



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

**FABRICACIÓN Y ESTUDIO DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA *IN VITRO* DE
ESTRUCTURAS MACROPOROSAS COMPUESTAS DE PLA/BIOGLASS® 45S5 POR
EL MÉTODO DE NTIPS**

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

ING. JOAQUIN VILLALBA GUEVARA

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES**

Morelia, Mich. Julio 2019



Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

Of. Núm. IIMM-ST-070-2019.

Morelia, Mich., Junio 21 del 2019.

ING. JOAQUIN VILLALBA GUEVARA

Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Maestro en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales, con la tesis titulada ***"FABRICACION Y ESTUDIO DE LA RESPUESTA BIOLOGICA IN VITRO® DE ESTRUCTURAS MACROPOROSAS COMPUESTAS DE PLA/BIOGLASS 45S5 POR EL METODO DE NTIPS"***, le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

0200157-8	DRA. ENA ATHENEA AGUILAR REYES	(Presidente)
8103424-5	DR. JOSE EGBERTO BEDOLLA BECERRIL	(Vocal)
0200161-6	DR. CARLOS ALBERTO LEON PATIÑO	(Vocal)
1501007-3	DRA. NOEMI ORTIZ LARA	(Vocal)
1501007-7	DRA. DIANA CHOLICO GONZALEZ	(Vocal)
0100048-9	DR. JORGE A. VERDUZCO MARTINEZ	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

U. M. S. N. H.

Atentamente



Dr. Alberto Ruiz Marín
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigación
en Metalurgia y Materiales

ARM/cea

Agradecimientos y dedicatorias.

Agradezco a la Dra. Ena A. Aguilar Reyes por el apoyo y dirección del proyecto.

Agradezco al Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales por el apoyo al desarrollo del proyecto.

Agradezco a la Dra. Rosa Elvira por sus atenciones y apoyo para realizar la evaluación biológica de este proyecto.

Agradezco al M.C. Luis Suarez por su tiempo, apoyo y amistad.

Agradezco el apoyo de CONACYT para el desarrollo del trabajo de tesis por medio del proyecto CB-2013-C01-222262.

Agradezco a la Dra. María Pau Ginebra y a la M.C. Meritxell Molmeneu por su apoyo durante la estancia realizada en la Universidad Politécnica de Cataluña.

Agradezco a mis compañeros dentro del instituto por sus consejos, enseñanzas y sinceridad durante mi estancia en la Maestría. En especial a mis amigos Maricruz, Rodrigo, Karla, Alex, Cindy, Roció, Anel, Deysi.

Para finalizar, dedico este trabajo a mis padres: Consuelo Miriam Guevara Sánchez y a Joaquin A. Villalba Camacho, todos mis logros y éxitos siempre serán suyo también. Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XII
 CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	 1
1.1 OBJETIVOS	3
<i>Objetivo general</i>	3
<i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3 HIPÓTESIS	4
1.4 METAS CIENTÍFICAS.....	4
 CAPÍTULO 2 REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.	 5
2.1 BIOMATERIALES CERÁMICOS Y BIOVIDRIOS.....	9
2.2 BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.....	10
2.3 BIOMATERIALES COMPUESTOS.....	12
2.4 ENSAYOS IN VITRO	22
 CAPÍTULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL	 33
3.1 PREPARACIÓN DEL BIOGLASS 45S5	33
3.2 OBTENCIÓN DE ANDAMIOS PLA/BIOGLASS	34
3.3 CARACTERIZACIÓN DEL BIOGLASS.....	36
3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS ANDAMIOS COMPUESTOS PLA/BIOGLASS 45S5	37
3.4.1 <i>Ensayos in vitro</i>	39
 CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 43

4.1	BIOGLASS 45S5.	43
4.1.1	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	43
4.1.2	<i>Tamaño y distribución de partícula</i>	45
4.1.3	<i>Difracción de Rayos X</i>	46
4.1.4	<i>Calorimetría diferencial de barrido</i>	47
4.1.5	<i>Área superficial del Bioglass 45S5</i>	49
4.2	ANDAMIOS DE PLA/BIOGLASS	49
4.2.1	<i>Morfología</i>	50
4.2.2	<i>Densidad aparente y porosidad</i>	53
4.2.3	<i>Cristalinidad</i>	54
4.2.4	<i>Ángulo de contacto</i>	56
4.2.5	<i>Microtomografía computarizada de Rayos X (μCT)</i>	60
4.2.6	<i>Ensayos in vitro</i>	64
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES	66
	RECOMENDACIONES Y TRABAJO A FUTURO	67
	REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Rutas de síntesis del ácido poliláctico [34].	12
Figura 2.2 Micrografías obtenidas por MEB de andamios preparados de soluciones con diferentes cantidades de agua. 7.5 % en peso PDLA (PM = 180,000) templado en N ₂ líquido; relación dioxano/agua: (a) 100/0, (b) 90/10 y (c) 85/15 [38].	14
Figura 2.3 Morfología de andamios fabricados con diferentes métodos y materiales. (a) TPU-Di, (b) TPU-mHA-Di, (c) TPU-nHa-Di, (d) TPU-DiW, (e) TPU-mHa-DiW, (f) TPU-nHa-DiW [10].	15
Figura 2.4 Imagen de MEB de la morfología de los poros de andamios de PLLA con diferentes contenidos de vidrio bioactivo cerámico, a baja magnificación: (A) 0 wt%, (B) 10 wt%, (C) 20 wt% y (D) 30 wt%; a alta magnificación: (E) 0 wt%, (F) 10 wt%, (G) 20 wt% y (H) 30 wt% [39].	16
Figura 2.5 Morfología de compósitos porosos de PLLA/BG con diferentes contenidos de partículas de BGC después de inmersión en SBF por diferentes periodos, observados por SEM: (A) 0 wt%, (B) 10 wt%, (C) 20 wt%, (D) 30 wt%. El subíndice indica el tiempo de incubación en SBF (días). Las imágenes insertadas en la serie C son altas magnificaciones de aglomerados de apatita formados en la superficie de compuestos de PLLA/ 20 wt% BGC después de diferentes tiempos de inmersión [39].	17
Figura 2.6 Micrografías obtenidas por MEB de diferentes regiones de un andamio de PDLA/Bioglass® 45S5, con diferentes arquitecturas. Regiones de la 1 a la 4 [40].	19
Figura 2.7 Imágenes por MEB de la zona transversal de la zona homogénea (zona 3) de: (a) andamio de PDLA, (b) andamio PDLA/ 2 vol% bioglass y (c) andamio de PDLA/ 15 vol% Bioglass® 45S5 [40].	20
Figura 2.8 Micrografías obtenidas por MEB de andamios compuestos de PLLA/Bioglass: (a) PLLA, (b) PLLA/1% BG45S5, (c) PLLA/2.5% BG45S5, (d) PLLA/5%BG45S5, (e) PLLA/1% BG13-93, (f) PLLA/2.5%BG13-93, (g) PLLA/5%BG13-93 [41].	21

Figura 2.9 Micrografías por MEB de andamios de PDLLA/40%Bioglass después de la inmersión en SBF por (a) 7 días, (b) 14 días, (c) 28 días a baja magnificación, y (d) 28 días a alta magnificación [13].	24
Figura 2.10 Micrografía de MEB de un andamio de PDLLA/5% Bioglass después de 28 días de inmersión en SBF [13].	24
Figura 2.11 Conteo de osteoblastos en diferentes posiciones de la espuma después de 8 días en cultivo [13].	26
Figura 2.12 Comparación de la proliferación de células de osteoblastos (MG-63) en andamios de coralino (CR) y andamios de coralino recubierto con fosfato de calcio (CRC) [43].	27
Figura 2.13 Resultados del efecto de viabilidad celular de nanocristales de disulfuro de hierro obtenidos a diferentes temperaturas. Las células NIH-3T3 fueron cultivadas en ausencia de disulfuro de hierro, en 1% de metanol y en 250 nM de nanocristales de disulfuro de hierro obtenido a 220°C, 230°C, 235°C y 240°C. Después de 48 horas de cultivo, las células fueron analizadas por el ensayo MTT. Donde no se observaron diferencias significativas [44].	28
Figura 2.14 Integridad de la monocapa de células y núcleos de las células, después de 48 horas de cultivo. (Aa) sin tratamiento (control), (Bb) metanol al 1% (vehículo), disulfuro de hierro obtenido a: (Cc) 220°C, (Dd) 230°C, (Ee) 235°C, y (Ff) 240°C. La dosis para todos los casos fue de 250 nM de material. La monocapa fue observada por microscopio de luz visible y los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI y luego observados con un microscopio de luz UV a magnificación de 40X [44].	29
Figura 2.15 Evaluación de la biocompatibilidad en células de fibroblasto de ratón NIH-3T3. (A) Ensayo MTT desarrollado en PMMA y resina natural evaluado en 24 y 72 horas. (B) Evaluación de proliferación celular por ensayo BrdU por 24 horas de exposición [45].	30
Figura 2.16 Ensayo de genotoxicidad en linfocitos de humano por ensayo cometa. (A) Imágenes representativas de células manchadas con bromuro de etidio expuestas a electroforesis. (B) Análisis cuantitativo de daño positivo al ADN [45].	32
Figura 3.1 Esquema de las actividades realizadas en el presente proyecto.	33

Figura 4.1	Micrografías obtenidas por MEB de las partículas del polvo de Bioglass 45S5...	44
Figura 4.2	Análisis EDS del Bioglass 45S5 fabricado.	45
Figura 4.3	Tamaño y distribución de tamaño de partícula del Bioglass 45S5.....	46
Figura 4.4	Patrón de difracción del Bioglass 45S5.....	47
Figura 4.5	Termograma del Bioglass 45S5 obtenido por calorimetría diferencial de barrido.	48
Figura 4.6	Micrografías por MEB de los andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5.	50
Figura 4.7	Micrografías por MEB de andamios de 13PLA/5BG A) 500x, B) 1000x y C) 1500x.	51
Figura 4.8	Partículas de biovidrio dentro de los andamios de PLA/Bioglass 45S5.....	52
Figura 4.9	Micrografías de las diferentes zonas del andamio 13PLA/5BG: a) zona 1: capa superior del andamio, b) Zona 2: zona después de 40 μm de la superficie del andamio, c): zona 3: parte central del andamio y la que presenta poros de mayor tamaño, d) zona 4: zona base del andamio.	53
Figura 4.10	Porcentaje de cristalinidad en los andamios compuestos PLA/Bioglass 45S5.	55
Figura 4.11	Evaluación des ángulo de contacto.....	56
Figura 4.12	Ángulos de contacto de andamios de PLA/BG con agua y formamida. Mediciones realizadas para error: 5.....	58
Figura 4.13	Estructura interna de andamio de 13PLA por μCT	61
Figura 4.14	Distribución de tamaño de poros del andamio 13PLA.....	62
Figura 4.15	Imágenes de micro CT del andamio 13PLA/5BG.....	63
Figura 4.16	Distribución de tamaño de poro del andamio 13PLA/5BG.....	64
Figura 4.17	Resultados de porcentajes de viabilidad obtenidos por ensayo MTT de andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5 en contacto con células osteoblastos (MG-63).....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Variables en la preparación de muestras y fases obtenidas del sistema PLA-DCM-Hexano [31].	22
Tabla 3.1 Reactivos y cantidades necesarios para la obtención de 100 g Bioglass® 45S5 por el método de fusión y temple.	34
Tabla 3.2 Porcentajes usados en la fabricación de andamios. La temperatura utilizada se mantuvo constante en -20°C para la separación de fases.	36
Tabla 4.1 Elementos detectados por EDS en una muestra de bioglass, porcentaje atómico.	44
Tabla 4.2 Densidad y porosidad de los andamios PLA/Bioglass 45S5.	54
Tabla 4.3 Valores obtenidos de energía superficial.	59

RESUMEN

En este trabajo se fabricaron andamios porosos compuestos de ácido poliláctico (PLA) y bioglass por la técnica de separación de fases inducido por no solvente y temperatura, usando 13, 18 y 23 % de ácido poliláctico en el sistema PLA-DCM y una relación de 1 de DCM-Hexano, además fueron utilizadas diferentes cantidades de bioglass como refuerzo (5, 10 y 15%). El bioglass utilizado fue fabricado por fusión y temple, y se realizó su caracterización de morfología, tamaño de partícula, área superficial, densidad, así como un análisis por calorimetría diferencial de barrido. La porosidad de los andamios fue evaluada por microscopía electrónica de barrido y microtomografía de rayos X obteniendo tamaños de poro del rango de 1 a 250 micras y porosidades del rango de 73 a 88%, la morfología de los andamios es modificada a medida que la cantidad de PLA y bioglass aumenta, obteniendo porosidades más pequeñas y superficies más rugosas. Las composiciones de andamios fabricados son identificadas como semicristalinos con valores de 55 a 65% de cristalinidad, siendo la cristalinidad un valor importante para el tiempo de degradación del material; se evaluó el ángulo de contacto del material con dos líquidos diferentes: agua y formamida, determinando la energía superficial de los andamios por el arreglo matemático de Owens-Wendt-Kaeble, ubicándolos como material hidrofóbico con baja energía superficial. Se evaluó la citotoxicidad de los andamios realizando ensayo MTT con la línea celular MG-63 (osteoblastos) obteniendo un porcentaje de viabilidad aceptable comparado con el ensayo control, por lo que los andamios no causan daño a las células.

Palabras clave: Ácido poliláctico, bioglass, andamio, biomateriales, osteoblastos.

ABSTRACT

In this work, the porous structures composed of polylactic acid (PLA) and bioglass were fabricated by the technique of no-solvent and temperature phase separation induced, using 13, 18 and 23%wt of polylactic acid in the PLA-DCM system and a ratio of 1 of DCM-Hexane, in addition to the different amounts of bioglass as reinforcement (5, 10 and 15%wt). The bioglass used was fabricated by fusion and quenching. The morphology, particle size, surface area and density of the scaffolds were characterized, as well as an analysis by differential scanning calorimetry. The porosity of the scaffolds was evaluated by scanning electron microscopy and X-ray microtomography obtaining pore size ranging from 1 to 250 microns and porosities ranging from 73 to 88%, the morphology of the scaffolds was modified as the amount of PLA and bioglass increases, obtaining smaller porosities and rougher surfaces. The scaffold compositions are identified as semi-crystalline with values of 55 to 65% crystallinity, the crystallinity being an important value for the degradation time of the material; the contact angle of the material was evaluated with two different liquids: water and formamide, determining the surface energy of the scaffolds by the mathematical arrangement of Owens-Wendt-Kaeble, locating them as a hydrophobic material with low surface energy. The cytotoxicity of the scaffolds was evaluated by performing MTT assay with the MG-63 cell line (osteoblasts) obtaining an acceptable viability percentage compared with the control assay, so the scaffolds do not cause damage to the cells.

Keywords: polylactic acid, bioglass, scaffold, biomaterials, osteoblasts.

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

En años recientes se ha dado un aumento en la investigación de nuevos materiales para aplicaciones médicas, este tipo de investigaciones lleva la unión de diversas ciencias con la finalidad de aportar medidas preventivas, de acción y de control a diversas enfermedades y problemas de salud. Una rama de estas investigaciones se centra en el estudio de nuevos materiales orientados a la parte ósea del cuerpo. El desarrollo de nuevos materiales para aplicaciones óseas se debe al intento de mejorar los tratamientos y cuidados para enfermedades óseas que existen en la sociedad actual, además a esto se le suma el normal deterioro óseo que se da en los seres humanos por la edad [1-3].

Con “nuevos materiales” orientados a restablecer la integridad anatómica y funcional de la estructura ósea se refiere a la fabricación de injertos; estos se pueden clasificar en autoinjerto (el receptor y el donante son el mismo individuo) o aloinjerto (el tejido se trasplanta de una persona a otra) [4], pero estas técnicas involucran un elevado costo y otros factores como intervenciones dolorosas y que pueden presentar rechazo del tejido que fue injertado. Por tanto, existe la necesidad de encontrar alternativas a dichos procedimientos.

La ingeniería de tejidos se encarga del desarrollo de estos materiales para diferentes aplicaciones biomédicas, y una rama de esta ingeniería se ha centrado en desarrollar tejidos aloplásticos (injertos desarrollados a partir de materiales inertes, también llamados materiales de injerto de hueso sintético) [5]. Un ejemplo de estos tipos de injertos son los andamios (*scaffolds*), los cuales favorecen y permiten la restauración o reparación de tejido, evitando los problemas de los métodos convencionales.

Un andamio puede definirse como una estructura tridimensional que tiene como principal aplicación la de brindar soporte y su vida útil permite el crecimiento celular y la formación de tejido nuevo. Debido a esto es de gran importancia considerar diferentes aspectos en su diseño y fabricación, tales como: el material con el que se fabricará, método de fabricación, control de la porosidad, forma y tamaño del poro deseado, ya que éstos modifican el crecimiento y proliferación de las células en el andamio [6].

El uso de materiales poliméricos como el ácido poliláctico (PLA) [7] y sus diferentes variantes [8], así como la policaprolactona (PCL) [9], el poliuretano rígido (TPU) [10], entre otros, han sido estudiados para la fabricación de andamios por diferentes técnicas. Con la adición de materiales cerámicos a estos andamios se han modificado diferentes características y propiedades, tales como forma y tamaño de poro, bioactividad, biocompatibilidad, dureza, propiedades mecánicas, entre otras [5-9]; por lo que una correcta combinación de materiales beneficia a los andamios para aplicaciones médicas.

Uno de los refuerzos cerámicos más utilizados en la fabricación de andamios compuestos de matriz polimérica son los biovidrios, siendo el Bioglass® 45S5, desde su introducción en 1969 por Larry Hench [11] y hasta el día de hoy, uno de los vidrios bioactivos más utilizado en aplicaciones clínicas. Su composición en porcentaje en peso de 45% SiO₂, 24.5% CaO, 24.5% Na₂O, y 6% P₂O₅, brinda una bioactividad clase A (materiales capaces de formar unión tanto con el tejido duro como con el blando), y es considerado el de mayor índice de bioactividad ($I_B = 10$) dentro de esta categoría [12].

La combinación de materiales poliméricos biodegradables (ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL)) con fases inorgánicas bioactivas como refuerzo para producir biomateriales compuestos son ampliamente investigados para la producción de andamios orientados a la restauración de tejidos. Los polímeros biodegradables presentan algunas cualidades importantes para la producción de andamios como son: fácil procesamiento, producción en diferentes formas y tamaños, biodegradabilidad; mientras que las fases inorgánicas bioactivas, como biovidrios, promueven el aumento de las propiedades mecánicas del andamio, confieren bioactividad al material, y se puede promover la adherencia y proliferación celular [13].

En este trabajo, se desarrollan estructuras porosas compuestas de ácido poliláctico (PLA)/Bioglass 45S5, obtenidas por el método de separación de fases inducido por no solvente y temperatura (NTIPS, por su siglas en inglés), se realizó la caracterización de la morfología, composición, forma y tamaño de poro de los andamios, así como la evaluación biológica y de citotoxicidad por medio de pruebas in vitro en cultivos celulares de osteoblastos (MG-63 ATCC), con el objetivo de determinar la eficacia de dichas estructuras como futuros andamios aplicados la regeneración ósea.

1.1 Objetivos

Objetivo general

Evaluar biológicamente estructuras macroporosas compuestas de PLA/Bioglass[®] 45S5 fabricadas por el método de NTIPS en cultivos celulares de osteoblastos.

Objetivos específicos

- Obtener el Bioglass 45S5 mediante la técnica de fusión y temple.
- Fabricar estructuras macroporosas compuestas de PLA/Bioglass 45S5 mediante la técnica de separación de fases por no solvente y temperatura (NTIPS).
- Evaluar morfología, porosidad y área superficial de los andamios obtenidos de PLA/Bioglass45S5, para determinar si el andamio es óptimo para la proliferación celular.
- Comprobar la bioactividad de los andamios mediante la formación de hidroxiapatita en su superficie mediante la inmersión en fluido corporal simulado (SBF).
- Comprobar la toxicidad y osteoconductividad de los andamios por incubación de células, mediante la proliferación celular cuando está en contacto con el andamio.

1.2 Justificación

El uso de injertos para la regeneración ósea se ha desarrollado en gran medida en la última década, debido a la mejora en los tratamientos y cuidados para enfermedades óseas que existen en la sociedad que afectan la estructura ósea, siendo los materiales metálicos los primeros en ser utilizados para resolver este problema. Debido a los inconvenientes que originan los materiales metálicos para el cuerpo humano, tales como; infecciones, cirugías de extracción del material, rechazo del cuerpo, el uso de materiales compuestos de matriz polimérica con refuerzos cerámicos ha ido en aumento. Estos materiales presentan las ventajas de los materiales poliméricos en cuanto

a la biodegradabilidad, no toxicidad para el cuerpo y mejorando propiedades estructurales y de bioactividad por parte del refuerzo cerámico.

El desarrollo de andamios compuestos de matriz polimérica con refuerzo cerámico se ha realizado por diferentes técnicas de síntesis, siendo la técnica de separación de fases inducida por no solvente y/o temperatura una de las que brindan un mayor control de la porosidad, fácil proceso de síntesis y bajo costo al fabricar estos tipos de andamios.

1.3 Hipótesis

La combinación de un polímero sintético biocompatible, como el ácido poliláctico, y una fase inorgánica bioactiva, como el Bioglass 45S5, en la fabricación de estructuras tridimensionales mediante la técnica de separación de fases inducida por no solvente y cambio de temperatura, resultará en la obtención de andamios con propiedades microestructurales y fisicoquímicas que favorecerán la formación de hidroxiapatita al contacto con fluido corporal simulado y presentarán una excelente adhesión y proliferación de la línea celular de osteoblastos MG-63.

1.4 Metas científicas

- Fabricar 9 composiciones diferentes de andamios compuestos de PLA (ácido poliláctico) y bioglass 45S5 por la técnica de NTIPS.
- Fabricar andamios de PLA/Bioglass 45S5 con un mínimo de 85% de porosidad interconectada y un rango de tamaño de poro entre 20 y 100 μm .
- Obtener proliferación celular en un rango de 90-100% de la línea MG-63 analizadas por el ensayo MTT.

CAPÍTULO 2 REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL ESTADO DEL ARTE.

La ingeniería de tejidos, también reconocida por algunos autores como medicina regenerativa, es una ciencia interdisciplinaria cuya finalidad es reparar, restaurar, mantener o mejorar la función de algún tejido u órgano; la base de la ingeniería de tejidos combina el uso de células vivas, matrices extracelulares, sustitutos biológicos, manipulación del entorno extracelular e implantación en el cuerpo [13]. Esta ciencia ha ido tomando una fuerza y una viabilidad en cuanto a los estudios de investigación multidisciplinarios, muchos de los cuales ya han mostrado resultados probados, centrados en la regeneración y recuperación de tejidos y que han estado más enmarcados en los últimos tiempos en cuanto a tejido: óseo, piel, cartílago, etc. [9].

La utilización de injertos para la restauración de tejido óseo que ha sido dañado por causas asociadas a enfermedades, accidentes o la simple degradación que se va dando al aumentar la edad en los seres humanos, es de gran importancia debido al papel que el tejido óseo juega en la locomoción, soporte y protección de los órganos vitales, además de todo esto el hueso debe poseer una arquitectura que permita la movilidad de los individuos, esto está asociado a la presencia de colágeno y apatita que lo constituyen; el hueso es el segundo tejido más trasplantado solo por detrás de las transfusiones sanguíneas [14, 15].

Se denomina injerto a aquella parte de un órgano o tejido que tras ser extirpado de una zona donante se coloca o inserta en otra zona receptora con el objetivo de dar soporte y/o corregir un defecto estructural [16]. Un injerto óseo puede cumplir diferentes funciones, esto con la variación de las propiedades que presente. Las principales propiedades que deben presentar son:

Osteogénesis: síntesis de hueso nuevo por osteoblastos presentes dentro del injerto óseo o que han colonizado después de la implantación [4].

Osteoinducción: proceso por el que las células madre mesenquimales son reclutadas en la zona receptora y a su alrededor y pueden diferenciarse en condroblastos y osteoblastos [2].

Osteoconducción: proceso en el que tiene lugar un crecimiento tridimensional de capilares, tejido perivascular y células madre mesenquimales, desde la zona receptora del huésped hacia el injerto.

Este andamiaje permite la formación de hueso nuevo mediante un patrón previsible, determinado por la biología del injerto y el entorno mecánico de la interface huésped-injerto [11].

Bioactividad: es 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 [17, 18].

Material bioreabsorbible: es aquel capaz de degradarse químicamente, absorbiéndose de manera controlada sin causar un daño, éste puede o no crear tejido cuando se va absorbiendo dependiendo de su propósito [17, 18].

Biocompatibilidad: es la capacidad de un material de existir en contacto con los tejidos vivos sin causar un grado inaceptable de daño [17, 18].

Existen implantes fabricados a partir de aleaciones de metales como el hierro, cobalto y titanio que pueden ser implantados de manera permanente en el tejido óseo para llenar un defecto y brindar fijación interna, sin embargo, problemas de fatiga, corrosión, infecciones, y la pobre interface entre el tejido y el injerto siempre están presentes. Este tipo de materiales presentan la desventaja de tener un módulo elástico significativamente mayor al del hueso natural, esto hace que el injerto absorba la mayor parte de los esfuerzos generados en la zona donde fue implantado, dejando al hueso sin los esfuerzos necesarios para mantenerse funcionando correctamente. Cuando la atenuación de los esfuerzos ocurre genera la reabsorción del hueso alrededor del implante, haciendo necesaria su extracción.

Debido a estos inconvenientes de los materiales metálicos utilizados como biomateriales, se ha optado por recubrirlos con materiales poliméricos o a sustituirlos por implantes de materiales poliméricos, cerámicos o compuestos. Con estos implantes se han solucionado problemas como el riesgo de enfermedades por corrosión del implante, se han disminuido procedimientos quirúrgicos, disminución del riesgo de infección y de rechazo del injerto.

Actualmente, el estudio de tejidos aloplásticos o andamios (*scaffolds*), como también se les conoce, se ha vuelto una colaboración multidisciplinaria para realizar mejoras en el diseño, fabricación, así como la caracterización del material y caracterización *in vivo* e *in vitro*, proliferación celular, diferenciación celular, uso de biorreactores, etc.

Los andamios son soportes o estructuras tridimensionales temporales, en los que las células pueden crecer y formar tejidos, por lo que, al momento de diseñarlos y fabricarlos, se deben tener en consideración aspectos que van desde la técnica o método a utilizar para su fabricación, como el control de la topografía y rugosidad de la superficie, porosidad, forma y tamaño de poro, lo cual es importante para aumentar la migración de las células en su interior y en la superficie de los mismos [6, 19].

La obtención de andamios permite entonces que estos templates tridimensionales actúen como una estructura soporte que debe tener características y propiedades que le permitan biomimetizar el tejido que se pretende regenerar sobre sus bases, es decir, que sirva como una matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) que permita que se dé la adhesión de las células y su posterior proliferación y diferenciación [20], hasta la verificación de la formación de tejido neonato sobre éste y que luego conlleve a la formación de un tejido nuevo con sus propias características biológicas, mecánicas, etc.

Para la fabricación de andamios, se deben considerar varios aspectos que son fundamentales: éstos deben poseer estructuras internas porosas e interconectadas para poder direccionar la regeneración titular o la regeneración de nuevo tejido, así como de los sistemas de vascularización, los sistemas que permiten el intercambio de fluidos y nutrientes biológicos, además debe cumplir con la correcta función de descarte de los desechos que genere [6, 21]. Dentro del diseño de los andamios se realizan adecuaciones para que éstos puedan cumplir con ciertos parámetros en sus propiedades mecánicas dependiendo de la función para la que se estén diseñando y fabricando, esto lleva a seleccionar biomateriales adecuados para poder garantizar dichas propiedades.

Como se ha mencionado anteriormente, otra característica importante que un andamio debe poseer es poder degradarse a medida que el nuevo tejido se va formando, permitiendo su fijación en esa estructura 3D y que los productos de degradación que vayan generando no presenten carácter tóxico, si no que siga permitiendo que la estructura sea biocompatible [22, 23].

El hueso, desde un punto de vista histológico, es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado. Cumple con funciones estructurales, tiene la capacidad de almacenar iones Ca y P, y regula la concentración de electrolitos clave en la sangre. La composición del hueso no es la misma para todos los huesos del esqueleto, ya que cada uno cumple una función dentro del cuerpo,

tienen diferentes formas y tamaños por lo que su composición varía, pero en promedio su composición química es de 25% agua, 45% minerales como fosfatos y carbonatos de calcio y un 30% de materia orgánica, es decir, colágeno principalmente y proteínas [24]. En términos de la matriz extracelular, el hueso está compuesto de una fase inorgánica (mineral), y una fase orgánica. La fase mineral o inorgánica principalmente consta de calcio y fósforo, análoga a la hidroxiapatita (HA). La fase orgánica del hueso consiste principalmente de colágeno tipo I, proteínas no colágenas, agua y lípidos [25, 26].

Los huesos pueden ser clasificados en huesos largos (que se encuentran en las extremidades), huesos cortos (como muñecas, tobillos, dedos), huesos planos (como lo son el esternón y cráneo) y los huesos irregulares (como la pelvis y las vértebras). El hueso puede ser identificado por su compactación; el hueso más compacto es llamado hueso cortical y el hueso poroso es llamado hueso trabecular. Ambos tipos de huesos contienen una variedad de células especializadas, tales como son fibroblastos, osteoblastos (células formadoras de hueso), condroblastos, adipocitos, osteoclastos (células reabsorbedoras de hueso) y mioblastos, cada una con funciones específicas para la funcionalidad de los huesos; matriz orgánica y fase mineralizada [27].

La degradación de los componentes que conforman los huesos se van dando gradualmente a lo largo de la vida, y existen factores que aumentan la velocidad de degradación, tales como enfermedades, deficiencias de elementos en el cuerpo, por lo que la ingeniería de tejidos es una ciencia de gran relevancia con la finalidad de prevenir, retrasar y reparar estas situaciones. Esto se puede lograr con la correcta selección de materiales y técnicas de fabricación que brinden las características adecuadas para cada problema y cada paciente.

Metales como el hierro, titanio, cobalto, magnesio, acero inoxidable y cromo son biocompatibles, resistentes y algunos son de fácil acceso a ellos y económicos. Pero como se mencionó anteriormente presentan ciertos inconvenientes a la hora de utilizarlos como material para andamios sintéticos óseos.

Trabajos previos de investigación han demostrado que un andamio sintético óseo debe mantener sus propiedades mecánicas de 1 a 3 meses después de la implantación y éste debe ser completamente reabsorbido a través de procesos metabólicos entre los 12 y 18 meses de modo que

no intervenga y afecte la regeneración de tejido [25]. Debido a esto, los materiales cerámicos y poliméricos llevan una ventaja ante los metales, debido a la degradabilidad que pueden presentar.

2.1 Biomateriales cerámicos y biovidrios

Materiales cerámicos tales como los fosfatos de calcio han sido investigados desde hace más de 40 años como sustitutos óseos y son una opción clara a tener en cuenta [11]. Los tipos más comunes de materiales a base de fosfatos de calcio utilizados para la construcción de andamios son hidroxiapatita, fosfato tricálcico, fosfatos de calcio bifásico y vidrios bioactivos [28].

El Bioglass 45S5 es el vidrio bioactivo más utilizado en aplicaciones clínicas. Los vidrios son sólidos amorfos comúnmente compuestos de materiales base sílice con otros aditivos menores. Comparado con vidrios como los de botellas, ventanas, espejos etc., el Bioglass 45S5 contiene menos cantidad de sílice y una alta cantidad de calcio y fósforo. El nombre 45S5 se debe al 45% de SiO_2 y la relación molar de 5:1 de calcio-fósforo. Esta alta proporción de calcio-fósforo promueve la formación de cristales de apatita, debido a que los iones de calcio y fósforo actúan como núcleos de cristalización. La composición específica del Bioglass 45S5 es óptima en aplicaciones biomédicas por su composición similar a la de la hidroxiapatita, que es el componente mineral del hueso. Esta similitud proporciona la capacidad al Bioglass 45S5 para integrarse con el hueso [11, 29].

Las técnicas más comúnmente utilizadas para la producción de vidrios bioactivos son las técnicas sol-gel y la ruta de fusión y temple. Una de las ventajas de la técnica de sol-gel para la fabricación de biovidrio es que las propiedades estructurales y superficiales, como tamaño de partícula, área superficial, pueden ser reguladas dependiendo de la composición y las condiciones de síntesis, pudiéndose obtener materiales nanoestructurados controlados. Aunque los vidrios de sílice obtenidos por el método de 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 catalizador, por lo que 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 en el vidrio lo que

disminuye la bioactividad, algunos procesos sin el uso de nitratos han sido desarrollados utilizando temperaturas de 550°C en el proceso, por lo que algunas zonas con fase cristalina pueden ser formadas y la bioactividad del material puede verse disminuida [12, 30]. Otra desventaja que puede llegar a ocurrir durante el proceso de sol-gel para la fabricación de biovidrios es que el control de las condiciones en las que debe ocurrir el proceso debe ser estricto, ya que, de modificar el tiempo, temperatura, o presión, el resultado del proceso puede verse afectado, además los tiempos del proceso puede ser largos y para producción puede ser una desventaja.

Por otro lado, la ruta de fusión y temple, siendo la técnica de fabricación más antigua, proporciona una manera rápida de obtener considerables cantidades de biovidrio, y a su vez el proceso de fabricación es más sencillo, menos sensible a factores del ambiente y materiales libres de nitratos que afecten la biocompatibilidad de éste, la técnica consiste en la mezcla de los materiales precursores para ser llevados a una temperatura de fusión y después de un tiempo de estadía a esa temperatura es templado, consiguiendo un sólido con la misma estructura amorfa que el fluido [30].

La capacidad bioactiva de los vidrios es evaluada mediante la hidroxiapatita, que es una capa superficial de fosfato carbonatado que se desarrolla sobre la superficie del vidrio bioactivo cuando está en contacto con el fluido corporal simulado a través de reacciones interfaciales. Estos biovidrios junto con algunos polímeros son utilizados en la ingeniería de tejidos para el desarrollo de andamios porosos para la restauración de tejido óseo [11, 31].

2.2 Biomateriales poliméricos

Los polímeros son la unión de varias moléculas con pesos moleculares de 10,000 a 1,000,000 g/g·mol, son materiales con propiedades de resistencia a la corrosión, aislantes, ligeros pero presentan la desventaja de no poder emplearse a temperaturas elevadas. En general, estos materiales se caracterizan por poseer densidades bajas y bajas resistencias a la tensión, pero elongaciones altas en comparación con los materiales metálicos [32].

Los polímeros 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 la adhesión y funcionamiento celular. Sin embargo, pueden provocar inmunogenicidad y contener impurezas patogénicas. Mientras que los polímeros sintéticos biodegradables han sido

ampliamente utilizados en ingeniería celular como vehículos para trasplante celular y andamios [33].

El ácido poliláctico (PLA) es sin duda uno de los polímeros sintéticos más utilizados en ingeniería de tejido óseo, ya que sus productos de degradación no son tóxicos, son metabolitos naturales que eventualmente son eliminados por el cuerpo en forma de dióxido de carbono y agua. El PLA es un polímero comercialmente disponible utilizado en una gran variedad de aplicaciones debido a su alta resistencia y biodegradabilidad. El PLA entra en la clasificación de termoplástico que se obtiene como un producto de la fermentación del almidón de algunas plantas como maíz, caña, papa, remolacha, etc. El ácido poliláctico puede ser sintetizado por condensación para obtener un bajo peso molecular y un material frágil, otra forma de sintetizarlo es por condensación azeotrópica deshidratante del ácido láctico, otro proceso, y el que es más utilizado, es la polimerización de apertura de anillo de lactida para obtener PLA de alto peso molecular. En la Figura 2.1 se muestran las tres diferentes rutas por las que el PLA puede ser sintetizado [34].

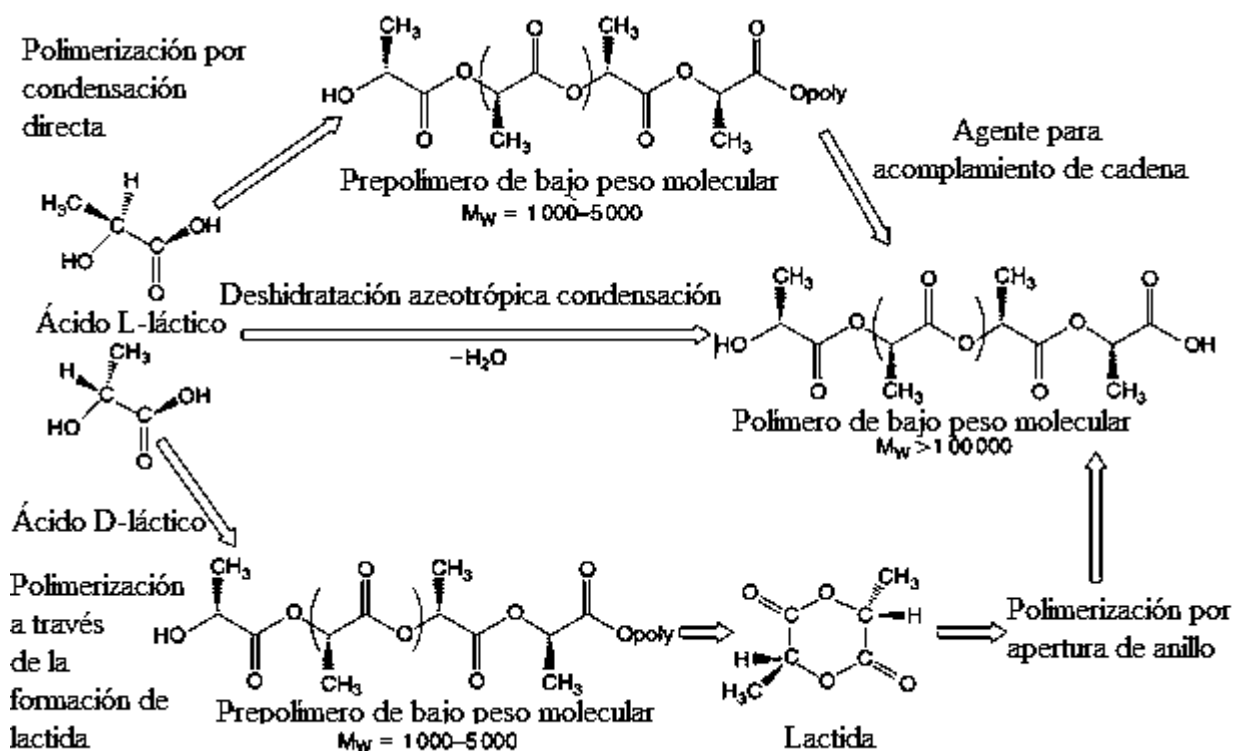


Figura 2.1 Rutas de síntesis del ácido poliláctico [34].

2.3 Biomateriales compuestos

Desde las últimas 3 décadas, muchos grupos de investigación [19, 21] han desarrollado técnicas novedosas para dar forma a biomateriales (bien sean de naturaleza polimérica, cerámica, metálica o material compuesto) en estructuras 3D complejas que exhiban las propiedades requeridas para aplicaciones en la ingeniería de tejidos o medicina regenerativa.

Los materiales poliméricos son los que han aportado más avances en este particular, dada su versatilidad química, propiedades reológicas, mecánicas y la posibilidad de añadir aditivos químicos, fármacos o biomoléculas [33]. Por lo anterior, se ha buscado mejorar algunas de sus propiedades mediante la adición de otros componentes, con la finalidad de fabricar andamios compuestos que cumplan con las características para aplicaciones en regeneración ósea, necesarias para garantizar un mejor desempeño físico-químico, mecánico, farmacológico y quirúrgico [35].

Siendo aspectos clave, el diseño, la selección de los materiales, los métodos de fabricación, así como los ensayos mecánicos y pruebas biológicas, los que le darán al paciente y al médico la confiabilidad que posteriormente le conferirá el éxito a los mismos.

Algunas de las técnicas más empleadas en la fabricación de biomateriales compuestos son: hilado y tejido de fibras, *solvent casting* y lixiviación de partículas, espumado con gas, moldeo desde el fundido, técnica de fusión de porógeno, *electrospinning* o electro-hilado, prototipado rápido de formas libres sólidas, impresión en 3D, procesamiento por altas presiones, separación de fases, etc., cada una con sus ventajas y desventajas, pero considerada como la técnica más apropiada para reunir los requerimientos propios para la recuperación de un tejido en particular, que no son posibles conseguir empleando otros métodos [36, 6, 19]. Entre los métodos mencionados, la separación de fases es el que se utilizará para el desarrollo de este proyecto.

El método de separación de fases se emplea para la preparación de materiales poliméricos porosos, y consiste en generar la inestabilidad de una solución polimérica, lo cual se puede lograr mediante la modificación de la temperatura (TIPS, separación de fases inducida térmicamente) o la adición de un no solvente (NIPS, separación de fases inducida por no solvente) o una combinación de ambas (NTIPS, separación de fases inducida térmicamente y por no solvente) 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. El resultado de la combinación de las técnicas de NIPS y TIPS es un proceso más corto de fabricación de andamios con las mismas ventajas de técnica, modificando ligeramente las formas de los poros [37].

La relación de solvente/no solvente en la técnica de NIPS y NTIPS afecta directamente al comportamiento de la separación de fases del sistema. Chen y col. [38] fabricaron andamios de PDLLA [ácido poli(D, L-láctico)] y PLLA [ácido poli(L-láctico)] por el método de TIPS, mostrando que la estructura de los poros está ampliamente influenciada por la cantidad de solvente y no solvente añadidos, como se puede observar en la Figura 2.2, al variar los contenidos de dioxano y agua la forma y tamaños de los poros varían significativamente. El paso de un método de separación de fases de dos componentes a un sistema ternario al añadir agua a un sistema PDLLA-dioxano, induce un cambio en la morfología de una estructura tubular anisotrópica Figura 2.2(a); a una arquitectura de poros circulares isotrópicos, Figura 2.2(c), por el cambio de

mecanismo de sólido-líquido a líquido-líquido debido al no solvente. Además, se observó que al agregar un no solvente al sistema, convirtiéndolo en un sistema ternario compuesto de PDLLA, dioxano y agua, no a todas las composiciones se obtiene la separación de fases líquido-líquido y que la relación solvente/no solvente tiene influencia en el tamaño y forma de poro, como se puede observar en la Figura 2.2 al comparar las imágenes (b) y (c).

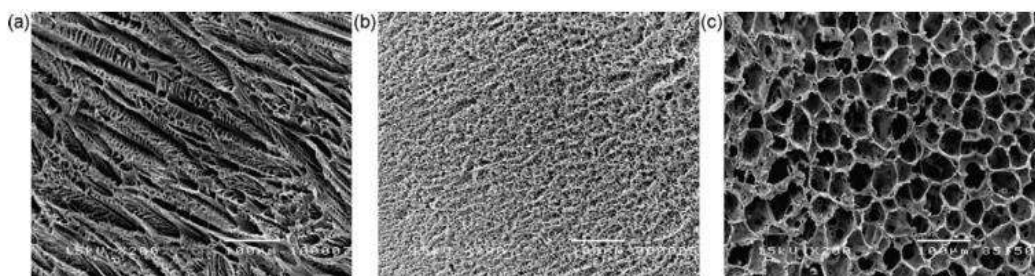


Figura 2.2 Micrografías obtenidas por MEB de andamios preparados de soluciones con diferentes cantidades de agua. 7.5 % en peso PDLLA (PM = 180,000) templado en N₂ líquido; relación dioxano/agua: (a) 100/0, (b) 90/10 y (c) 85/15 [38].

Mi y col. [10] presentaron andamios de poliuretano (TPU)/hidroxiapatita (HA) en diferentes tamaños (HA, micro HA (mHA), nano HA (nHA)), mediante el método de separación de fases inducida térmicamente, en los que 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 (Di) como solvente mostraron una estructura con poros orientados con muy poca interconectividad, como se muestra en la imagen de la Figura 2.3(a)-(c), a diferencia de los andamios en los cuales se incorporó agua desionizada (DiW) como no solvente, en el cual los poros formados mostraron estructura esférica y mayor interconectividad, mostrado en la Figura 2.3 (d)-(f), esto debido a que el mecanismo de separación de fases cambia de sólido-líquido a líquido-líquido. Además, se analizó el efecto de la adición de HA en forma de polvo, con diferentes tamaños de partícula; no observaron cambios significativos a medida que los tamaños de la hidroxiapatita disminuyeron.

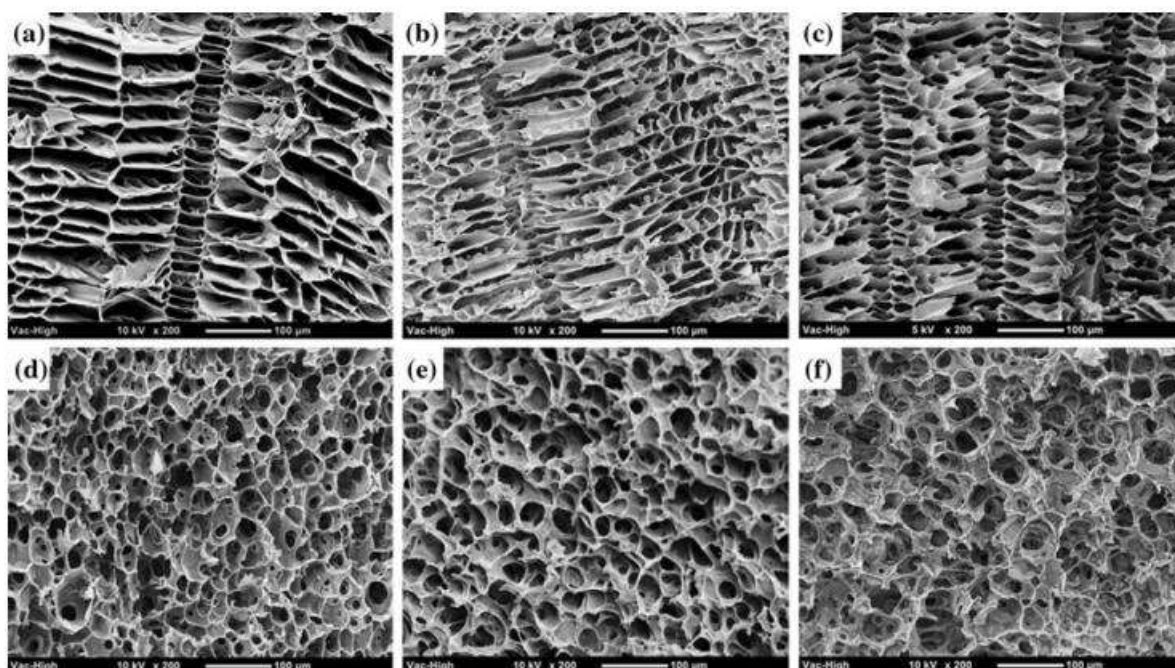


Figura 2.3 Morfología de andamios fabricados con diferentes métodos y materiales. (a) TPU-Di, (b) TPU-mHA-Di, (c) TPU-nHa-Di, (d) TPU-DiW, (e) TPU-mHa-DiW, (f) TPU-nHa-DiW [10].

Un grupo importante de andamios compuestos reportados en la literatura comprende combinaciones de partículas de vidrio bioactivo 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 y una alta bioactividad es conferida por las partículas de biovidrio. Hong y col. [39] desarrollaron andamios con contenidos de vidrio bioactivo cerámico (BGC, por sus siglas en inglés) de 0, 10, 20 y 30% en peso, mostrados en la Figura 2.4 (a)-(d) respectivamente, notando que los andamios con 0, 10 y 20% en peso de de vidrio bioactivo cerámico no presentaban gran variación en la morfología y distribución de los poross, en cambio el andamio con 30% de vidrio bioactivo tenía una drástica disminución de su porosidad comparado con el resto de los andamios, esto se atribuye a la disminución del volumen del solvente en relación al peso total de PLLA y BGC durante la preparación de los andamios.

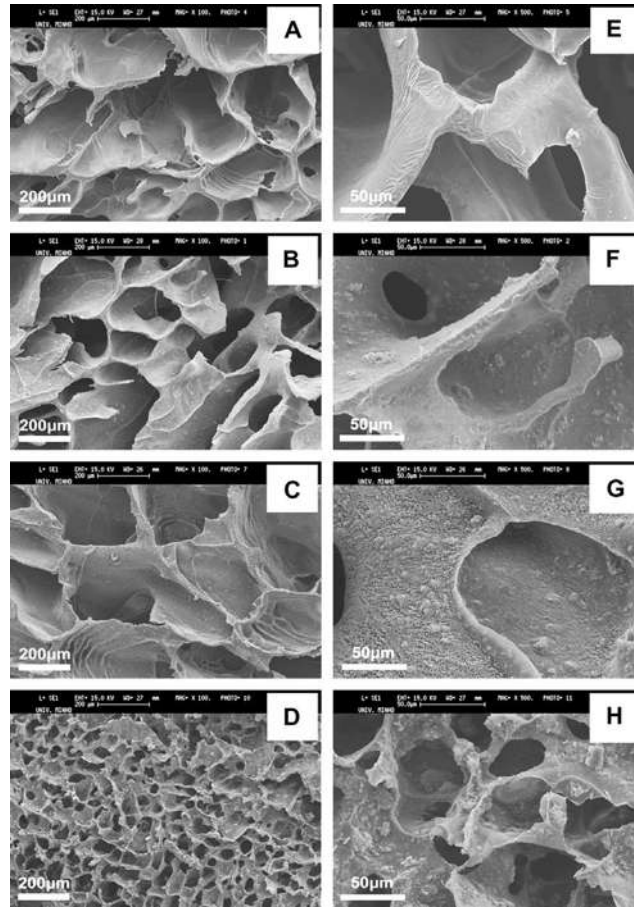


Figura 2.4 Imagen de MEB de la morfología de los poros de andamios de PLLA con diferentes contenidos de vidrio bioactivo cerámico, a baja magnificación: (A) 0 wt%, (B) 10 wt%, (C) 20 wt% y (D) 30 wt%; a alta magnificación: (E) 0 wt%, (F) 10 wt%, (G) 20 wt% y (H) 30 wt% [39].

Además, Hong y col. [39] observaron que los materiales compuestos de vidrio bioactivo cerámico ($50\text{SiO}_2\text{-}40\text{CaO-}5\text{P}_2\text{O}_5$) y PLLA pueden formar capas de hidroxiapatita en sus superficies, durante ensayos in vitro; como se observa en la Figura 2.5, a diferentes concentraciones de biovidrio los andamios exhiben diferentes grados de bioactividad al ser sumergidos en SBF.

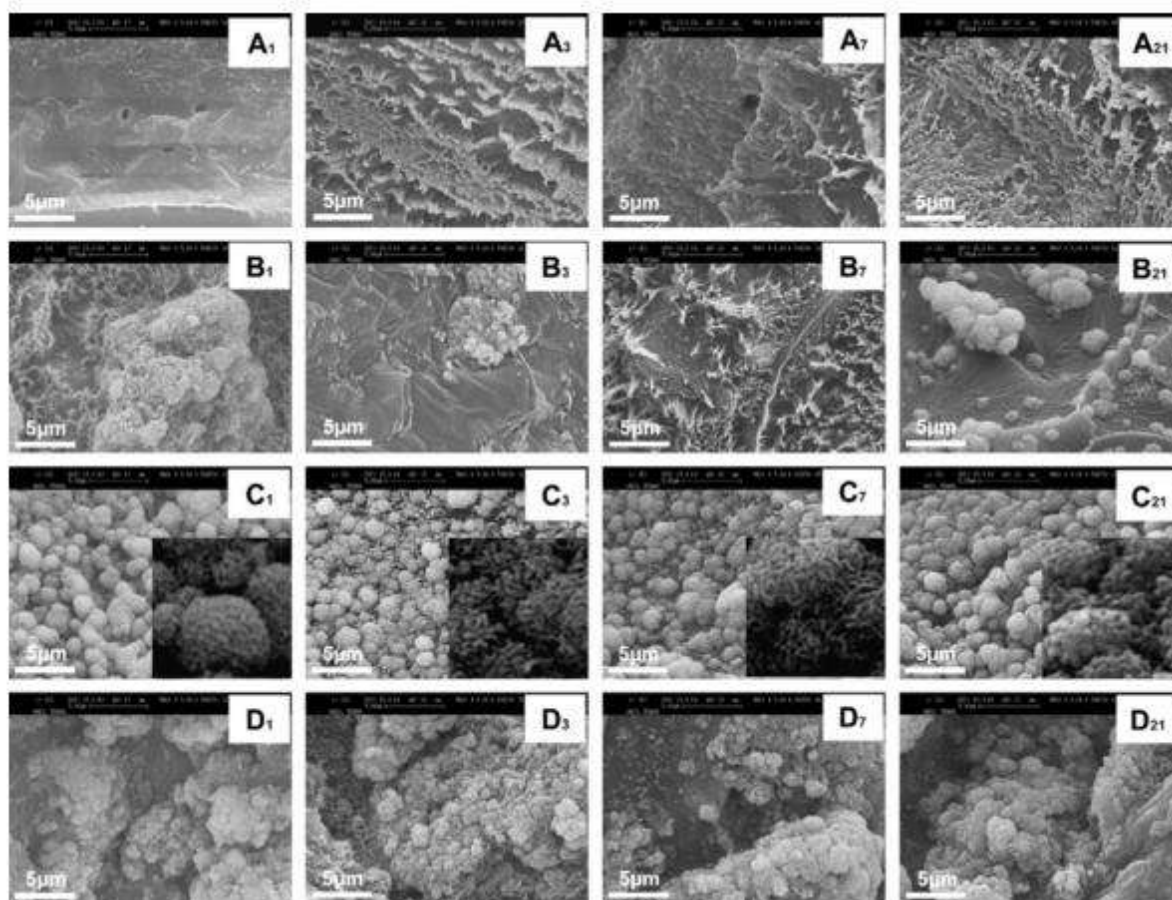


Figura 2.5 Morfología de compósitos porosos de PLLA/BG con diferentes contenidos de partículas de BGC después de inmersión en SBF por diferentes periodos, observados por SEM: (A) 0 wt%, (B) 10 wt%, (C) 20 wt%, (D) 30 wt%. El subíndice indica el tiempo de incubación en SBF (días). Las imágenes insertadas en la serie C son altas magnificaciones de aglomerados de apatita formados en la superficie de compuestos de PLLA/ 20 wt% BGC después de diferentes tiempos de inmersión [39].

La Figura 2.5 muestra micrografías a varios tiempos de inmersión (1, 3, 7 y 21 días), representados como subíndices en los identificadores de cada imagen. Hong y col. [39] encontraron además, que la cantidad de hidroxiapatita depende de la cantidad de biovidrio que se agrega, siendo el material de PLLA/BGC con un 20% de vidrio bioactivo el que genera una capa más uniforme de los aglomerados de hidroxiapatita después de varios tiempos de inmersión, mostrado en la Figura 2.5 (C). Y notaron que aún a concentraciones mayores de BGC no es seguro obtener una cantidad

mayor de hidroxiapatita; como se muestra en la Figura 2.5 (D), los materiales con un 30% de vidrio bioactivo presentan una capa menos uniforme de hidroxiapatita que las imágenes (A)-(C) de la Figura 2.5.

Por otro lado, Blaker y col. [40] investigaron andamios de PDLLA fabricados por el método de TIPS con dos contenidos de Bioglass® 45S5, usando la separación de fases sólido-líquido, se obtuvieron poros alargados de $\sim 100\ \mu\text{m}$ de diámetro e interconectados. Un punto a destacar de esta investigación es que, al terminar el proceso de fabricación, el andamio poseía diferentes tipos de poros dependiendo de la relación de distancia con el centro del andamio. El andamio se dividió en 4 zonas con diferentes morfología y distribución de poros, en la Figura 2.6 se muestra la ubicación de las 4 zonas y la morfología de los poros de las zonas 1, 2 y 4.

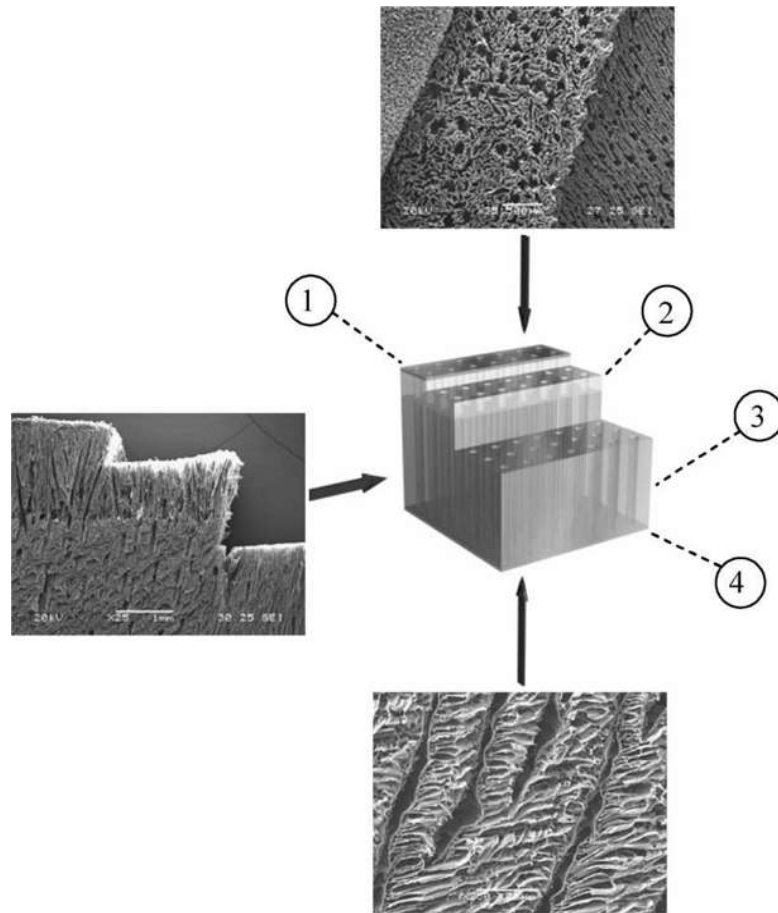


Figura 2.6 Micrografías obtenidas por MEB de diferentes regiones de un andamio de PDLLA/Bioglass® 45S5, con diferentes arquitecturas. Regiones de la 1 a la 4 [40].

Estos experimentos fueron realizados en muestras de 90 mm de diámetro y 10 mm de espesor. La zona 1 consiste en la zona superior del andamio de aproximadamente 10 μm de espesor que presenta porosidad pero es más densa que las demás regiones, la zona 2 es una zona más ordenada y la porosidad anisotrópica comienza a aparecer, tiene un espesor de 1.5 a 2.5 mm; la zona 3 presenta la arquitectura de poros más ordenada y en esta zona se encuentran los poros de mayor tamaño de diámetro promedio y la interconectividad de los poros está presente, esta zona es de 5-7 mm de espesor y está presente en la mayoría del andamio; en la Figura 2.7 (a)-(c) se muestra la zona 3 de andamios de PDLLA con diferentes contenidos de bioglass (0, 2 y 15%, respectivamente). Finalmente, la zona 4 es una capa densa formada en la parte baja del andamio de aproximadamente 30 μm y se atribuye a un congelamiento rápido durante el proceso.

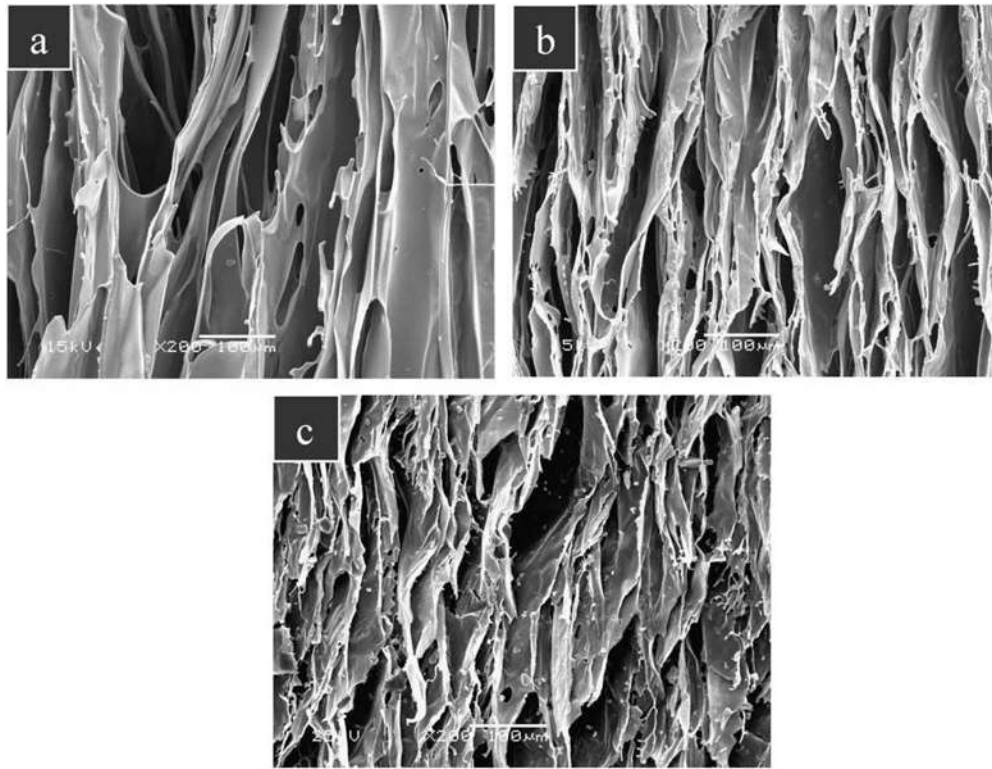


Figura 2.7 Imágenes por MEB de la zona transversal de la zona homogénea (zona 3) de: (a) andamio de PDLLA, (b) andamio PDLLA/ 2 vol% bioglass y(c) andamio de PDLLA/ 15 vol% Bioglass® 45S5 [40].

Conoscenti y col. [41] compararon el efecto de dos composiciones de Bioglass (45S5 y 13-93) en andamios de PLLA fabricados por la técnica de separación de fases inducida térmicamente y por no solvente. El sistema usado para el experimento fue: 6% en peso de PLLA y dioxano/agua (solvente /no solvente) en relación 87/13 wt/wt. Usaron composiciones de 0, 1, 2.5 y 5% en peso. Se demostró que el Bioglass 13-93 no tiene influencia en la microestructura del andamio en ninguna de las 3 composiciones, mostrado en la Figura 2.8 (E)-(G), mientras que el Bioglass 45S5 en la concentración de 5%, Figura 2.8 (D), mostró una variación en la forma de los poros y a concentraciones pequeñas de 1%, Figura 2.8 (B), no mostró variación con respecto al andamio sin Bioglass, Figura 2.8 (A). En la investigación se reporta que la adición del Bioglass 13-93 a los andamios es mucho más fácil que la adición de Bioglass 45S5.

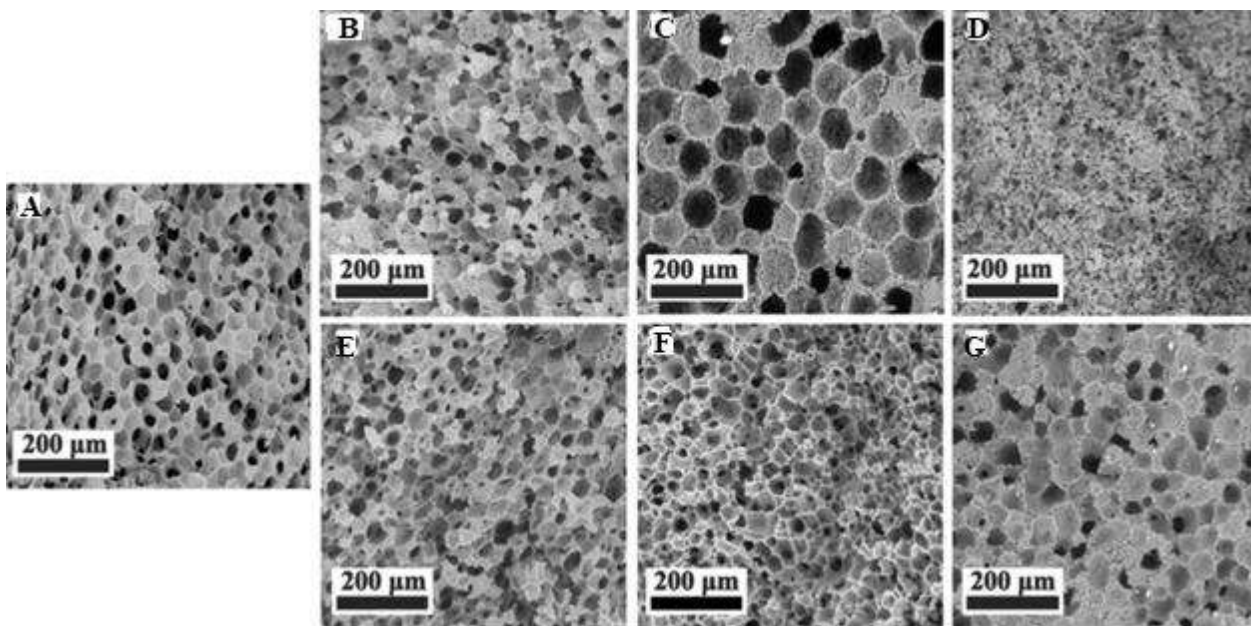


Figura 2.8 Micrografías obtenidas por MEB de andamios compuestos de PLLA/Bioglass: (a) PLLA, (b) PLLA/1% BG45S5, (c) PLLA/2.5% BG45S5, (d) PLLA/5%BG45S5, (e) PLLA/1% BG13-93, (f) PLLA/2.5%BG13-93, (g) PLLA/5%BG13-93 [41].

Rezabeigi y col. [37] llevaron a cabo una serie de experimentos para la creación de un diagrama ternario del sistema PLA-diclorometano (DCM)-hexano para la fabricación de andamios, siendo polímero, solvente y no solvente, respectivamente, que puede ser utilizado en las técnicas de NIPS, TIPS y NTIPS. Se encontró que la separación de fases líquido-líquido para este sistema depende solamente de dos variables: la relación polímero/solvente (relación en peso) y la relación de solvente y no solvente (relación en volumen). Se utilizaron varias relaciones de estas dos variables para crear el diagrama ternario, encontrando algunas composiciones en las que ocurría la separación de fases líquido-líquido, esto es reportado en la Tabla 2.1. Se argumentó que el aumento de PLA en el sistema incrementa la velocidad con la que la separación de fases ocurre. La Tabla 2.1 presenta diferentes relaciones de Hexano-DCM, relacionadas con diferentes concentraciones de PLA en DCM; las combinaciones de estas variables dan como resultados diferentes reacciones de separación de fases. Esta investigación es de gran importancia para el proyecto ya que es la referencia principal para las composiciones que se utilizarán, realizando variaciones en el proceso.

En este trabajo se tomó como base la relación de hexano-DCM de 1, y se tomaron 3 diferentes concentraciones de PLA en DCM (13, 18 y 23%) donde ocurre la separación de fases líquido-líquido, siendo este tipo de separación de fases las de interés para el trabajo por su producción de estructuras porosas e interconectadas.

Tabla 2.1 Variables en la preparación de muestras y fases obtenidas del sistema PLA-DCM-Hexano [31].

Hexane/DCM (v/v)	PLA in DCM concentration (wt.%)																																		
		0.25	0.5	0.75	1	3	5	6	6.25	6.5	6.75	7	9	10	11	13	13.25	13.5	13.75	14	15	16	16.5	16.75	17	18	19	19.5	19.75	20	23	25	29	30	
	0.25												S		S			S							S		S	S	S	L	L	L			
	0.5												S		S			S	S	S	S	S	S	S	L	L	L		S	L		L			
	0.75						S	S				S	S		S	S	S	L	L	L		L			L	L	L								
	1		S		S	S	S	S	S	L	L	L	L	L	L	L				L		L			L	L	L				L	L	L	L	
	1.15		P		P		P					P																							
	1.25	P	P	P	P																														P

(S) Una fase

(L) Separación de fases Líquido-Líquido

(P) Presipitación, separación sólido-líquido

□ Condiciones no evaluadas

2.4 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 y altos tiempos de procesos de la experimentación *in vivo*. Actualmente se han utilizado dos métodos para el ensayo de la bioactividad *in vitro* de biomateriales. Uno de estos métodos consiste en evaluar la capacidad de formación de apatita de materiales biocerámicos en fluidos corporales simulados (SBF) [13, 30, 41].

Kokubo y col. [42] 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, el cual es un fluido fisiológico acelular con concentraciones iónicas casi iguales a las del plasma sanguíneo. A partir de que se desarrolló el

fluido corporal simulado, este método de inmersión es utilizado como base para describir la bioactividad ósea realizada con diferentes materiales.

Blaker y col. [13] evaluaron la bioactividad de andamios de PDLLA/Bioglass (con 5% y 40% de refuerzo, relación en peso) por medio de inmersión en SBF basados en los descrito por Kokubo y col. [42]. En la Figura 2.9 se muestran las micrografías de los andamios después de varios tiempos de inmersión en SBF, llevándose a cabo el experimento durante 7, 14 y 28 días, Figura 2.9 (a)-(c), respectivamente. Se reportó que al día 7 pequeños cristales se desarrollaron en la superficie del andamio en regiones cercanas a las partículas de biovidrio, Figura 2.9 (a). Los andamios con mayor contenido de Bioglass (40 wt%) presentaron mayor formación de hidroxiapatita (HA) en comparación con las demás composiciones evaluadas, en la Figura 2.9 (d) se muestran una magnificación de la capa de HA formada después de 28 días en SBF.

Mientras que en los andamios con contenido de bioglass (5 wt%) la formación de HA es más lenta, en la Figura 2.10 se muestra la formación de HA en el andamio de PDLLA/5%BG a 28 días de inmersión, siendo apenas formaciones puntuales y dispersas sobre los andamios; esto se asocia a que al tener menor contenido de bioglass los sitios donde puede comenzar el crecimiento de HA son menos.

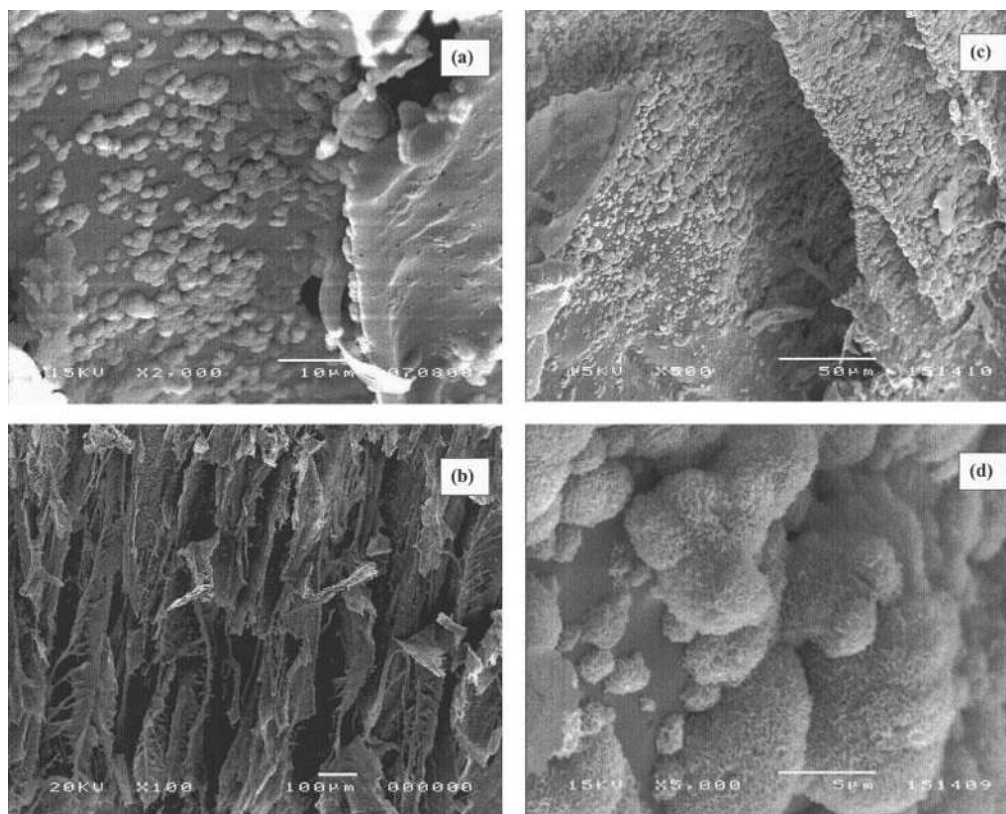


Figura 2.9 Micrografías por MEB de andamios de PDLLA/40%Bioglass después de la inmersión en SBF por (a) 7 días, (b) 14 días, (c) 28 días a baja magnificación, y (d) 28 días a alta magnificación [13].

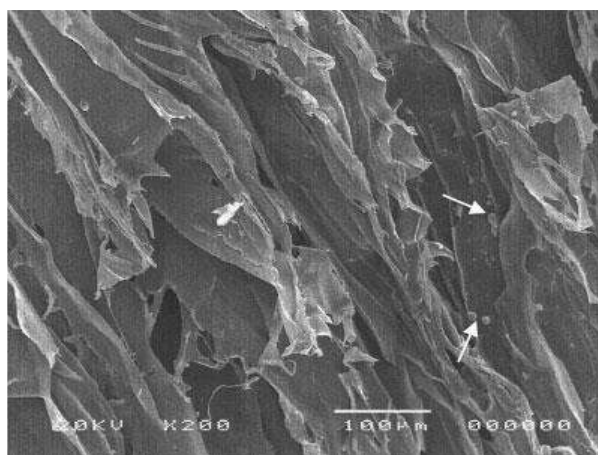


Figura 2.10 Micrografía de MEB de un andamio de PDLLA/5% Bioglass después de 28 días de inmersión en SBF [13].

Los materiales compuestos, matriz polimérica y refuerzo cerámico, fabricados como biomateriales han demostrado tener una excelente capacidad de formación hidroxiapatita por la prueba de inmersión en SBF, siendo el biovidrio una gran influencia para la formación de la hidroxiapatita en el andamio.

El segundo método consiste en investigar la respuesta *in vitro* de células óseas. Los cultivos celulares son sistemas para el estudio y observación de un determinado tipo de células bajo condiciones específicas, siendo este tipo de ensayos de menor complejidad que un ensayo *in vivo*. Los ensayos pueden ser por contacto directo de las células y el material, o indirecto, adicionando un extracto del material al cultivo celular. Con este tipo de ensayos se busca observar y evaluar el comportamiento de las células cuando están en contacto con el material, ya sea, su adhesión, proliferación y/o diferenciación.

Blaker y col. [13] hicieron ensayos de biocompatibilidad, utilizando la línea celular MG-63, se realizó el conteo de las células después de 8 días de incubación en las espumas sin Bioglass y con 5 y 40 wt% de Bioglass, como se muestra en la Figura 2.11, donde se confirma que la presencia de Bioglass 45S5 beneficia la adhesión y proliferación celular en el material. La aparición de una mayor presencia de células en la superficie (*top*) de las espumas se atribuye al método en el que se llevó a cabo el cultivo celular, agregando las células al andamio por goteo sobre la muestra.

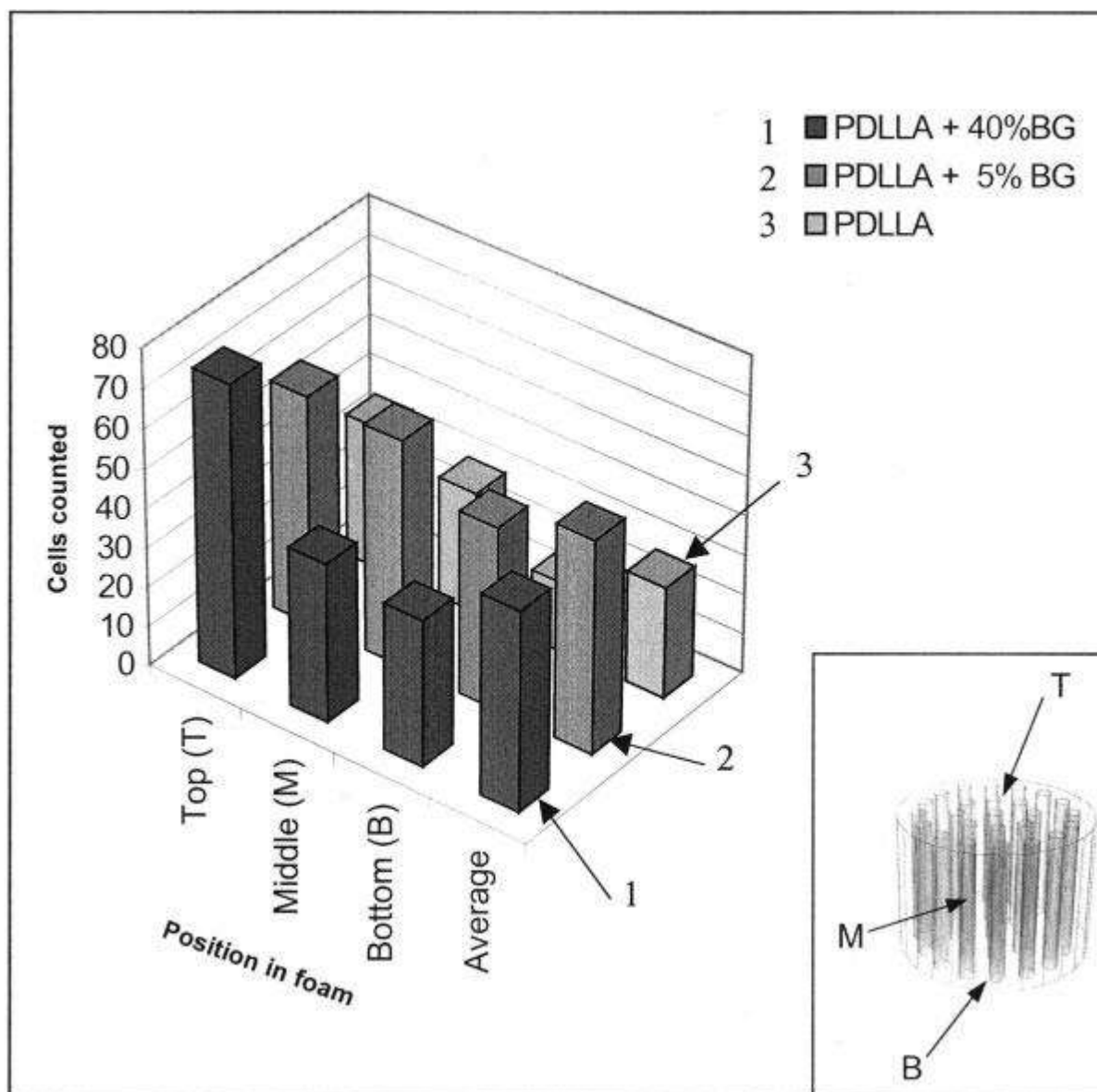


Figura 2.11 Conteo de osteoblastos en diferentes posiciones de la espuma después de 8 días en cultivo [13].

Además de los ensayos *in vitro* para evaluar la bioactividad de un material, se utilizan técnicas como el ensayo MTT, ensayo DAPI, ensayo BrdU y ensayo cometa para cuantificar la viabilidad de las células en contacto con el material, y evaluar el daño que el material pueda causar a las células.

Yoo y col. [43] realizaron ensayos de biocompatibilidad a andamios de coralino (CR) y andamios de coralino recubiertos con fosfato de calcio (CRC) con una línea celular de osteosarcoma de humano MG-63 (ATCC, por sus siglas en inglés *American Type Culture Collection*), se evaluaron tiempos de cultivos de 1, 2, 3, 5 y 7 días.

En la Figura 2.12 se observa que la densidad óptica, la cual es una medición indirecta de la proliferación celular, aumenta de manera significativa a medida que aumenta el tiempo de cultivo para 1, 2, 3 y 5 días, sin embargo, al día 7 el aumento es menor, esto se debe a que la caja de cultivo puede estar llena de células o estar cerca de llenarse por lo que la proliferación se ve afectada. Una conclusión que aportaron fue que la modificación de la superficie de un andamio, en este caso con fosfato de calcio, promueve la diferenciación y mineralización de los osteoblastos.

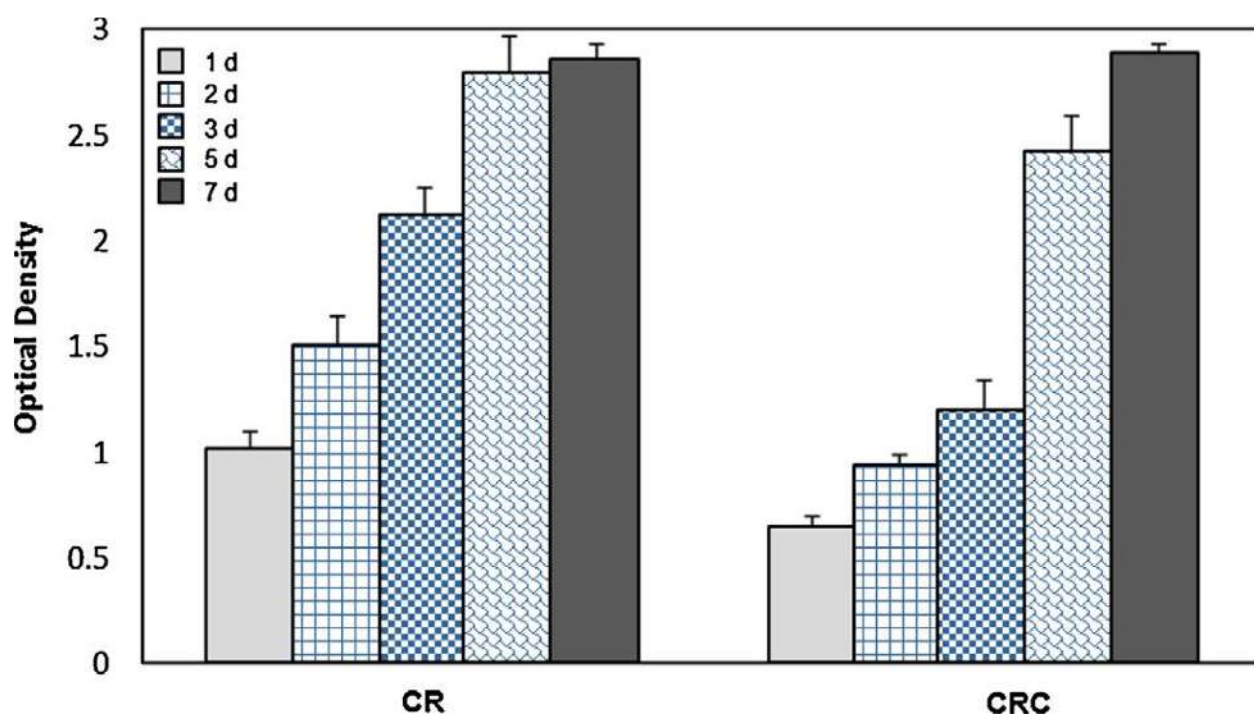


Figura 2.12 Comparación de la proliferación de células de osteoblastos (MG-63) en andamios de coralino (CR) y andamios de coralino recubierto con fosfato de calcio (CRC) [43].

Santos y col. [44] realizaron la evaluación biológica de nanocristales de disulfuro de hierro sintetizado a diferentes temperaturas, utilizando la línea celular de NIH-3T3 (fibroblastos de ratón); la evaluación se llevó a cabo con el ensayo MTT, para determinar la viabilidad de la célula, y el ensayo DAPI, para determinar la preservación de los núcleos de las células. En la Figura 2.13 se muestran los resultados obtenidos por el ensayo MTT, donde se pueden observar que la viabilidad de las células en contacto con el material a diferentes temperaturas no presenta una variación importante en relación a la muestra control, por lo que la adhesión y proliferación de la línea celular puede ser comprobada.

La cito arquitectura de los núcleos de las células mantuvieron su integridad por 48 horas de cultivo en contacto con los nanocristales de disulfuro de hierro a todas las temperaturas (220, 230, 235 y 240°C), como se muestra en las Figuras 2.14 (c)-(f) respectivamente, que se hicieron en comparación con la muestra control, por lo tanto, se dio la proliferación celular en contacto con el material.

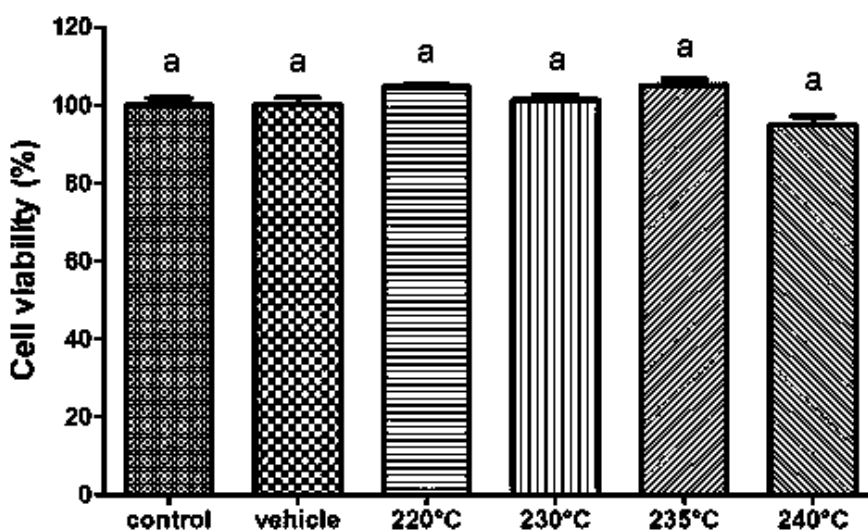


Figura 2.13 Resultados del efecto de viabilidad celular de nanocristales de disulfuro de hierro obtenidos a diferentes temperaturas. Las células NIH-3T3 fueron cultivadas en ausencia de disulfuro de hierro, en 1% de metanol y en 250 nM de nanocristales de disulfuro de hierro obtenido a 220°C, 230°C, 235°C y 240°C. Después de 48 horas de cultivo, las células fueron analizadas por el ensayo MTT. Donde no se observaron diferencias significativas [44].

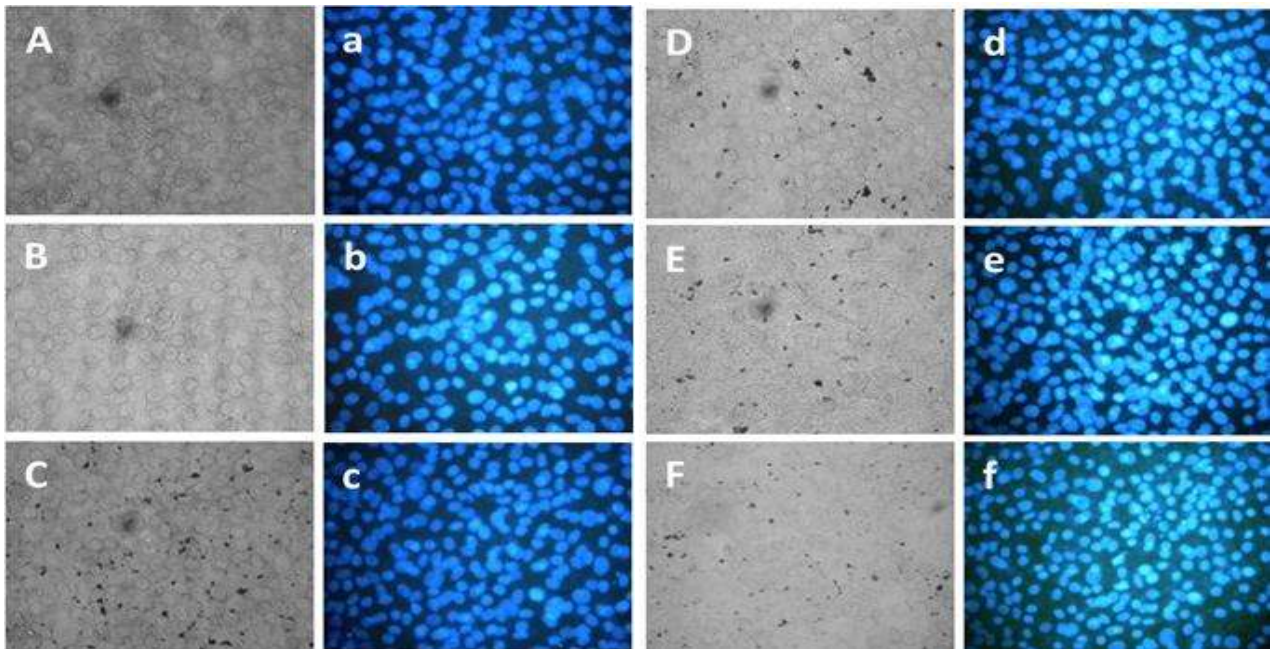


Figura 2.14 Integridad de la monocapa de células y núcleos de las células, después de 48 horas de cultivo. (Aa) sin tratamiento (control), (Bb) metanol al 1% (vehículo), disulfuro de hierro obtenido a: (Cc) 220°C, (Dd) 230°C, (Ee) 235°C, y (Ff) 240°C. La dosis para todos los casos fue de 250 nM de material. La monocapa fue observada por microscopio de luz visible y los núcleos de las células fueron teñidos con DAPI y luego observados con un microscopio de luz UV a magnificación de 40X [44].

Acosta y col. [45] evaluaron el poli (metil metacrilato) (PMMA) con y sin nanopartículas de plata para aplicaciones dentales. Utilizaron la línea celular NIH-3T3 y linfocitos de humano para evaluar su biocompatibilidad, y con la ayuda de tres ensayos determinaron la viabilidad del material para aplicaciones dentales; ensayo MTT (Figura 2.15(A)), ensayo BrdU (Figura 2.15(B)) y ensayo cometa (Figura 2.16).

El ensayo MTT se desarrolló en PMMA con y sin nano partículas de plata y en resina natural que se utiliza comúnmente en el mercado dental (Figura 2.15(A)), revelando que la viabilidad del PMMA con nano partículas de plata no afecta la proliferación celular de la misma manera que las

otras dos muestras que ya son utilizadas en el mercado dental, esto se puede determinar por la no significativa variación en los resultados obtenidos en ambos tiempos de ensayo.

El ensayo BrdU fue hecho por un tiempo de 24 horas de exposición (Figura 2.15 (B)), los resultados muestran que los materiales en todas las muestras analizadas no limitan la proliferación, a excepción del control negativo que estuvo expuesto a la radiación UV.

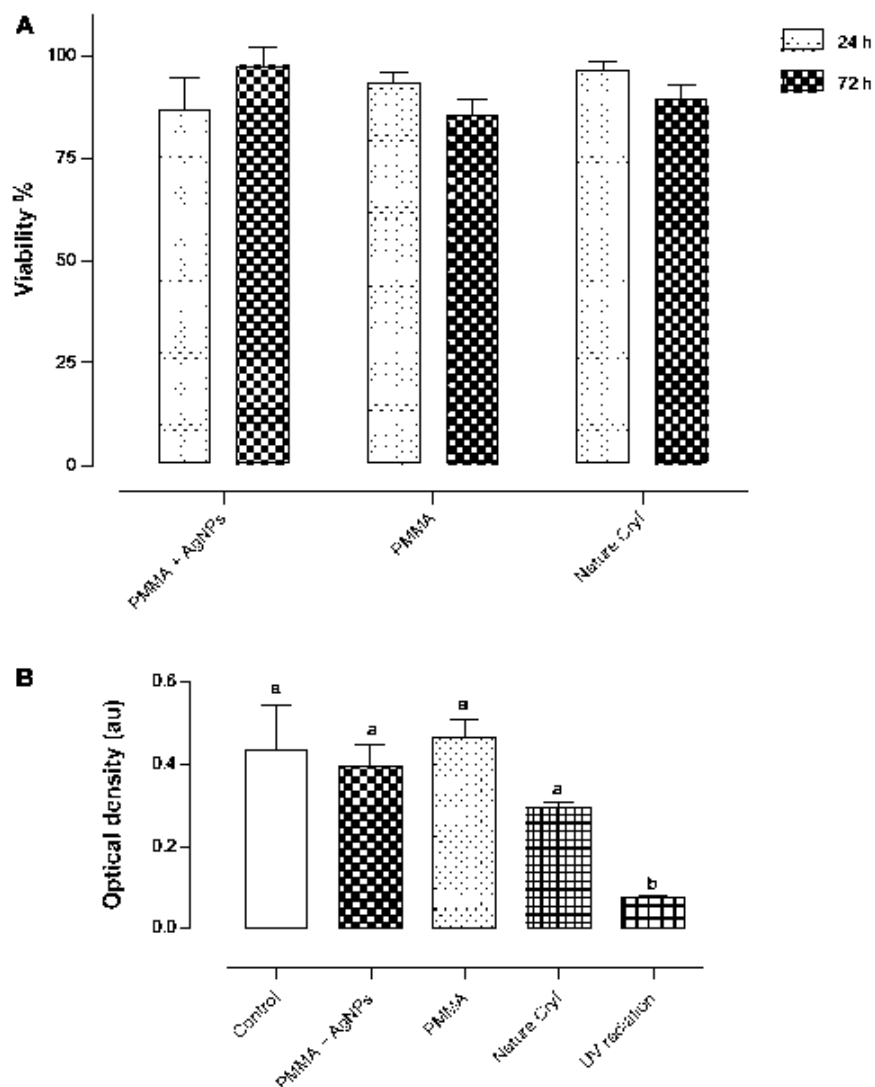


Figura 2.15 Evaluación de la biocompatibilidad en células de fibroblasto de ratón NIH-3T3. (A) Ensayo MTT desarrollado en PMMA y resina natural evaluado en 24 y 72 horas. (B) Evaluación de proliferación celular por ensayo BrdU por 24 horas de exposición [45].

El ensayo cometa fue desarrollado en linfocitos de humano (Figura 2.16 (A)), buscando determinar la genotoxicidad de las muestras, los resultados muestran que tanto la muestra control, el PMMA con y sin nano partículas de plata, y la resina natural, no dañan el material de ADN de las células expuestas, y esto se corroboró con la muestra control negativa que estuvo expuesta a la radiación UV, donde se muestra un daño al ADN celular. En la Figura 2.16(B) se representa de manera estadística lo encontrado en el ensayo cometa.

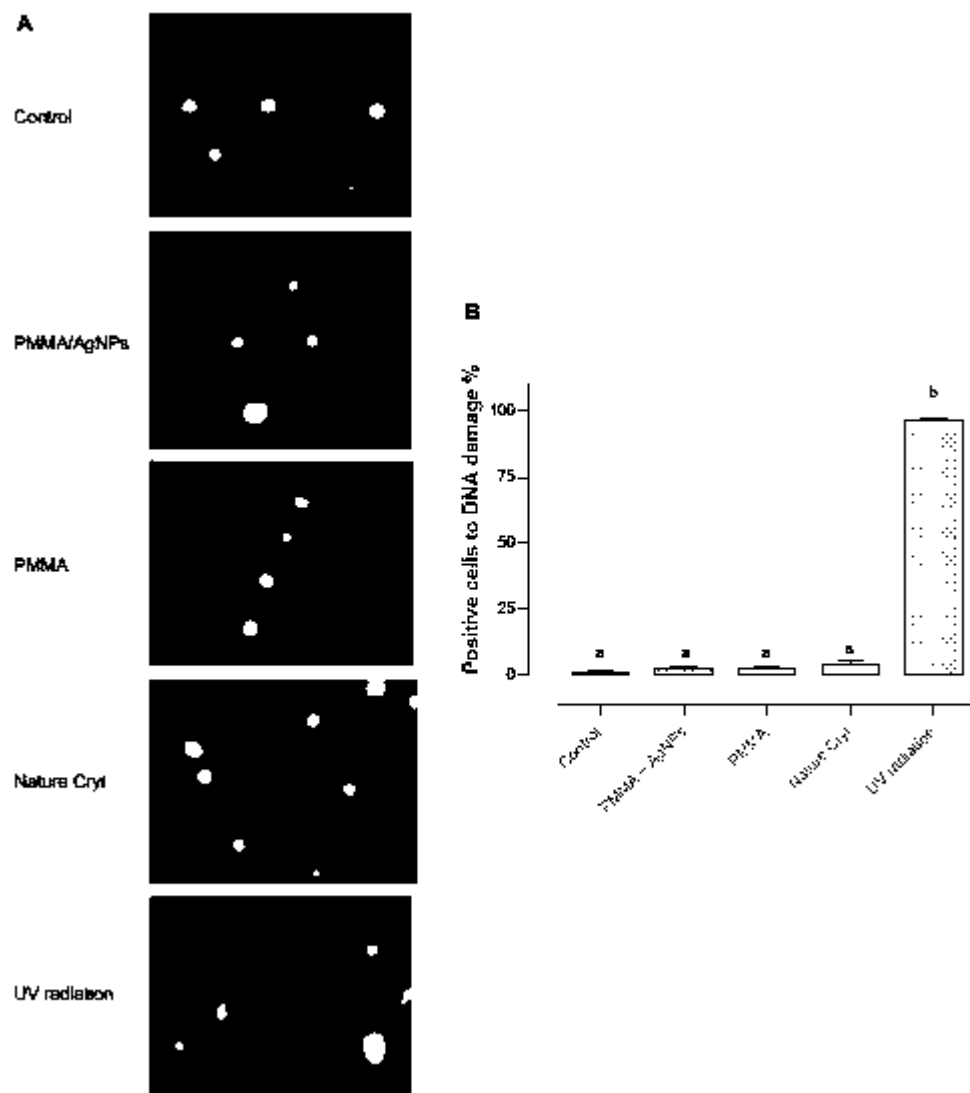


Figura 2.16 Ensayo de genotoxicidad en linfocitos de humano por ensayo cometa. (A) Imágenes representativas de células manchadas con bromuro de etidio expuestas a electroforesis. (B) Análisis cuantitativo de daño positivo al ADN [45].

CAPÍTULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

A continuación, se describe la metodología empleada para la preparación de los andamios de PLA/Bioglass 45S5 fabricados por la técnica de NTIPS, este método se basa en lo descrito por Rezabeigi y col., [36, 46] y Lua Gómez [47], además se describe la caracterización realizada. En la Figura 3.1 se describe esquemáticamente el trabajo realizado durante el proyecto.

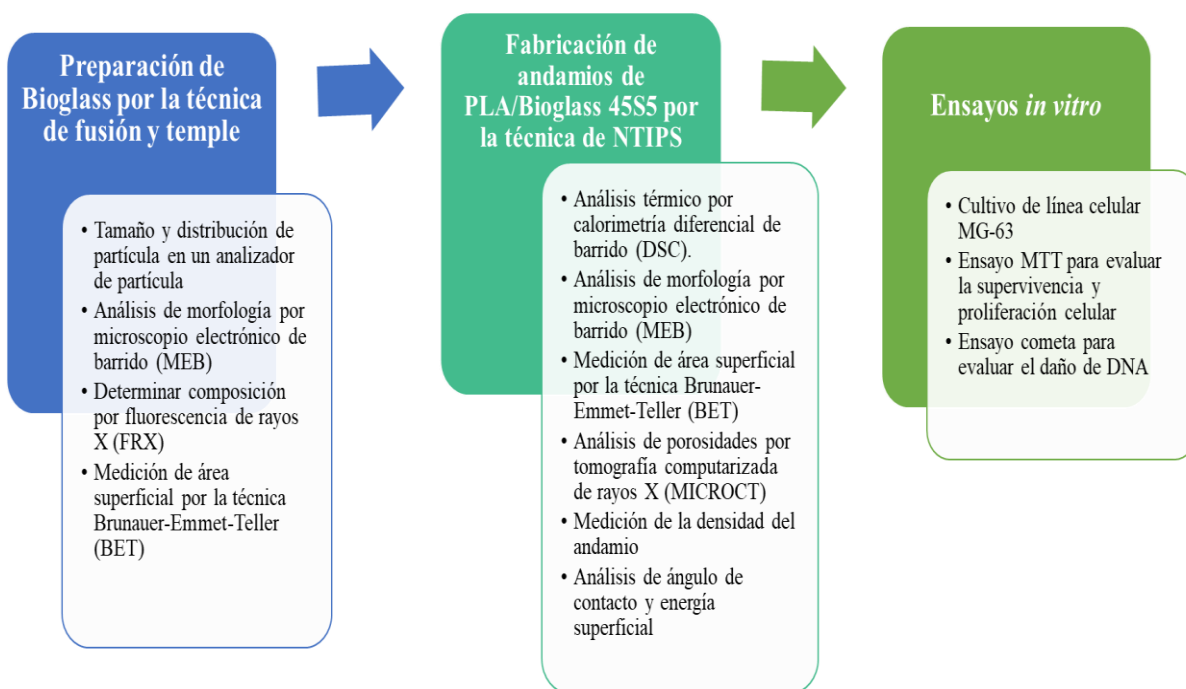


Figura 3.1 Esquema de las actividades realizadas en el presente proyecto.

3.1 Preparación del Bioglass 45S5

El Bioglass 45S5, de composición 45SiO₂- 24.5CaO-24.5Na₂O-6P₂O₅ % en peso, se obtuvo por el método de fusión y temple a partir de las proporciones estequiométricas de los polvos de alta pureza SiO₂, CaO, Na₂CO₃ y P₂O₅ (*Sigma Aldrich*, Tabla 3.1) los cuales se mezclaron en un contenedor

de polietileno por un periodo de 30 minutos. La fusión de la mezcla se llevó a cabo en un horno *HTF-1700 Carbolite* usando un crisol de sílice fundida. El ciclo térmico constó de elevar la temperatura desde temperatura ambiente hasta 950 °C a una velocidad de 10 °C/min con una permanencia a esta temperatura de 30 minutos; enseguida se elevó la temperatura a 1350°C a una velocidad de 10 °C/min, y se mantuvo ahí durante 30 minutos. Inmediatamente después de cumplir el paso anterior, el material fundido se templó en agua fría para formar una frita y el material resultante se secó durante 24 horas a 100 °C y posteriormente se pulverizó en un molino de discos vibratorio *RS 200 Retsch* durante 1 minuto.

Tabla 3.1 Reactivos y cantidades necesarios para la obtención de 100 g Bioglass® 45S5 por el método de fusión y temple.

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

3.2 Obtención de andamios PLA/Bioglass

El proceso utilizado para la fabricación de los andamios compuestos de PLA/Bioglass® 45S5 se basa en el método desarrollado por Rezabeigi y col. [36] 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.

Los reactivos utilizados para la fabricación de los andamios fueron PLA con 1.6% de D-Lactato (*Nature Works Ingeo Biopolymer 4032D*, $\rho = 1.24 \text{ g/cm}^3$), diclorometano (*J. T. Baker*, >95.5%, $\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$), hexano (*J. T. Baker*, >95%, $\rho = 0.65 \text{ g/cm}^3$) y metanol (*J. T. Baker*, 99.9%, $\rho = 0.7918 \text{ g/cm}^3$).

Antes de utilizar el PLA fue sometido a un tratamiento térmico de fusión y temple con la finalidad de eliminar la cristalinidad del polímero para facilitar la disolución de éste en el diclorometano.

Para la preparación de los andamios compuestos se llevó a cabo la disolución de PLA en diclorometano (DCM), obteniendo soluciones con concentración de 13, 18 y 23 % en peso de PLA. La mezcla se agitó en un recipiente hermético a temperatura ambiente hasta obtener una solución polimérica totalmente homogénea; la disolución se llevó a cabo a una temperatura menor de 30 °C para evitar la rápida pérdida de DCM, agregando una mayor cantidad de DCM de lo requerido para facilitar la disolución del PLA, y posteriormente se dejó evaporar hasta llegar al peso deseado para el experimento. Una vez que el polímero estaba disuelto, se agregaron las partículas de biovidrio a la solución en cantidades para obtener sistemas con 5, 10 y 15 % en peso con respecto a la mezcla final de PLA/Bioglass, fue homogeneizada durante unos minutos, posteriormente, la mezcla fue llevada a un baño ultrasónico durante 10 minutos para dispersar el vidrio en la solución. Posteriormente, se agregó el hexano (no solvente), en este punto se analizaron diferentes velocidades para agregar el hexano a la mezcla, en una cantidad volumétrica igual a la de DCM usado en la disolución, este paso se llevó a cabo bajo agitación vigorosa.

Una vez disuelto el hexano en la solución, la mezcla se llevó a un congelador a -20 °C, el tiempo de permanencia a esta temperatura fue analizado e identificado para cada sistema durante la investigación, buscando que la gelación del sistema se llevará a cabo. El gel resultante se sumergió en 200 mL de metanol para llevar a cabo el intercambio de solvente, este proceso se realizó durante 24 horas. Después del intercambio de solvente, las espumas se dejaron secar al aire por un día, para posteriormente secar a temperatura ambiente en una cámara de vacío, el tiempo necesario hasta que se registrara un peso constante.

Tabla 3.2 Porcentajes usados en la fabricación de andamios. La temperatura utilizada se mantuvo constante en -20 °C para la separación de fases. |

% PLA	% DCM	% Bioglass	Relación Hexano/DCM	Nomenclatura
13	87	0	1	13 PLA
13	87	5	1	13PLA/5BG
13	87	10	1	13PLA/10BG
13	87	15	1	13PLA/15BG
18	82	0	1	18 PLA
18	82	5	1	18PLA/5BG
18	82	10	1	18PLA/10BG
18	82	15	1	18PLA/23BG
23	77	0	1	23 PLA
23	77	5	1	23PLA/5BG
23	77	10	1	23PLA/10BG
23	77	15	1	23PLA/15BG

3.3 Caracterización del Bioglass

Los ensayos de caracterización para el Bioglass fueron realizados al polvo resultante de la molienda.

La morfología de los polvos fue estudiada utilizando un microscopio electrónico de barrido *Jeol JSM-6400*, se realizaron análisis puntuales por EDS (espectrometría de energía dispersiva) para determinar la composición del vidrio obtenido.

Se llevó a cabo la determinación de tamaño y distribución de tamaño de partícula en un analizador de partícula *Coulter LS100Q*, los resultados son presentados en funciones distributivas acumulativas, que representan cantidades de masa de partículas pertenecientes a un tamaño dado.

Para determinar la naturaleza amorfa del vidrio obtenido se realizó un análisis de difracción de rayos X en un difractómetro de rayos X *D8 Advance Bruker*, en un rango de 10-90°, usando un paso de 0.02° por cada 0.6 s. Se realizó la medición de área superficial por la técnica de BET en un medidor de área superficial *Quantosorb Jr*.

Se realizó el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un equipo SDT Q600 *TA Instruments*, usando un crisol de alúmina en un rango de temperatura de 25 a 1300°C con velocidad de calentamiento de 10 °C/min para determinar las temperaturas de transición vítrea, cristalización y fusión del biovidrio. Además, se determinó la densidad del vidrio obtenido mediante un picnómetro de helio *Micromeritics AccuPyc 1330*.

3.4 Caracterización de los andamios compuestos PLA/Bioglass 45S5

Se realizó el estudio de morfología y análisis de porosidad (tamaño de poro, distribución de tamaño de poro, morfología, microestructura) mediante imágenes obtenidas en un microscopio *Jeol JSM-6400*.

Se realizó la medición de área superficial por la técnica de BET en un equipo *Quantosorb Jr*. Posteriormente, se determinó la densidad aparente (ρ) del andamio a partir de sus dimensiones geométricas, evaluando 3 muestras rectangulares de 15 mm de largo x 7.5 mm de ancho para los sistemas 13 PLA y 13PLA/5BG, y dividiendo la masa de los andamios entre su volumen, de acuerdo a Blaker y col. [40]. A partir de los valores obtenidos se determinó la porosidad de los andamios (P) de PLA/Bioglass 45S5 mediante la Ecuación (3.2) descrita por Reazbeigi y col. [46]:

$$P = \left[1 - \rho \left(\frac{W_g}{\rho_g} + \frac{W_{PLA}}{X_c(\rho_c - \rho_a) + \rho_a} \right) \right] \quad (3.1)$$

Donde:

ρ = densidad aparente del andamio.

W_g = fracción en peso del vidrio.

W_{PLA} = fracción en peso del PLA.

ρ_g = densidad del vidrio (2.7566 g/cm³, determinado experimentalmente por la técnica de picnómetro de helio).

X_c = fracción cristalina de la matriz PLA.

ρ_c = densidad del PLA completamente cristalino (1.290 g/cm³) [46].

ρ_a = densidad del PLA completamente amorfo (1.248 g/cm³) [46].

Se llevó a cabo el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC), en un calorímetro diferencial de barrido modulado *MDSC Q200 TA Instruments*, para determinar la capacidad calorífica, así como su entalpía de fusión. El análisis se realizó desde temperatura ambiente hasta 300 °C en un crisol de aluminio con velocidad de calentamiento de 10°C/min. A partir de este análisis se evaluó el grado de cristalinidad del material (X_c) de los andamios usando la Ecuación (3.2):

$$X_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H^0} \times \left(\frac{1}{w} \right) \quad (3.2)$$

Donde:

ΔH_m = calor de fusión de las muestras.

ΔH^0 = calor de fusión del PLA completamente cristalino (106 J/g) [36].

w = fracción en peso de PLA en el andamio.

Se evaluaron los ángulos de contacto de los andamios usando un equipo *Contact Angle System OCA* utilizando dos líquidos, agua y formamida. El experimento constó en realizar 5 mediciones de cada líquido con un tiempo de exposición de gota de 5 segundos para cada una de las muestras evaluadas. Posteriormente, se evaluó la energía superficial de las muestras utilizando en modelo matemático de Owens-Wendt-Kaeble [48]. La caracterización de la energía superficial de los

andamios se realizó con la finalidad de determinar si las células pueden adherirse directamente a ellos o se tienen que modificar su superficie con algún tratamiento o recubrimiento.

Se realizó el análisis de los andamios con 13% de PLA con y sin refuerzo de Bioglass 45S5 (5%), por medio de un microtomógrafo (μ CT), *SkyScan 1272 Bruker*, para conocer la microestructura interna y porosidad.

3.4.1 Ensayos *in vitro*

Se realizaron pruebas con cultivos celulares utilizando las líneas celulares de osteosarcoma de humano MG-63 (ATCC), siguiendo el protocolo descrito por Yoo y col. [43]. El cultivo celular se llevó a cabo en un medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) agregando 1% (v/v) de solución antibiótica antimicótica y 10% (v/v) suero fetal bobino (PBS) en una incubadora con 5% CO₂ a 37°C.

Se tomaron 6 muestras de andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5 por sistema, con peso similar para comparar los resultados.

Previo a realizar los ensayos con cultivos celulares se descongelaron los viales que contenían las células. Para asegurar el mayor nivel de viabilidad, el vial se debe descongelar de manera lenta para que las células no sufran daño. Los pasos realizados, para la evaluación de la toxicidad de los andamios fueron los siguientes:

Se cultivaron las líneas celulares y se mantuvieron en crecimiento logarítmico en un medio a 37 °C y 5 % de CO₂. Posteriormente se realizó el cambio del medio de cultivo de las células al observar un cambio en la coloración de rojo a amarillo, para mantener viable el cultivo celular y una confluencia del 80 al 100%. Obtenida la confluencia, se retiró el medio de cultivo por aspiración y se lavó la monocapa celular con 3 μ L de PBS, con la finalidad de eliminar residuos de medio de cultivo. Después, se adicionó 0.5 mL de suspensión de tripsina al 0.025 %, se incubó de 3 a 5 min a 37 °C, asegurando que la tripsina elimine las uniones intercelulares entre las células y la placa de cultivo, observándose una suspensión celular en el microscopio invertido; una vez obtenida la suspensión celular, se homogenizó con 0.5 mL de medio de cultivo para inactivar a la tripsina. Las células fueron recuperadas con ayuda de una micropipeta, pipeteando suavemente para disgregar los cúmulos de células, para después transferirlas a un tubo cónico de 15 mL y nuevamente

homogenizar adicionando medio hasta 10 mL. Posteriormente, se tomó una muestra de la solución y se colocó una alícuota de 10 μ L en uno de los extremos de la cámara de Neubauer, con la que se contaron y posteriormente se obtuvo el número de células de la solución madre con la Ecuación. (3.3):

$$\text{No. de células por mL} = \frac{\# \text{ cel} \times \text{FD} \times 10,000}{\text{Número de cuadrantes contados}} \quad (3.3)$$

Donde:

cel = número de células contadas en los cinco cuadrantes.

10,000 = factor de volumen (superficie X profundidad).

FD = factor de dilución = volumen total/volumen de alícuota.

Una vez contadas las células en la alícuota de la solución madre, se realizaron diluciones para obtener una densidad de 3×10^3 a 5×10^3 cel/mL, agregando medio de cultivo.

Para el experimento se inocularon 3×10^3 a 5×10^3 cel/mL en 100 μ L de medio de cultivo, en placas de 12 pozos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 24 h, se retiró el medio y se adicionó 97 μ L de medio de cultivo fresco asignando 6 pocillos para cada tratamiento. Los tratamientos analizados fueron: un control positivo y uno negativo, los andamios fabricados. Una vez colocado los tratamientos en cada pocillo se incubó durante 24 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

Después de los tiempos de cultivo de las células, se midió la biocompatibilidad por medio del ensayo de viabilidad celular por bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)- 2,5 difeniltetrazol (ensayo MTT).

El método MTT fue desarrollado por Mosmann [49] en 1983 siendo modificado en 1986 por Denizot y Lang [50]. El ensayo MTT se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir

supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Después de incubar las células MG-63 se procedió a realizar el ensayo MTT. Primero se utilizó tripsina EDTA para disociar las células y resuspenderlas en medio de cultivo suplementado (10% de suero fetal bovino y antibiótico). Para determinar el número de células requeridas por pozo, fue necesario realizar la técnica con células sin los tratamientos a analizar y se determinó su densidad óptica (DO), esta densidad debe ser igual o mayor a 1. Se utilizaron cajas de 12 pozos, donde se sembraron las células antes calculadas, en la mayoría de las líneas celulares son 20,000 células por pozo. Fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir la adherencia.

Cabe mencionar que los andamios fueron cortados para tener especímenes de un peso similar para ser colocados en los platos de pozos.

Después del tiempo de cultivo, se agregaron las muestras de los andamios en cada pozo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir que el andamio estuviera en contacto con las células. Al cumplir el tiempo de cultivo, el andamio y el exceso de medio de cultivo fueron retirados. Posteriormente, se colocó 100 µL de medio sin suero y rojo fenol por pozo, después se añadió 50 µL de MTT en solución tampón libre de calcio y magnesio y se incubó por 4 horas a 37°C para permitir la formación de cristales de formazán. Cumplido el tiempo de incubación se eliminó el sobrenadante y se añadió 100 µL de isopropanol. Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán fueron disueltos. Finalmente, la lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro, *Microplate Reader Bio-Rad*, a una longitud de onda de 540 nm.

Los valores obtenidos fueron analizados con ayuda de la Ecuación (3.4), para determinar el porcentaje de viabilidad de las células al estar en contacto con los andamios.

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{DO de células tratadas}}{\text{DO de células control}} \times 100 \quad (3.4)$$

Es indispensable realizar cada ensayo por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos (sustancia de la cual se conozca su poder citotóxico) y células no tratadas, las cuales deben dar una lectura de DO mayor o igual a 1. Los valores de comparación se hacen sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC50) en las células tratadas con los agentes específicos.

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se mostrarán los resultados de la caracterización de los materiales precursores y enseguida los resultados obtenidos de los andamios compuestos.

4.1 Bioglass 45S5.

Se obtuvo bioglass 45S5 por la técnica de fusión y temple en forma de fritas, posteriormente se pulverizó con la finalidad de obtener el bioglass en forma de polvo para usarlo en la fabricación de los andamios. Los resultados de la caracterización son descritos a continuación.

4.1.1 Microscopía electrónica de barrido

Se tomaron micrografías por microscopio electrónico de barrido para evaluar la morfología y el tamaño de partícula del vidrio fabricado. En la Figura 4.1 se presentan micrografías a diferentes aumentos del bioglass 45S5. En la Figura 4.1(A) se observa una amplia distribución de tamaños y formas de las partículas del bioglass, en la Figura 4.1(B)-(D) se muestran el bioglass a diferentes aumentos, las partículas poseen formas irregulares debido al proceso de molienda, de superficie lisa y sin porosidades, así como un amplio rango de tamaños de partícula; como se observa en la Figura 4.1(C). Las partículas pequeñas tienden a posicionarse en la superficie de las partículas de mayor tamaño y/o a aglomerarse con otras partículas de tamaño similar, Figura 4.1(D).

Se realizaron análisis por EDS para determinar los elementos presentes en el biovidrio. En la Figura 4.2 se muestra el mapeo de una zona del biovidrio analizado a 1000x; se observa la distribución de los elementos presentes, los porcentajes obtenidos son reportados en la Tabla 4.1. Aunque estos valores no son exactos para determinar la composición del bioglass, ya que son análisis puntuales y no son considerados representativos de toda la muestra, sin embargo, desde el punto de vista cualitativo permiten identificar los elementos presentes en la muestra y que pueden esperarse en otros análisis más especializados como es la fluorescencia de Rayos X. En la Tabla 4.1 se muestran los elementos característicos del Bioglass 45S5 [11] que están presentes en el vidrio fabricado, en porcentaje atómico, y que se distribuyen en todas las partículas analizadas. La presencia de Al en el Bioglass 45S5 no es significativa para hacer variar las funciones del vidrio y se atribuye a

contaminación del crisol de sílice fundida utilizado, que incluye en su composición cantidades significativas de Al_2O_3 .

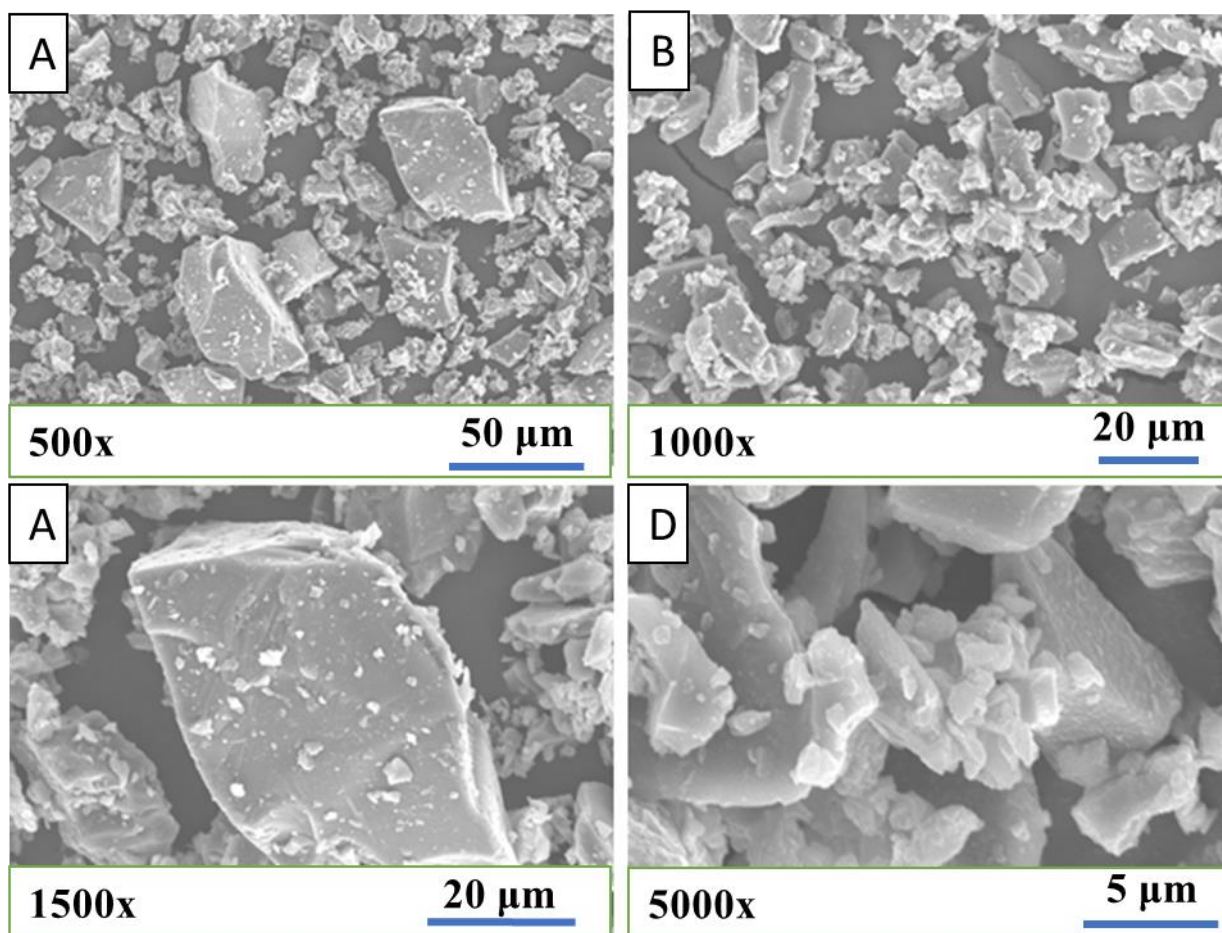


Figura 4.1 Micrografías obtenidas por MEB de las partículas del polvo de Bioglass 45S5.

Tabla 4.1 Elementos detectados por EDS en una muestra de bioglass, porcentaje atómico.

O ■	Na ■	Si ■	P ■	Ca ■	Al ■	C
53.1838	14.9455	18.3339	1.1835	7.2526	0.9874	4.1131

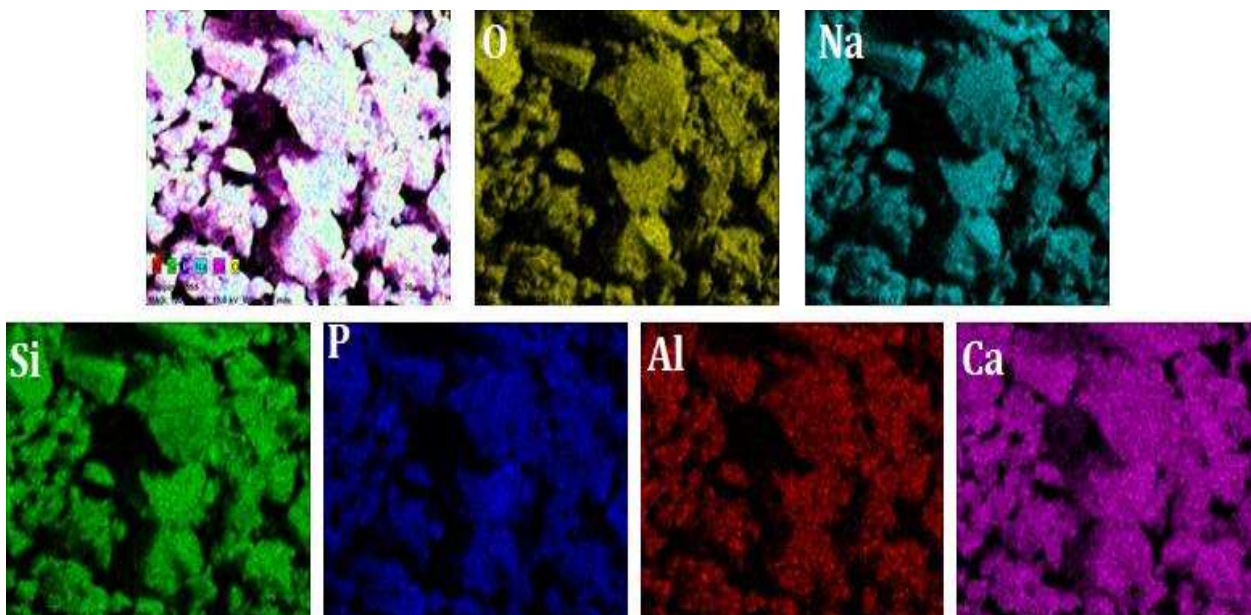


Figura 4.2 Análisis EDS del Bioglass 45S5 fabricado.

4.1.2 Tamaño y distribución de partícula

En la Figura. 4.3 se presenta la gráfica de distribución de tamaños de las partículas presentes en la muestra de Bioglass 45S5 fabricado. Se puede observar que se tiene un amplio rango que va de $0.375 \mu\text{m}$ a $69.61 \mu\text{m}$; esto concuerda con las imágenes obtenidas por MEB donde se observan varios tamaños de partículas. Este amplio rango de partícula podría disminuirse si se realiza el proceso de pulverizado más de una vez.

El polvo obtenido por el proceso de fusión y temple y posteriormente pulverizado, tiene un tamaño promedio de $13.13 \pm 2.833 \mu\text{m}$, los resultados obtenidos muestran que un poco más del 50% de las partículas se encuentra por encima del tamaño de partícula promedio; otros autores [10] indican que los diferentes tamaños de partícula no afectan el proceso de separación de fases, pero es deseable que las partículas sean de menor tamaño para promover la formación de hidroxiapatita con el aumento de área superficial.

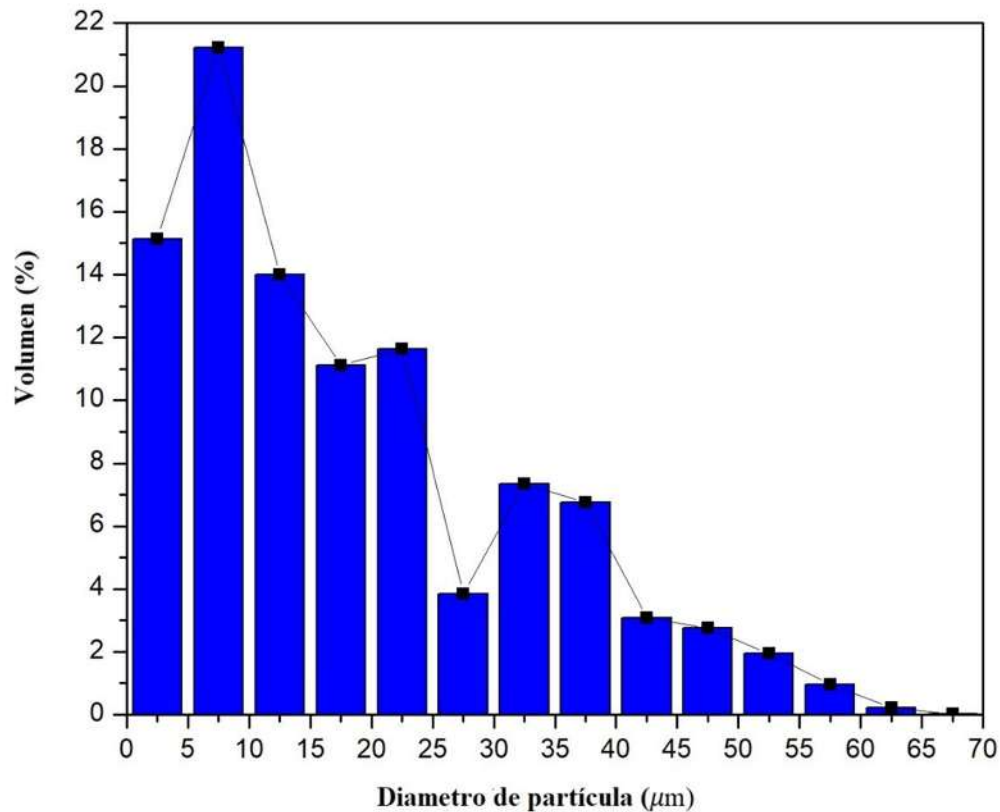


Figura 4.3 Tamaño y distribución de tamaño de partícula del Bioglass 45S5.

4.1.3 Difracción de Rayos X

En la Figura 4.4 se muestra el patrón de difracción de rayos X para el polvo de Bioglass 45S5, donde se observa la formación de un pico no definido en el rango de 20 a 37° aproximadamente que indica la estructura amorfa presente; esto asegura que la velocidad y temperatura de temple en agua fría durante el procesamiento fue suficiente para obtener una estructura amorfa. La obtención de esta estructura es importante para el desarrollo del proyecto ya que se ha reportado que la presencia de vidrio bioactivo con fase cristalina puede retrasar la formación de hidroxiapatita por presentar una estructura más ordenada con enlaces químicos difíciles de romper [29-31, 42].

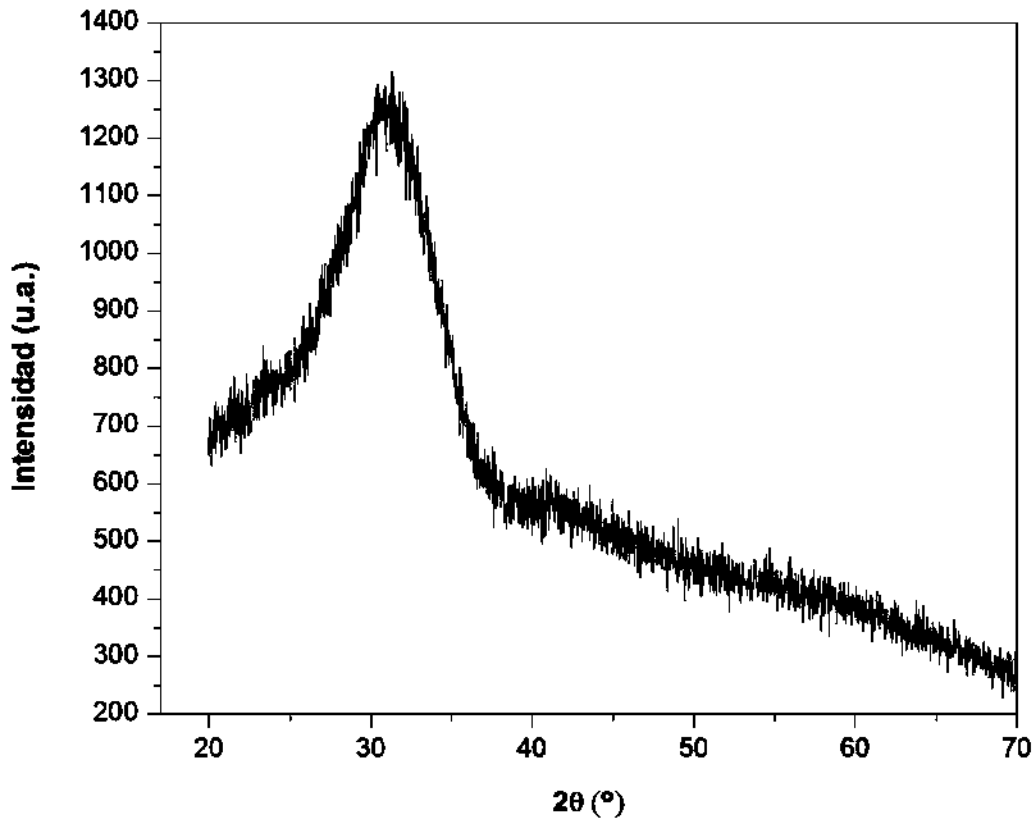


Figura 4.4 Patrón de difracción del Bioglass 45S5.

4.1.4 Calorimetría diferencial de barrido

Se realizó la técnica de calorimetría diferencial de barrido para conocer las temperaturas de cristalización, transición vítrea y de fusión del material fabricado. En la Figura 4.5 se puede observar el termograma obtenido. El primer cambio en la pendiente se observa en 523 °C correspondiente a la temperatura de transición vítrea (T_g), la T_g reportada para el Bioglass 45S5 obtenido por la técnica de fusión y temple es de 570 °C [51]. La segunda señal que se observa corresponde a la temperatura de cristalización (T_c) con una temperatura de inicio de 625 °C y un máximo a 720 °C, siendo una reacción exotérmica, la máxima temperatura que se ha reportado para la transformación a la fase cristalina es de 610°C [51]; finalmente aparece un pico

correspondiente a una reacción endotérmica que corresponde a la temperatura de fusión a 1155 °C, temperaturas en el rango entre 1070 a 1300 °C han sido reportados para Bioglass 45S5 [51]. Los valores obtenidos son cercanos a los reportados por otros autores y estas variaciones se deben a diferentes factores como son: composición, proceso de fabricación y variantes al realizar la técnica de caracterización [52]; al comparar las temperaturas obtenidas con los reportados por Lefebvre y col. [51] siendo que ambos fueron fabricados por la técnica de fusión y temple, se asocia la variación de temperatura a que realizaron un paso de descarbonatación a 950 °C por 5 horas, así como a la variación en la composición del Bioglass 45S5 por la presencia de Al en el vidrio fabricado para este trabajo.

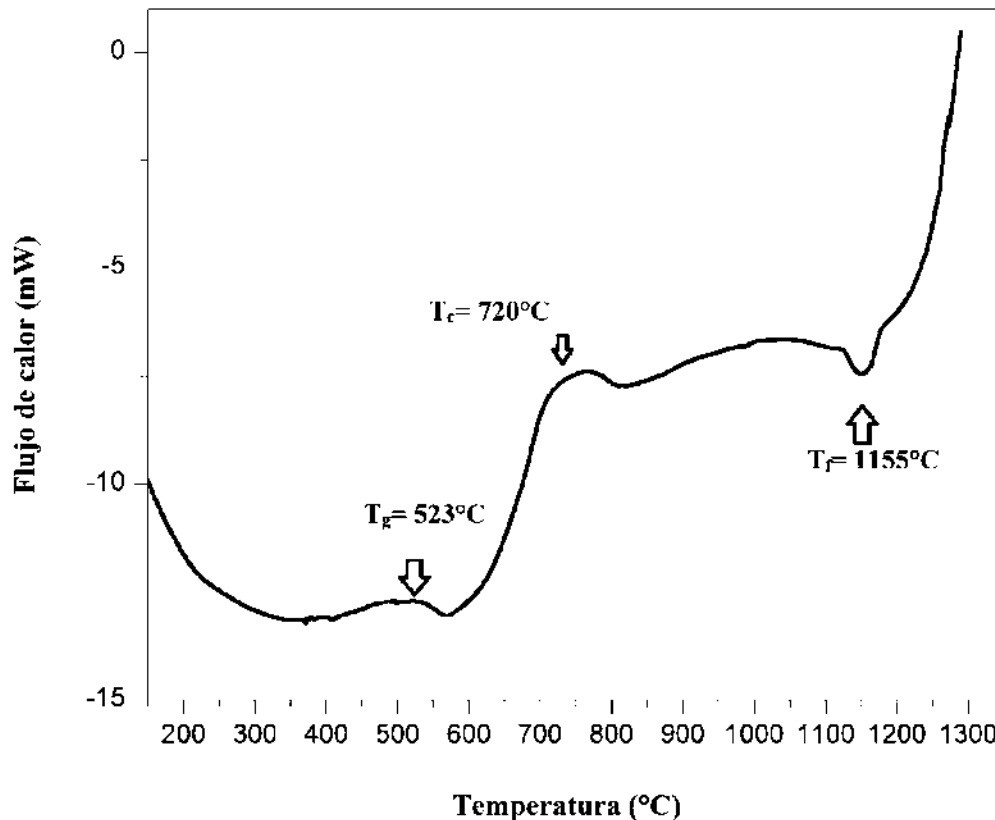


Figura 4.5 Termograma del Bioglass 45S5 obtenido por calorimetría diferencial de barrido.

4.1.5 Área superficial del Bioglass 45S5

El área superficial obtenida por la técnica de BET fue de $0.42 \text{ m}^2/\text{g}$. Este valor es relativamente bajo, pero se encuentra dentro del rango antes publicado por Sepúlveda y col. [53] que es de 0.15 a $2.7 \text{ m}^2/\text{g}$ para vidrios fabricados por fusión y temple. El vidrio fabricado por esta técnica presenta ventajas por el tiempo corto de fabricación, aunque los tamaños de partícula obtenidos son mayores y por lo tanto su área superficial es mayor; en comparación con otros métodos como el de sol-gel que presenta tamaños nanométricos y grandes áreas superficiales que podrían favorecer la producción de hidroxiapatita durante la inmersión en SBF. Finalmente, la densidad del vidrio obtenida mediante un picnómetro de helio es de 2.7566 g/cm^3 , este valor se encuentra dentro del rango reportado por la literatura de 2.68 a 2.82 g/cm^3 ; la variación de densidad se puede asociar a la diferencia de composición final de bioglass.

4.2 Andamios de PLA/Bioglass

El proceso de fabricación de los andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5 por separación de fases inducido térmicamente y por no solvente fueron realizados por el método descrito por Rezabeigi y col. [36]; la técnica fue modificada para adecuarla al proceso para las tres composiciones que se desarrollaron en este proyecto, en los pasos de adición del no solvente y tiempos de congelación. El no solvente (hexano) se agregó a la solución de PLA-DCM mediante un goteo lento (aproximadamente 1 gota cada 3 s) y agitando a alta velocidad para evitar la precipitación del polímero, principalmente cuando la concentración del polímero y del biovidrio aumentan ya que resulta más complicado agitar la solución.

Por otro lado, los tiempos de congelación para la formación del gel de las muestras varió dependiendo de la concentración de PLA utilizado en la fabricación. En los andamios con mayor contenido de polímero (18 y 23%) la formación del gel se llevó a cabo en menor tiempo mientras que en las muestras con 13% de PLA, el proceso de formación de gel fue muy lento. Por lo que para ajustar los procesos y que los resultados pudieran ser comparados, se estableció un tiempo de 7 días a -20°C , tiempo en el que todas las composiciones llevaron a cabo el proceso de formación de gel adecuadamente.

4.2.1 Morfología

Se obtuvieron micrografías por microscopio electrónico de barrido de los andamios de PLA/Bioglass 45S5 para visualizar las diferencias en la morfología con respecto al contenido de PLA y biovidrio.

En la Figura 4.6 se presentan las imágenes para las diferentes composiciones de los andamios compuestos.

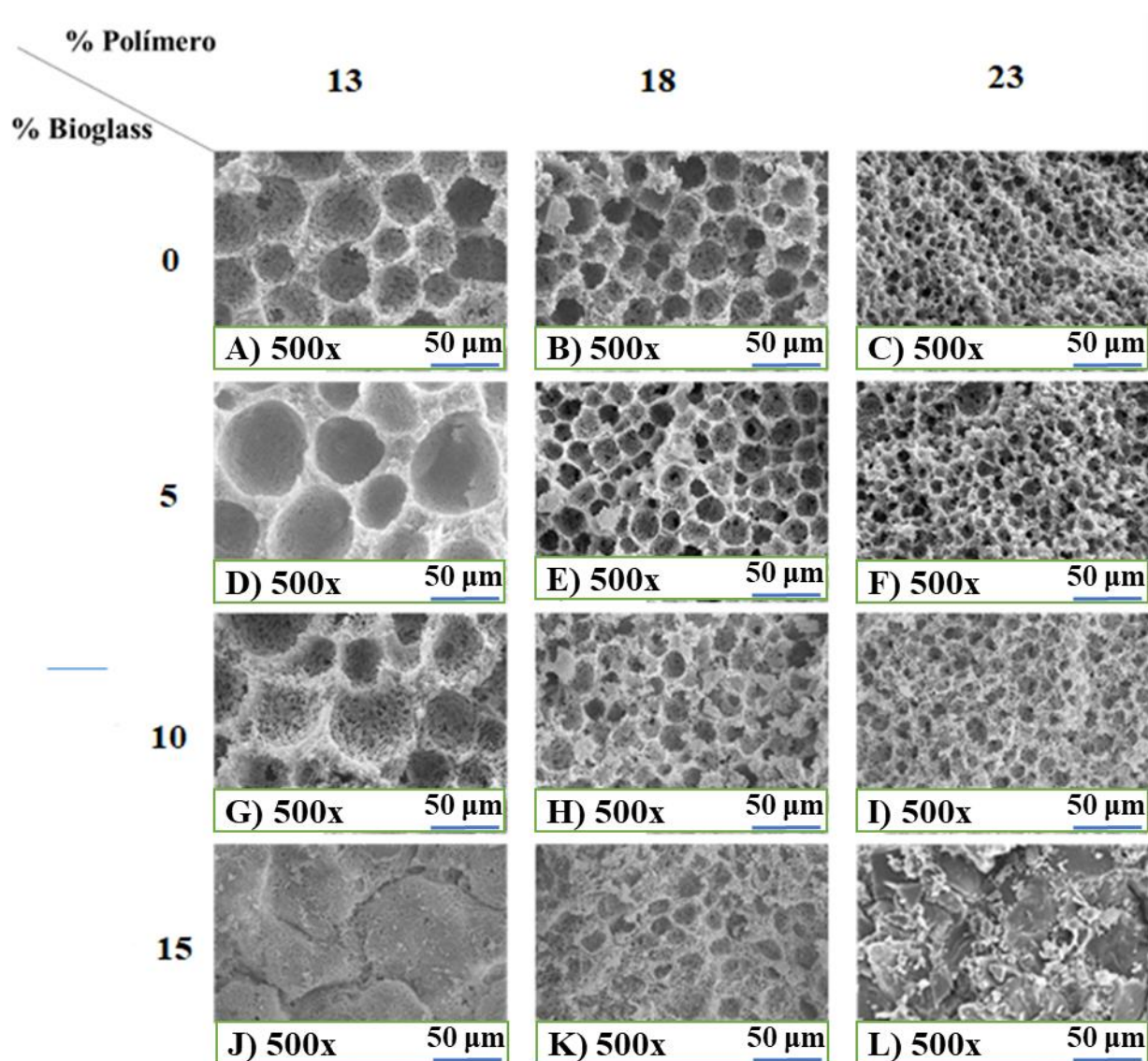


Figura 4.6 Micrografías por MEB de los andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5.

Se observa la diferencia de tamaño de poro de todas las muestras. Para todos los contenidos de polímero (13, 18 y 23%) las muestras con 15% de Bioglass 45S5 no mostraron poros definidos como en las composiciones con menor contenido de biovidrio. La cantidad de refuerzo puede afectar la formación de poros, algunos autores reportan que la producción de andamios por separación de fases tiene un límite aceptable de refuerzo para cada sistema; Hong y col. [39] reportan un límite de 30% de refuerzo para sistemas PLLA-dioxano-BG. Los andamios con composiciones de 0, 5 y 10% de Bioglass 45S5 muestran la formación de macro y meso poros, requeridos para aplicaciones en regeneración ósea. La formación de poros se atribuye al proceso de temple a la que es sometida la muestra, debido a la coalescencia de gotas de hexano-DCM y al intercambio de solvente que se produce al sumergir el andamio en metanol, así mismo, con menor influencia durante el secado de la muestra se pueden llegar a formar poros de menor tamaño [43,53].

Los andamios con estructuras porosas presentan interconectividad, a través de micro y meso poros, en la Figura 4.7(A)-(C) se presentan imágenes a diferentes magnificaciones que muestran los diferentes tamaños de poros presentes en la muestra 13% PLA/5BG, así como su interconectividad. Estas interconectividades son necesarias para la restauración de tejidos, ya que se utilizan en el intercambio de nutrientes, el desecho de productos durante el desarrollo de tejidos nuevos y la vascularización [18,48].

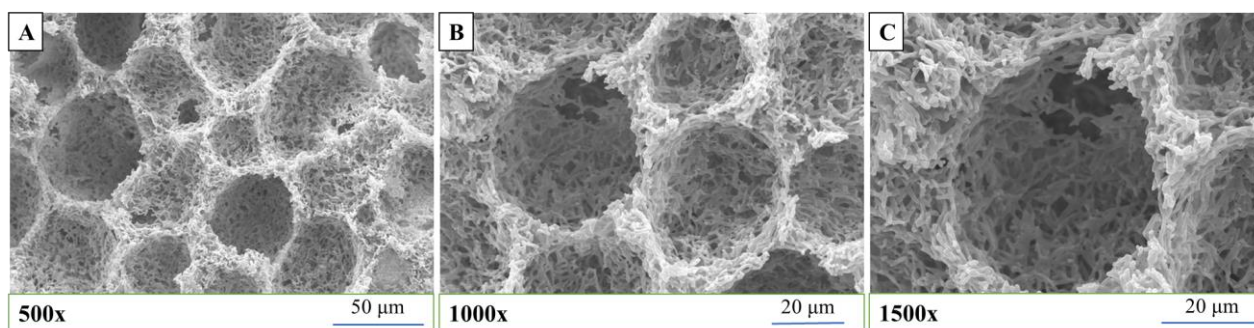


Figura 4.7 Micrografías por MEB de andamios de 13PLA/5BG A) 500x, B) 1000x y C) 1500x.

No se encontraron partículas de biovidrio en la superficie externa de los andamios, por lo que se procedió a cortar algunas muestras. En la Figura 4.8 se pueden observar partículas encontradas dentro de los andamios, se observa que algunas están sobre la superficie expuesta del andamio

después del corte, Figura 4.8(A), y en otros casos partículas de vidrio atrapadas en el andamio y la estructura porosa formada alrededor ellas, Figura 4.8(B) y (C).

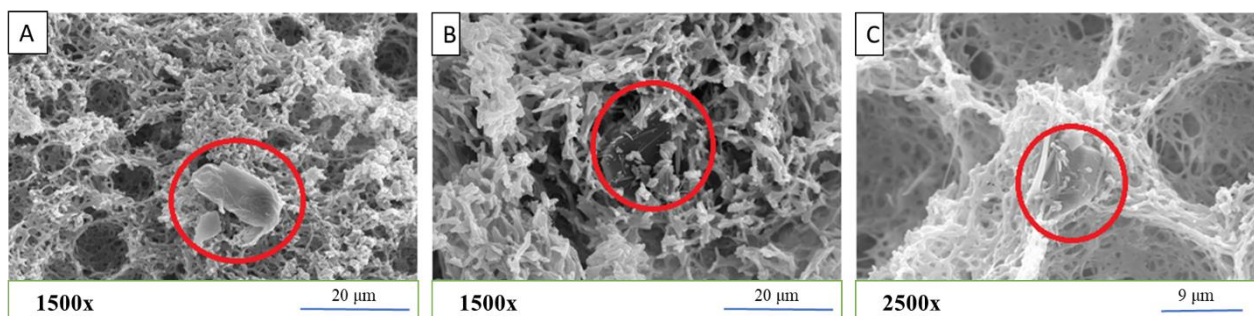


Figura 4.8 Partículas de biovidrio dentro de los andamios de PLA/Bioglass 45S5.

Se evaluaron muestras cilíndricas de 2 cm de diámetro por 3 cm de altura y por medio de microscopía electrónica de barrido fueron identificadas zonas con diferentes tamaños de poro, desde el centro del andamio hasta la capa externa. En la Figura 4.9 se muestran micrografías de las zonas encontradas dentro del andamio 13PLA/5BG. La zona 1 (Figura 4.9(A)): corresponde a la zona superficial del andamio y abarca aproximadamente 40 µm hacia el centro del andamio, presenta poros de tamaño pequeño (0 a 9 µm) presentando interconectividad hacia el centro del andamio; la zona 2 (Figura 4.9 (B)) se encuentra inmediatamente después de la zona 1 y presenta la formación de poros de tamaños de ~45 µm, esta zona rodea la parte central del andamio y a medida que se acerca a la parte central del andamio (zona 3) donde los tamaños de poro son del rango de 80-100 µm. La Figura 4.9(C) muestra la micrografía de la zona 3 que representa la parte central del andamio correspondiente a un área de 0.5 cm x 0.5 cm x 0.1 cm; finalmente la zona 4 (Figura 4.9(D)) corresponde a la zona de la base del andamio y es la zona que presenta la morfología más cerrada que se atribuye a que es la zona donde ocurre un temple más rápido a la hora de almacenar según lo reportado por Conoscenti y col. [40].

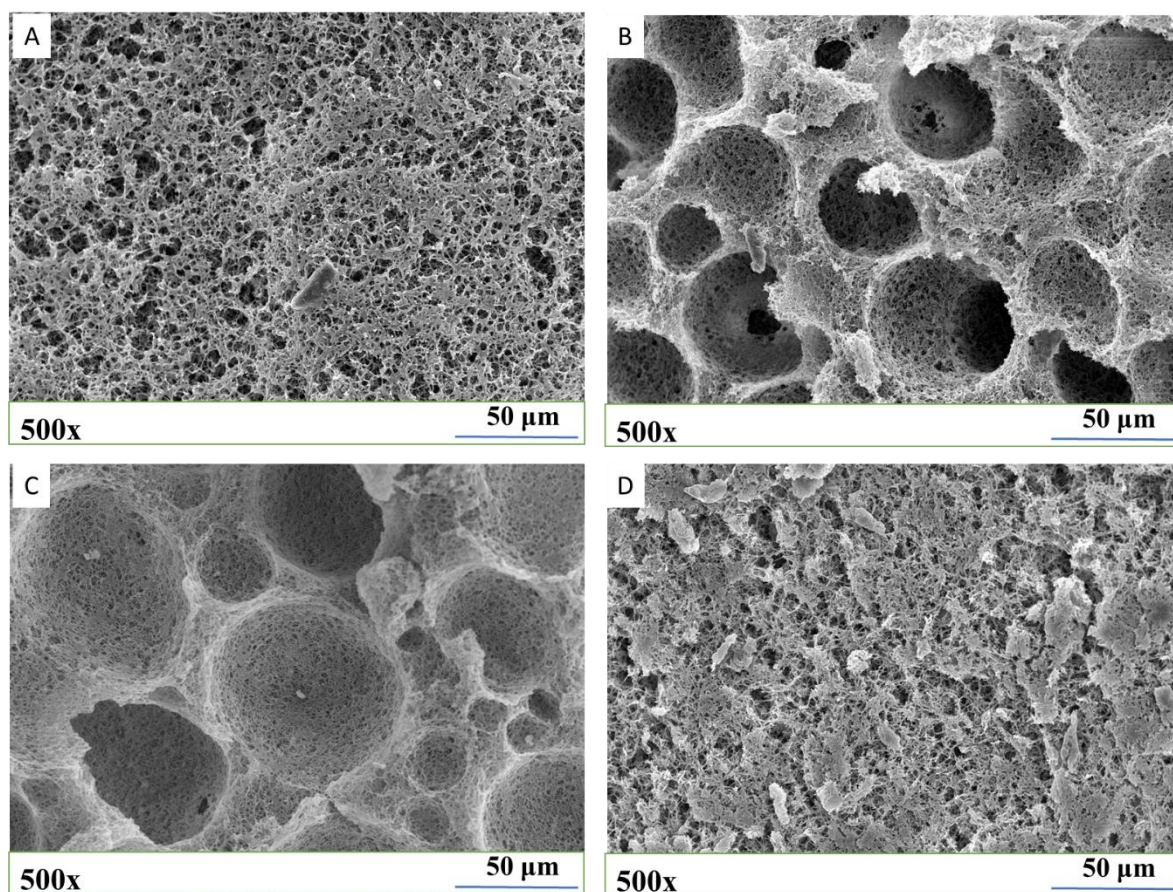


Figura 4.9 Micrografías de las diferentes zonas del andamio 13PLA/5BG: a) zona 1: capa superior del andamio, b) Zona 2: zona después de 40 µm de la superficie del andamio, c): zona 3: parte central del andamio y la que presenta poros de mayor tamaño, d) zona 4: zona base del andamio.

4.2.2 Densidad aparente y porosidad

En la Tabla 4.2 se muestran los resultados de densidad y porosidad promedios para cada uno de los sistemas fabricados de PLA/Bioglass 45S5. Se observa que la densidad tiende a aumentar cuando se incrementa la cantidad de PLA en el sistema de fabricación y así mismo presenta la tendencia a incrementar cuando se agrega mayor contenido de Bioglass 45S5. Esto se asocia a que, durante la fabricación, las soluciones con más contenido de PLA y Bioglass presentan mayor viscosidad por tener menor cantidad de solvente en el sistema, por lo tanto, la formación de poros se ve reducida. Esto se ve reflejado en la porosidad de los andamios, siendo las muestras con 13% PLA las que

tienen mayor porcentaje de porosidad (82 a 88%) y las de 23% de PLA presentan el menor porcentaje de porosidad (~72%). Los resultados obtenidos son comparados con los obtenidos por μ CT.

Tabla 4.2 Densidad y porosidad de los andamios PLA/Bioglass 45S5.

Composición	Densidad aparente (g/cm ³)	Porosidad (%)
13PLA	0.1399 $\pm$ 0.023	88.86
13PLA/5BG	0.1785 $\pm$ 0.035	85.02
13PLA/10BG	0.2256 $\pm$ 0.014	82.54
18PLA	0.2797 $\pm$ 0.025	76.96
18PLA/5BG	0.3204 $\pm$ 0.041	74.40
18PLA/10BG	0.3452 $\pm$ 0.029	73.33
23PLA	0.3774 $\pm$ 0.024	72.97
23PLA/5BG	0.3484 $\pm$ 0.042	72.49
23PLA/10BG	0.3439 $\pm$ 0.120	72.32

4.2.3 Cristalinidad

La cristalinidad es una característica importante de los materiales bioreabsorbible, como el PLA, debido a que su velocidad de degradación dependerá de la fracción cristalina [46, 9, 7].

El método de fabricación de los andamios (separación de fases inducido térmicamente y por no solvente, NTIPS) propicia la cristalización del polímero en dos etapas principalmente: durante la separación de fases y durante el temple. En la Figura 4.10 se muestra la gráfica del porcentaje cristalinidad en función del contenido de PLA para andamios sin biovidrio y con contenido de biovidrio del 5 y 10%; los andamios con un contenido de 15% de biovidrio no se consideraron debido a que no presentan la formación de poros definidos.

Los valores obtenidos se encuentran en el rango de 55 a 66% de cristalinidad; se puede observar que las muestras con biovidrio, para 13 y 18% de PLA, poseen un menor porcentaje de cristalinidad, que puede asociarse al incremento de viscosidad de la solución final de PLA-DCM-hexano por la adición del biovidrio, que acelera el proceso de separación de fases y no da lugar a un ordenamiento de las cadenas poliméricas [36, 46].

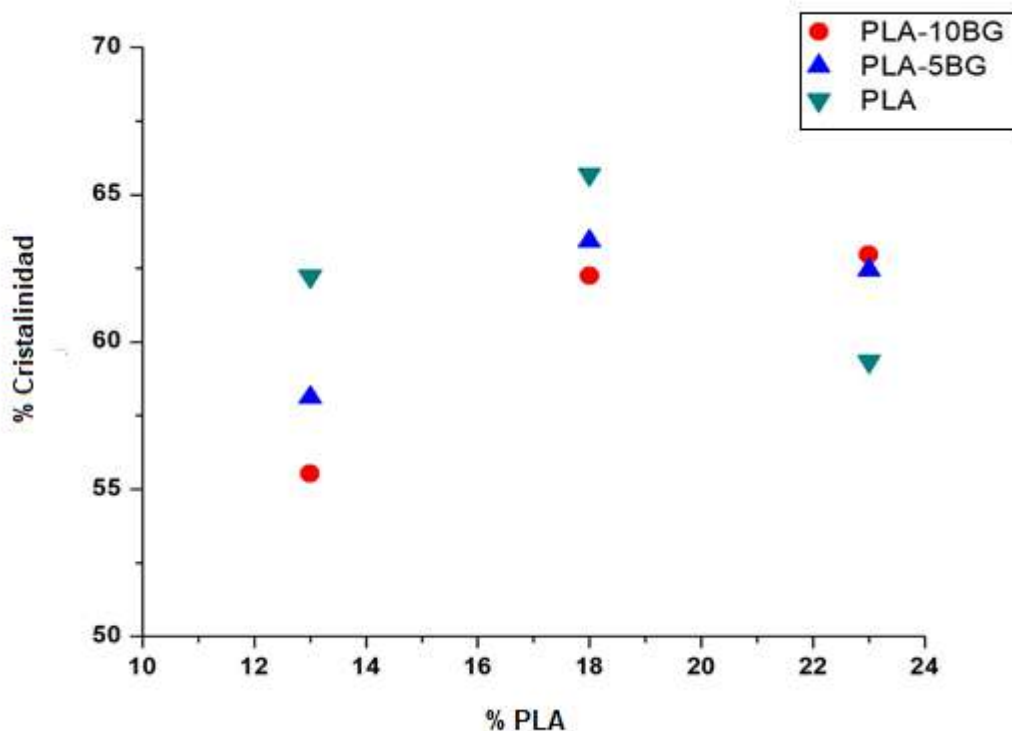


Figura 4.10 Porcentaje de cristalinidad en los andamios compuestos PLA/Bioglass 45S5.

La Figura 4.10 muestra también que los andamios de 13PLA/10BG son los que poseen el menor porcentaje de cristalinidad y los andamios de 18PLA presentan el mayor porcentaje de cristalinidad. Esto se puede asociar al tiempo de congelado, al estandarizar los tiempos de congelado, los andamios de mayor porcentaje de PLA (de mayor viscosidad) realizaron la separación de fases en menor tiempo y tuvieron un mayor tiempo de espera para el siguiente paso del proceso, lo que favoreció que el polímero pudiera cristalizar y formar cadenas más ordenadas; mientras que los andamios con menor contenido de PLA (13%) realizaron la separación de fases

más lentamente, pero normal según lo reportado, y el tiempo de permanencia después de la separación de fases fue más corto, lo que no afectó los valores de cristalinidad obtenidos [36,46]. Por otro lado, los andamios con 23% de PLA en sus diferentes concentraciones de Bioglass 45S5 presentaron un comportamiento opuesto a los andamios con otras concentraciones de PLA, es decir, los andamios con 10% de Bioglass tienen mayor porcentaje de cristalinidad y los que no tienen refuerzo tienen menor cristalinidad; esto es asociado por la velocidad de separación de fases y el tiempo de almacenado a -20°C de cada sistema.

4.2.4 *Ángulo de contacto*

Los valores obtenidos de los ángulos de contacto de los andamios, como se ilustra en la Figura 4.11, se evaluaron para determinar sus energías superficiales y estimar la forma en la que van a interactuar los andamios con los fluidos corporales.

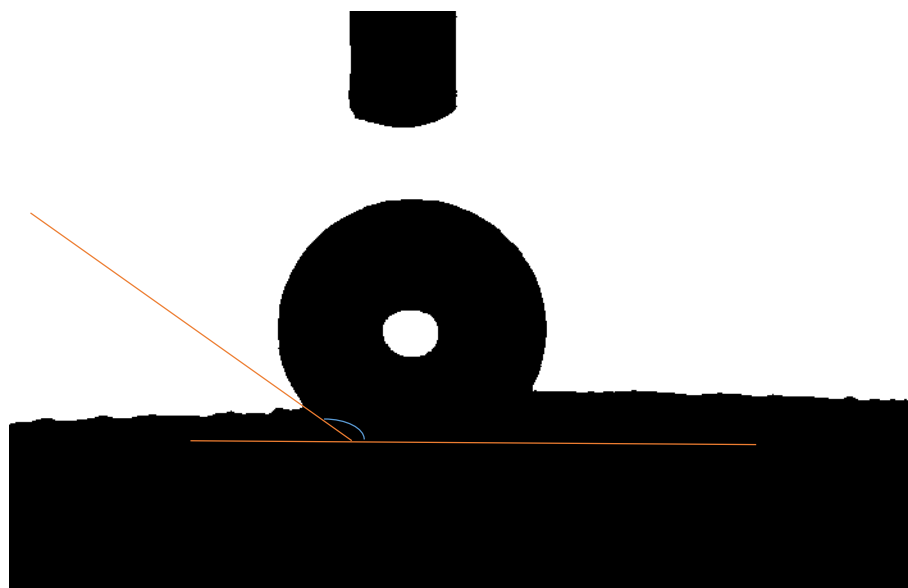


Figura 4.11 Evaluación del ángulo de contacto.

En la Figura 4.12(A) y (B) se muestran los valores obtenidos para dos diferentes líquidos, agua y formamida, respectivamente. En la Figura 4.12(A) se muestra que los andamios presentan ángulos de contacto muy grandes con agua, con un rango de $130-160^{\circ}$, lo que indica que su comportamiento

es hidrofóbico en todas las muestras, eso se asocia a que el ácido poliláctico tiene este comportamiento. En las micrografías obtenidas por MEB, se observa que las partículas de Bioglass 45S5 están distribuidas aleatoriamente, tanto en las paredes de los poros como en las uniones de estos, siendo un factor a considerar al evaluar el ángulo de contacto en los andamios; ya que el Bioglass presenta un comportamiento hidrofílico y pueda hacer que las mediciones varíen de manera significativa en diferentes zonas del andamio.

En la Figura 4.12(B) se muestran los resultados obtenidos para el ángulo de contacto con formamida, cuyo rango de valores es más grande debido a que el andamio 13PLA/5BG presentó un ángulo de contacto muy bajo de 63° en relación a las otras muestras con un rango de 105° a 140° .

Es necesario determinar el ángulo de contacto de los andamios con dos sustancias para poder utilizar el modelo matemático de Owens-Wendt-Kaeble [48]. En la Tabla 4.3 se muestran los valores promedios de energía superficial, energía dispersiva, energía polar, así como los valores promedios de los ángulos de contacto de cada muestra.

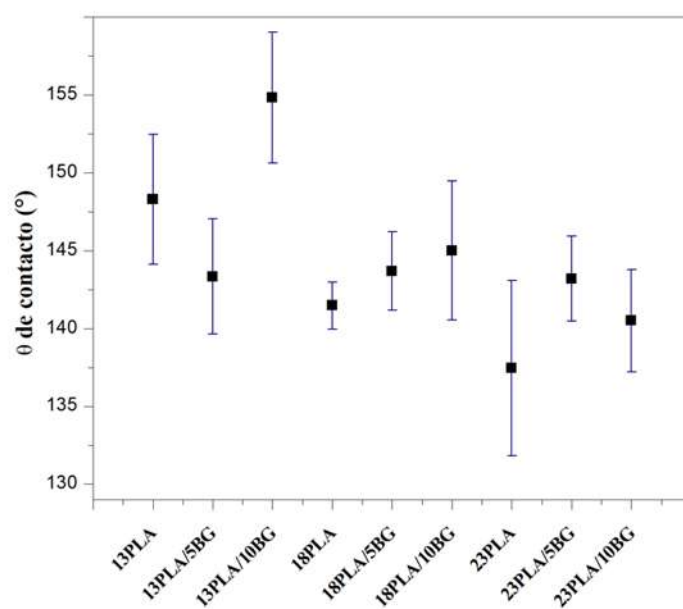
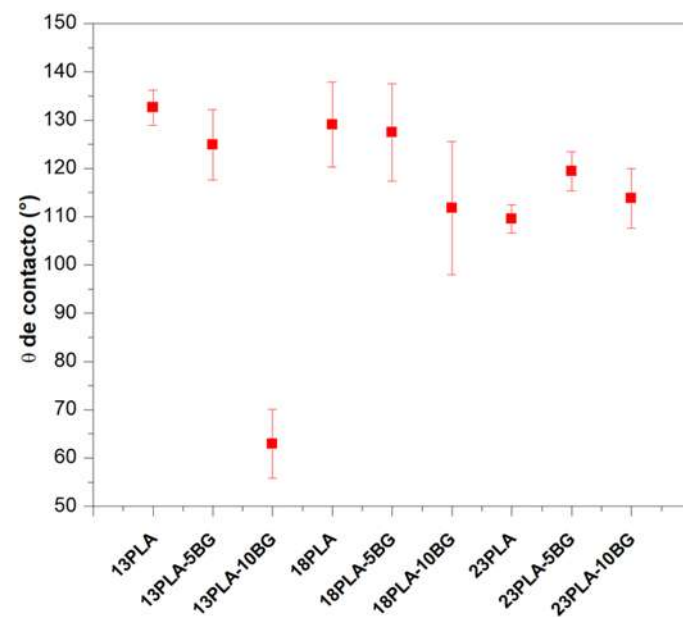
A**B**

Figura 4.12 Ángulos de contacto de andamios de PLA/BG con: A) agua y B) formamida. Muestras evaluadas para cada composición: 5.

Tabla 4.3 Valores obtenidos de energía superficial.

Muestra	Ángulo de contacto con agua (°)	Ángulo de contacto con formamida (°)	Energía superficial (nJ/cm ²)	Energía dispersiva (nJ/cm ²)	Energía polar (nJ/cm ²)
13PLA	148.3	132.6	4.044	3.0508	0.536
13PLA/5BG	143.34	124.88	8.032	6.898	1.148
13PLA/10BG	154.82	62.96	185.908	135.298	50.606
18PLA	141.48	129.1	4.474	4.11	0.364
18 PLA/5BG	143.68	127.5	9.42	7.76	1.662
18PLA/10BG	145	111.74	24.44	20.344	4.094
23PLA	137.46	109.56	17.074	15.38	1.694
23PLA/5BG	143.2	119.44	10.312	9.302	1.012
23PLA/10BG	140.5	113.84	14.782	13.248	1.534

Las muestras fabricadas con 13 y 18% de PLA presentan la tendencia de aumentar su energía superficial cuando el contenido de biovidrio aumenta; mientras que este patrón no se repite en las muestras con contenido de 23% de PLA, lo cual se asocia a la dificultad de evaluar el ángulo de contacto con la formamida en dichas muestras, ya que la gota era absorbida rápidamente después de colocarla en la superficie lo que hacía difícil su medición.

La muestra que presenta una mayor cantidad de energía superficial es la 13PLA/10BG con un valor de 185.90 nJ/cm² presenta una variación grande comparado con las otras energías superficiales calculadas, esto se asocia a errores en la medición de ángulo de contacto, tanto con agua como con formamida, se observa en la Tabla 4.3 los valores de ángulo de contacto del andamio 13PLA/10BG varían de la tendencia de las demás mediciones realizadas.

4.2.5 Microtomografía computarizada de Rayos X (μ CT)

Se evaluaron dos andamios por las técnicas de microtomografía computarizada de rayos X, debido a que presentaban tamaño de poros adecuado según los datos obtenidos por micrografías del microscopio electrónico de barrido, y la menor cristalinidad según análisis de DSC, para su uso en la restauración de tejido óseo. Las muestras analizadas fueron 13PLA y 13PLA/5BG.

En la Figura 4.13 (A)-(C) se observa la estructura interna del andamio fabricado con 13% de PLA en el sistema de PLA-DCM-hexano, según los valores obtenidos por el análisis de μ CT, éste presenta una porosidad del 53.63%, este valor de porosidad están en la media del rango permitido para reparación de hueso trabecular (30-90% de porosidad) y cumple todo el rango del hueso cortical (5-30% de porosidad) [54]. La Figura 4.13 presenta diferentes tamaños y orientaciones de poros dependiendo de la zona en la que fue tomada la imagen, esto es debido a la manera en la que se extrae el solvente y no solvente del andamio durante su fabricación.

El análisis de μ CT identifica la naturaleza de los poros (abiertos o cerrados), siendo que el andamio de 13PLA presenta mayoría de poros abiertos teniendo 53.42% y de poros cerrados un 0.021%. Este tipo de estructura beneficia una futura aplicación de los andamios, debido a que presenta porosidad abierta e interconectada que permitiría la vascularización y el crecimiento de nuevo tejido en el interior de éste.

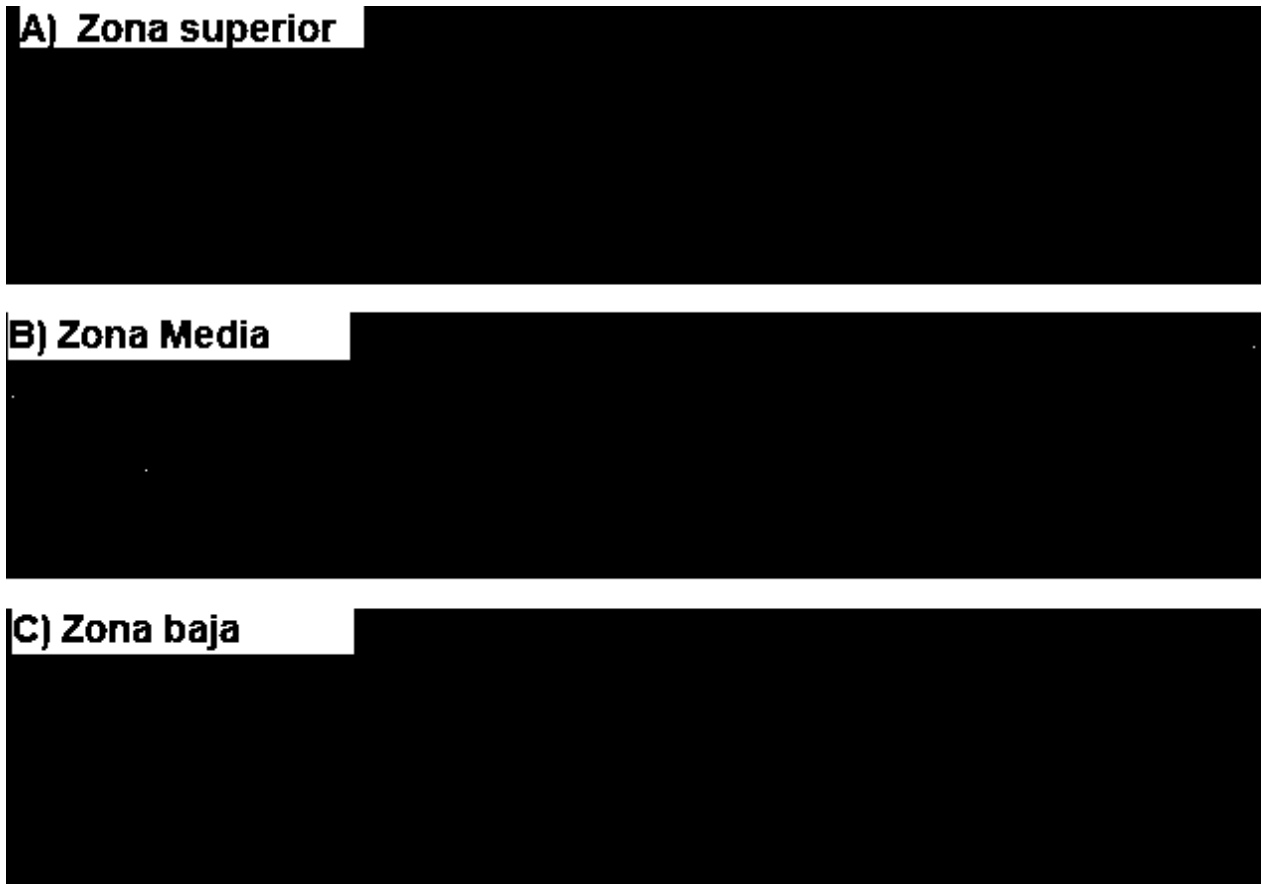


Figura 4.13 Estructura interna de andamio de 13PLA por μ CT.

El análisis de la porosidad realizado por μ CT reporta un rango muy amplio de distribución de tamaño de poros, esto se puede observar en la Figura 4.14. La distribución de los tamaños de poro muestra un comportamiento bimodal con tamaños de poros en un rango de 5 a 250 μm , mostrando que los poros de 60-65 μm son los que tienen mayor presencia, seguido por tamaños de poro del rango de 190-200 μm , ambos tamaños son importantes en el anclaje de las células para la regeneración de tejido óseo [13, 41].

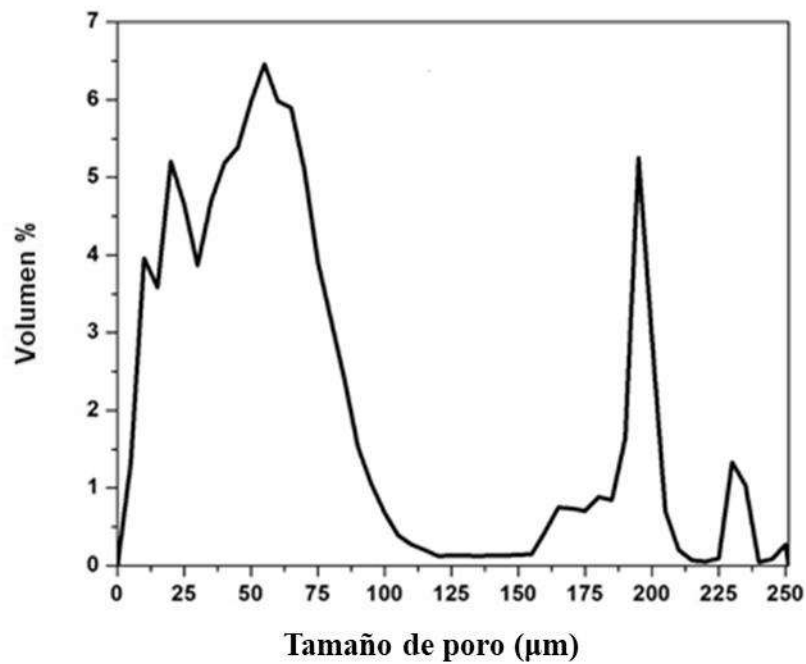


Figura 4.14 Distribución de tamaño de poros del andamio 13PLA.

En la Figura 4.15 se observa diferentes imágenes que muestran la estructura interna del andamio 13PLA/5BG, obtenidas por μ CT. La muestra presenta un amplio rango de tamaños de poro a través de las diferentes capas de su estructura interna. También se observa la presencia y distribución de las partículas de Bioglass dentro del andamio, captadas por el μ CT como puntos brillosos dentro de las imágenes, la cual es homogénea debido al tratamiento con ultrasonido que se le da al andamio durante la fabricación.

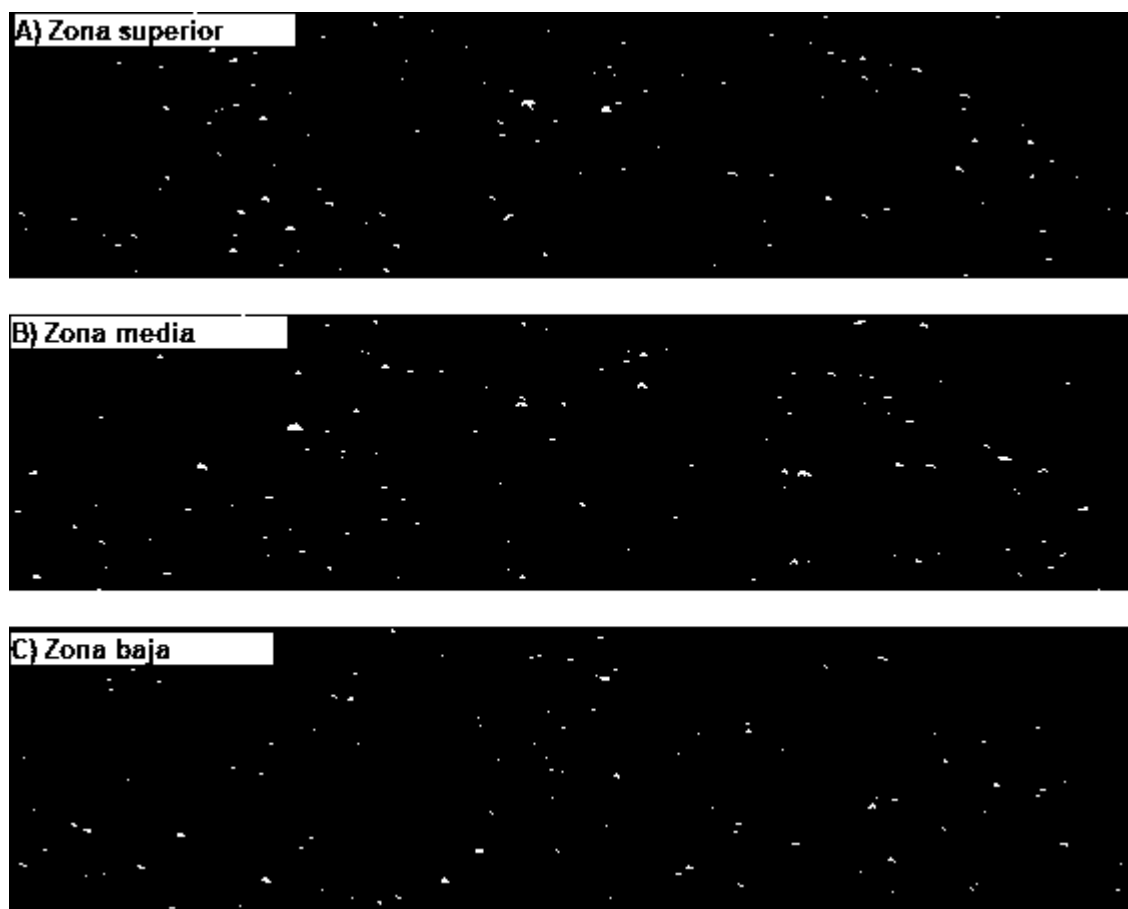


Figura 4.15 Imágenes de micro CT del andamio 13PLA/5BG.

El análisis de la porosidad para el andamio 13PLA/5BG presenta valores de 50.61%, este valor próximo al que se obtuvo para el andamio 13PLA, cumple con los rangos aceptables para la regeneración de tejido óseo. Se nota una ligera disminución de porosidad, con respecto al andamio sin partículas de biovidrio, ya que éste modifica la morfología y tamaños de poros en los andamios fabricados por separación de fases [13, 40, 41]. El análisis de poros muestra la presencia de poros abiertos representando el 50.57% de la porosidad del andamio y poros cerrados representando solo un 0.04% de la porosidad del andamio.

La distribución de tamaños de poro se observa en la Figura 4.16, el rango de tamaños de poros es de 1-100 μm , que en comparación al andamio sin refuerzo disminuye los tamaños a la mitad. La distribución también es bimodal presentando tamaños principales, el primero de 10-12 μm y el

segundo alrededor de 50 μm , que son tamaños aceptables para la regeneración de tejido óseo según lo reportado por algunos autores [6,19,22], y el tamaño obtenido para este andamio sigue dentro del rango reportado.

La estructura de poros abiertos combinado con los tamaños que presenta el andamio 13PLA/5BG son adecuados para el uso de dicho andamio para aplicaciones de restauración ósea, ya que permite la vascularización y el crecimiento de nuevo tejido.

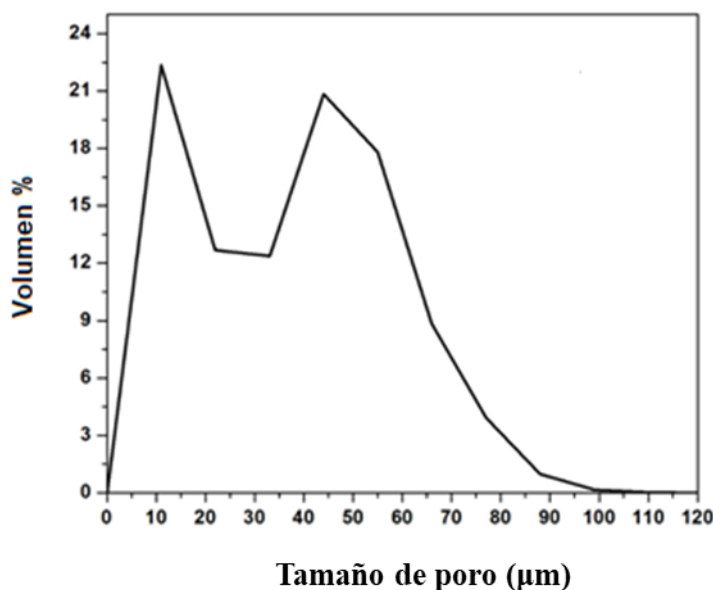


Figura 4.16 Distribución de tamaño de poro del andamio 13PLA/5BG.

Los valores obtenidos de porcentajes de porosidad por μCT son menores a los obtenidos por densidad aparente de los andamios, esto se asocia a que la resolución de los análisis por μCT solo alcanzan ciertos tamaños de poro e ignora algunas porosidades localizadas en las paredes de poros más grandes, como los observados por MEB.

4.2.6 Ensayos *in vitro*

Los ensayos *in vitros* fueron realizados en los andamios de 13, 18 y 23 % PLA, así como los sistemas con 5 y 10% de refuerzo. El análisis de la DO obtenida del ensayo fue realizado en el

programa Prisma, para comparar los resultados obtenidos y analizar si existe una diferencia representativa en los % de viabilidad.

Para realizar el ensayo se ocuparon diferentes platos de cultivo por lo que en cada uno se colocaron dos sistemas y un control, esto para asegurar que no hubiera variación entre el control y los sistemas de diferentes platos de cultivo. En la Figura 4.17 se muestra una gráfica comparativa de los porcentajes de viabilidad obtenidos por el ensayo MTT, así como una clasificación comparativa con las muestras control (sin andamio).

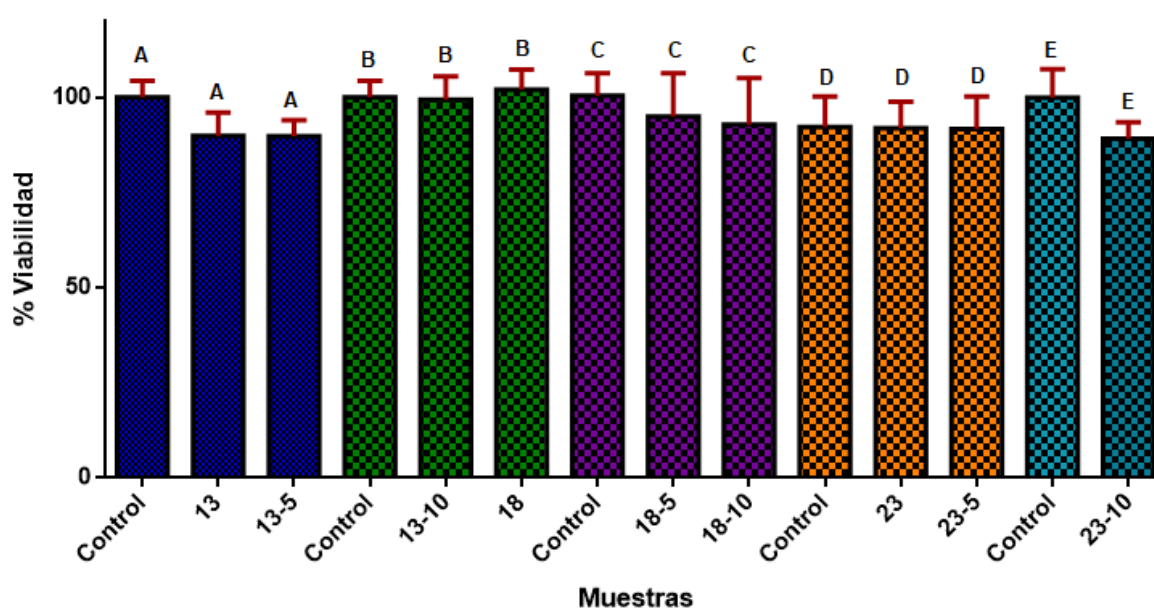


Figura 4.17 Resultados de porcentajes de viabilidad obtenidos por ensayo MTT de andamios compuestos de PLA/Bioglass 45S5 en contacto con células osteoblastos (MG-63).

Cada uno de los andamios presentó un comportamiento neutral al estar en contacto con los osteoblastos cultivados y esto fue comprobado ya que el análisis estadístico realizado por el programa Prisma no encontró una variación significativa con el control correspondiente a cada sistema. Los andamios de PLA/Bioglass 45S5 fabricados por el método de separación de fases no causan daño a las células de osteoblastos, permitiendo su proliferación en condiciones estándares de cultivo.

CAPÍTULO 5 CONCLUSIONES

Se fabricaron andamios tridimensionales, porosos e interconectados de ácido poliláctico con y sin refuerzo de Bioglass 45S5 por la técnica de separación de fases inducido térmicamente y por no solvente; utilizando el sistema PLA-DCM-Hexano a -20°C, se obtuvieron andamios con 5, 10 y 15% de refuerzo. Los andamios presentaron tamaños de poros en el rango de 1 a 250 μm ; a medida que se aumentó la cantidad de refuerzo, la morfología de los andamios se modificó, obteniendo poros de menor tamaño. Los andamios con 15% de refuerzo de biovidrio o mayor a éste forman poros muy pequeños o no lo hacen. Todos los andamios presentaron porcentajes de cristalinidad en el rango de 55 a 67%, este valor depende del porcentaje de la cantidad de solvente y no solvente utilizada, y se ve influenciado por la cantidad de vidrio empleado además del tiempo de permanencia a -20°C. Los andamios presentaron un comportamiento hidrofóbico con valores de ángulo de contacto por arriba de los 120°; además presentaron energías superficiales muy bajas a excepción del andamio 13PLA/5BG. Los sistemas de 13, 18, 23% de PLA con 0, 5 y 10% de Bioglass presentaron un rango de porosidad interconectada de 72 a 89%, los andamios estudiados por μCT mostraron poros abiertos e interconectados. Los ensayos *in vitro* realizados comprueban que los andamios no causan un daño a la proliferación celular, por lo que su uso en aplicaciones biológicas es factible.

RECOMENDACIONES Y TRABAJO A FUTURO

Según lo reportado de los andamios de PLA/BG en sus diferentes composiciones fabricadas en este trabajo, convendría analizar posibles recubrimientos de hidroxiapatita o algún modificador de superficie para aumentar la energía superficial y que la adhesión celular se vea incrementada y pueda darse de mejor manera la restauración ósea. Se deben hacer pruebas con más líneas celulares que intervengan en la formación de hueso nuevo para dar paso a ensayos *in vivo*.

Por parte de la fabricación de andamios se debe probar diferentes solventes y no solventes para el PLA, buscando reducir posibles agentes contaminantes que perjudiquen la proliferación celular; ya que el uso de DCM y Hexano pueden disminuir la eficiencia del andamio si no son removidos de manera correcta.

Durante el proceso de fabricación valdría la pena evaluar la influencia del enfriamiento de la solución de PLA-solvente-no solvente a temperaturas más bajas y en tiempos más cortos con la ayuda de un liofilizador, para determinar la influencia de esto en la microestructura de los poros así como en la porosidad del andamio.

Por último se recomienda agregar algún elemento extra en la composición del Bioglass, buscando una mejora en futuras aplicaciones tales como la plata cuyo uso como antibacterial, o elementos como el titanio con sus excelentes propiedades de biocompatibilidad y excelentes propiedades ante la corrosión que beneficiarían la colocación y estadía del andamio dentro del cuerpo.

REFERENCIAS

- [1] Bover J., Ureña-Torres P., Torregrosa J.-V., Rodríguez-García M., Castro-Alonso C., Górriz J. L., Laiz Alonso A. M., Cigarrán S., Benito S., López-Báez V., Lloret Cora M. J., daSilva I. and Cannata-Andía J. *Osteoporosis, densidad mineral ósea y complejo CKD-MBD (I): consideraciones diagnósticas*. **Nefrología**. 38(5), 476-490, 2018.
- [2] Burge R., Dawson-Hughes B., Solomon D. H., Wong J. B., King A. and Tosteson A. *Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025*. **Journal of Bone and Mineral Research** 22(3), 465-475, 2007.
- [3] Pérez Rojas J. M. and Maroto Fernandez K. E. *Osteoporosis Primaria: Estratificación del Riesgo de Fractura en la Atención Primaria*. **Medicina Legal de Costa Rica**. 35(84-93), 2018.
- [4] Barón Zárate Kalfópulos A. R. S. *Injertos óseos en cirugía ortopédica*. **Cirugía y Cirujanos**. 74(3), 217 - 222, 2006.
- [5] Detsch R. and Boccaccini A. R. *The role of osteoclasts in bone tissue engineering*. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. 9(10), 1133-1149, 2015.
- [6] Sabino M., M L., Dernowsek J., Rezende R. and Silva J. *Techniques for manufacturing polymer scaffolds with potential applications in tissue engineering*. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**. 37(2), 1-27, 2017.
- [7] Schugens C., Maquet V., Grandfils C., Jerome R. and Teyssie P. *Biodegradable and macroporous polylactide implants for cell transplantation: 1. Preparation of macroporous polylactide supports by solid-liquid phase separation*. **Polymer**. 37(6), 1027-1038, 1996.
- [8] Nokhasteh S., Sadeghi-avalshahr A., Molavi A. M., Khorsand-Ghayeni M. and Naderi-Meshkin H. *Effect of bioactive glass nanoparticles on biological properties of PLGA/collagen scaffold*. **Progress in Biomaterials**. 7(2), 111-119, 2018.
- [9] Armentano I., Dottori M., Fortunati E., Mattioli S. and Kenny J. M. *Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review*. **Polymer Degradation and Stability**. 95(11), 2126-2146, 2010.
- [10] Mi H.-Y., Jing X., Salick M. R., Cordie T. M., Peng X.-F. and Turng L.-S. *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.
- [11] Hench L. L. *The story of Bioglass*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 17(11), 967-978, 2006.
- [12] Rezabeigi E., Wood-Adams P. M. and Drew R. A. L. *Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process*. **Materials Science and Engineering: C**. 40(248-252), 2014.
- [13] Blaker J. J., Gough J. E., Maquet V., Notingher I. and Boccaccini A. R. *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**. 67(4), 1401-1411, 2003.
- [14] Wang W. and Yeung K. W. K. *Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review*. **Bioactive Materials**. 2(4), 224-247, 2017.
- [15] Nair A. K., Gautieri A., Chang S.-W. and Buehler M. J. *Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone*. **Nature Communications**. 4(1724), 1-9, 2013.
- [16] Monzón Trujillo D., Martínez Brito I., Rodríguez Sarduy R., Piña Rodríguez J. J. and Pérez Mír E. A. *Injertos óseos en implantología oral*. **Revista Médica Electrónica**. 36(449-461), 2014.
- [17] Hutmacher D. W. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. **Biomaterials**. 21(24), 175-189, 2000.
- [18] Vert M., Li S. M., Spenlehauer G. and Guerin P. *Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters*. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. 3(6), 432-446, 1992.
- [19] Yang S., Leong K. F., Du Z. and Chua C. K. *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors*. **Tissue Engineering**. 7(6), 679-689, 2001.
- [20] Badylak S. F., Freytes D. O. and Gilbert T. W. *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. **Acta Biomaterialia**. 5(1), 1-13, 2009.
- [21] Zhao P., Gu H., Mi H., Rao C., Fu J. and Turng L.-s. *Fabrication of scaffolds in tissue engineering: A review*. **Frontiers of Mechanical Engineering**. 13(1), 107-119, 2018.
- [22] Alaribe Franca N., Manoto Sello L. and Motaung Shirley C. K. M. *Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering*. **Biologia**. 71(4), 353, 2016.
- [23] Norman J. J. and Desai T. A. *Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds*. **Annals of Biomedical Engineering**. 34(1), 89-101, 2006.
- [24] Stevens M. M. *Biomaterials for bone tissue engineering*. **Materials Today**. 11(5), 18-25, 2008.
- [25] El-Ghannam A. *Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering*. **Expert Review of Medical Devices**. 2(1), 87-101, 2005.
- [26] Schwartz A. V. *Marrow Fat and Bone: Review of Clinical Findings*. **Frontiers in Endocrinology**. 6(40), 2015.
- [27] Fernández-Tresguerres Hernández-Gil I., Alobera Gracia M. A., Canto Pingarrón M. d. and Blanco Jerez L. *Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo*. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal (Internet)**. 11(47-51), 2006.
- [28] Orgaz F. R. J., Capel F. *Materiales biocerámicos y biovidrios*. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio**. 26(1), 13-19, 1987.
- [29] Chen Q. Z., Thompson I. D. and Boccaccini A. R. *45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 27(11), 2414-2425, 2006.

- [30] Aguiar H. S., Julia & González, Pío. *Los vidrios bioactivos en el mundo de los biomateriales*. **Anales de Química**. 107(3), 2011.
- [31] Delgado A. M. C. y. A. L. *Revisión del comportamiento biocompatible de biovidrio como material promisorio en la industria biomédica*. **Informador Técnico**. 79(2), 179 - 187, 2015.
- [32] Climent-Montouli F. *BIOMATERIALES I. Clasificación de materiales*. **Revista de la Reial Academia de Medicina de Catalunya**. 8(3), 139 - 151, 2006.
- [33] Middleton J. C. and Tipton A. J. *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. **Biomaterials**. 21(23), 2335-2346, 2000.
- [34] Avérous L. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. M. N. Belgacem and A. Gandini. Amsterdam. Elsevier. 433-450. 2008.
- [35] Wang H., Li Y., Zuo Y., Li J., Ma S. and Cheng L. *Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering*. **Biomaterials**. 28(22), 3338-3348, 2007.
- [36] Rezabeigi E., Wood-Adams P. M. and Drew R. A. L. *Production of porous polylactic acid monoliths via nonsolvent induced phase separation*. **Polymer**. 55(26), 6743-6753, 2014.
- [37] Rezabeigi E., Wood-Adams P. M. and Drew R. A. L. *Isothermal ternary phase diagram of the polylactic acid-dichloromethane-hexane system*. **Polymer**. 55(14), 3100-3106, 2014.
- [38] Chen J.-S., Tu S.-L. and 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.
- [39] Hong Z., Reis R. L. and Mano J. F. *Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(l-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles*. **Acta Biomater**. 4(5), 1297-1306, 2008.
- [40] Blaker J. J., Maquet V., Jérôme R., Boccaccini A. R. and Nazhat S. N. *Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass® composite foams as scaffolds for bone tissue engineering*. **Acta Biomaterialia**. 1(6), 643-652, 2005.
- [41] Conoscenti G., Carfi Pavia F., Ciraldo F. E., Liverani L., Brucato V., La Carrubba V. and Boccaccini A. R. *In vitro degradation and bioactivity of composite poly-l-lactic (PLLA)/bioactive glass (BG) scaffolds: comparison of 45S5 and 1393BG compositions*. **Journal of Materials Science**. 53(4), 2362-2374, 2018.
- [42] Kokubo T. and Takadama H. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* **Biomaterials**. 27(15), 2907-2915, 2006.
- [43] Yoo Y.-W., Park G. J. and Lee W. K. *Surface modification of coralline scaffold for the improvement of biocompatibility and bioactivity of osteoblast*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. 33(1), pp. 33-41, 2016.
- [44] Santos-Cruz J., Nunez-Anita R. E., Mayen-Hernandez S. A., Martinez-Alvarez O., Acosta-Torres L. S., de la Fuente-Hernandez J., Campos-Gonzalez E., Vega-Gonzalez M. and Arenas-Arrocena M. C. *Colloidal synthesis of biocompatible iron disulphide nanocrystals*. **Artificial Cells Nanomedicine Biotechnology**. 46(5), 1034-1041, 2018.

- [45] Acosta-Torres L. S., Mendieta I., Nunez-Anita R. E., Cajero-Juarez M. and Castano V. M. *Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures*. **International Journal Nanomedicine**. 7(4777-4786, 2012.
- [46] Rezabeigi E., Wood-Adams P. M. and Drew R. A. L. *Morphological examination of highly porous polylactic acid/Bioglass((R)) scaffolds produced via nonsolvent induced phase separation*. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**. 105(8), 2433-2442, 2017.
- [47] Lúa Gómez N. J. 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. Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales, Instituto de Investigaciones Metalúrgicas y Materiales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, Michoacán, México. 2017.
- [48] Gomez D., Muñoz A., Gonzalez J. and Sequeda F. *Estudio de la energía superficial y hemocompatibilidad del Ti y TiN sintetizados por Magnetron Sputtering para aplicaciones médicas*. **Scientia et technica**. 20(2), pp. 97 - 104, 2015.
- [49] Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. **Journal Immunological Methods**. 65(1-2), 55-63, 1983.
- [50] Denizot F. and Lang R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. **J Immunol Methods**. 89(2), 271-277, 1986.
- [51] Lefebvre L., Chevalier J., Gremillard L., Zenati R., Thollet G., Bernache-Assolant D. and Govin A. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments*. **Acta Materialia**. 55(10), 3305-3313, 2007.
- [52] Durgalakshmi D., Subhathirai S. P. and Balakumar S. *Nano-bioglass: A Versatile Antidote for Bone Tissue Engineering Problems*. **Procedia Engineering**. 92(2-8, 2014.
- [53] Sepulveda P., Jones J. R. and Hench L. L. *Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses*. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**. 58(6), 734-740, 2001.
- [54] A. Lalegname D. S., G. Etse. *Análisis micromecánico de huesos*. **Mécanica Computacional**. 21(1), pp. 2530-2538, 2002.