comparados con los andamios compuestos de PLA-Bioglass la pérdida de peso de éstos es prácticamente nula, de igual forma la absorción de agua de éstos después de 28 días es de tan sólo un ~29 %, un valor muy bajo si se compara con los andamios con Bioglass integrado.

Los valores relativamente altos en la desviación estándar obtenidos para los ensayos *in vitro* pueden ser debido a que las partículas de Bioglass no se encuentran perfectamente distribuidas a través de todo el andamio, y además el tamaño de las partículas de Bioglass varía considerablemente entre unas y otras partículas por lo cual algunos de los especímenes sometidos a el estudio pueden tener mayor contenido de Bioglass que otros, lo cual genera una diferencia en la velocidad de degradación y capacidad de absorción de agua entre un andamio y otro.

En base a los resultados observados, tanto en la capacidad de absorción de agua como la pérdida de peso, claramente se muestra que la adición de Bioglass a los andamios tiene una gran influencia en la degradación *in vitro* de éstos, es evidente que la mejora en el porcentaje de absorción de agua con respecto la cantidad de Bioglass aumenta, lo cual es debido a la capacidad hidrofílica de éste lo cual ayuda a contrarrestar en gran medida la naturaleza hidrofóbica del PLA como se ve al comparar los resultados de los andamios sin bioglass con los que contienen partículas bioactivas. La pérdida de peso incrementa ampliamente debido a que la mejora en la afinidad hacia el fluido simulado provoca que éste tenga contacto con una mayor superficie del andamio lo que produce una mayor hidrólisis en la red de PLA.

Varios estudios previos concuerdan con los resultados encontrados en el presente proyecto de investigación, en los cuales se ha demostrado que incorporando partículas de Bioglass a andamios

de matriz polimérica se puede controlar la velocidad de degradación de éstos. Mediante la variación en la cantidad de la fase bioactiva añadida a los andamios se puede acelerar la degradación del polímero a través de la mejora en la capacidad de absorción de agua, para acelerar el proceso de hidrólisis [60,93,94].

La variación del pH del medio de incubación con respecto al tiempo fue monitoreada por 10 días, para las composiciones 13%PLA-5% Bioglass y 13%PLA-10% Bioglass, los resultados se muestran en la Figura 4.15. Como se observa, el pH inicialmente comienza a aumentar en ambas composiciones, aunque el aumento es más notable en el andamio con 10 % de Bioglass. El máximo aumento en el pH se alcanza aproximadamente a los 3 y 5 días para los sistemas con 5 % y 10% de Bioglass, respectivamente. Después el pH comienza a disminuir en ambos casos, aunque de manera más pausada en el caso del sistema con 10 % de Bioglass. El aumento en el pH es debido a la disolución y liberación de iones Ca^{2+} y Na^+ del vidrio a la solución, por lo cual, este aumento es más notorio y acelerado en el caso del andamio con mayor contenido de vidrio. Posteriormente, la degradación del PLA comienza a tener efecto sobre el pH ya que debido a la hidrólisis se libera ácido láctico el cual comienza a disminuir el pH del medio, por lo cual este efecto es más marcado en el andamio con menor cantidad de Bioglass ya que la neutralización debido a los iones liberados por el vidrio es menor.

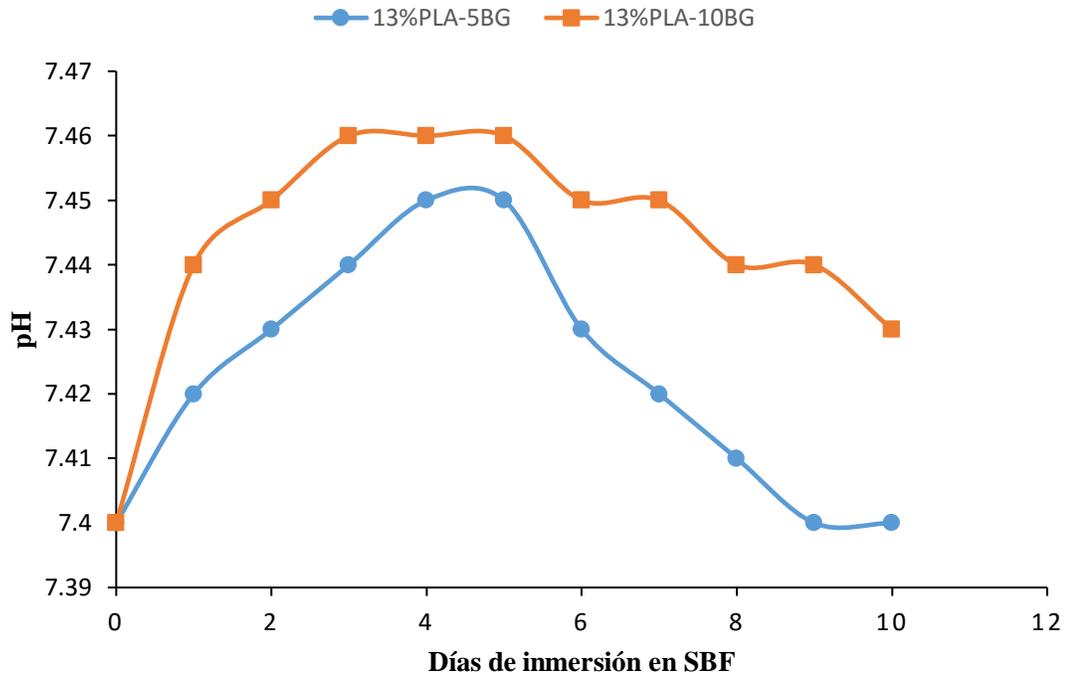


Figura 4.15 Gráfica del cambio en el pH de la solución SBF durante los primeros 10 días de incubación.

En general el pH no varía en gran medida a través del tiempo de monitoreo debido a la neutralización entre el polímero y el vidrio. Este comportamiento de neutralización ha sido encontrado en sistemas similares al aquí estudiado, donde el pH no tiene un cambio brusco a través del tiempo de incubación en fluidos simulados [93]. Este efecto de neutralización de los productos ácidos es una ventaja, ya que se evita la posible reacción inflamatoria producida por el aumento de pH debido a la degradación del PLA, también es favorable ya que un aumento o disminución muy pronunciado en el pH no es recomendable para la viabilidad de los osteoblastos [95]. Además, la neutralización del medio reduce la velocidad de degradación del PLA, de forma que su integridad mecánica se asegura por mayor tiempo.

Los resultados de los ensayos de compresión realizados a 3 especímenes de 5 mm² x 10 mm después de 28 días de inmersión en SBF se muestran en la Tabla 4.9. Como se observa, todos los andamios sufrieron una disminución en la resistencia a la compresión, debido a la pérdida de peso sufrida por la degradación de éstos a través del tiempo de incubación, sin embargo, al final de los 28 días de inmersión en SBF, los andamios aún presentan características mecánicas apropiadas

para andamios porosos de polímero-partículas bioactivas [4], lo cual los sitúa como soportes mecánicos adecuados para el área a regenerar.

Tabla 4.9 Esfuerzo máximo de andamios 13 % PLA con 5 % y 10 % de Bioglass antes y después de inmersión en SBF (compresión máxima = 60%, $n = 3$).

Composición	Esfuerzo Máximo (MPa)
13PLA-5BG	0.39 ± 0.10
13PLA-5BG @ 28 días en SBF	0.18 ± 0.01
13PLA-10BG	0.23 ± 0.04
13PLA-10BG @ 28 días en SBF	0.15 ± 0.06

La adición de partículas de Bioglass a las espumas tiene el objetivo principal de conferir bioactividad a los andamios, la cual es necesaria para lograr unión con el tejido óseo ya que como se ha mostrado en estudios anteriores los andamios poliméricos de PLA por sí solos no demuestran la capacidad de formación de hidroxiapatita al ser sometidos a pruebas *in vitro* en SBF [60,96].

Las imágenes por MEB mostradas en las figuras 4.16 y 4.17 de las muestras de 13% PLA con 5% y 10 % Bioglass, respectivamente, después de inmersión en SBF muestran la formación de cristales de hidroxiapatita en la superficie de la red polimérica de los andamios, la formación de hidroxiapatita se observó en ambas composiciones desde el tercer día de inmersión en SBF.

Puede observarse que la morfología de la apatita formada cambia a través del tiempo de inmersión desde una estructura con forma parecida a escamas (Figura 4.16[a]) para un tiempo de inmersión de 3 días, a una estructura con la forma típica de coliflor de la hidroxiapatita con numerosos cristales pequeños después de 28 días de inmersión (Figura 4.16[b]), también se observa en la figura 4.16[a] la formación de partículas más compactas de superficie lisa con formas irregulares las cuales han sido atribuidas a la formación de los cristales de hidroxiapatita [96].

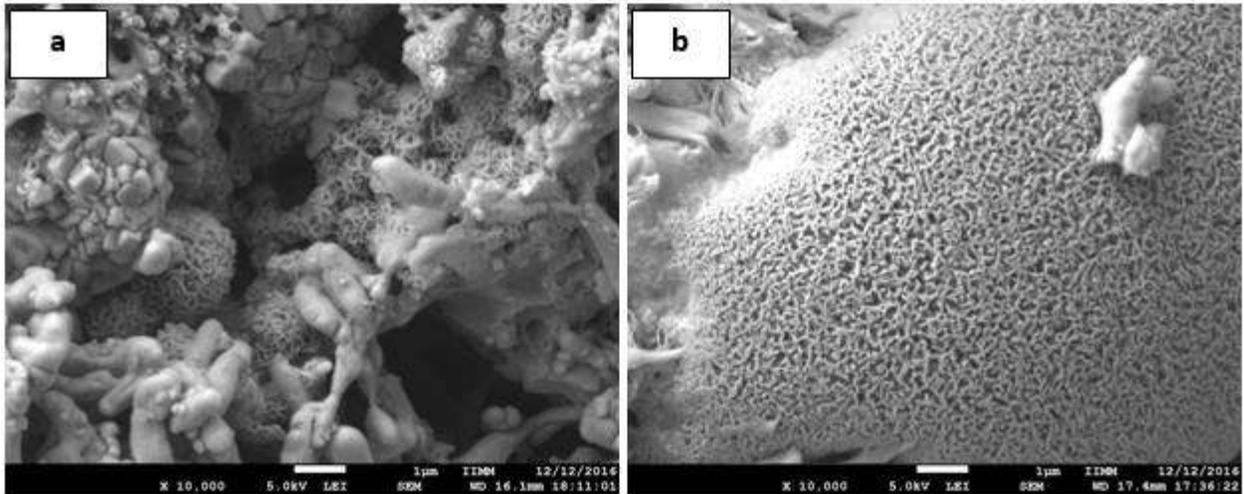


Figura 4.16 Imágenes por MEB a 10000x de la formación y evolución de la HA en andamios de 13% PLA-5% Bioglass a tiempos de (a) 3 días y (b) 28 días de incubación en SBF.

Hong y colaboradores [60] prepararon andamios de PLLA con porosidades similares a las aquí obtenidas (~90%), los andamios fueron preparados mediante el método de separación de fases inducido térmicamente con diferentes cantidades de nano partículas de vidrio bioactivo de composición 55 % SiO_2 , 40% CaO , 5% P_2O_5 (porcentaje mol), los andamios de PLLA con 10 % de nano partículas añadidas no mostraron ningún cambio en la superficie después de 10 días de incubación en SBF al contrario de los andamios estudiados en este proyecto los cuales muestran mayor bioactividad, ya que tanto los andamios con 5% y 10 % de Bioglass presentan formación de hidroxiapatita en su superficie desde el tercer día de incubación, lo cual es debido a que el Bioglass 45S5 es la composición de vidrio bioactivo que exhibe mayor índice de bioactividad [3].

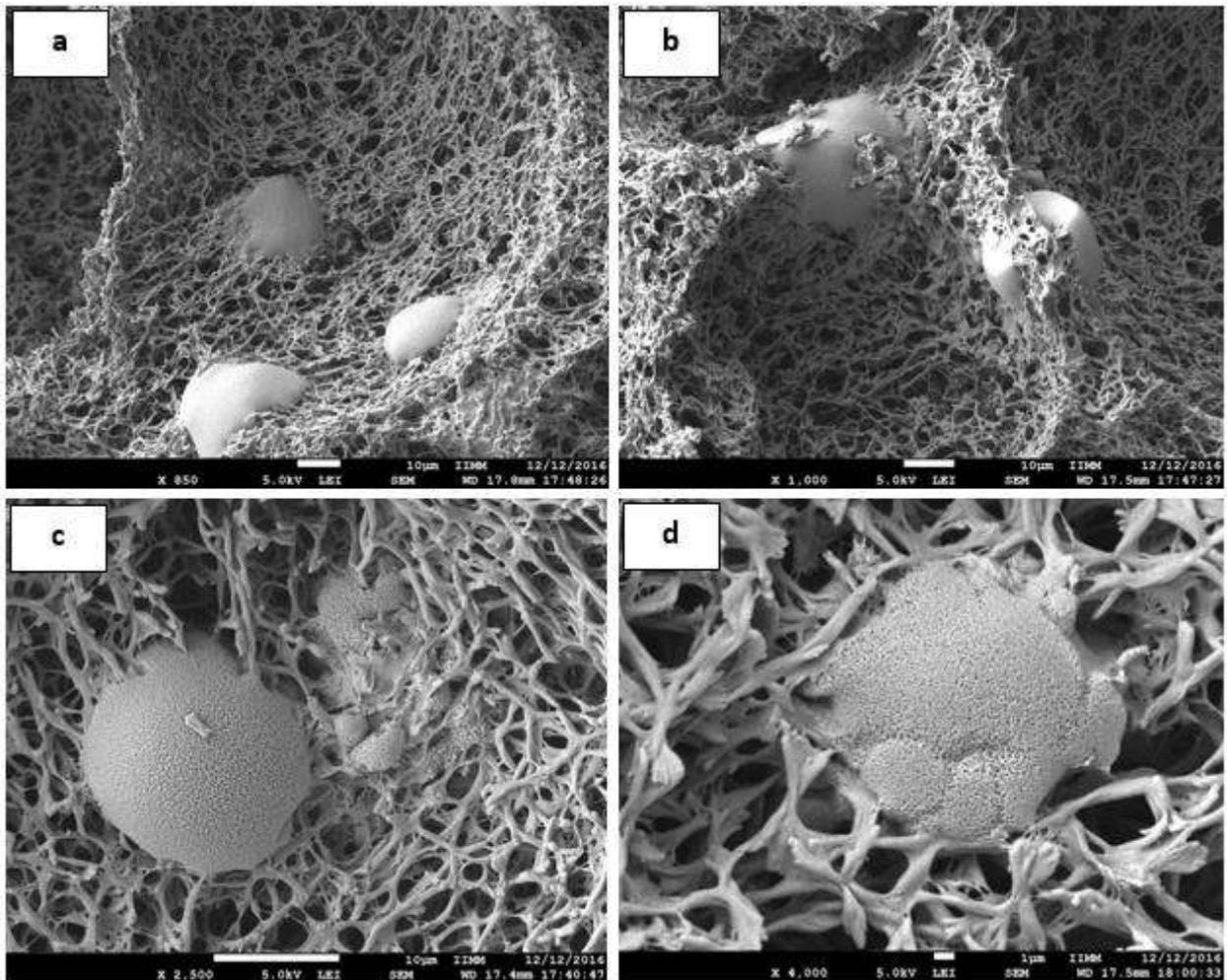


Figura 4.17 Imágenes por MEB de la formación de HA en la superficie de los andamios de 13% PLA-10% Bioglass después de 28 días de incubación en SBF. (a) 850x, (b) 1000x, (c) 2500x, y (d) 4000x.

Los estudios *in vitro* demostraron la bioactividad de los andamios a través de la formación de cristales de hidroxiapatita en la superficie del material lo cual permitirá que estos pueden generar unión con el tejido óseo a través de la formación de esta capa de hidroxiapatita superficial [3].

5. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo permitió la obtención de andamios porosos bioactivos de PLA/Bioglass® 45S5 a través del método de separación de fases líquido-líquido con el uso de hexano como no solvente y temperatura de separación de fases de -20 °C. De las caracterizaciones realizadas a los andamios obtenidos se puede concluir que:

1. Mediante el método de fusión y temple se logró la obtención de partículas de Bioglass® 45S5 totalmente amorfas con una densidad de 2.825 g/cm³ y un tamaño promedio de partícula de 9.706 µm.
2. Con el método de NTIPS y las condiciones establecidas para la separación de fases, a través del sistema diclorometano-hexano-PLA se obtuvieron andamios porosos con la morfología necesaria para su uso en regeneración ósea, ya que todas las composiciones estudiadas presentan una morfología con macro y mesoporos, los cuales son requeridos para la adhesión y migración celular de los osteoblastos.
3. Debido al proceso de separación de fases todos los andamios resultaron ser semicristalinos (53%-59%), la estructura cristalina presente caracterizada mediante XRD resulta ser la fase α' del PLA.
4. El tamaño de poro obtenido varió en un rango entre 10 µm-120 µm siendo la composición con menor contenido de PLA (13% PLA) en la solución inicial la que produce los andamios con mayor tamaño de poro, la adición de Bioglass al sistema acelera la separación de fases reduciendo el tamaño de poro.
5. Todos los andamios presentaron altas porosidades (> 89%) y relativamente alta área superficial (47 m²/g -71 m²/g), ambas propiedades no se vieron afectadas significativamente por la adición o incremento en el contenido de Bioglass.

6. La mayor influencia de la adición de Bioglass se observó en las propiedades mecánicas y degradación de las espumas. El esfuerzo a la compresión de los andamios disminuyó en gran medida conforme el contenido de vidrio aumentó, lo cual es atribuido a la pobre interface vidrio-polímero, aún así los andamios presentaron propiedades mecánicas adecuadas para este tipo de compósitos incluso después de su inmersión en SBF por 28 días (0.15 MPa para el sistema 13% PLA con 10% de Bioglass). Por el contrario, la degradación de los andamios, evaluada mediante la pérdida de peso y absorción de agua, aumentó considerablemente a mayor contenido de Bioglass.

7. En los estudios *in vitro*, los andamios mostraron la capacidad de producir hidroxiapatita en su superficie desde el tercer día de incubación lo cual los sitúa como materiales bioactivos capaces de formar una unión con el tejido óseo circundante.

TRABAJO A FUTURO O RECOMENDACIONES

Se recomienda la modificación de la superficie de las partículas de Bioglass 45S5 para obtener una mayor adhesión entre las partículas bioactivas y el polímero, de tal forma que las propiedades mecánicas de los andamios no se vean disminuidas por la adición de partículas de Bioglass. Otra alternativa para incrementar las propiedades a la compresión de las espumas sería la adición de partículas de Bioglass 45S5 con un menor tamaño de partícula de ser posible nanométrico a los andamios para incrementar la interacción superficial de las dos fases.

También se recomienda comprobar la capa de hidroxiapatita formada a través del tiempo de incubación mediante espectroscopia de infrarrojo.

Como trabajo futuro para profundizar más es el estudio se sugiere la realización de pruebas *in vitro* en cultivos celulares a los andamios para evaluar la toxicidad, adhesión y proliferación celular, además se podría estudiar la morfología de andamios fabricados a temperaturas diferentes a los 20 °C, así como a concentraciones de PLA y Bioglass distintas a las analizadas en este proyecto, también se podría analizar las propiedades de compresión, morfología y la degradación *in vitro* de los andamios al añadir partículas bioactivas con composiciones diferentes al Bioglass 45S5.

REFERENCIAS

- [1] FELICITY R.A.J ROSE, RICHARD O.C. OREFFO. Bone Tissue Engineering: Hope Vs Hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 292(1), 1-7, 2002.
- [2] BLAKER JJ, GOUGH JE, MAQUET V, NOTINGHER I, BOCCACCINI AR. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 67A (4), 1401–1411, 2003.
- [3] HENCH LL. The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 17 (11), 967-978, 2006.
- [4] REZWAN K, CHEN QZ, BLAKER JJ, BOCCACCINI AR, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. Volume 27, p 3413-3431, 2006.
- [5] ELDESOQI K, SEEBACH C, NGUYEN NGOC C, MEIER S, NAU C, SCHAIBLE A, MARZI I, HENRICH D. High Calcium Bioglass Enhances Differentiation and Survival of Endothelial Progenitor Cells, Inducing Early Vascularization in Critical Size Bone Defects. *PLoS ONE*. 8(11), 2013.
- [6] Q. FU, E. SAIZ, M.N. RAHAMAN, A.P. TOMSIA. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives, *Materials Science and Engineering*. C (31), 1245–1256, 2011.
- [7] LIU A, HONG Z, ZHUANG X, CHEN X, CUI Y, LIU Y, JING X Surface modification of bioactive glass nanoparticles and the mechanical and biological properties of poly(L-lactide) composites. *Acta Biomater*. 4, 1005–1015, 2008.
- [8] KIM HW, LEE HH, CHUN GS. Bioactivity and osteoblast responses of novel biomedical nanocomposites of bioactive glass nanofiber filled poly (lactic acid). *Journal of Biomedical Materials Research A*. (85), 651–663, 2008.
- [9] GIANNOUDIS PV, DINOPOULOS H, TSIRIDIS E, Bone substitutes: an update. *Injury*. 36(3), 20-7, 2005.
- [10] SALGADO AJ, COUTINHO OP, REIS RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*. 4, 743–765, 2004.
- [11] STOCK UA, VACANTI JP, Tissue engineering: current state and prospects. *Annual Review of Medicine*. 52, 443-51, 2001.
- [12] KIM KM, EVANS GRD. Tissue engineering: the future of stem cells. *Topics in tissue engineering*. 2, 1-21, 2005.

- [13] KAUR S, SANDHU S, DHILLON SK, MAKHNI SK. Tissue Engineering and its future perspective in therapeutic medicine- A Brief Review. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research*. 4(4), 159-164, 2016.
- [14] JOSHUA R. PORTER, TIMOTHY T. RUCKH, KETUL C. POPAT. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. 25(6), 1539–1560, 2009.
- [15] AMIT S. MISTRY, ANTONIOS G. MIKOS. Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration. *Regenerative Medicine II Advances in Biochemical Engineering*. 9, 1-22, 2005.
- [16] STEVENS MOLLY M., Biomaterials for bone tissue engineering, *Materials Today*.11(5), pp 18-25, 2008.
- [17] ACKERMAN LV, SPJUT H. J. Bone and Joints. *Monographs in Pathology*. Editors: The Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 300- 31, 1976.
- [18] POLO-CORRALES L, LATORRE-ESTEVEZ M, RAMIREZ-VICK JE, Scaffold design for bone regeneration, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14(1). 15-56, 2014.
- [19] REY C, COMBRES C, DROUET C, GLIMCHER MJ, Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis International*. 20(6), 1013-1021, 2009.
- [20] DEMERS C, HAMDY CR, CORSI K, CHELLAT F, TABRIZIAN M, YAHIA L, Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Bio-medical Materials and Engineering*, 12(1), 15-35, 2002a.
- [21] RIDHA HAMBLI, NOUR HATTAB. Application of Neural Network and Finite Element Method for Multiscale Prediction of Bone Fatigue Crack Growth in Cancellous Bone. *Multiscale Computer Modeling in Biomechanics and Biomedical Engineering. Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*. 14, 3-30, September 2012.
- [22] S. WEINER AND H. D. WAGNER, THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science*. 28,271-298, 1998.
- [23] MANASSERO MATHIEU, ADELIN DECAMBRON, NANE GUILLEMIN, HERVÉ PETITE, RENA BIZIOS, VÉRONIQUE VIATEAU. Coral Scaffolds in Bone Tissue Engineering and Bone Regeneration. Springer, *The Cnidaria, Past, Present and Future*, 691-714, 2016.
- [24] SEN MK, MICLAU T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions?. *Injury*.38 (1), 75-80, 2007.
- [25] WARD WG, GOLDNER RD, NUNLEY JA, Reconstruction of tibial bone defects in tibial nonunion. *Microsurgery*, 11(1), 63-73, 1990.

- [26] KAREN J.L BURGA, SCOTT PORTERB, JAMES F KELLAMB. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 21(23), 2347–2359, 2000.
- [27] PATEL NR, GOHIL PP. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*. 2(4), 91-101, 2012.
- [28] LOPEZ-HEREDIA MA, SOHIER J, GAILLARD C, QUILLARD S, DORGET M, LAYROLLE P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 29, 2608–2615, 2008.
- [29] HUGHES TB. Bioabsorbable implants in the treatment of hand fractures: an update. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 445, 169– 174, 2006.
- [30] SIMON JA, RICCI JL, DI CESARE PE. Bioresorbable fracture fixation in orthopedics: a comprehensive review. Part I. Basic science and preclinical studies. *American Journal of Orthopedics*. 26, 665– 671, 1997.
- [31] EL-GHANNAM A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices*. 2, 87 -101, 2005.
- [32] PAUL W, SHARMA CP. Ceramic drug delivery: a perspective. *Journal of Biomaterials Applications*. 17, 253–264, 2003.
- [33] LI R, CLARK AE, HENCH LL, An investigation of bioactive glass powders by sol–gel processing. *Journal of Biomaterials Applications*. 2:231–9, 1991.
- [34] DUCHEYNE P. Bioceramics: materials characteristics versus in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21(A2), pp. 219–236, 1987.
- [35] BOCCACCINI AR, NOTINGHER I, MAQUET V, JÉRÔME R. Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass particles for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 14, 443– 450, 2003.
- [36] SEPULVEDA P, JONES JR., HENCH LL. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(2), 340-348, 2002.
- [37] JOHN C MIDDLETON, ARTHUR J TIPTON. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 21(23), 2335–2346, 2000.
- [38] Q. CHEN, J. A. ROETHER A. R. BOCCACCINI. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite. *Topics in tissue engineering*. Eds. N Ashammakhi 4, 2008.
- [39] SCHMIDMAIER G, WILDEMANN B, BAIL H, LUCKE M, FUCHS T, STEMBERGER A, ET AL. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and

transforming growth factorbeta 1) from a biodegradable poly (D, L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone*. 28(4), 341-350, 2001.

- [40] ANDERS SÖDERGÅRDA, MIKAEL STOLT. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, *Progress in polymer science*, Volume 27, 1123-1163, 2002.
- [41] SAINI P, ARORA M, RAVI KUMAR MNV, Poly (lactid acid) Blends in Biomedical Applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*.107, 47-59, 2016.
- [42] LU L, MIKOS AG, Poly (lactic acid), in: J. E. Mark (Ed.), *Polymer Data Handbook*, Oxford University Press, New York, pp. 627–633, 1999.
- [43] ZHANG R, MA PX. Degradation behavior of porous poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Polymer Preprint*. 41,1618–1619, 2000.
- [44] J. REIGNIER, M.A. Huneault. Preparation of interconnected poly(ϵ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer and salt particulate leaching. *Polymer*. 47, 4703-4717, 2006.
- [45] MA P X., ZHANG, R., XIAO, G., FRANCESCHI, R. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly (α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(2), 284-293,2001.
- [46] MA P X. *Tissue Engineering*. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. 3rd ed. NJ, John Wiley & Sons, 2004.
- [47] MA P. X., CHOI J. W., Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network, *Tissue Engineering*,7, 3-33, 2001.
- [48] GIBSON LJ. The mechanical Behaviour of cancellous bone. *Journal of Biomechanics*.18, 317-328, 1985.
- [49] DIETMAR W. HUTMACHER Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, *Biomaterials*. 21(24), 2529-43, 2001.
- [50] LIAO, CJ, CHEN CF, CHEN JH, CHIANG SF, LIN YJ, CHANG YKY. Fabrication of porous biodegradable polymer scaffolds using a solvent merging/particulate leaching method. *Journal of Biomedical Materials Research*. 59, 676-681,2002.
- [51] XIAOHUA LIU, MA P X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477-486, 2004
- [52] BAKER R. W. *Membrane Technology and Applications*. McGraw-Hill: New York, 2000

- [53] F. W. ALTENA AND C. A. SMOLDERS, Calculation of liquid-liquid phase separation in a Ternary System of Polymer in Mixture of a Solvent and a Nonsolvent. *Macromolecules*. 15, 1491-1497, 1982.
- [54] M. DI LUCCIO, R. NOBREGA, C.P. BORGES. Microporous anisotropic phase inversión membranes from bisphenol-A polycarbonate; study of ternary system, *polymer*. 41, 4309-4315, 2000.
- [55] FENG JUN HUA, GO EUN KIM, JONG DOO LEE, YONG KEUN SON, DOO SUNG LEE. Macroporous poly(L-lactide) scaffold 1. Preparation of a macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of a PLLA-dioxane-water system, *Journal of Biomedical Materials Research part A*. 63 (2), 161-167, 2002
- [56] DOUGLAS R. LLOYD, SUNG SOO KIM, KEVIN E. KINZER. Microporous membrane formation via thermally-induced phase separation. II. Liquid-liquid phase separation. *Journal of Membrane Science*, 64 (1-2) ,1-11, 1991
- [57] CHEN, J.S., TU, S.L., TSAY, R.Y., A morphological study of porous polylactide scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 41(2), 229-238, 2010.
- [58] GOLLWITZER H, IBRAHIM K, MEYER H, MITTELMEIER W, BUSCH R, STEMBERGER A. Antibacterial poly (D, L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51(3), 585-591, 2003.
- [59] HY MI, X JING, MR SALICK, TM CORDIE, XF PENG, LS TURNG. Morphology, mechanical properties, and mineralization of rigid thermoplastic polyurethane/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue applications: effects of fabrication approaches and hydroxyapatite size. *Journal of Materials Science*. 49(5), 2324-2337, 2014.
- [60] Z. HONG, R.L. REIS, J.F. MANO. Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly (L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 4 (5), 1297-1306, 2008.
- [61] WU, CHENGTIE & XIAO, YIN. Evaluation of the in vitro bioactivity of bioceramics. *Bone and Tissue Regeneration Insights*. 2, 25-29, 2009.
- [62] KOKUBO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*. 27(15), 2907-15, 2006
- [63] FATMA H. ELBATAL, GEHAN T. EL-BASSYOUNI. Bioactivity of Hench Bioglass and Corresponding Glass-Ceramic and the Effect of Transition Metal Oxides. *Silico*. 3(4), 185-197, 2011.
- [64] S D MCCULLEN, Y ZHU, S H BERNACKI, R J NARAYAN, B POURDEYHIMI, R E GORGA, AND E G LOBOA. Electrospun composite poly (L-lactic acid)/ tricalcium

- phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomedical Materials*. 4(3), 035002, 2009.
- [65] E. REZABEIGI, P.M. WOOD-ADAMS, R. A. DREW. Production of porous polylactic acid monoliths via nonsolvent induced phase separation. *Polymer*. 55 (26), 6743-6753, 2014.
- [66] E. REZABEIGI, P.M. WOOD-ADAMS, R. A. DREW. Isothermal ternary phase diagram of the polylactic acid-dichloromethane-hexane system. *Polymer*. 55(14), 3100–3106, 2014.
- [67] WEIDAN DING, DAVOUD JAHANI, EUNSE CHANG, AYSE ALEMDAR, CHUL B. PARK, MOHINI SAIN. Development of PLA/cellulosic fiber composite foams using injection molding: Crystallization and foaming behaviors. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 83,130–139, 2016.
- [68] NOFAR M., ZHU W. L., PARK C. B. & RANDALL J., Crystallization Kinetics of Linear and Long-Chain-Branched Polylactide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 50 (24),13789–13798, 2011.
- [69] J. BLAKER, V. MAQUET, R. JEROME AND S.N.A. BOCCACCINI, “Mechanical properties of highly porous PDLA/bioglass composites foams as scaffolds for bone tissue engineering”, *Acta Biomater*, Vol.1, 643-652, 2005.
- [70] E. TAMJID, R. BAGHERI, M. VOSSOUGH, A. SIMCHI, Effect of particle size on the in vitro bioactivity, hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites. *Materials Science and Engineering: C*. 31(7), 1526-1533, 2011.
- [71] OSCAR PEITL, EDGAR DUTRA ZANOTTO, LARRY L. HENCH, Highly bioactive P2O5–Na2O–CaO–SiO2 glass-ceramics. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 292 (1–3), 115–126, 2001.
- [72] PEITL FILHO O, LATORRE GP, HENCH LL Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5, *Journal of Biomedical Materials Research*. 30(4), 509-14, 1996.
- [73] LI P, ZHANG F, KOKUBO T. The effect of residual glassy phase in a bioactive glass–ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro. *J Mater Sci Med*. 3, 452–6, 1992.
- [74] ANTONIOU G, MIKOS AG, TEMENOFF JS. Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(2), 2000.
- [75] YANG S, LEONG K, DU Z, CHUA C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. traditional factors. *Tissue Eng*. 7(6), 679–89, 2001.

- [76] MURPHY, C.M., HAUGH, M.G., AND O'BRIEN, F.J. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 31, 461, 2010.
- [77] NEHRER S, BREINAN H.A, RAMAPPA A, YOUNG G, SHORTKROFF S, LOUIE LK, SLEDGE CB, YANNAS IV. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*. 18, 769, 1997.
- [78] LEE, S.J., LEE, I.W., LEE, Y.M., LEE, H.B., AND KHANG, G. Macroporous biodegradable natural/synthetic hybrid scaffolds as small intestine submucosa impregnated poly(D,L-lactide-coglycolide) for tissue-engineered bone. *J Biomater Sci Polym*. 15, 1003, 2004.
- [79] BAKSH, D., DAVIES, J.E., AND KIM, S. Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med* 9, 743, 1998.
- [80] AKAY, G., BIRCH, M.A., AND BOKHARI, M.A. Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials*. 25, 3991, 2004.
- [81] XIN, YUANRONG FUJIMOTO, TAKASHI UYAMA, HIROSHI. Facile fabrication of polycarbonate monolith by non-solvent induced phase separation method. *Polymer*. 53(14), 2847–2853, 2012.
- [82] QIAN XING, XIA DONG, RONGBO LI, HONGJUN YANG, CHARLES C. HAN, DUJIN WANG, Morphology and performance control of PLLA-based porous membranes by phase separation, *polymer*, 54 (21), 5965-5973, 2013.
- [83] YASUNIWA M, TSUBAKIHARA S, IURA TAKAHASI K. Crystallization behavior of poly (L-lactic acid). *Polymer*. 47(21), 7554-7563, 2006.
- [84] TAKAHIKO KAWAI, NELLY RAHMAN, GO MATSUBA, KOJI NISHIDA, TOSHIJI KANAYA, MITSURU NAKANO, HIROTAKA OKAMOTO, JUMPEI KAWADA, ARIMITSU USUKI, NOBUTAKA HONMA, KATSUHIKO NAKAJIMA, AND MASATOSHI MATSUDA. Crystallization and Melting Behavior of Poly (l-lactic Acid). *Macromolecules*. 40 (26), 9463–9469, 2007.
- [85] HENCH LL. An introduction to bioceramics. Wilson J, editors. 2nd ed. London: World Scientific; 1999.
- [86] NIEMELÄ T, NIIRANEN H, KELLOMÄKI M, TÖRMÄLÄ P. Self-reinforced composites of bioabsorbable polymer and bioactive glass with different bioactive glass contents. Part I. Initial mechanical properties and bioactivity. *Acta Biomater*. 1, 235–42, 2005.
- [87] NIIRANEN H, PYHÄLTÖ T, ROKKANEN P, KELLOMÄKI M, TÖRMÄLÄ P. In vitro and in vivo behaviour of self-reinforced bioabsorbable polymer and self-reinforced

- bioabsorbable polymer/bioactive glass composites. *J Biomed Mater Res.* 69, 699–708, 2004.
- [88] RICH J, JAAKKOLA T, TIRRI T, NÄRHI T, YLI-URPO A, SEPPÄLÄ J. In vitro evaluation of poly(ϵ -caprolactone-co-DL-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials.* 23, 2143–50, 2002.
- [89] MISRA SK, MOHN D, BRUNNER TJ, STARK WJ, PHILIP SE, ROY I, SALIH V, KNOWLES JC, BOCCACCINI AR. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass® composites, *Biomaterials.* 29, 1750-1761, 2008.
- [90] KEAVENY TM, MORGAN EF, NIEBUR GL, YEH OC. Biomechanics of trabecular bone. *Annual Review of Biomedical Engineering.* 3,307-33, 2001.
- [91] PITT CG, JEFFCOAT AR, ZWEIDINGER RA, SCHINDLER A. Sustained drug delivery systems. I. The permeability of poly(ϵ -caprolactone), poly(DL-lactide) and their copolymers. *Journal of Biomedical Materials Research,* 13, 497–507, 1979.
- [92] QIU Q-Q, DUCHEYNE P, AYYASWAMY PS. New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. *Journal of Biomedical Materials Research.* 52, 66–76, 2000.
- [93] V. MAQUET, A.R. BOCCACCINI, L. PRAVATA, I. NOTINGHER, R. JEROME. Porous poly(α -hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterization. *Biomaterials.* 25, 4185-4194, 2004.
- [94] V. MAQUET, A. R. BOCCACCINI, L. PRAVATA, I. NOTINGHER, R. JEROME. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams, *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 1, 66(2), 335-46, 2003.
- [95] CHIARA VITALE-BROVARONE, ENRICA VERNÉ, LORENZA ROBIGLIO, GERMANA MARTINASSO, ROSA A. CANUTO, GIULIANA MUZI. Biocompatible glass–ceramic materials for bone substitution, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* 19, 471–478, 20
- [96] ROETHER JA, BOCCACCINI AR, HENCH LL, MAQUET V, GAUTIER S, JEROME R. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. *Biomaterials.* 23, 3871–3878, 2002.