



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE LOS MATERIALES

**MATERIALES NANOESTRUCTURADOS
EN BASE A FOSFATOS DE CALCIO:
HACIA LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

D'Elía Noelia Laura

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2016

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Materiales, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Química del Sur (INQUISUR) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2012 y el 28 de Septiembre de 2016 bajo la dirección de la Dra. Paula Verónica Messina, Profesora Adjunta de la Universidad del Sur e Investigadora Independiente de CONICET.

Noelia Laura D'Elía



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

Llegar a esta instancia fue gracias al apoyo de muchas personas a nivel académico y personal, a cada uno de ellos les quiero dedicar mi más sentido agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer el apoyo de los miembros de las instituciones en donde se llevó a cabo este trabajo de investigación, el Departamento de Química de la Universidad del Sur y el Instituto de Química del Sur – CONICET. Además, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca interna doctoral.

Especialmente estoy agradecida de mi directora Paula Messina, por su guía y por contagiar siempre las ganas de seguir adelante, siempre con ideas novedosas. Gracias por confiar en mí y dejarme formar parte de este proyecto.

Merecen mi especial agradecimiento mis compañeros, Noel y Javier, por todas todos los momentos compartidos desde el principio, por su amistad y compañerismo. Gracias por volver grato y enriquecedor cada momento volviéndonos un gran equipo. También a mis compañeros Nancy y Lucho por las charlas, consejos y palabras de aliento.

Me gustaría reconocer también a los investigadores que colaboraron en la realización de este trabajo, Dra. Graciela Santillán, Bqco. Juan Laiuppa, Dra. Caroline Hoemann, Ing. Colleen Matheu y a el Dr. José Marco-Brown, a todos ellos agradezco su contribución, compromiso y profesionalismo aportado en cada uno de los desafíos propuestos.

Quisiera dedicar este trabajo a las personas más importantes e influyentes en mi vida, mi familia, a Fran y a mis amigos por acompañarme en este proceso de cambio y crecimiento brindando su apoyo, amor y cariño incondicional.

Resumen

El hueso es un tejido mineralizado formado por una matriz compleja en sus diferentes niveles jerárquicos que van desde la macro a la nanoescala. La biomineralización ósea ocurre mediante un proceso que involucra la formación y el control morfológico de cristales inorgánicos de apatita biológica mediante sistemas autoensamblados de moléculas que actúan como nanoreactores; éstos ejercen un control exquisito sobre la nucleación, crecimiento y modelado de los minerales. El entendimiento de estos procesos biológicos ha servido como fuente de inspiración para la obtención de biomateriales sintéticos.

La hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) sintética, es un material comúnmente utilizado en ingeniería de biomateriales por sus propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas, que le proporcionan una buena biocompatibilidad, excelente habilidad para formar enlaces químicos con el tejido óseo y apropiada osteoconductividad. Actualmente, uno de los desafíos de la ingeniería de tejido óseo consiste en el diseño de una matriz capaz de imitar las propiedades del hueso a modo de proporcionar un reemplazo temporal del tejido lesionado, y a su vez con una velocidad de biodegradación adecuada que permita la reparación y regeneración del tejido.

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas previamente, los objetivos planteados para este trabajo de investigación fueron (i) obtener HA nanocristalina a partir de la precipitación organizada de los cristales en sistemas autoagregados formados por el anfifilo CTAB y distintos polímeros como agentes directores de estructura y (ii) evaluar el potencial efecto reparador del tejido óseo de los materiales obtenidos.

Se utilizaron plantillas CTAB/polímero diferentes para obtener cuatro materiales que presentaron una composición química análoga a la apatita biológica presente en el hueso, pero con características topográficas diversas influenciadas por las interacciones específicas entre los sistemas híbridos CTAB/polímero y las sales inorgánicas en solución.

Para analizar el comportamiento de los materiales en un entorno biológico fueron inmersos en diferentes soluciones fisiológicas simuladas para probar sus propiedades de biodegradación, bioactividad y adsorción de albúmina. La biocompatibilidad *in vitro* de los mismos se comprobó utilizando osteoblastos y células madre mesenquimales (MSC). En

estos ensayos se analizaron los siguientes aspectos: (i) viabilidad y diferenciación de osteoblastos; (ii) adhesión de MSC en cubiertas de HA y (iii) adhesión, integridad del citoesqueleto y genotoxicidad de MSC en cubiertas híbridas biomiméticas HA / colágeno tipo I. Finalmente, se estudió la influencia de las nanopartículas en la coagulación.

Los resultados de este trabajo demostraron que es posible controlar las características fisicoquímicas y la rugosidad de los materiales utilizando diferentes sistemas como directores de estructura, las cuales tienen una gran influencia en las respuestas generadas en un entorno biológico simulado. Además, se ha logrado obtener con éxito un material de HA que induce respuestas favorables en los ensayos de bioactividad, biocompatibilidad *in vitro* y en la activación de la coagulación, todos ellos indicadores indirectos de su potencial efecto osteoinductor *in vivo*. La información generada resalta la influencia de las características superficiales de los biomateriales para determinar su potencial uso en regeneración de tejido y su futura aplicación como parte de andamios en ingeniería de tejido óseo.

Abstract

Bone is a mineralized tissue composed by a complex matrix arranged in different hierarchical levels of organization going from macro- to nanoscales. Bone tissue biomineralization involves a control and formation of inorganic crystals of biological apatite by self-assembled systems of molecules that act as nano-reactors controlling nucleation and growth of minerals. Understanding from biological process has led to important advances in the manufacture of synthetic biomaterials.

Synthetic hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$), is a material commonly used in biomaterial engineering due to its unique physicochemical and biological properties such as good biocompatibility, excellent ability to form chemical bonds with bone tissue and appropriate osteoconductivity. Nowadays, one of the challenges of bone tissue engineering consists of designing a bioactive matrix capable of mimicking the natural properties of bone while providing a temporary replacement for the injured tissue with a suitable biodegradation rate, and thus sustaining tissue repair and regeneration.

Therefore, the objectives for this thesis were (i) to obtain nanocrystalline HA using inorganic crystal precipitation in self-assembled systems of CTAB and polymers as structure directing agents and, (ii) to evaluate the potential bone tissue regenerative effect of HA nanomaterials.

During the synthesis, templates of four CTAB / polymer systems were used in order to obtain materials with similar chemical composition of biological apatite, but with different topographies generated by each micelle/polymer system and inorganic minerals hybrid interaction.

Firstly, materials were immersed in different simulated fluids to test their properties: biodegradation, bioactivity and albumin adsorption. The materials' biocompatibility was tested in the presence of both, osteoblasts and mesenchymal stem cells (MSC). The following assays were performed: (i) immature osteoblasts' viability and differentiation, (ii) MSCs' adhesion onto nano-HA materials coatings, and (iii) MSCs' adhesion, cytoskeletal integrity and genotoxicity onto HA/collagen type I coating. Finally, the influence in coagulation process by HA nanoparticles was studied.

The results obtained in this research have showed that it is possible to control the physicochemical and roughness characteristics of the materials by using different structural systems directors, which have dissimilar responses in simulated biological environments. Additionally, we successfully synthesized a HA material that induce favorable responses in bioactivity, biocompatibility and coagulation *in vitro* assays; suggesting its *in vivo* osteoinductive potential. These results highlight the influence of material's surface characteristics to determine their tissue regeneration potential to be applied for engineering osteogenic scaffolds.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director

Índice de contenidos

Prefacio.....	I
Agradecimientos.....	II
Resumen.....	III
Abstract.....	VI
Índice de contenidos.....	VII
Lista de abreviaturas y símbolos.....	XII
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1. Organización jerárquica del hueso	1
1.1.1. Composición y características de la nanoarquitectura ósea.....	2
1.1.2. Formación de la nanoarquitectura ósea: proceso de biomineralización.....	5
1.2. Clasificación de los biomateriales según sus propiedades.....	6
1.3. Requerimientos de un implante óseo de última generación.....	7
1.3.1. Fenómenos biológicos en la interfase biomaterial – hueso.....	7
1.3.2. Influencia de las características superficiales: hidrofili­cidad y nanorugosidad.....	8
1.4. Hidroxiapatita nanoestructurada aplicada a regeneración de tejido óseo	10
1.4.1. Obtención de nanopartículas de HA mediante la utilización de agregados micelares.....	11
1.4.2. Técnicas para la caracterización fisicoquímica de nanopartículas.....	13
3.5. Referencias bibliográficas.....	15
Capítulo 2: Objetivos generales y específicos.....	22
Capítulo 3: Síntesis y caracterización de HA nanoestructurada.....	23
3.1. Introducción.....	23
3.1.1. Síntesis de nanopartículas de HA utilizando estructuras autoensambladas de CTAB.....	23
3.1.2. Obtención de superestructuras utilizando polímeros como directores de estructura.....	24
3.1.3. Estudio de la topografía de superficies.....	26

3.2	Métodos experimentales.....	28
3.2.1	Reactivos.....	28
3.2.2	Síntesis de materiales de HA: MI, MII, MIII y MIV.....	28
3.2.3	Técnicas de caracterización.....	29
3.2.3.1	Microscopía electrónica de barrido y cálculo de los parámetros de rugosidad.....	29
3.2.3.2	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X.....	33
3.2.3.3	Microscopía electrónica de transmisión.....	33
3.2.3.4	Difracción de rayos X en polvo.....	33
3.2.3.5	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier...	34
3.2.3.6	Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano...	34
3.2.3.6	Potencial Zeta (ζ).....	35
3.2.4	Análisis estadístico de los datos.....	35
3.3	Resultados y discusión.....	36
3.3.1	Optimización de las condiciones de síntesis.....	36
3.3.2	Caracterización fisicoquímica de nanomateriales de HA.....	39
3.3.3	Nucleación y crecimiento de los cristales de HA.....	43
3.3.4	Sistemas de plantillas CTAB – polímeros.....	44
3.3.5	Análisis de la rugosidad.....	45
3.3.6	Carga superficial.....	47
3.3.7	Afinidad por el agua.....	48
3.4	Conclusión.....	49
3.1	Referencias bibliográficas.....	50
	Capítulo 4: Biodegradación <i>in vitro</i>.....	57
4.1.	Introducción.....	57
4.2.	Métodos experimentales.....	59
4.2.1.	Reactivos.....	59
4.2.2.	Ensayo de biodegradación.....	60
4.3.	Resultados y discusión.....	60
4.3.1.	Mecanismo propuesto para la biodegradación <i>in vitro</i>	63
4.4.	Conclusión.....	65
4.5.	Referencia bibliográficas.....	66
	Capítulo 5: Bioactividad <i>in vitro</i>.....	68

5.1	Introducción.....	68
5.2	Métodos experimentales.....	70
5.2.1	Reactivos.....	70
5.2.2	Ensayo de bioactividad.....	71
5.2.3	Microscopía electrónica de barrido, cálculo de los parámetros de rugosidad y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X	71
5.3	Resultados y discusión.....	72
5.3.1	Caracterización de las cubiertas	72
5.3.2	Cinética de crecimiento de las cubiertas.....	76
5.3.3	Influencia de las características superficiales de los materiales en la nucleación y crecimiento de las cubiertas.....	79
5.3.4	Análisis termodinámico de la deposición de las cubiertas.....	81
5.4	Conclusión.....	82
5.5	Revisión bibliográfica.....	82
Capítulo 6: Adsorción de la proteína BSA e influencia en la bioactividad <i>in vitro</i>.		86
6.1	Introducción.....	86
6.2	Métodos experimentales.....	88
6.2.1	Reactivos.....	88
6.2.2	Obtención de la superficie específica y porosimetría de MI.....	89
6.2.3	Isoterma de adsorción de BSA.....	89
6.2.4	Ensayo de bioactividad en presencia de BSA.....	90
6.2.5	Microscopía electrónica de barrido, cálculo de los parámetros de rugosidad y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X	90
6.3	Resultados y discusión.....	91
6.3.1	Superficie, volumen y tamaño de poro del material MI.....	91
6.3.2	Adsorción de BSA sobre la HA MI	91
6.3.3	Influencia de la adsorción de BSA en la bioactividad <i>in vitro</i>	96
6.3.3.1	Mecanismo propuesto para la inhibición de los depósitos generado por la BSA.....	98
6.4	Conclusión.....	100
6.5	Referencias bibliográficas.....	101
Capítulo 7: Biocompatibilidad en osteoblastos.....		105
7.1.	Introducción.....	105

7.2.	Métodos experimentales.....	107
7.2.1	Reactivos.....	107
7.2.2.	Aislamiento y cultivo de los osteoblastos de calvaria de rata.....	107
7.2.3.	Tratamientos de osteoblastos de calvaria de rata.....	108
7.2.4.	Ensayo de viabilidad.....	108
7.2.5.	Estudio de la morfología celular.....	109
7.2.6.	Cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina.....	109
7.2.7.	Análisis estadístico de los datos.....	110
7.3.	Resultados y discusión.....	110
7.3.1.	Viabilidad y morfología de osteoblastos.....	110
7.3.2.	Diferenciación de osteoblastos: influencia de la degradación y la topografía de los materiales.....	111
7.4.	Conclusión.....	115
7.5.	Referencias bibliográficas.....	115
Capítulo 8: Biocompatibilidad de MSC sobre cubiertas biomiméticas.....		118
8.1	Introducción.....	118
8.2	Métodos experimentales.....	120
8.2.1	Reactivos.....	120
8.2.2	Aislamiento de células madre mesenquimales (MSC) de conejo	121
8.2.3	Ensayos de adhesión de MSC de conejo.....	121
8.2.3.1	Ensayo de viabilidad y proliferación de MSC sobre cubiertas de HA.....	121
8.2.3.2	Ensayo de viabilidad de MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas HA MI/Co.....	123
8.2.3.3	Expresión de la proteína α -SMA en MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas HA MI/Co I.....	123
8.2.3.4	Estudio de genotoxicidad en MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas de HA MI/Co I.....	125
8.2.4	Análisis estadístico de los datos.....	125
8.3	Resultados y discusión.....	126
8.3.1	Adhesión de MCS sobre cubiertas de HA: Ensayo de viabilidad y proliferación.....	126
8.3.2	Adhesión de MCS sobre cubiertas biomiméticas: HA MI/Co I..	128

8.3.2.1	Ensayo de viabilidad e integridad del citoesqueleto.....	128
8.3.2.3	Estudio de genotoxicidad.....	130
8.4	Conclusión.....	133
8.5	Referencias bibliográficas.....	133
Capítulo 9: Influencia en el proceso de coagulación.....		137
9.1	Introducción.....	137
9.2	Métodos experimentales.....	139
9.2.1	Reactivos.....	140
9.2.2	Ensayos de tromboelastografía.....	142
9.2.3	Análisis estadístico de los datos.....	142
9.3	Resultados y discusión.....	142
9.3.1	Mecanismo propuesto para la activación de la coagulación inducido por la HA.....	146
9.4	Conclusión.....	147
9.5	Referencias bibliográficas.....	148
Capítulo 10: Conclusiones generales y perspectivas a futuro.....		150
Capítulo 11: Producción científica.....		154

Lista de abreviaturas y símbolos

BJH	Modelo de Barrett-Joyner-Halenda para el análisis de porosimetría.
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Albúmina sérica bovina Fracción V.
BSE	<i>Back-scattered electrons</i> , Electrones retrodispersados.
C	Control.
C+	Control positivo.
Ca-P	Fosfatos de calcio.
CMC	Concentración micelar crítica.
Co I	Colágeno tipo I.
Col.	Colaboradores
DE	Desvío estandar.
CPP	<i>Critical Packing Parameter</i> , Parámetro de empaquetamiento crítico.
CTAB	<i>Cetyl trimethylammonium bromide</i> , Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
D_f	Dimensión fractal.
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i> , Medio Eagle modificado por Dulbecco y nutrientes F12.
DRX	Difracción de rayos X.
EDX	Energía dispersiva de rayos X.
FAL	Enzima fosfatasa alcalina.
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Suero fetal bovino.
FT-IR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> , Espectroscopia de luz infrarroja por transformada de Fourier.
Gla	Ácido glutámico gamma carboxilado.
HA	Hidroxiapatita.
HHBW	<i>High Hydrogen Bonded Water</i> , Agua asociada con alta cantidad de hidrógenos.
H-TEM	<i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i> , Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.
IGEPAL® CA 630	Octilfenoxipolietoxietanol.
IHBW	<i>Intermediate hydrogen bonded water</i> , Agua asociada con número

intermedio de hidrógenos.

J	Velocidad de nucleación del cristal.
K	Tiempo desde el comienzo de la formación del coágulo hasta los 20 mm.
LHBW	<i>Less Hydrogen Bonded Water</i> , Agua asociada con baja cantidad de hidrógenos.
MA	Amplitud máxima del coágulo.
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i> , Medio Esencial Mínimo de Eagle.
MI	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ polipropilenglicol 400.
MII	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ polietilenglicol.
MIII	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ copolímero polietilenglicol – polipropilenglicol – polietilenglicol.
MIV	Material de hidroxiapatita obtenido utilizando una plantilla de CTAB/ octilfenoxipolietoxietanol.
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> , Células madre mesenquimales.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,bromuro de 5-difeniltetrazolio.
NIRS	<i>Near-Infrared Spectroscopy</i> , Espectroscopia de infrarrojo cercano.
P₀	Peso seco al inicio de la inmersión en solución reguladora.
PEG	Polietilenglicol 400.
PEG-PPG-PEG	Copolímero polietilenglicol – polipropilenglicol – polietilenglicol.
PPG	Polipropilenglicol.
PPP	Plasma sanguíneo humano pobre en plaquetas.
PPP sin MP	Plasma sanguíneo humano pobre en plaquetas sin micropartículas, vesículas lipídicas ni exosomas.
P_t	Peso seco luego de la inmersión en solución reguladora.
R	Tiempo de reacción.
R_a	Rugosidad media.
Relación Ca/P	Relación molar de iones calcio (Ca ²⁺) e iones ortofosfatos (PO ₄ ³⁻).
R_{ku}	Coefficiente de escarpadura.
R_q	Rugosidad cuadrática media.
R_{sw}	Coefficiente de asimetría.

XIV

$R_{z,i}$	Profundidad de rugosidad individual.
$R_{z,m\acute{a}x}$	Profundidad de rugosidad máxima.
$R_{z,med}$	Profundidad de rugosidad media.
S	Sobresaturación.
S_{BET}	Superficie específica del material utilizando el modelo de Brunauer-Emmet-Teller.
SBF	<i>Simulated body fluid</i> , Suero fisiológico simulado.
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , Microscopía electrónica de barrido.
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> , Microscopía electrónica de transmisión.
TMA	Tiempo en llegar a la máxima amplitud del coágulo.
U	Unidad de enzima.
UI	Unidades internacionales.
X_c	Fracción de la fase cristalina
α-SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i> , α -actina de músculo liso.
γ	Tensión interfacial entre la apatita y la solución.
ΔG	Energía libre de Gibbs.
ΔG^*	Energía libre de activación de la nucleación.
$f(\theta)$	Ángulo de contacto entre el núcleo y el sustrato.

Capítulo 1

Introducción general

En las últimas décadas la ingeniería de tejidos ha avanzado a nivel mundial como resultado de la creciente demanda derivada de la complejidad de las problemáticas de salud actuales y el aumento de la esperanza de vida [1]. Cada año millones de personas sufren de fracturas óseas graves que constituyen un importante problemática e implican un gran gasto de los sistemas de atención de salud [2]. La necesidad de reemplazar o reparar el deterioro de los huesos ha llevado a los científicos a buscar nuevos diseños y métodos de síntesis para obtener biomateriales innovadores que sustituyan y regeneren los tejidos. Actualmente, resulta un gran desafío el diseño de biomateriales que imiten la complejidad de la organización jerárquica del hueso y que a su vez posean las mismas propiedades biológicas y mecánicas. Atendiendo a estas consideraciones, ha sido necesario un estudio interdisciplinario del tema, enfocando la problemática desde áreas como la ingeniería de materiales, la fisicoquímica y la bioquímica. En el presente capítulo se dará una breve introducción de los conceptos utilizados en ingeniería de tejidos y de los materiales sobre los que se fundamenta el trabajo desarrollado en la presente disertación.

1.1. Organización jerárquica del hueso

El hueso es un tejido con una organización ordenada en el cual estructuras complejas a gran escala se forman a partir de otras más pequeñas. El esqueleto humano adulto tiene en total 206 huesos, siendo su estructura y composición dependiente de la ubicación y función particular. A gran escala el esqueleto se conforma en un 20 % por hueso esponjoso, o trabecular, y en un 80 % por hueso compacto, o cortical [3]. El hueso esponjoso es extremadamente poroso, con espacio para la médula ósea y los vasos sanguíneos, pero con menor resistencia a la compresión. A diferencia de éste, el hueso compacto es la capa densa exterior, cuya función principal es la de soporte.

A nivel microscópico el hueso se organiza en bloques estructurales llamados osteonas, formados por capas concéntricas de hueso lamelar ubicadas alrededor de un grupo de vasos sanguíneos, alojados en el interior de un conducto central llamado canal de Havers. En estas

estructuras las fibras de colágeno se orientan de manera alterna, lo que les confiere una resistencia significativa [4], [5].

El último nivel jerárquico del hueso se compone de una nanoarquitectura formada por fibrillas de colágeno de 300 nm de largo y 1,5 nm de diámetro [6]; sobre y entre las fibrillas se ubican los cristales inorgánicos de apatita biológica con dimensiones que varían entre los 10 a 100 nm y de formas variadas, siendo mayormente aplanados aunque se encontraron de forma acicular y de rodillo [7] (figura 1.1).

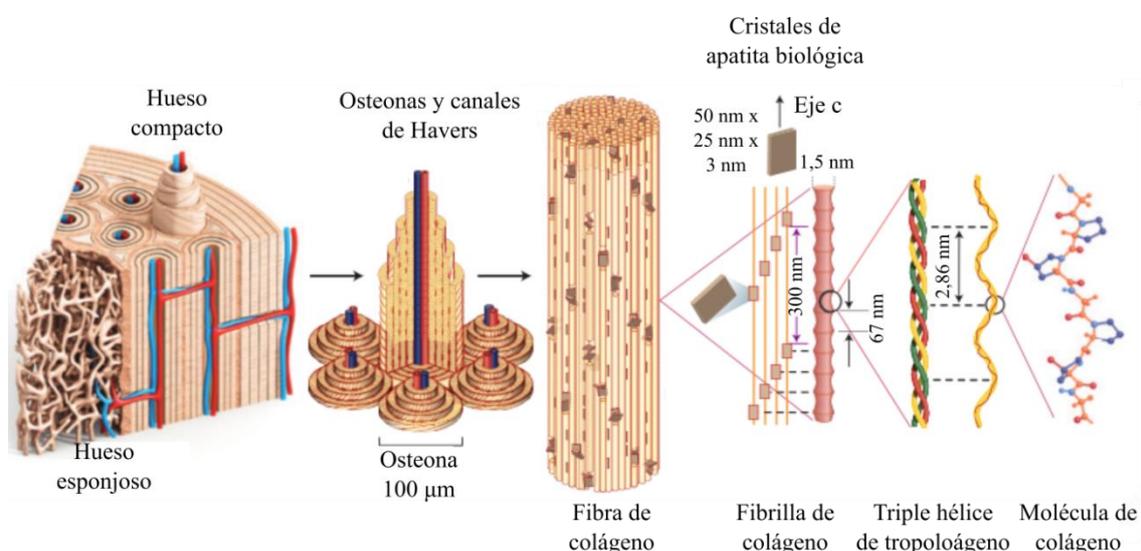
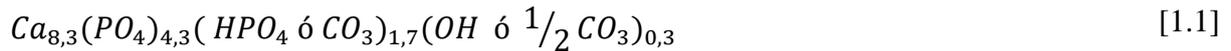


Figura 1.1: Organización jerárquica del hueso en donde se observan las distintitas estructuras que lo componen a diferentes escalas. Esquema adaptado de Wegst y col. [8].

1.1.1. Composición y características de la nanoarquitectura ósea

A nanoescala, el hueso, la dentina y el esmalte dental se compone de una fase orgánica reforzada por una matriz inorgánica compuesta por depósitos de apatita carbonatada pobremente cristalizada, denominada “apatita biológica” [9]. La matriz orgánica está formada por aproximadamente un 95 % de fibras de colágeno de tipo I (Co I) y un 5 % de proteoglicanos, glicoproteínas (como la osteopontina y la osteocalcina), citoquinas y factores de crecimiento [10]. Por otro lado, la matriz inorgánica es compleja y variable, debido a que la red cristalina de la apatita biológica tiene múltiples sustituciones iónicas pudiendo, además, alojar grandes cantidades de vacancias [11]. Su composición química y estructura cristalina es muy similar a la de la hidroxiapatita (HA) estequiométrica $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ salvo

algunas modificaciones, por lo que muchos autores utilizan la denominación “hidroxiapatita” para referirse a la apatita biológica ósea. Dentro de las modificaciones químicas más relevantes se pueden nombrar las sustituciones de los iones fosfato (PO_4^{3-}) por iones carbonato (CO_3^{2-}) o iones fosfato ácido (HPO_4^{2-}), y la de los iones oxidrilo (OH^-) por los iones carbonato (CO_3^{2-}), originando la siguiente formulación química tentativa: [12]



También, un quinto de los iones calcio (Ca^{2+}) pueden estar reemplazados por iones sodio (Na^{2+}), potasio (K^+) y/o magnesio (Mg^{2+}) (figura 1.2). El efecto que generan estas sustituciones es la reducción de las constantes de la red cristalina c y a , modificando las propiedades del cristal como la cristalinidad, estabilidad térmica, morfología y solubilidad, entre otras [13]. Como resultado la apatita biológica es deficiente en calcio y parcialmente carbonatada respecto a la HA estequiométrica, con una relación Ca/P menor a 1,67 (tabla 1.1).

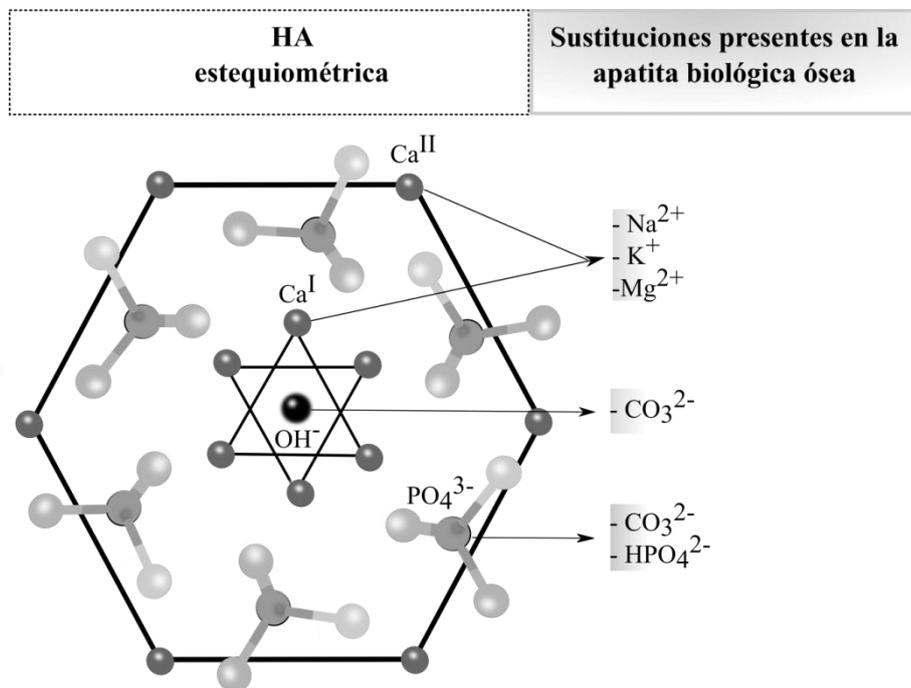


Figura 1.2: Esquema de una unidad estructural hexagonal de HA estequiométrica proyectada en la dirección [001]. A la derecha se indica la ubicación de las sustituciones iónicas en el cristal de la apatita biológica ósea. Esquema adaptado de la publicación de Lu y col. [14].

Tabla 1.1 Comparación de las características químicas, cristalográficas y mecánicas de la apatita biológica ósea y la HA estequiométrica [15], [16].

	Apatita biológica ósea	HA estequiométrica
Composición (% peso)		
Ca	24,50	39,60
P	11,50	18,50
CO ₃ ²⁻	5,8	-----
Na	0,70	-----
Mg	0,55	-----
K	0,03	-----
F	0,02	-----
Cl	0,10	-----
Relación Ca/P (% peso)	2,13	2,15
Relación Ca/P (% atómico)	1,65	1,67
Características del cristal		
Parámetro de red ($\pm 0,0003$ nm)		
a	0,941	0,943
c	0,6880	0,6887
Tamaño aproximado del cristal	50 x 25 x (2,5 – 5) nm	Desde micras a nanómetros
Porcentaje de cristalinidad (%)	33 - 37	100
Propiedades mecánicas		
Módulo elástico (GPa)	7 - 30	10
Resistencia a la tracción (MPa)	50 - 150	≈ 100

Mayormente, la HA obtenida en el laboratorio se caracteriza por cristalizar en su forma más estable de cristal hexagonal, con un grupo espacial P63/m y en dirección [001] a lo largo del eje “c” [17], [18]. A la hora de analizar su interacción con otras moléculas, resulta importante destacar la característica superficial anisotrópica de los cristales por poseer dos planos principales con carga neta diferente: el plano “c” negativo por la presencia de grupos fosfato y el plano “a” positivo con iones calcio expuestos en su superficie (figura 1.3) [19].

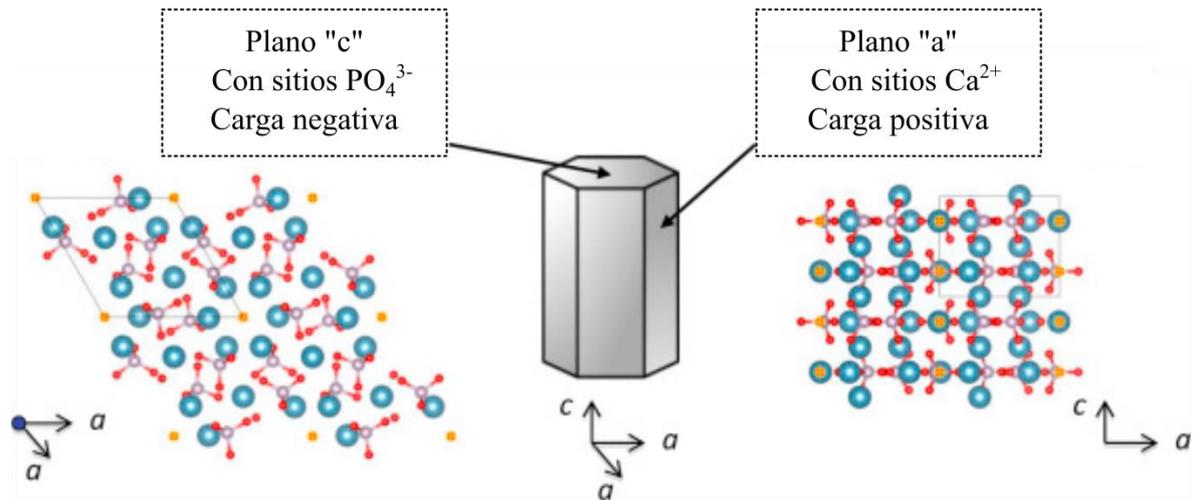


Figura 1.3: Representación esquemática de un cristal hexagonal de HA estequiométrica en donde se indican los planos "c" y "a". Las esferas azules, blancas, rojas y amarillas son Ca, P, O y OH, respectivamente. Imagen adaptada de la publicación de Okada y col. [20]

1.1.2. Formación de la nanoarquitectura ósea: proceso de biomineralización

Las células del hueso responsables de la producción de los elementos constituyentes de la matriz ósea son los osteoblastos. En principio, estas células sintetizan y secretan fibras de Co I, al igual que otras proteínas constituyentes de la matriz extracelular como la osteopontina, osteocalcina y fosfatasa alcalina (FAL). Las fibras colágenas se autoensamblan en el espacio extracelular donde adquieren su estructura secundaria de triple hélice, a partir de aquí denominadas fibrillas [21]. En el proceso de mineralización vuelven a tomar protagonismo los osteoblastos por ser las encargadas de liberar al espacio extracelular vesículas cargadas de iones generando el microambiente sobresaturado necesario para iniciar la nucleación de los cristales de apatita biológica. Más aún, algunas investigaciones afirman que en el interior de estas vesículas se forman fosfatos de calcio amorfos precursores de la apatita biológica, aunque el mecanismo exacto no se encuentra completamente dilucidado y existen diversas teorías al respecto [22]. Entonces, una vez sobresaturado de iones el microambiente ocurre la nucleación de la fase sólida por la agrupación estocástica de soluto, donde un grupo de tamaño crítico, considerado como el precursor de la cristalización, se deposita en los huecos que quedan entre las fibrillas de colágeno. Luego se forman los cristales hexagonales de apatita y crecen con el eje "c" orientado en dirección paralelo a las fibrillas de Co I (figura 1.1); de este modo la nucleación y crecimiento mineral se encuentra asociada al tamaño, organización y periodicidad en la que se encuentran ensambladas [23].

Sin embargo, como el Co I no es un agente nucleador de apatita biológica *per se*, ciertas proteínas no colágenas, capaces de unirse al calcio y al fosfato a través de sus grupos ésteres fosfato y carboxilo, ayudan a la deposición ordenada de los cristales de apatita biológica determinando sus dimensiones, forma, orientación y distribución tridimensional [22], [24]–[26]. Así, a medida que el hueso madura la matriz ósea aumenta por nucleación y agregación de dichos cristales guiados por la matriz proteica que actúa como plantilla.

1.2. Clasificación de los biomateriales según sus propiedades

Hasta aquí se ha profundizado acerca de la organización jerárquica del hueso desde su dimensión macroscópica hasta la nanométrica; a continuación se procederá a ahondar en conceptos básicos sobre biomateriales y luego los específicamente diseñados para sustituir el tejido óseo.

Un biomaterial es cualquier sustancia que ha sido diseñado para interactuar con sistemas biológicos para un propósito médico - ya sea un producto terapéutico (aplicado a el tratamiento, aumento, reparación o sustitución de una función de los tejidos del cuerpo) o un diagnóstico [27]. Los biomateriales fueron clasificados por los especialistas según sus propiedades en cuatro “generaciones” claramente marcadas, las cuales no se deben interpretar de manera cronológica sino conceptual, puesto que cada una es producto de la evolución en los requisitos y las propiedades de los materiales involucrados [28]. La primera generación de biomateriales son los bioinertes; este tipo de materiales no generan una respuesta o interacción con el entorno cuando se introducen en el tejido biológico [29], metales como el acero inoxidable, el titanio y el aluminio son algunos ejemplos [30]. Los materiales de la segunda generación se caracterizan por ser bioactivos y degradables en condiciones biológicas, denominándose biodegradables. La bioactividad es definida como la capacidad del biomaterial a unirse al tejido circundante [31], que para los sustitutos de tejido óseo se encuentra asociada a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada en su superficie. La importancia de la formación de esta cubierta radica en que es la responsable de la formación de enlaces químicos fuertes entre el tejido óseo y el implante [32]; si esto no ocurriese el implante puede ser encapsulado por tejido conectivo fibroso impidiendo la aposición directa del hueso lo que culmina en el rechazo del implante [33]. Los avances en el conocimiento de los mecanismos biológicos han conducido a una mejor comprensión de las interacciones biológicas con las superficies de los biomateriales, y por lo tanto se han

desarrollado biomateriales de tercera generación, capaces de estimular o inhibir respuestas celulares específicas a nivel molecular, haciendo que una vez implantados ayuden al cuerpo a regenerarse a sí mismo [34]. Finalmente, la cuarta generación son los denominados materiales “inteligentes” o biomiméticos, por imitar no solo el grado de complejidad del tejido sino también su funcionalidad [35]. Hasta el momento no se han podido obtener materiales con la misma organización jerárquica del hueso, que por la naturaleza híbrida de su matriz se caracteriza por poseer una gran resistencia a la compresión y al mismo tiempo es flexible y resistente a la fractura, actuando como soporte mecánico y estructural pero además interviniendo en las funciones biológicas del tejido [36].

1.3. Requerimientos de un implante óseo de última generación

1.3.1. Fenómenos biológicos en la interfase biomaterial - hueso

Cuando un implante óseo es insertado en el cuerpo humano se desencadena una secuencia de reacciones en su interfase que resultan determinantes para su posterior integración con el tejido óseo circundante. Tal es así que, los implantes de última generación son capaces de inducir en sus superficies procesos biológicos específicos que culminan en la formación de hueso nuevo y la integración del implante al hueso circundante, como se esquematiza en la figura 1.4.

En este campo de estudio se utilizan tres términos para nombrar los principales fenómenos biológicos que aseguran la curación y éxito del implante: osteoconducción, osteoinducción y osteointegración [37]. El término osteoconducción se refiere a la capacidad del implante a direccionar la formación de hueso nuevo en su superficie; para ellos el biomaterial debe actuar como andamio dirigiendo el crecimiento vascular, migración y adhesión celular (figura 1.4 A-C) [38], [39]. La osteoinducción ocurre cuando el material brinda el entorno adecuado para la diferenciación de las células madre mesenquimales o MSC (del inglés “mesenchymal stem cells”) a osteoblastos, evento que se desencadena en la primera semana de implantación (figura 1.4 D-E) [37]. Por último, el anclaje estable entre el implante y el hueso en el tiempo se denomina osteointegración, proceso complejo que es influenciado por la naturaleza macroscópica y microscópica de la superficie del implante y su biocompatibilidad, entre otros [36].

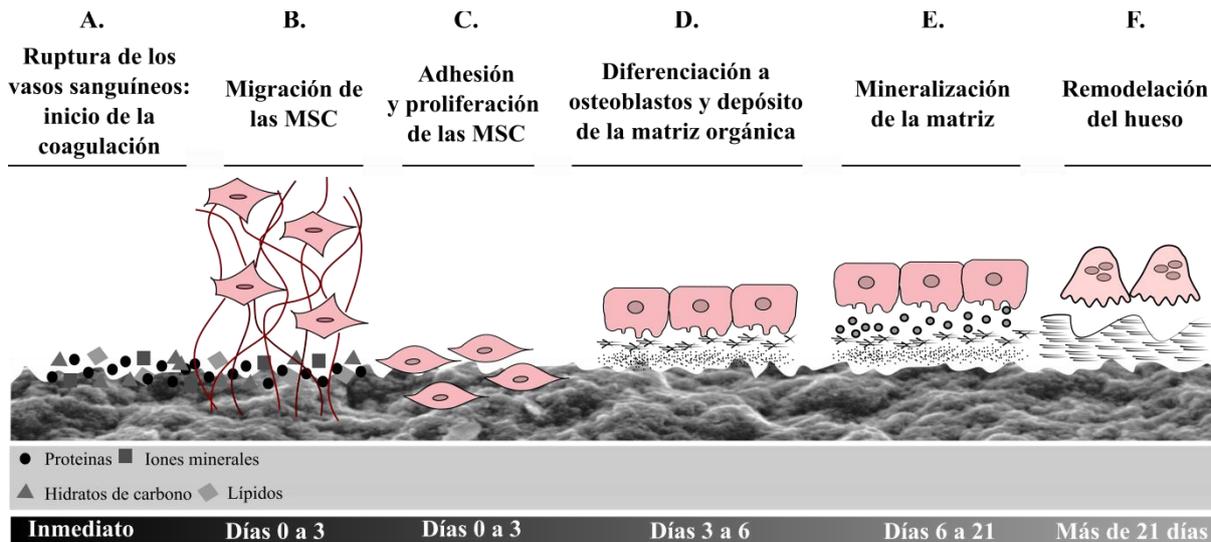


Figura 1.4: Eventos que se desencadenan en la interfase biomaterial – hueso. **(A)** Inmediatamente después de que un biomaterial es implantado los iones y proteínas del medio toman contacto con la superficie del material. Además, se produce la ruptura de los vasos circundantes al tejido haciendo que se inicie el proceso de coagulación [40]. **(B)** Tras la formación del coagulo las células madre mesenquimales (MSC) migran hacia la superficie del material gracias a la red tridimensional de fibrina [33]. **(C)** Luego se adhieren, proliferan y modifican la matriz extracelular mediante la liberación de citoquinas y factores de crecimiento [42]. **(D)** Entre el día 3 y 6, la polarización de las células osteogénicas y las modificaciones de la matriz desencadenan su diferenciación a osteoblastos, los cuales comienzan a depositar la matriz orgánica [24]. **(E)** Entre el día 6 al 21 ocurre la mineralización. **(F)** Después de los 21 días, el hueso nuevo es remodelado por acidificación y proteólisis mediada por osteoclastos [43]. Esquema adaptado de la publicación de Schwartz y col. [42].

1.3.2. Influencia de las características superficiales: hidrofiliidad y nanorugosidad

Como se observa en la figura 1.4 el primer contacto del biomaterial una vez implantado es con los iones y moléculas del medio biológico. Los fluidos corporales tienen una composición diversa y compleja por lo que desencadenan un amplio rango de interacciones y procesos competitivos moleculares en su interfase. En primer lugar ocurre la adsorción de agua, luego los iones forman una doble capa electroquímica, posteriormente se adsorben biomoléculas de bajo peso molecular, como pequeñas cadenas de aminoácidos, y finalmente las proteínas [44]. Estas últimas una vez adsorbidas, pueden adquirir diferentes conformaciones geométricas que son reconocidas o no por los receptores transmembrana

celulares dependiendo de las secuencias de aminoácidos que dejen expuestas. Generalmente, el reconocimiento celular de estos sitios proteicos específicos permite la adhesión de las células osteogénicas al sustrato (figura 1.5) [45].

Ciertas características superficiales de los biomateriales tiene una gran influencia en la adsorción de proteínas, como ser la composición, forma, cristalinidad, carga superficial, hidratación y topografía [45], [46]. Entre ellas se considera que la hidrofiliidad moderada y la nanorugosidad benefician la interacción célula – implante [45]. La hidrofiliidad no solo determina el tipo y cantidad de proteínas que se adsorben, sino también la conformación que éstas adquieren. En superficies moderadamente hidrofílicas ciertas moléculas de la matriz extracelular, como la fibrina, el colágeno y la laminina, son adsorbidas en su configuración espacial más flexible, y de este modo son fácilmente reconocidas por los receptores de membrana celular [47]. Por otra parte, otras moléculas como la albúmina, la proteína más abundante del plasma sanguíneo, se adsorbe preferentemente sobre superficies hidrofóbicas [48], [49] bloqueando la adsorción de otras proteínas pro – adherentes e inhibiendo la adhesión celular [50].

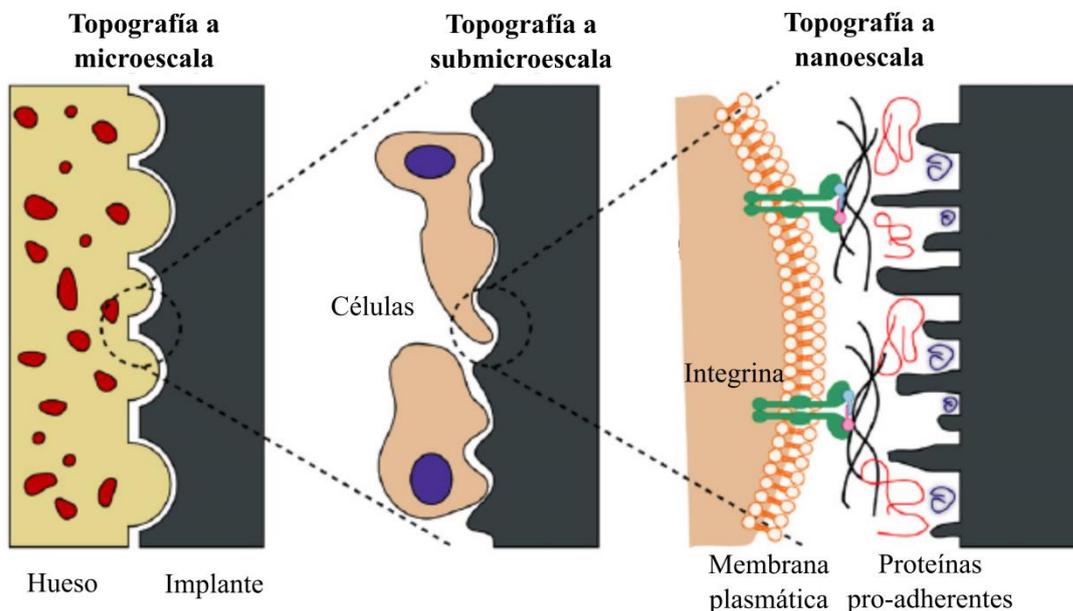


Figura 1.5: Esquema de la interacción célula – implante. A nanoescala observa como las integrinas, que son receptores transmembrana de adhesión celular, reconocen a ciertas proteínas de la matriz extracelular (proteínas pro – adherentes como la fibronectina y la vitronectina) adsorbidas sobre la superficie del implante. Esquema adaptado de la publicación de Gittens y col. [51].

Con relación a la topografía superficial del implante, existe un gran interés en su modificación a modo de acelerar la velocidad de osteointegración. Entre las distintas topografías posibles, los materiales a nanoescala, por definición con dimensiones entre 1 y 100 nm [52], demostraron tener una influencia positiva en la regeneración del tejido óseo [45]. Además de simular la nanoarquitectura de la matriz inorgánica natural del hueso, la rugosidad nanométrica presenta ventajas respecto a la microrugosidad, como ser su gran superficie de reacción debido a la mayor relación superficie – volumen y su capacidad de interactuar con diferentes moléculas biológicas de tamaño similar. Al mismo tiempo favorece la difusión de nutrientes en la zona del implante, lo que da lugar a un adecuado crecimiento y proliferación celular [53]. Más aún, se cree que las superficies nanoestructuradas promueven la adhesión preferencial de osteoblastos sobre la de otras células como los fibroblastos; de este modo se reduce el riesgo del encapsulamiento del implante mediado por los fibroblastos y se promueve la integración del mismo con el tejido circundante [54]. Es importante destacar que se ha visto una notable disminución de la respuesta inflamatoria e inmunológica en los materiales con mencionadas dimensiones [55]. Sumado a esto, algunos investigadores observaron una bioactividad mejorada sobre superficies nanoestructuradas, posiblemente debido a la mayor superficie de reacción [56], [57].

1.4. Hidroxiapatita nanoestructurada aplicada a regeneración de tejido óseo

Los cerámicos de fosfato de calcio, y en particular la HA sintética, tienen una ventaja básica y al mismo tiempo fundamental para ser aplicados en regeneración del tejido óseo en comparación con otros biomateriales: su composición química. Cuando son utilizados en implantología ósea y dental, su semejanza en la composición química con la apatita biológica induce respuestas biológicas similares a las que ocurren normalmente en el entorno del tejido óseo [58] (figura 1.4). Los biomateriales de fosfato de calcio se utilizan con éxito en cirugías cráneo-maxilofaciales [59], odontología y ortopedia [60], y también pueden aplicarse como material de relleno o como recubrimientos de implantes metálicos de cadera y dentales para aumentar sus propiedades bioactivas [61]. Como se mencionó en la sección anterior, particularmente la HA nanoestructurada ha llamado considerablemente la atención por sus propiedades ventajosas respecto a materiales de mayor escala. La incorporación de nanopartículas de HA a los materiales mejora sus propiedades mecánicas y biológicas,

volviéndolos más densos, con mayor resistencia a la fractura y osteointegración mejorada [62], [63].

1.4.1. Obtención de nanopartículas de HA mediante la utilización de agregados micelares

Con el objetivo de obtener nanopartículas de HA los investigadores han utilizado diversidad de síntesis, sin embargo muchas de ellas dan como resultado partículas con baja cristalinidad, grandes diámetros y productos finales con impurezas [64]–[71]. Las más utilizadas con las síntesis hidrotérmicas, aunque en la mayoría de los casos se observan características indeseadas en los productos finales. Cuando se emplean tratamientos a temperaturas relativamente altas se obtienen polvos gruesos policristalinos, y cuando se utilizan temperatura más bajas los polvos se aglomeran y el tamaño de partícula no es homogéneo [72].

A modo de evitar los inconvenientes mencionados anteriormente, se han diseñado con éxito nuevas síntesis hidrotérmicas “biomiméticas” que emplean estructuras orgánicas blandas, como los agregados micelares y poliméricos, que actúan como agentes directores de estructura [67], [73], [74]. Las superficies de estas estructuras orgánicas dirigen la nucleación de los compuestos inorgánicos por complementariedad geométrica, electrostática y estereoquímica, permitiendo un control preciso del tamaño y forma de las partículas [75]–[77]. Estas técnicas son análogas a la mineralización del hueso, en donde los cristales de la matriz mineral se forman y crecen orientados por los agregados de moléculas proteicas.

Entre las estructuras orgánicas blandas mencionadas, los anfifilos se utilizan a menudo para imitar los sistemas biológicos por ser moléculas simples con la capacidad de autoensamblarse para formar estructuras geométrías más complejas, denominados agregados micelares. Los anfifilos tienen una estructura bipolar formada por una zona hidrofílica, altamente soluble en agua, y una zona hidrofóbica o liposoluble, generalmente formada por una cadena hidrocarbonada alquílica o perfluoroalquílica. Estas moléculas tienden a organizarse espontáneamente en solución a fin de satisfacer su doble afinidad y la manera en que se agregan o autoensamblan se correlaciona con la estructura química del anfifilo en condiciones experimentales bien definidas [78], [79]. La estructura de los agregados micelares que forman puede determinarse mediante el parámetro de empaquetamiento crítico

o CPP (del inglés “critical packing parameter”) que permite correlacionar la forma del anfifilo con la morfología del agregado (figura 1.6) y se calcula con la siguiente expresión [80]:

$$CPP = \frac{v}{a_0 \cdot l_c} \quad 1.1$$

donde v es el volumen que ocupa la región hidrofóbica del anfifilo, l_c la longitud de la región hidrofóbica y a_0 el área de la región hidrofílica (figura 1.7).

Parámetro de empaquetamiento crítico (CPP)	Forma del anfifilo	Estructura del agregado micelar	Curvatura del agregado
$CPP < 1/3$	Cono	Esfera	+
$1/3 < CPP < 1/2$	Cono truncado	Cilindro	
$1/2 < CPP < 1$	Cono truncado	Vesícula (bicapa)	
$CPP \approx 1$	Cilindro	Lamelar	0
$CPP > 1$	Cono truncado	Esfera reversa	-

Figura 1.6: El parámetro de empaquetamiento crítico (CPP) está determinado por la forma del anfifilo, que a su vez influye en la estructura del agregado micelar. Esquema adaptado de la publicación de Ramanathan y col. [79].

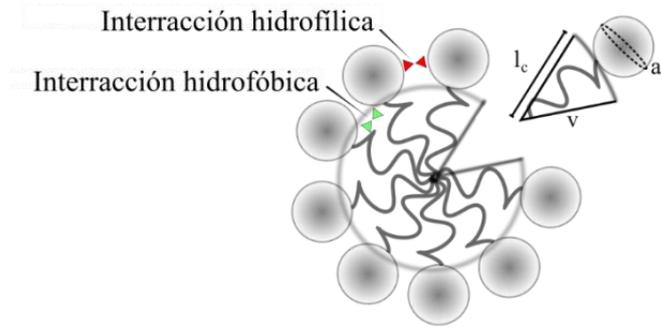


Figura 1.7: Estructura de un anfifilo e interacciones en una micela. Volumen que ocupa la región hidrofóbica del anfifilo (v), longitud de la región hidrofóbica (l_c) y área de la región hidrofílica (a_0).

Las micelas son un tipo de agregado que se forma por el autoensamblado espontáneo de moléculas anfifílicas cuando se encuentran por encima de la denominada concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual las propiedades fisicoquímicas de la solución cambian de forma abrupta. A esta concentración los anfifilos se organizan de manera tal que las regiones hidrofóbicas se ubican en el interior y las regiones hidrofílicas en el exterior de la micela formando una corona [79].

Ciertas condiciones experimentales, como el pH, la temperatura y la luz, pueden alterar la carga de los grupos polares y como consecuencia cambian las características de los agregados micelares [81]–[83]. Así mismo, la adición de sales a una disolución de micelas iónicas puede originar un aumento del grado de empaquetamiento de las moléculas de anfifilo en el agregado debido a la neutralización de su carga, produciéndose, bien un crecimiento axial de la micela, una transformación de micela esférica en cilíndrica, o la transición de agregado micelar a vesícula. Tal es el caso de las sales de cloruro de potasio y cloruro de calcio que apantallan con sus iones las repulsiones entre las cabezas polares de ciertos anfifilos y como resultados aumentan su CPP pasando de micelas esféricas a cilíndricas [84], [85].

1.4.2. Técnicas para la caracterización fisicoquímica de nanopartículas

Cuando los nanomateriales, por sí mismos o integrados a dispositivos médicos, se introducen en un entorno biológico pueden inducir una variedad de efectos que van desde un

aumento en la bioactividad del implante hasta la citotoxicidad. Esto puede ser debido a una variedad de interacciones intermoleculares que ocurren en la interfase [41]; por tal motivo las propiedades fisicoquímicas del nanomaterial deben ser estudiadas exhaustivamente como primer paso para su posterior aplicación biomédica. En la tabla 1.2 se da una breve descripción de las técnicas utilizadas para la caracterización fisicoquímica de los nanomateriales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Tabla 1.2: Técnicas utilizadas para la caracterización de nanomateriales cristalinos.

Técnica	Aplicación
Microscopía electrónica	
SEM	Estudio de la rugosidad superficial [86]
EDX - SEM	Detección y cuantificación de elementos químicos. Proporción elemental en diferentes regiones de la muestra.
TEM	Análisis morfológico de las nanopartículas. Distribución de tamaño de partícula.
H-TEM	Observación de planos cristalográficos [87], [88]
Métodos espectroscópicos	
DRX	Determinación de la identidad del cristal. Tamaño cristalino y porcentaje de cristalinidad. Identificación de distorsiones en parámetros en la red del cristal Detección de impurezas o subproductos de síntesis [89].
FT-IR	Detección de la presencia de determinados grupos funcionales en la estructura de la muestra. Detección de impurezas o subproductos de síntesis.
NIRS	Análisis cuantitativo y cualitativo del agua adsorbida en superficie.
Potencial zeta (ζ)	Obtención de la carga superficial: valor absoluto mayor que 30 mV indica una condición estable, mientras que un valor entre 10 mV y -10 mV son consideradas partículas aproximadamente neutrales [90].

Abreviaturas: Microscopía de barrido o SEM (del inglés “scanning electron microscopy”), Analizador de energía dispersiva de rayos X, o EDX (del inglés “energy dispersive X-ray spectroscopy”), Microscopía electrónica de transmisión o TEM y H-TEM (del inglés “transmission electron microscopy” y “high resolution transmission electron microscopy”), Difracción de rayos X o DRX, Espectroscopía de luz infrarroja por transformada de Fourier o FT-IR (del inglés “Fourier transform infrared spectroscopy”), espectroscopía de IR cercano o NIRS (del inglés “near-infrared spectroscopy”).

1.5. Referencias bibliográficas

- [1] A. R. Amini, C. T. Laurencin, and S. P. Nukavarapu, “Bone tissue engineering: recent advances and challenges.” *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 40, no. 5, pp. 363–408, 2012.
- [2] A. Hofmann, U. Ritz, M. H. Hessmann, C. Schmid, A. Tresch, J. D. Rompe, A. Meurer, and P. M. Rommens, “Cell viability, osteoblast differentiation, and gene expression are altered in human osteoblasts from hypertrophic fracture non-unions.” *Bone*, vol. 42, no. 5, pp. 894–906, May 2008.
- [3] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology.” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. 131–139, 2008.
- [4] E. F. Eriksen, D. W. Axelrod, and F. Melsen, *Bone histomorphometry*. Raven Press, 1994.
- [5] J. Rho, “Mechanical properties and the hierarchical structure of bone,” vol. 20, pp. 92–102, 1998.
- [6] H. Lodish, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell, “Collagen: the fibrous proteins of the matrix,” in *Molecular Cell Biology*. 4th edition, WH Freeman, 2000.
- [7] Y. Cai, Y. Liu, W. Yan, Q. Hu, J. Tao, M. Zhang, Z. Shi, and R. Tang, “Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation,” *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 36, pp. 3780–3787, 2007.
- [8] U. G. K. Wegst, H. Bai, E. Saiz, A. P. Tomsia, R. O. Ritchie, C. Ortiz, and M. Boyce, “Bioinspired structural materials,” *Nat. Mater.*, vol. 14, no. 1, pp. 23–36, 2014.
- [9] C. Rey, “Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties.” *Biomaterials*, vol. 11, pp. 13–15, Jul. 1990.
- [10] V. Kartsogiannis and K. W. Ng, “Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 228, no. 1, pp. 79–102, 2004.
- [11] C. Rey and C. Combes, “Physical chemistry of biological apatites,” in *Biomineralization and biomaterials, Fundamentals and applications*, Elsevier Ltd., 2015, pp. 97–127.
- [12] F. Barrère, C. a. van Blitterswijk, and K. de Groot, “Bone regeneration: Molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 317–332, 2006.
- [13] V. Uskokovic, “The Role of Hydroxyl Channel in Defining Selected Physicochemical Peculiarities Exhibited by Hydroxyapatite,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 46, pp. 36614–

- 36633, 2015.
- [14] X. Lu, H. Zhang, Y. Guo, Y. Wang, X. Ge, Y. Leng, and F. Watari, “Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO₂ nanotubes under urea modulation,” *CrystEngComm*, vol. 13, no. 11, pp. 3741–3749, 2011.
- [15] D. Shi, *Biomaterials and tissue engineering*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [16] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine,” *Materials (Basel)*., vol. 2, no. 2, pp. 399–498, 2009.
- [17] M. Mucalo, *Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications*. Elsevier, 2015.
- [18] W. I. Schmidt, “Über die Orientierung der Kristallite im Zahnschmelz,” *Naturwissenschaften*, vol. 24, no. 23, p. 361, 1936.
- [19] T. Kawasaki, “Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing,” *J. Chromatogr. A*, vol. 544, pp. 147–184, 1991.
- [20] M. Okada and T. Matsumoto, “Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications,” *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 51, no. 4, pp. 85–95, 2015.
- [21] M. J. Glimcher, “The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification,” *Instr. Course Lect.*, vol. 36, pp. 49–69, 1986.
- [22] S. Boonrungsiman, “The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 35, pp. 14170–14175, 2012.
- [23] J. An, S. Leeuwenburgh, J. Wolke, and J. Jansen, “Mineralization processes in hard tissue,” in *Biomaterialization and Biomaterials*, 2016, pp. 129–146.
- [24] H. C. Anderson, “Matrix vesicles and calcification,” *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 5, no. 3, pp. 222–226, 2003.
- [25] M. J. Glimcher and H. Muir, “Recent Studies of the Mineral Phase in Bone and Its Possible Linkage to the Organic Matrix by Protein-Bound Phosphate Bonds [and Discussion],” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 304, no. 1121, pp. 479–508, 1984.
- [26] S.-H. Rhee, Y. Suetsugu, and J. Tanaka, “Biomimetic configurational arrays of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 21, pp. 2843–2847, 2001.
- [27] B. Munksgaard, “Advances in dental implant materials and tissue regeneration,” *Periodontol.* 2000, vol. 41, pp. 136–156, 2006.

- [28] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, and J. a Planell, “Biomaterials in orthopaedics,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, pp. 1137–1158, 2008.
- [29] B. Allan, “Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 83, no. 11, pp. 1235–1240, 1999.
- [30] T. S. Hin, *Engineering materials for biomedical applications*. World scientific, 2004.
- [31] L. L. Hench and J. Wilson, “Surface-active biomaterials,” *Science (80-.)*, vol. 226, no. 4675, pp. 630–636, 1984.
- [32] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [33] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971.
- [34] L. L. Hench and J. M. Polak, “Third-generation biomedical materials,” *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, 2002.
- [35] B. M. Holzapfel, J. C. Reichert, J. T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, and D. W. Hutmacher, “How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 4, pp. 581–603, 2013.
- [36] M. O. Guler and A. B. Tekinay, *Therapeutic Nanomaterials*. John Wiley & Sons, 2016.
- [37] T. Albrektsson and C. Johansson, “Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration,” *Eur. Spine J.*, vol. 10, no. 2, pp. 96–101, 2001.
- [38] J. Davies, “Understanding peri-implant endosseous healing,” *J. Dent. Educ.*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [39] L. F. Cooper, “Biologic determinants of bone formation for osseointegration: clues for future clinical improvements,” *J. Prosthet. Dent.*, vol. 80, no. 4, pp. 439–449, 1998.
- [40] M. Nakamura, K. Niwa, S. Nakamura, Y. Sekijima, and K. Yamashita, “Interaction of a blood coagulation factor on electrically polarized hydroxyapatite surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 82, no. 1, pp. 29–36, 2007.
- [41] A. E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, “Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface,” *Nat Mater*, vol. 8, no. 7, pp. 543–557, 2009.
- [42] Z. Schwartz and B. D. Boyan, “Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 56, no. 3, pp. 340–347, 1994.
- [43] C. Minkin and V. C. Marinho, “Role of the osteoclast at the bone-implant interface,”

- Adv. Dent. Res., vol. 13, pp. 49–56, 1999.
- [44] J. D. Andrade and V. Hlady, “Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses,” *Biopolym. HPLC*, vol. 79, pp. 1–63, 1986.
- [45] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorecik, “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants.,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–767, 2011.
- [46] P. C. Lin, S. Lin, P. C. Wang, and R. Sridhar, “Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 32, no. 4, pp. 711–726, 2014.
- [47] J. Y. Lim and H. J. Donahue, “Biomaterial characteristics important to skeletal tissue engineering,” *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, vol. 4, no. 4, pp. 396–398, 2004.
- [48] W. Norde and C. E. Giacomelli, “BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states.,” *J. Biotechnol.*, vol. 79, no. 3, pp. 259–268, 2000.
- [49] M. Malmsten, *Biopolymers at interfaces*. CRC Press, 2003.
- [50] T. A. Horbett, “The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 2, no. 1, pp. 225–240, 1994.
- [51] R. A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, and B. D. Boyan, “The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395–3403, 2011.
- [52] S. Jain, A. P. Jain, S. Jain, O. N. Gupta, and A. Vaidya, “Nanotechnology: An emerging area in the field of dentistry,” *J. Dent. Sci.*, pp. 1–9, 2013.
- [53] R. J. Narayan, “The next generation of biomaterial development.,” *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 368, no. 1917, pp. 1831–1837, 2010.
- [54] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios, “Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 475–483, 2000.
- [55] E. Saino, M. L. Focarete, C. Gualandi, E. Emanuele, A. I. Cornaglia, M. Imbriani, and L. Visai, “Effect of electrospun fiber diameter and alignment on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines,” *Biomacromolecules*, vol. 12, no. 5, pp. 1900–1911, 2011.
- [56] G. Wang, X. Liu, H. Zreiqat, and C. Ding, “Enhanced effects of nano-scale topography on the bioactivity and osteoblast behaviors of micron rough ZrO₂ coatings.,” *Colloids*

- Surf. B. Biointerfaces, vol. 86, no. 2, pp. 267–74, 2011.
- [57] C. Lindahl, H. Engqvist, and W. Xia, “Influence of surface treatments on the bioactivity of Ti,” *ISRN Biomater.*, vol. 2013, 2013.
- [58] E. Schepers, M. de Clercq, P. Ducheyne, and R. Kempeneers, “Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions.,” *J. Oral Rehabil.*, vol. 18, no. 5, pp. 439–452, 1991.
- [59] J. Prein, *Manual of Internal Fixation in the Cranio-Facial Skeleton: Techniques as recommended by the AO/ASIF-Maxillofacial Group*. Springer Science & Business Media, 1998.
- [60] T. J. Webster, “Nanophase ceramics: The future orthopedic and dental implant material,” *Adv. Chem. Eng.*, vol. 27, pp. 125–166, 2001.
- [61] J.-A. Epinette and M. T. Manley, *Fifteen years of clinical experience with hydroxyapatite coatings in joint arthroplasty*. Springer, 2013.
- [62] M. a. Meyers, a. Mishra, and D. J. Benson, “Mechanical properties of nanocrystalline materials,” *Prog. Mater. Sci.*, vol. 51, no. 4, pp. 427–556, 2006.
- [63] S. Ramesh, C. Y. Tan, I. Sopyan, M. Hamdi, and W. D. Teng, “Consolidation of nanocrystalline hydroxyapatite powder,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 8, no. 1–2, pp. 124–130, 2007.
- [64] Y. Zhang and J. Lu, “A simple method to tailor spherical nanocrystal hydroxyapatite at low temperature,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 9, no. 4, pp. 589–594, 2007.
- [65] Z. H. Zhou, P. Le Zhou, S. P. Yang, X. Bin Yu, and L. Z. Yang, “Controllable synthesis of hydroxyapatite nanocrystals via a dendrimer-assisted hydrothermal process,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 42, no. 9, pp. 1611–1618, 2007.
- [66] R. J. Chung, M. F. Hsieh, K. C. Huang, L. H. Perng, F. I. Chou, and T. S. Chin, “Anti-microbial hydroxyapatite particles synthesized by a sol-gel route,” *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 33, no. 2, pp. 229–239, 2005.
- [67] Y. Sun, G. Guo, D. Tao, and Z. Wang, “Reverse microemulsion-directed synthesis of hydroxyapatite nanoparticles under hydrothermal conditions,” *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 68, no. 3, pp. 373–377, 2007.
- [68] S. Nakamura, T. Isobe, and M. Senna, “Hydroxyapatite nano sol prepared via a mechanochemical route,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 3, no. 1, pp. 57–61, 2001.
- [69] Y. Han, X. Wang, and S. Li, “A simple route to prepare stable hydroxyapatite nanoparticles suspension,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 11, no. 5, pp. 1235–1240, 2009.
- [70] J. Liu, K. Li, H. Wang, M. Zhu, and H. Yan, “Rapid formation of hydroxyapatite

- nanostructures by microwave irradiation,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 396, no. 4–6, pp. 429–432, 2004.
- [71] Y. J. Wang, C. Lai, K. Wei, X. Chen, Y. Ding, and Z. L. Wang, “Investigations on the formation mechanism of hydroxyapatite synthesized by the solvothermal method,” *Nanotechnology*, vol. 17, no. 17, pp. 4405–4412, 2006.
- [72] M. Yoshimura, H. Suda, K. Okamoto, and K. Ioku, “Hydrothermal synthesis of biocompatible whiskers,” *J. Mater. Sci.*, vol. 29, no. 13, pp. 3399–3402, 1994.
- [73] M. Cao, Y. Wang, C. Guo, Y. Qi, and C. Hu, “Preparation of ultrahigh-aspect-ratio hydroxyapatite nanofibers in reverse micelles under hydrothermal conditions,” *Langmuir*, vol. 20, no. 11, pp. 4784–4786, 2004.
- [74] K. Lin, J. Chang, R. Cheng, and M. Ruan, “Hydrothermal microemulsion synthesis of stoichiometric single crystal hydroxyapatite nanorods with mono-dispersion and narrow-size distribution,” *Mater. Lett.*, vol. 61, no. 8–9, pp. 1683–1687, 2007.
- [75] S. Mann, D. D. Archibald, J. M. Didymus, T. Douglas, B. R. Heywood, F. C. Meldrum, and N. J. Reeves, “Crystallization at Inorganic-organic Interfaces: Biominerals and Biomimetic Synthesis,” *Science*, vol. 261, no. 5126, pp. 1286–1292, 1993.
- [76] S. Mann, “Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry,” *Nature*, vol. 365, no. 6446, pp. 499–505, 1993.
- [77] A. Firouzi, D. Kumar, L. M. Bull, T. Besier, P. Sieger, Q. Huo, S. A. Walker, J. A. Zasadzinski, C. Glinka, and J. Nicol, “Cooperative organization of inorganic-surfactant and biomimetic assemblies,” *Science*, vol. 267, no. 5201, pp. 1138–1143, 1995.
- [78] J. Hill, L. Shrestha, S. Ishihara, Q. Ji, and K. Ariga, “Self-Assembly: From Amphiphiles to Chromophores and Beyond,” *Molecules*, vol. 19, no. 6, pp. 8589–8609, 2014.
- [79] M. Ramanathan, L. K. Shrestha, T. Mori, Q. Ji, J. P. Hill, and K. Ariga, “Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 15, no. 26, pp. 10580–10611, 2013.
- [80] R. A. Khalil and A. Z. Al-hakam, “Theoretical estimation of the critical packing parameter of amphiphilic self-assembled aggregates,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 318, pp. 85–89, 2014.
- [81] G. Verma, V. K. Aswal, and P. Hassan, “pH-Responsive self-assembly in an aqueous mixture of surfactant and hydrophobic amino acid mimic,” *Soft Matter*, vol. 5, no. 15, pp. 2919–2927, 2009.

- [82] T. S. Davies, A. M. Ketner, and S. R. Raghavan, "Self-assembly of surfactant vesicles that transform into viscoelastic wormlike micelles upon heating," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 20, pp. 6669–6675, 2006.
- [83] A. M. Ketner, R. Kumar, T. S. Davies, P. W. Elder, and S. R. Raghavan, "A simple class of photorheological fluids: Surfactant solutions with viscosity tunable by light," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 6, pp. 1553–1559, 2007.
- [84] S. Ozeki and S. Ikeda, "The sphere—rod transition of micelles and the two-step micellization of dodecyltrimethylammonium bromide in aqueous NaBr solutions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 87, no. 2, pp. 424–435, 1982.
- [85] C. Gamboa, H. Ríos, and L. Sepúlveda, "Effect of the nature of counterions on the sphere-to-rod transition in cetyltrimethylammonium micelles," *J. Phys. Chem.*, vol. 93, no. 14, pp. 5540–5543, 1989.
- [86] J. B. Hall, M. a Dobrovolskaia, A. K. Patri, and S. E. McNeil, "Characterization of nanoparticles for therapeutics.," *Nanomedicine (Lond).*, vol. 2, no. 6, pp. 789–803, 2007.
- [87] A. Patri, M. Dobrovolskaia, S. T. Stern, and S. McNeil, "Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics," in *Nanotechnology for Cancer Therapy*, 1st ed., New York: CRC Press, 2006, pp. 105–138.
- [88] Z. L. Wang, "Transmission Electron Microscopy and Spectroscopy of Nanoparticles," in *Characterization of Nanophase Materials*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, pp. 37–80.
- [89] D. Zanchet, B. D. Hall, and D. Ugarte, "2 X-ray Characterization of Nanoparticles," in *Characterization of Nanophase Materials*, vol. 1, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2000, pp. 13–36.
- [90] J. Clogston and A. Patri, "Zeta Potential Measurement," in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery SE - 6*, vol. 697, Humana Press, 2011, pp. 63–70.

Capítulo 2

Objetivo general

La presente propuesta estudiará nuevas estrategias de síntesis de materiales en base a hidroxiapatita nanocrystalina similar a la apatita biológica que forma parte del tejido óseo. En estos materiales se desea conjugar la capacidad de actuar como estructura de soporte temporal con la de regenerar tejidos dañados.

Objetivos específicos

1. Sintetizar materiales que simulen la matriz mineral ósea mediante la utilización de sistemas formados por micelas cilíndricas de CTAB y polímeros como agentes directores de la estructura.
2. Realizar una caracterización fisicoquímica y determinar los parámetros de rugosidad de los materiales para analizar si sus características particulares se ven influenciadas por las distintas interacciones de los sistemas CTAB/polímero.
3. Estudiar el comportamiento de los materiales en diferentes entornos fisiológico *in vitro*:
 - a. Biodegradación al pH fisiológico de la sangre y a pH ácido para simular condiciones de resorción ósea.
 - b. Biomineralización en presencia de suero fisiológico simulado, solución sin proteínas ni células que simula las condiciones iónicas del plasma sanguíneo, utilizada para estudiar la bioactividad *in vitro* de los materiales.
 - c. Interacción con albúmina, la proteína más abundante del plasma sanguíneo, y su efecto sobre la biomineralización.
4. Estudiar la biocompatibilidad de los materiales *in vitro* mediante ensayos de viabilidad, diferenciación, adhesión, integridad del citoesqueleto y genotoxicidad.
5. Analizar el efecto de los materiales en el proceso de coagulación.

Capítulo 3

Síntesis y caracterización de HA nanoestructurada

3.1 Introducción

En este trabajo de investigación se utilizó una síntesis biomimética hidrotermal con el fin de obtener nanopartículas de HA de morfología y tamaño controlado. Para regular el tamaño, forma, nucleación y crecimiento cristalino de las nanopartículas se manipularon plantillas de CTAB. La restricción del crecimiento y evolución de los cristales se logró utilizando cuatro polímeros diferentes, dando como resultado materiales con topografías particulares. El método propuesto permite obtener materiales que reproducen, en cierta medida, la estructura jerárquica ósea lo que les conferiría potenciales propiedades de bioactividad y biocompatibilidad. Tales características son deseables y, en ciertos casos, estrictamente necesarias para que los materiales puedan ser utilizados en un futuro como unidades de construcción nanométricas en ingeniería tisular; siendo diseñados con la finalidad de imitar las funciones estructurales y biológicas de la matriz extracelular.

3.1.1 Síntesis de nanopartículas de HA utilizando estructuras autoensambladas de CTAB

Datos informados en literatura indican que el tamaño de un nanocristal de apatita biológica es de aproximadamente 10 a 100 nm, con forma aplanada, acicular o de rodillos [1]. Con el fin de imitar su morfología y estructura cristalina se pueden utilizar micelas cilíndricas para dirigir la nucleación de los cristales. Uno de los anfifilos catiónicos formadores de micelas más efectivo y ampliamente estudiado es el bromuro de hexadeciltrimetilamonio, más conocido por su abreviatura CTAB (del inglés “Cetyl trimethylammonium bromide”). El CTAB es una sal de amonio cuaternaria que se caracteriza por tener una cadena hidrocarbonada de 16 carbonos y un grupo polar cargado positivamente [2] (figura 3.1). Por encima de la concentración micelar crítica (CMC) este anfifilo forma en solución acuosa micelas esféricas de 2 a 3 nm de diámetro [3], y en presencia de sales es posible obtener micelas cilíndricas de aproximadamente 47 nm de longitud [4], [5]. Las investigaciones realizadas por Liu y col. [6] han demostrado que la utilización de nitrito de sodio (NaNO_2)

durante la síntesis permite un control eficiente de la estructura de las micelas de CTAB. El nitrito de sodio no solo induce la transición de micelas esféricas a cilindros, sino que también evita que los nanocilindros formados aumenten en diámetro, debido a que actúa como un regulador de pH modificando las fuerzas iónicas en solución [6].



Figura 3.1: Estructura de la molécula de CTAB. La región hidrofílica del anfifilo se señala en rojo y la hidrofóbica con azul.

3.1.2 Obtención de superestructuras utilizando polímeros como directores de estructura

Las síntesis bioinspiradas se han desarrollado ampliamente como una ruta de desarrollo de materiales inorgánicos con morfologías controladas mediante la utilización de superestructuras orgánicas autoensambladas para la obtención de patrones complejos [7]. Una manera de diseñar estructuras inorgánicas jerárquicas es mediante la utilización de polímeros solubles en agua, los cuales intervienen en la formación y modificación de las partículas cristalinas.

El polietilenglicol (PEG) es un polímero comúnmente utilizado en biomedicina por su biocompatibilidad y sus propiedades fisicoquímicas favorables. En solución acuosa se caracteriza por formar una película muy móvil, tiene un gran volumen excluyente y, al ser una molécula libre de cargas, se evita la fuerte interacción entre los constituyentes de la síntesis [8], [9]. Se ha demostrado que durante la síntesis de nanopartículas de HA en presencia de CTAB y PEG es posible obtener estructuras dendríticas y nanorodillos distribuidos al azar, mientras que sin la incorporación de PEG se consiguen estructuras con forma de agujas [10], [11]. De acuerdo a las publicaciones de Qiu y col. [10], el PEG tiene tres funciones principales en este proceso: (i) modificar o controlar la superficie nanométrica del cristal, (ii) controlar la velocidad de reacción y (iii) actuar como un agente dispersante del nanocristal. Al igual que el PEG, existen otros polímeros que pueden ser empleados como

3.1.3 Estudio de la topografía de superficies

Como se profundizó en el capítulo 1 sección 1.3.2, el éxito de un implante se encuentra íntimamente relacionado con sus propiedades superficiales. Al ser la superficie del biomaterial la que estará en contacto directo con el sistema vivo, resulta fundamental su exhaustiva caracterización. La topografía superficial de un material puede ser caracterizada mediante técnicas como la microscopía de fuerza atómica o instrumentos electrónicos llamados rugosímetros. Otra alternativa es la utilización de microscopía electrónica de barrido (SEM) y diferentes paquetes computacionales que sirven para calcular parámetros de superficie empleando micrografías digitalizadas [14]–[16]. Una explicación más detallada de la técnica se encuentra en la sección 3.2.3.1 de “Métodos experimentales”. Los parámetros de rugosidad principalmente estudiados en el área de los biomateriales son: la rugosidad media (R_a), la rugosidad cuadrática media (R_q), el coeficiente de asimetría (R_{sw}) y el coeficiente de escarpadura (R_{ku}) (figura 3.3).

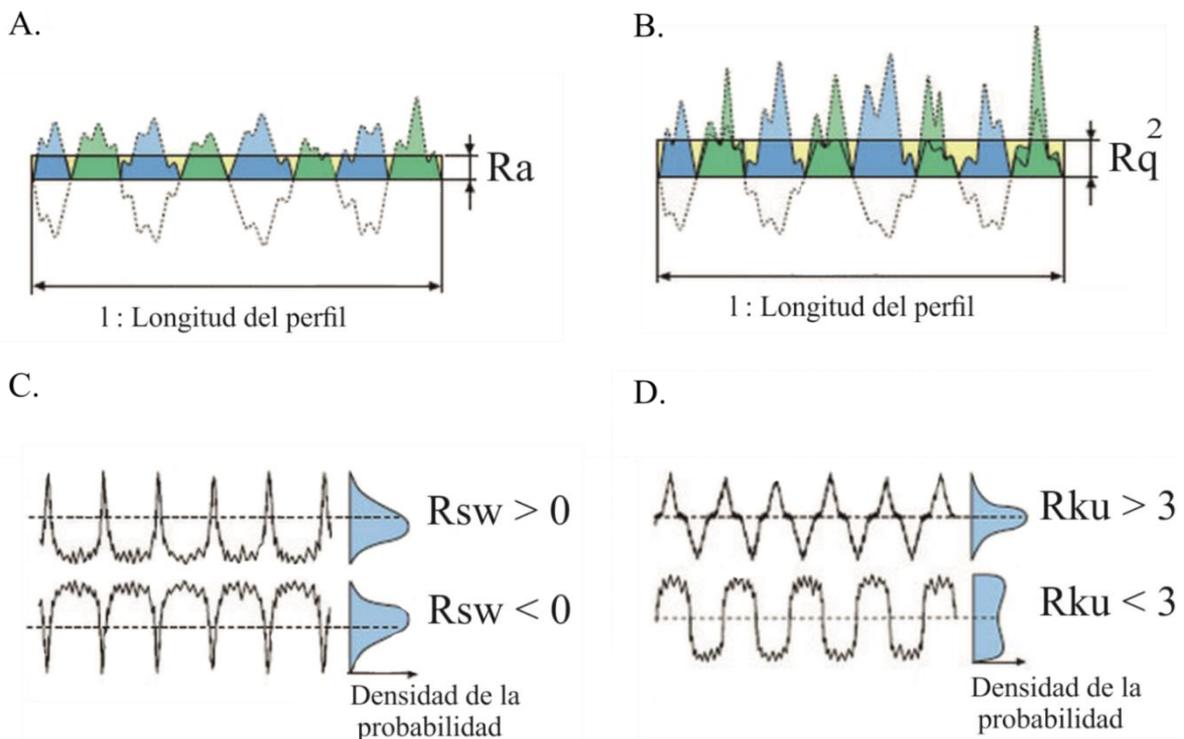


Figura 3.3: Representación gráfica de los parámetros de rugosidad de superficie más utilizados. (A) R_a : rugosidad media. (B) R_q : rugosidad cuadrática media. (C) R_{sw} : coeficiente de asimetría. (D) R_{ku} coeficiente de escarpadura. Esquema adaptado de la página web de Olympus® [17].

Universalmente el parámetro de rugosidad más utilizado es la rugosidad media, R_a , definida como la desviación absoluta media de la rugosidad desde la línea media a lo largo de la longitud del plano de muestreo. Por otro lado, la presencia de grandes desviaciones en la línea media se logra calculando la rugosidad cuadrática media, R_q , por ser un parámetro más sensible a las variaciones y se utiliza para representar la distribución de altura del perfil [18].

Cuando se obtienen valores R_a y R_q similares es posible diferenciar los perfiles mediante los coeficientes de asimetría, R_{sw} , y de escarpadura, R_{ku} . La combinación de ambos parámetros permiten además estudiar el efecto de la fricción y desgaste que ocurre en la interfase implante – hueso [19]. El coeficiente de asimetría, R_{sw} , es utilizado para estudiar la simetría del perfil de rugosidad sobre la línea media. Este parámetro permite distinguir entre perfiles con diferentes resistencias a la cizalladura, que es la tensión máxima de corte que puede soportar la interfase material – hueso antes de que falle el implante [20]. Es decir, un perfil con gran cantidad de valles profundos, y por lo tanto baja resistencia a la cizalladura, tiene un valor negativo de R_{sw} . Por el contrario, un perfil con alta resistencia a la cizalladura, en donde predominan los picos sobre los valles presenta un R_{sw} positivo. [21]. Finalmente, el R_{sw} es nulo cuando la distribución de alturas es simétrica, con igual cantidad de picos y valles.

Para la detección de picos agudos y valles profundos aislados es posible utilizar el coeficiente de escarpadura, R_{ku} , que describe la agudeza de la densidad de probabilidad del perfil [21]. Cuando R_{ku} es menor a 3 se dice que la distribución de la curva es platicúrtica, perfil característico por presentar escasos picos agudos. Si R_{ku} es mayor a 3 la distribución de la curva se la denomina leptocúrtica, con predominante picos altos [22].

Otro concepto interesante para el estudio de superficies y en la ciencia de los materiales es la arquitectura fractal. Los fractales naturales son patrones repetitivos a través de un rango finito de escalas que se observan en muchas estructuras biológicas, tales como el hueso. Su influencia y relevancia en el tejido biológico no se encuentra completamente dilucidada, pero se ha observado que las superficies de implantes revelan este tipo de patrones repetitivos en las escalas micro y nanométricas. Debido a esto, la dimensión fractal, D_f , es un parámetro importante que se utiliza frecuentemente para describir la arquitectura ósea ya que se la correlaciona con sus propiedades biomecánicas, y específicamente el método de “conteo en una caja” es extensamente utilizado para medir la D_f del hueso trabecular [23], [24]. En la

sección 3.2.3.1 de “Métodos experimentales” se hace una descripción detallada de esta metodología.

3.2 Métodos experimentales

3.2.1 Reactivos

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, $PM = 364.48 \text{ g/mol}$, 99 % Sigma), Polietilenglicol 400 (PEG 400, $PM = 380\text{--}420 \text{ g/mol}$, $\delta = 1,126 \text{ g/cm}^3$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Sigma-Aldrich), Polipropilenglicol (PPG, $PM = 425 \text{ g/mol}$, $\delta = 1,004 \text{ g/cm}^3$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Sigma-Aldrich), copolímero PEG – PPG – PEG (10 % m/m, $PM = 2800 \text{ g/mol}$, $\delta = 1,018 \text{ g/cm}^3$, Sigma-Aldrich), Octilfenoxipolietoxietanol (IGEPAL[®] CA 630, $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}$, $PM = 603 \text{ g/mol}$, $\delta = 1,06 \text{ g/cm}^3$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, Sigma-Aldrich), Fosfato de sodio (Na_3PO_4 , $PM = 148 \text{ g/mol}$, 96 % Sigma), Cloruro de calcio (CaCl_2 , $PM = 91 \text{ g/mol}$, 99 % Sigma), Nitrito de sodio (NaNO_2 , $PM = 69 \text{ g/mol}$, 97 % Sigma), solución reguladora de fosfato salino o PBS (del inglés “phosphate buffered saline”) (1X, Sigma-Aldrich). Se utilizó agua tridestilada para la preparación de todas las soluciones.

3.2.2 Síntesis de materiales de HA: MI, MII, MIII y MIV

Durante esta estudio se sintetizaron cuatro materiales de fosfato de calcio denominados MI, MII, MIII y MIV, a partir de una modificación de la síntesis descrita por Liu y col. [6]. En primer lugar, para el material MI se realizó una solución micelar de CTAB 3,13 mM en 350 ml de agua y se mantuvo bajo agitación magnética a 500 rpm a temperatura ambiente hasta el final de la síntesis. Luego se incorporaron 20 ml del polímero PPG. El siguiente paso fue incorporar en secuencia 2 M de nitrito de sodio en solución acuosa y 0,22 g de cloruro de calcio. Por último, se agregaron gota a gota 200 ml de solución acuosa de 0,41 M de fosfato de sodio. Para la integración de todos los reactivos se mantuvo la agitación magnética durante una hora a temperatura ambiente. Como siguiente paso, las soluciones obtenidas fueron sometidas a un tratamiento hidrotérmico en autoclave durante 24 h a $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Al sacar los frascos del autoclave se obtuvieron dos fases de las cuales el sobrenadante fue descartado y el precipitado, en el cual se encuentra el material, se filtró con papel de filtro y se lavó con agua tridestilada repetidas veces para remover impurezas. Durante la optimización de las

condiciones de síntesis con el fin de descartar los restos de componentes orgánicos los materiales se calcinaron durante 3 h a 400 °C y durante 6 h a 650°C. Los materiales MII, MIII y MIV se prepararon siguiendo el mismo protocolo pero en vez de PPG se utilizaron los polímeros PEG, el copolímero PEG–PPG–PEG e IGEPAL® CA 630 respectivamente. Como control del efecto de los polímeros en la estructuración de las nanopartículas se utilizó una síntesis sin agregar polímero.

3.2.3 Técnicas de caracterización

3.2.3.1 Microscopía electrónica de barrido y cálculo de los parámetros de rugosidad

Para estudiar la morfología de la superficie de los materiales se tomaron imágenes de microscopía de barrido (SEM) de emisión de campo ZEISS Ultra Plus operando con un voltaje de aceleración 3,00 kV (distancia de trabajo: 2,1 mm). La compensación local de carga se realizó por inyección de nitrógeno y las imágenes fueron adquiridas mediante detectores de electrones secundarios y de electrones retrodispersados integrados a la lente para la obtención de los perfiles de rugosidad superficial.

Como se hizo mención en el párrafo anterior, el perfil superficial de los materiales se obtuvo mediante el procesamiento de señales de electrones retrodispersados o BSE (del inglés “back-scattered electrons”) utilizando un software de procesamiento de datos [25], [26]. La imagen BES que se produce es proporcional a la inclinación a lo largo de la superficie de barrido del haz de electrones. Esto significa que el perfil de rugosidad superficial se puede derivar de la integración de las intensidades BES, que varían a lo largo del área de escaneo. De este modo se obtuvieron reconstrucciones digitalizadas del material en tres dimensiones [27] y se calcularon los siguientes parámetros de la topografía de superficie: R_a , R_q , R_{ku} , R_{sw} , los parámetros de profundidad ($R_{z,i}$, $R_{z,máx}$, $R_{z,med}$) y D_f utilizando el software ImageJ® 1.47v acoplado a paquetes de procesamiento de imágenes tales como “Roughness calculation” y “SurfCharJ 1q” [28].

Los parámetros R_a y R_q , se definen matemáticamente y se implementa digitalmente mediante las siguientes ecuaciones:

$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |y(x)| dx \quad 3.1$$

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad 3.2$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l \{y(x)\}^2 dx} \quad 3.3$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad 3.4$$

donde l es la longitud del perfil, y_i es la altura en el punto número i y n el número de intersecciones del perfil en la línea media (figura 3.4).

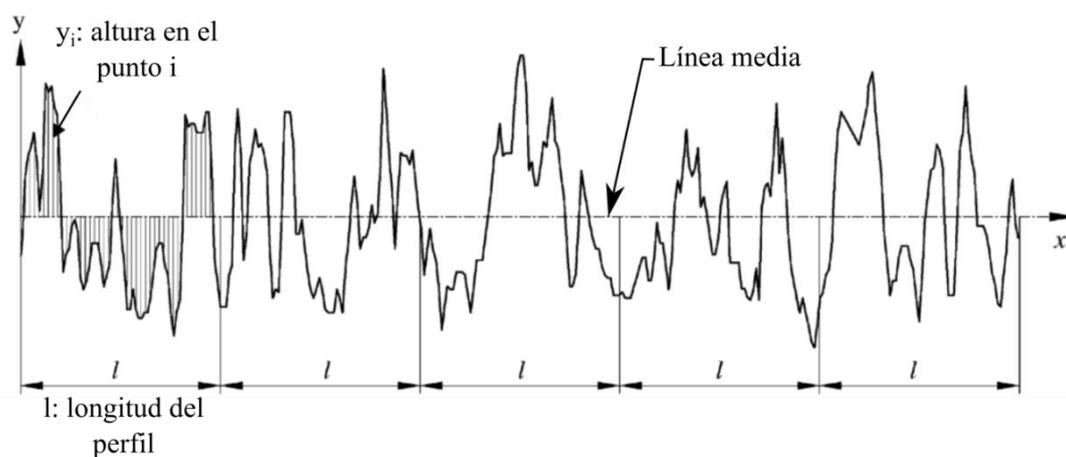


Figura 3.4: Gráfico de un perfil en el cual se indican los valores que se utilizan para calcular los parámetros de rugosidad. Esquema adaptado de la publicación de Gadelmawla y col. [18]

La línea media de R_q es la línea que divide el perfil, por lo que la suma de cuadrados de las desviaciones del perfil de alturas de éste es igual a cero. Para calcular la asimetría del

perfil a través del coeficiente R_{sw} , se utiliza una fórmula matemática y numérica, que tiene un número N de puntos, como se muestra a continuación:

$$R_{sw} = \frac{1}{R_q^3} \int_{-\infty}^{\infty} y^2 p(y) dy \quad 3.5$$

$$R_{sw} = \frac{1}{NR_q^3} \left(\sum_{i=1}^N y_i^3 \right) \quad 3.6$$

El coeficiente R_{ku} se representa matemáticamente e implementa digitalmente con las siguientes ecuaciones:

$$R_{ku} = \frac{1}{R_q^4} \int_{-\infty}^{\infty} y^4 p(y) dy \quad 3.7$$

$$R_{ku} = \frac{1}{NR_q^4} \left(\sum_{i=1}^N y_i^4 \right) \quad 3.8$$

En cuanto a los parámetros de profundidad se pueden nombrar a: la profundidad de rugosidad individual ($R_{z,i}$), la profundidad de rugosidad máxima ($R_{z,m\acute{a}x}$), la profundidad de rugosidad media ($R_{z,med}$), los cuales son utilizados para diferenciar perfiles asimétricos. $R_{z,i}$ es la distancia vertical entre el pico más alto y el valle más bajo dentro de un plano de muestreo. El promedio aritmético de las profundidades de rugosidad individuales de longitudes de muestreo consecutivos es $R_{z,med}$, y la mayor profundidad de la rugosidad dentro de la longitud de evaluación corresponde a $R_{z,m\acute{a}x}$ (figura 3.5) [29], [30].

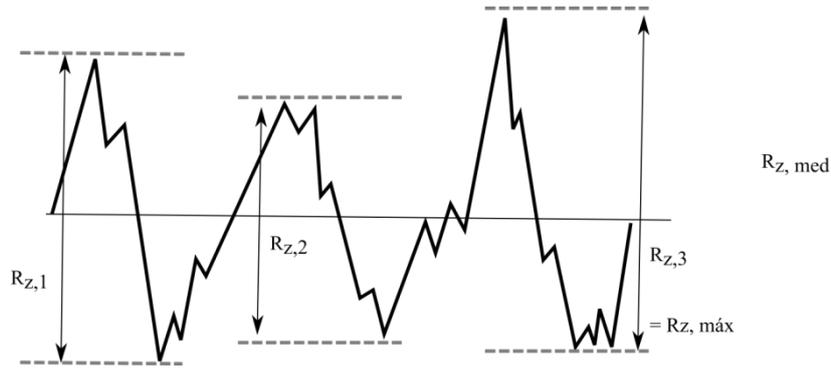


Figura 3.5: Representación gráfico de $R_{z,i}$, $R_{z,máx}$ y $R_{z,med}$. Esquema reproducido de la página web de Rubert & Co Ltd [31].

Para calcular la dimensión fractal (D_f) de la superficie de los materiales se puede utilizar el método de “conteo en una caja”. Este método previamente utilizado por Hassan y col. [32] consiste en aplicar una cuadrícula cada vez más fina sobre el área estudiada y contar, en cada iteración, el número de cajas que contiene al menos una parte del objeto a medir. Luego se relaciona D_f a un número “ $n(s)$ ” de cajas con dimensión “ s ” necesarias para rellenar el área superficial de la partícula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$D_f = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{\ln n(s)}{\ln(1/s)} \quad 3.9$$

Este método puede optimizarse utilizando un procedimiento de cálculo ideado por Foroutan-Pour y col. [33] que permite una determinación precisa de los parámetros clave del método, es decir, el número y las dimensiones de las cajas [34]. Inicialmente las imágenes con 256 niveles de grises 1024 x 768 píxeles son convertidas a imágenes binarias. Después, la dimensión fractal de la curva deriva de la pendiente de un ajuste lineal de mínimos cuadrados del gráfico “log n ” vs. “log (tamaño de la caja)”, siendo “ n ” el número de cajas iguales no solapadas que pueden llenar el área superficial proyectada de los agregados. Estas operaciones son realizadas con la ayuda de paquetes computacionales [28].

Muchos autores han demostrado que, en general, no hay una relación entre dimensiones fractales en 2D (D_f) y en 3D, basándose en la dimensión Minkowski–Bouligand y en el contenido de las proyecciones en las direcciones de planos [35]. Sin embargo, se han

encontrado relaciones entre ambos en sistemas específicos, tales como nanopartículas de óxido de aluminio [36], asumiendo una distribución de masa uniforme a lo largo de la tercera dimensión:

$$D_{3D} = 0,47D_f + 1,78 \quad 3.10$$

3.2.3.2 Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

Mediante espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) asociado al microscopio de barrido (SEM) de emisión de campo ZEISS Ultra Plus se obtuvo información cualitativa y semicuantitativa sobre la composición elemental de las muestras.

3.2.3.3 Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se observaron utilizando un microscopio de transmisión de electrones (TEM) CM-12 Philips equipado con una cámara digital MEGA VIEW-II DOCU y operado a 120 kV con un aumento de 730.000×. Los materiales en polvo se colocaron sobre portamuestras de cobre (2.000 *mesh*) y las observaciones se realizaron en campo brillante. Además, las micrografías de transmisión de alta resolución (HTEM) se obtuvieron con un TEM - FE OMEGA Libra 200 operado a 200 kV con un aumento de 100.0000×. En este caso, las muestras se colocaron en portamuestras de carbono (2.000 *mesh*) y las observaciones se realizaron en un campo brillante. Para el análisis morfológico de las nanopartículas se utilizaron las micrografías TEM obtenidas con los microscopios anteriormente mencionados, mientras que las dimensiones de las nanopartículas se calcularon con el programa de procesamiento de imágenes ImageJ[®] 1.47v. A partir de las micrografías HTEM se realizó una reconstrucción del patrón de difracción de electrones aplicando la transformada de Fourier mediante el software de procesamiento de imágenes ImageJ[®] 1.47v.

3.2.3.4 Difracción de rayos X en polvo

Los espectros de difracción de rayos X (DRX) de las muestras fueron obtenidos utilizando un difractómetro Philips PW 1710 con radiación Cu Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) y un monocromador de grafito operado a 45 kV; 30 mA y 25 ° C. El tamaño medio de las

partículas cristalinas (δ) se calculó a partir de la ecuación de Scherrer utilizando el ancho a media altura del pico más intenso del patrón de difracción de cada muestra [37]:

$$\delta = \frac{0,939\lambda}{\beta \cos\theta} \quad 3.11$$

donde 0,939 es el valor de la función de forma, λ es la longitud de onda de la radiación incidente (Cu K α), β es la anchura integral del pico de difracción del plano (211) del espectro y θ es el ángulo de difracción. La fracción de fase cristalina (X_c) del polvo de HA se evaluó utilizando la siguiente ecuación [37]:

$$X_c = 1 - \frac{v_{112/300}}{I_{300}} \quad 3.12$$

donde I_{300} es la intensidad del pico de difracción del plano (300) y $v_{112/300}$ es la intensidad del hueco entre los picos de difracción de los planos (112) y (300) de la HA. Las incertidumbres estimadas fueron del 20 % aproximadamente.

3.2.3.5 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Las muestras se analizaron utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) marca Fourier Nicolet FT-IR Nexus 470. Previamente fueron secadas al vacío para evitar la presencia de agua adsorbida en el espectro, luego se mezclaron con polvo de KBr y se prensaron para formar un comprimido semitransparente.

3.2.3.6 Espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano

Para las medidas de espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) las muestras en polvo fueron previamente mortereadas; se colocaron dentro de recipientes con fondo plano para formar cilindros de 10 mm de diámetro y 5 mm de espesor. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro FTIR - NIR Nicolet iS50 (Thermo Scientific, Waltham,

MA, USA) y, además, para llevar a cabo las medidas de reflectancia difusa, se utilizó un accesorio denominado “esfera integradora”. Los espectros se midieron en atmósfera de aire y a temperatura ambiente. En el presente estudio la esfera integradora fue operada en la región reflectiva entre 1000 – 2500 nm, y para calibrar la línea de base se utilizó un estándar de difusión reflectiva de oro (99,9 % Reflectivo).

3.2.3.7 Potencial Zeta (ζ)

El potencial Zeta (ζ) de las partículas se midió con un equipo Malvern Zetasizer Nano (ZS90) con un láser de He-Ne ($\lambda = 633$ nm). Para realizar las medidas se colocaron 800 μ l de soluciones diluidas de los materiales en solución reguladora 1X PBS (pH 7,4) previamente sonicados en una celda capilar Zetasizer Nano Series DTS1070 (Malvern). El software de Malvern calcula el potencial ζ a partir de las movilidades electroforéticas (μ_E), utilizando la ecuación de Henry [38].

$$U_E = \frac{2\mathcal{E}zf(K_a)}{3\eta} \quad 3.16$$

donde U_E es la movilidad electroforética, \mathcal{E} es la constante dieléctrica, z es el potencial ζ , $f(K_a)$ es la función de Henry y η es la viscosidad.

3.2.4 Análisis estadístico de los datos

La significación estadística de los datos se evaluó utilizando t-test de Student y se consideraron significativos los valores por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) [39]. Los datos cuantitativos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) del conjunto de experimentos.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Optimización de las condiciones de síntesis

En primer lugar se realizó la puesta a punto de las condiciones de síntesis de los materiales con el objetivo de descartar residuos orgánicos mediante tratamiento térmico, pero al mismo tiempo conservar la estructura cristalina del producto. Las técnicas de espectroscopia FT-IR y DRX son métodos ampliamente utilizados para investigar los cambios estructurales y la estabilidad térmica de los materiales a base de fosfato de calcio [40].

El CTAB es un compuesto indeseado en materiales con aplicación biomédica ya que las membranas plasmáticas de las células son bicapas fosfolipídicas que al interactuar con tensioactivos se desestabilizan, rompen y conducen a la muerte celular. Más aún, uno de los productos de disociación del CTAB, el catión CTA^+ , tiene una acción catalítica que puede provocar la inactivación de la enzima ATP sintasa mitocondrial, que juega un rol fundamental en la respiración celular, inhibiendo la actividad metabólica y conduciendo a la muerte celular [41]. A los efectos de detectar la presencia de mencionado producto orgánico se analizaron los espectros de FT-IR, los cuales revelaron que únicamente los materiales que no fueron calcinados presentaron los modos vibracionales característicos de CTAB en 2849 y 2916 cm^{-1} [42]. En todos los espectros se observaron las bandas características de absorción de los grupos funcionales fosfato en 1036 (ν_3), 602 (ν_2), 563 (ν_4) y 470 (δ) cm^{-1} y los oxidrilos en 632 (ν_1) y 3572 (ν_3). Por último, las bandas anchas observadas en los espectros de los materiales sin calcinar a 1650 y 3440 cm^{-1} indican la presencia de agua adsorbida, dichas bandas son menos pronunciadas en los de los materiales calcinados debido a su evaporación (figura 3.6).

La identidad cristalográfica de los materiales se determinó con DRX; del análisis de los espectros se detectó que los materiales calcinados a 400 °C durante 3 h ajustan con los picos de difracción indexados en la base de datos JCPDS (“Joint Committee on Powder Diffraction Standards”) número 00-09-0432 para la HA hexagonal con la siguiente formulación química $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (figura 3.7 A). En cambio, los espectros de los materiales calcinados durante 6 h a 650 °C no ajustan con el de la HA hexagonal (figura 3.7 B), posiblemente debido a la formación de productos de descomposición generados por el calcinado ya que se ha informado que a altas temperaturas la HA se descompone dando impurezas de óxidos de

calcio, fosfato tricálcico alfa (α -TCP) y beta (β -TCP) de acuerdo con la siguiente ecuación química [43], [44]:

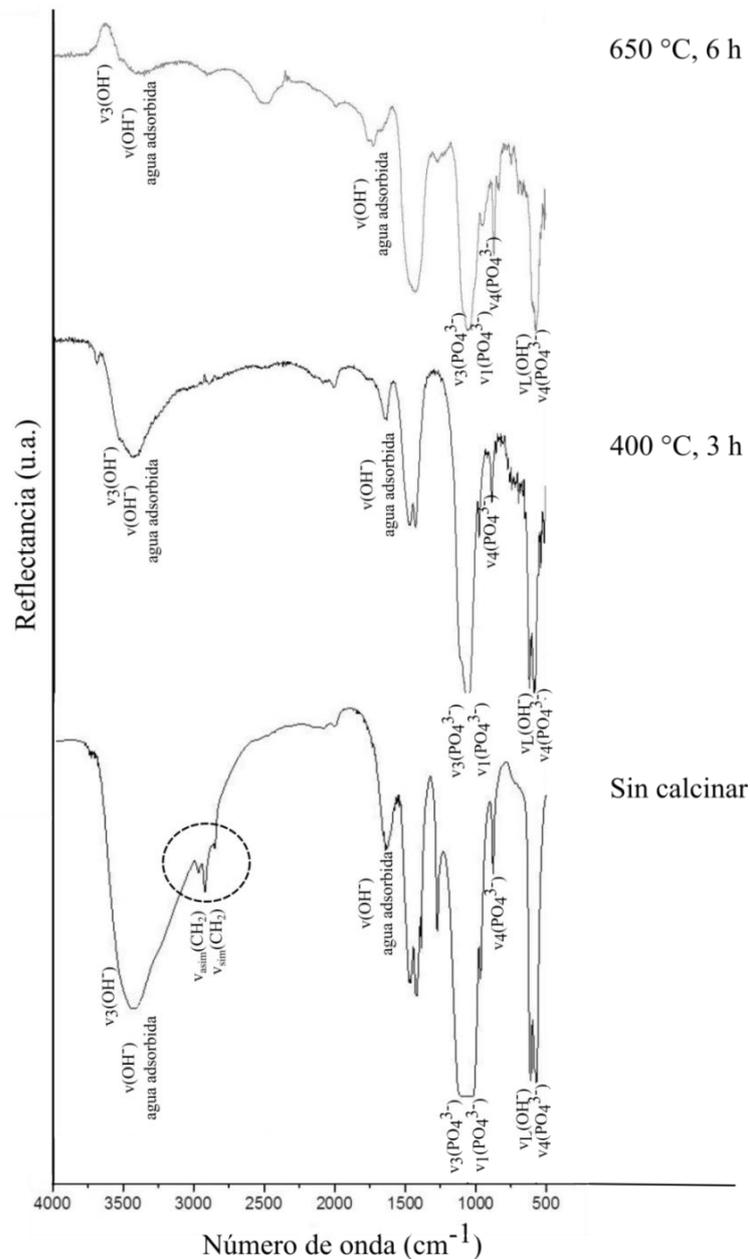
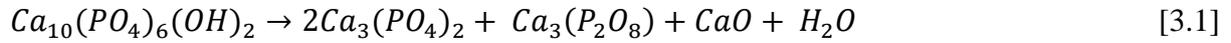


Figura 3.6: Espectros de FT-IR del material MI. El círculo punteado indica la zona en donde se encuentran los modos vibracionales ν_1 y ν_3 del CTAB en 2849 y 2916 cm^{-1} respectivamente. ν_1 : estiramiento simétrico; ν_2 : flexión simétrica; ν_3 : estiramiento asimétrico, ν_4 : flexión asimétrica, ν_L : modo libracional.

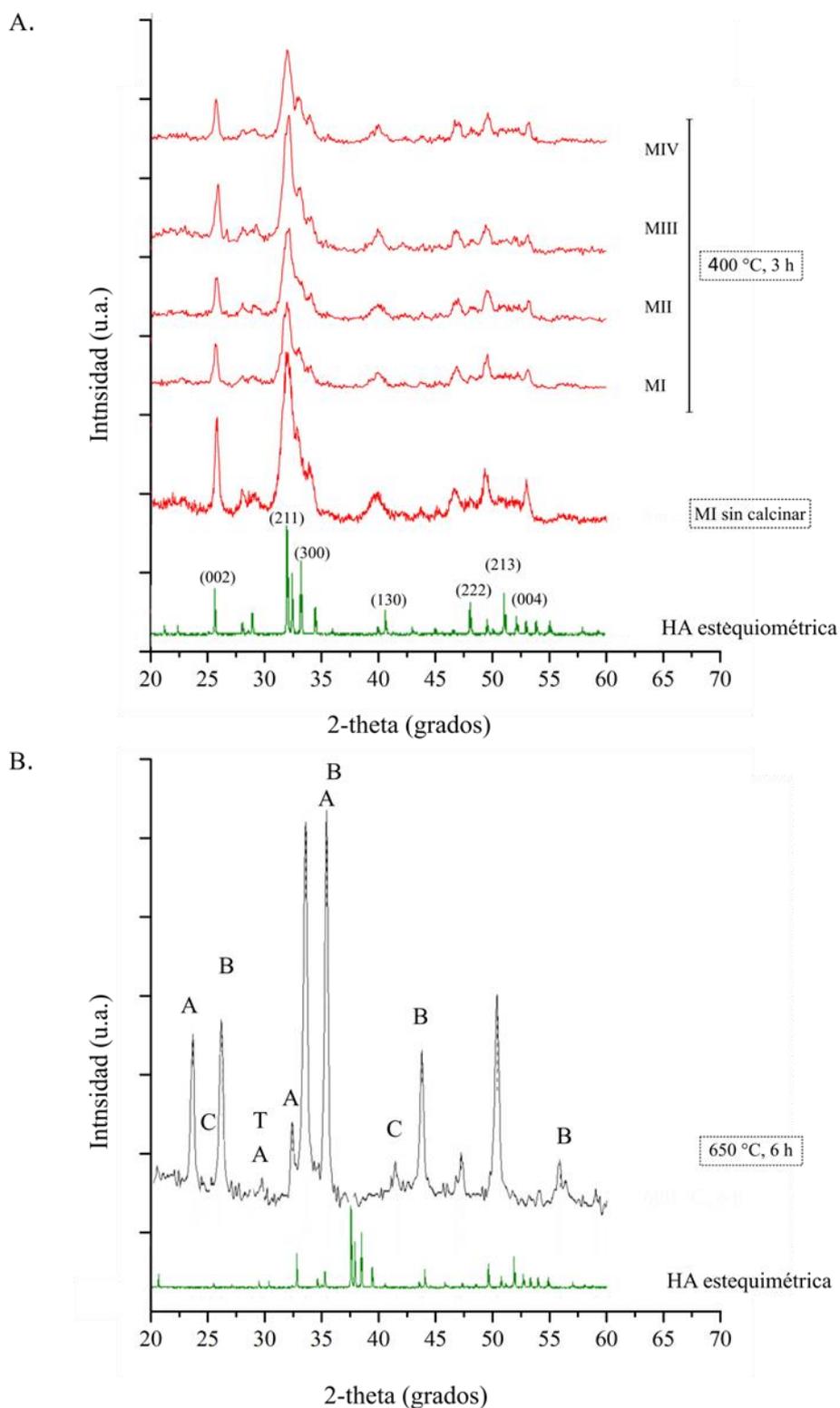


Figura 3.7: (A) Espectros de DRX de los materiales MI, MII, MIII y MIV (calcinaados a 400 y °C por 3 h) y MI sin calcinar. (B) Espectro de DRX del material calcinado durante 6 h a 650 °C. Los espectros se compararon con los principales picos de difracción de la HA estequiometrica de estructura hexagonal (nro. 00-09-0432 base de datos JCPDS) y con otros fosfatos de calcio: α -TCP (A), β -TCP (B), CaO (C) y fosfato tetracálcico (TTCP).

Los espectros de DRX y FT-IR demostraron que la filtración y posterior calcinación de los materiales a 400 °C durante 3 h fueron condiciones suficientes para eliminar los residuos orgánicos indeseados de la síntesis y al mismo tiempo permitió que se mantenga la estructura cristalina hexagonal de la HA, por lo que los materiales con mencionado tratamiento térmico fueron seleccionados para continuar con los estudios de caracterización.

3.3.2 Caracterización fisicoquímica de nanomateriales de HA

Como se mostró en la sección anterior, la naturaleza química y cristalográfica determinadas mediante el análisis de los espectros de FT-IR y DRX de los materiales coincide con la HA hexagonal.

A continuación se estudió la nanomorfología de los materiales mediante microscopia TEM, para ellos se diluyeron en etanol y se sonicaron para observar las partículas individuales. En las micrografías se encontró que están compuestos por partículas uniformes con forma de rodillos, alargadas y de bordes redondeados (Figura 3.8). La medición de los tamaños de las partículas en su eje longitudinal permitieron determinar que únicamente el material MIV difiere con respecto al resto significativamente, debido a su mayor dispersión en la distribución de tamaño; sin embargo los diámetros de las nanopartículas en todos los materiales son similares. Los tamaños de partícula aproximados obtenidos utilizando los espectros de DRX aplicando la ecuación de Scherrer fueron menores que los medidos utilizando las micrografías (tabla 1.1), lo que podría tener dos causas probables, la interferencias en los cálculos debidas al factor instrumental [45] y la suposición de partículas esféricas con cristales de simetría cúbica [46].

Las muestras control, a las que no se les agregó polímero durante la síntesis, dieron como producto final partículas individuales de mayor tamaño (entre 70 y 150 nm de longitud y 15 a 20 nm de diámetro), coincidiendo con los resultados obtenidos por otros grupos de investigación [5], [47]. Como se esperaba, la presencia de las moléculas poliméricas causó una reducción en las dimensiones de las nanopartículas en aproximadamente un 30 %.

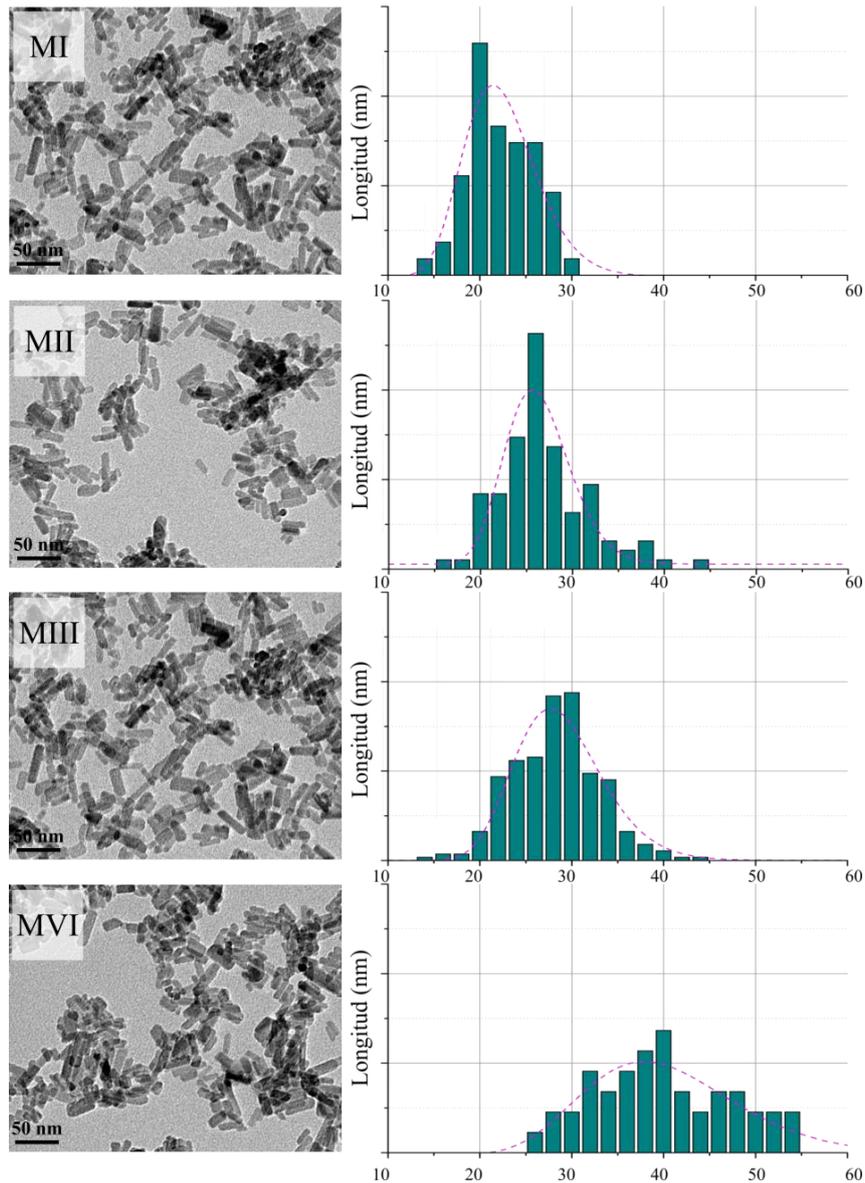


Figura 3.8: Micrografías TEM de los materiales MI, MII, MIII y MIV. Los histogramas muestran la distribución de tamaño en el eje longitudinal de las nanopartículas.

Tabla 1.1: Características de las nanopartículas en cada material obtenidas por TEM y DRX.

	MI	II	MIII	MIV
Microscopía TEM				
Longitud (nm)	$21,59 \pm 4,21$	$25,69 \pm 5,13$	$28,2 \pm 5,32$	$40,73 \pm 7,98$
Diámetro (nm)	$7,9 \pm 0,7$	$8,9 \pm 0,5$	$8,1 \pm 0,8$	$8 \pm 1,02$
Ecuación de Scherrer, δ				
Tamaño promedio (nm)	$13,0 \pm 3,0$	$8,4 \pm 2,5$	$10,4 \pm 3,1$	$8,9 \pm 1,5$
Porcentaje de cristalinidad, X_c (%)				
	$71,83 \pm 6,12$	$62,63 \pm 2,29$	$53,72 \pm 3,91$	$55,43 \pm 3,82$

Las micrografías HTEM permitieron identificar los planos cristalinos de las nanopartículas, y aplicando la transformada de Fourier a las imágenes se pudo observar el patrón hexagonal del cristal (Figura 3.9) [48]. Las distancias entre los planos cristalinos a lo largo del eje de elongación fueron de 0,358 nm y a lo largo del diámetro de 0,425 nm, dimensiones similares a las distancias interplanares de los planos (002) y (110) del cristal de HA respectivamente [37]. Por lo general, las partículas de HA estequiométrica crecen en dirección [001] sobre el eje “c” del cristal [49]. Esto coincide con lo observado en las micrografías de HTEM, ya que el plano cristalino del eje de elongación (002) es paralelo al plano (001).

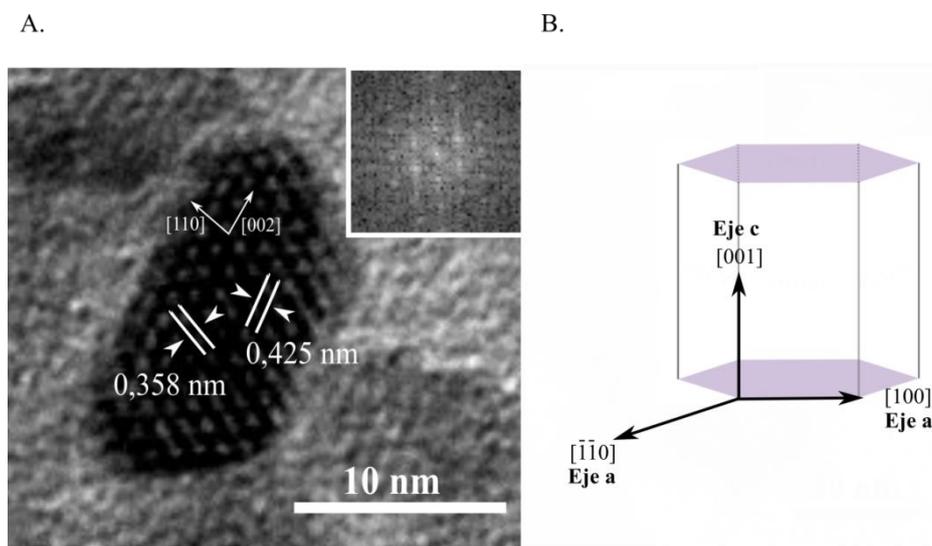


Figura 3.9: (A) Micrografía HTEM de una nanopartícula de HA del material MI en la que se observa los planos cristalinos. En el recuadro de las esquinas se muestran las difracciones de electrones del área selecta extraído por transformada de Fourier mediante procesamiento de imágenes utilizando el software ImageJ[®]. (B) Esquema de un cristal hexagonal en el cual se indican los ejes de simetría y direcciones de los planos utilizando la nomenclatura de los índices de Miller.

El porcentaje de cristalinidad aproximado se calculó utilizando la ecuación 3.12, que considera que el cristal de HA es más cristalino mientras más separados estén los picos de difracción (112) y (300) en los espectros de DRX. Considerando el porcentaje de cristalinidad se obtuvo el siguiente orden: MI > MII > MIII = MVI (tabla 1.1).

Por último, la microestructura de la superficie de los materiales y la composición elemental de las muestras se evaluó mediante micrografías SEM y EDX, respectivamente (figura 3.10). Los resultados revelaron que únicamente el material MIII presenta una

relaciones Ca/P similar a las del hueso cortical ($1,63 \pm 0,2$) y trabecular ($1,5 \pm 0,2$) [50]. El resto de los materiales poseen un exceso de calcio en su composición respecto a la HA estequiométrica, posiblemente debido a la presencia de óxidos de calcio como CaO y $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [51].

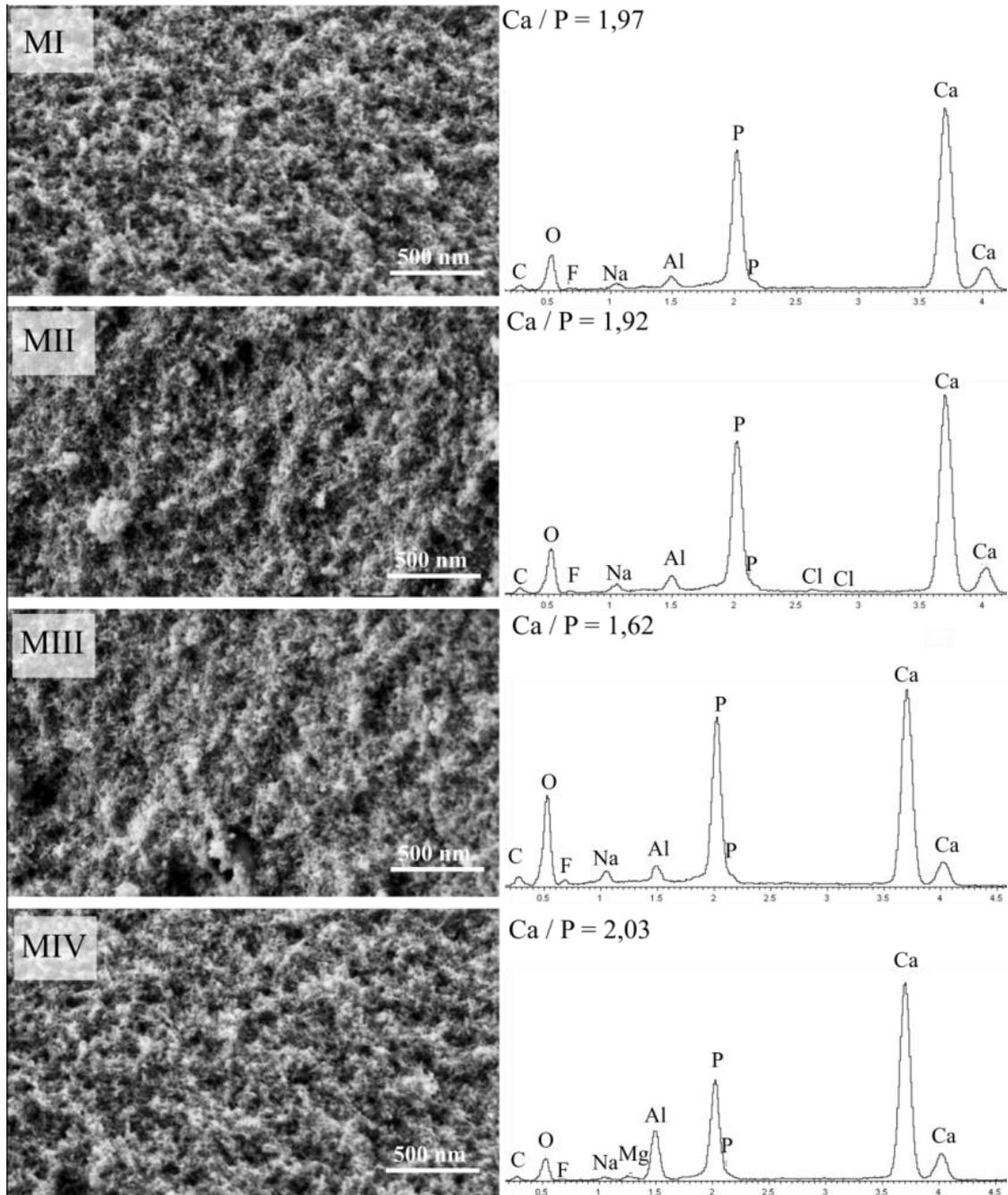


Figura 3.10: Determinación de la microestructura y microanálisis (SEM-EDX) de los materiales MI, MII, MIII y MIV en donde se observa la composición elemental de cada muestra. Esta información fue utilizada para calcular la relación molar de calcio respecto al fósforo (Ca/P).

3.3.3 Nucleación y crecimiento de los cristales de HA

Se propone que durante la síntesis los cristales se nuclearon sobre la superficie de las micelas cilíndricas autoagregadas formadas por CTAB mediante el mecanismo previamente descrito por Wang y col. [47]. En solución acuosa el CTAB se ioniza completamente en su catión con estructura tetraédrica, el CTA^+ . Los aniones fosfato (PO_4^{3-}) también tienen estructura tetraédrica, por lo que los cationes CTA^+ pueden interactuar favorablemente con los aniones PO_4^{3-} complementándose entre sí de manera estérica y electrostática [47]. Según el mecanismo de Wang y col. el proceso que podría estar teniendo lugar es que los iones PO_4^{3-} reemplacen los iones Br^- de las micelas de CTAB y luego los cationes Ca^{2+} estarían siendo atraídos mediante un mecanismo denominado “reconocimiento molecular” (figura 3.11 A).

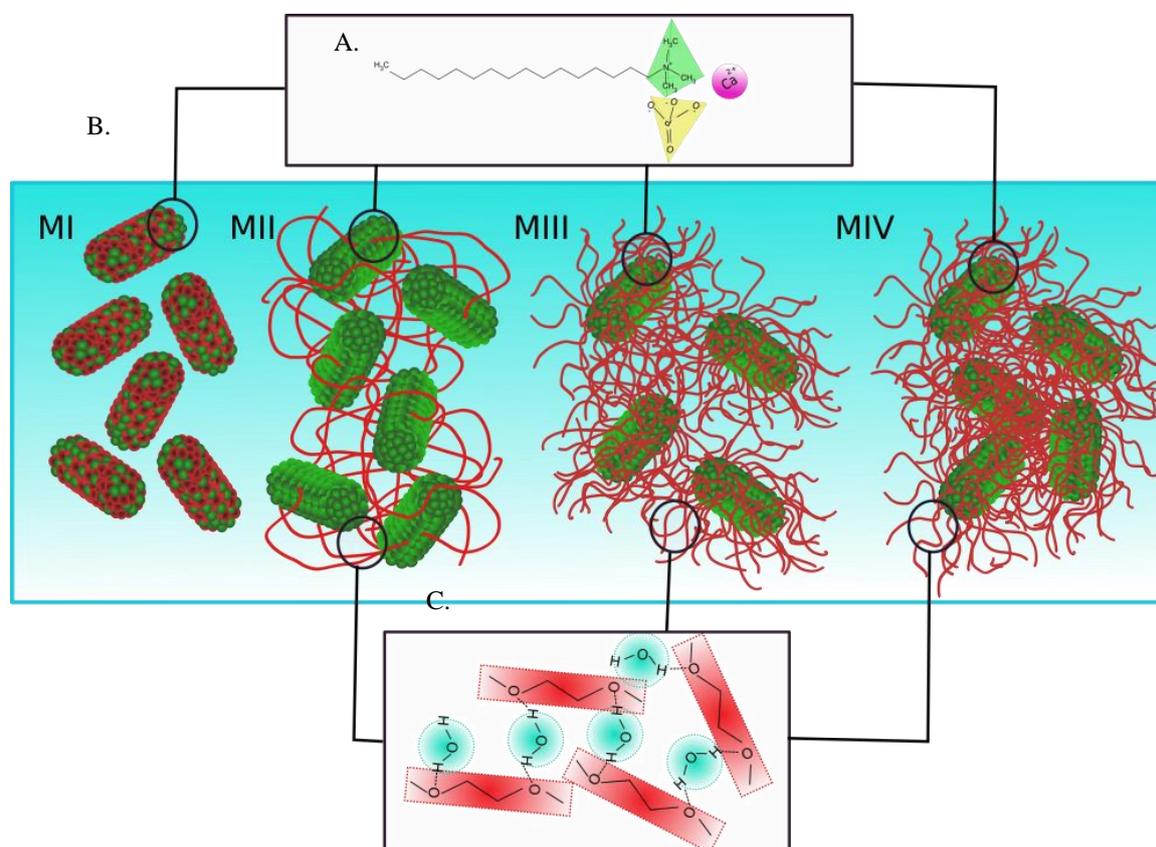


Figura 3.11: (A) Representación esquemática de los iones CTA^+ , Ca^{2+} y PO_4^{3-} . (B) Interacción de los polímeros con CTAB para la obtención de los diferentes materiales e (C) interacción entre las cadenas poliméricas hidrofílicas en medio acuoso.

3.3.4 Sistemas de plantillas CTAB – polímeros

Una considerable cantidad de literatura científica ha sido publicada en base al estudio de sistemas CTAB – polímero y su interacción en solución, especialmente el sistema CTAB - PPG [52]–[58], utilizado para la síntesis del material MI. Se ha determinado que las moléculas de PPG, que se caracterizan por ser hidrofóbicas y con baja solubilidad en agua, interactúan fuertemente en solución acuosa con las moléculas de CTAB para formar micelas mixtas CTAB/PPG a una concentración total en solución mayor a 7,0 – 8,8 mM (figura 3.11 B, MI) [53], [59]. En contraste, el homopolímero PEG es hidrofílico y se envuelve alrededor de la superficie externa de la micela de CTAB, formando bucles en el agua circundante [53] (figura 3.11 B, MII). Además, la presencia de las moléculas de PEG (CTAB/PEG ~ 1/51) genera un incremento en la CMC característica del CTAB a 0,11 mM [58].

Por otro lado, el copolímero tribloque PEG-PPG-PEG y el polímero IGEPAL® CA 630 están formados por segmentos hidrosolubles y otros liposolubles. Además, ambos polímeros forman mezclas de agregados en las condiciones de síntesis (CTAB/PEG–PPG–PEG ~ 1/7; CTAB/IGEPAL® CA 630 ~ 1/32) [60]; en este caso las cadenas poliméricas podrían estar formando puentes sobre diferentes dominios de la molécula [61] y además formar agregados cuando toman contacto con el agua (figura 3.11 B, MIII y MIV)

Como se muestra en el esquema 3.11 C, los sistemas micelares CTAB/PEG–PPG–PEG y CTAB/IGEPAL® CA 630 presentan cadenas de óxido de polietileno (PEO) que sobresalen por fuera de los agregados. La presencia de las cadenas de PEO da lugar a la formación del modelo de collar entre las micelas y los bloques del polímero entrecruzados [62]. Tasaki y col. [52], [58] desarrollaron una simulación de la dinámica molecular del PEG con 15 unidades de óxido de etileno (OE) en solución acuosa, revelando una estructura compleja de hidratación de PEG en agua. Una molécula simple de agua ubicada cada 2 unidades de OE actúa como un puente entre las cadenas de PEG y se propone que ocurre un comportamiento similar durante la síntesis de los materiales obtenidos. Las investigaciones realizadas por Tasaki y col. [52] demostraron que estos puentes se encuentran presentes incluso cerca de los 100 °C, lo que permite suponer que la organización estructural del polímero entre las micelas de CTAB persiste aún durante el tratamiento hidrotérmico al cual fueron sometidas las muestras.

En la síntesis hidrotermal utilizada las partículas tienen una restricción en su crecimiento mediada por la superficie de las micelas. Como resultado de estas interacciones,

la longitud de los nanorodillos de HA no excede los 47 nm correspondientes a la longitud de las micelas cilíndricas de CTAB formados bajo las condiciones de síntesis [5]. En las micrografías SEM no se observaron estructuras bicontinuas, solo una asociación de las nanopartículas de HA, lo que significa que no se mineralizó el polímero durante la formación del material y que la deposición de HA se encuentra restringida a la superficie de las micelas. Sin embargo la morfología de la superficie de los materiales es diferente dependiendo del polímero utilizado. El crecimiento anisotrópico de los cristales puede ser explicado por las interacciones específicas que tiene lugar utilizando cada uno de los polímero [63]. La adsorción de estos aditivos en caras particulares del cristal puede inhibir su crecimiento mediante la reducción de la energía superficial [63]. Además, el potencial de la interacción intermicelar puede ser modificado eficazmente por la cadenas de polímeros, tanto cuando forma puentes entre las micelas individuales como cuando se encuentran solo a su alrededor, generando las distancias entre las micelas se vean alteradas y, consecuentemente, se modifique la superficie y la porosidad del material.

3.3.5 Análisis de la rugosidad

Mediante inspección visual de las micrografías SEM todos los materiales tienen aspecto de red nanoestructurada (figura 3.12), sin embargo un análisis riguroso de las micrografías digitalizadas obtenidas demostró que los parámetros de rugosidad difieren ligeramente (tabla 1.2 y figura 3.12).

Tabla 1.2: Parámetros de rugosidad de los materiales.

	MI	MII	MIII	MIV
R_a (nm)	119,75	109,40	97,03	78,56
R_q (nm)	174,85	167,11	157,35	141,53
R_{sw}	1,45	1,52	1,61	1,78
R_{ku}	2,12	2,32	2,62	3,24
D_f	1,832	1,855	1,868	1,906
D_{3D}	2,64	2,65	2,66	2,68

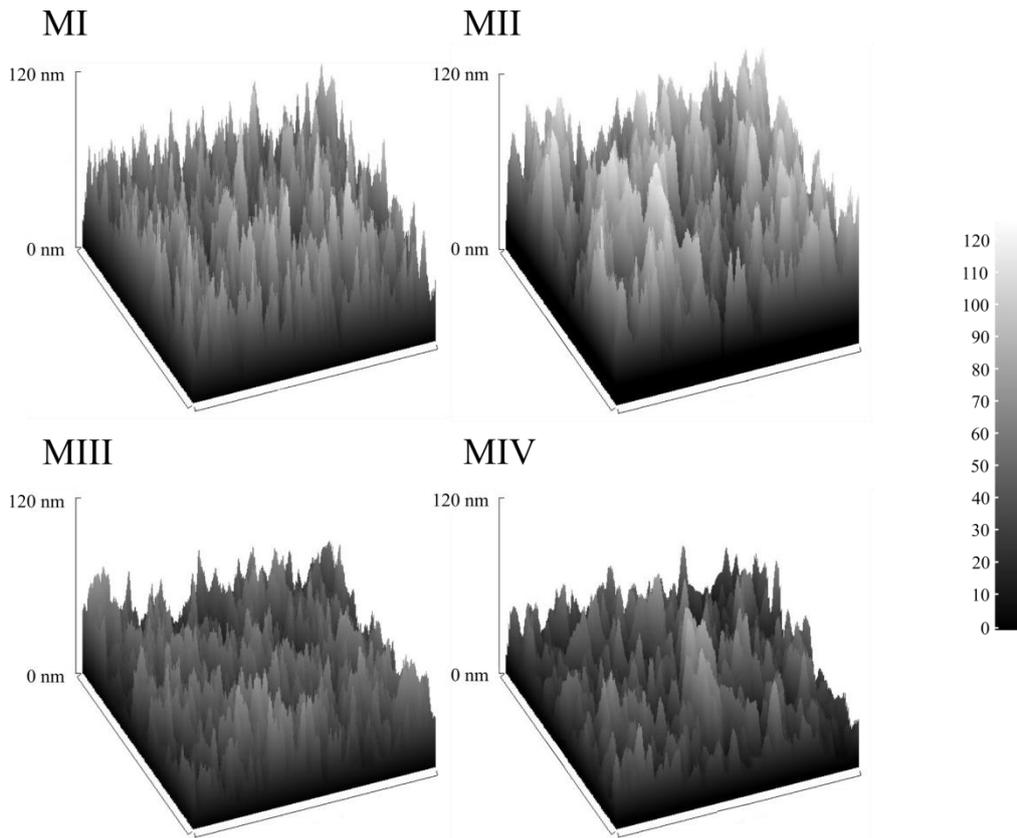


Figura 3.12: Reconstrucción topográfica 3D de los materiales.

Desde MI hasta MIV se pudo observar una disminución de la rugosidad media (R_a) y a su vez un aumento gradual en el valor de D_{3D} . Respecto al parámetro de asimetría, todos los materiales tienen un valor de R_{sw} positivo, característico de los perfiles donde predominan los picos sobre los valles, lo que les otorga mayor resistencia a la cizalladura [21]. En cuanto a el parámetro de escarpadura, en los materiales MI, MII y MIII se observa una distribución platicúrtica ($R_{ku} < 3$), característica de perfiles con escasos picos agudos. Por el contrario, la distribución de la curva del material MIV es leptocúrtica ($R_{ku} > 3$), donde predominan los picos agudos. Este parámetro resulta sumamente útil a la hora de analizar la topografía de implantes ya que la presencia de gran cantidad de picos agudos en la superficie del biomaterial genera un aumento en la concentración de tensiones en la interfase hueso – implante, lo que conlleva a la resorción ósea [21], [64]–[66], por lo tanto se esperarán mejores respuestas en superficies con valores de R_{ku} menores a 3.

Del análisis de los parámetros de rugosidad y la interacción CTAB – polímero se observa que los materiales MI y MII, sintetizados utilizando los homopolímeros PPG y PEG

respectivamente, tienen una topografía más irregular, mientras que los materiales MIII y MIV, preparados con copolímeros dibloque PEG-PPG-PEG e IGEPAL[®] CA 630 respectivamente, mostraron superficies menos irregulares. Las moléculas de PEG-PPG-PEG e IGEPAL[®] CA 630 tienen fracciones hidrofílicas e hidrofóbicas y forman mezclas de agregados en presencia de CTAB (figura 3.11 B MIII y MIV) [53]. En cambio, los homopolímeros PPG y PEG son completamente hidrofílicas o hidrofóbicas y se ubican totalmente por fuera o por dentro de los agregados de CTAB, a excepción de los dos grupos terminales –OH que se ubican entre las regiones polares de las moléculas del surfactante (figura 3.11 A MI y MII). En estos dos sistemas, la conexión de los agregados micelares disminuye al igual que el efecto estructural. En consecuencia, la habilidad del PEG y del PPG de unir las micelas formando un arreglado denso determina la topografía final del material inorgánico. Distinto es el caso de los polímeros IGEPAL[®] CA 630 y de PEG–PPG–PEG en donde sus regiones hidrofóbicas se ubican dentro de la mezcla de agregados de CTAB. Mientras que por fuera, en contacto con el agua, se ubican las cadenas hidrofílicas, una cadena de PEG con 7 unidades de óxido de etileno (OE) y dos con 3 unidades de OE, en IGEPAL[®] CA 630 y PEG-PPG-PEG respectivamente. Las partes sobresalientes de los polímeros interactúan a través de enlaces de hidrógeno [52] y enlazan, a su vez, agregados de CTAB en una especie de red estructurada compacta.

3.3.6 Carga superficial

Como se hizo mención en el capítulo 1 sección 1.3.2, tanto la afinidad por el agua como la carga superficial de los biomateriales son propiedades que influyen en el tipo y conformación de las proteínas que se adhieren [67]. Particularmente, la carga superficial es una característica que toma protagonismo en el primer contacto de la superficie del implante con las proteínas del plasma sanguíneo, impactando en la cascada de señales que inician la coagulación [68], mecanismo que se desencadena para detener la hemorragia en el momento de la implantación. Se ahondará sobre la influencia de la carga superficial en el proceso de coagulación en el capítulo 9 de la presente disertación.

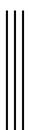
Algunos investigadores afirman que el punto isoeléctrico de la HA se encuentra por debajo de $\text{pH} = 6$, por lo que su carga neta es negativa en soluciones neutras y alcalinas, pH entre 6 y 11,7 respectivamente, ya que los grupos fosfatos quedan expuestos en la superficie (figura 3.11) [69]. Estos resultados concuerdan con las medidas de potencial ζ de carga

superficial del material MI en condiciones fisiológicas (37 °C y pH = 7,4) la cual es ligeramente negativa ($-11,02 \pm 1,90$ mV). De todas maneras es sabido que la carga superficial de la HA es muy dependiente de la composición y método de preparación químico [70] lo que justifica las cargas de los materiales MII ($-3,77 \pm 0,66$ mV), MIII ($6,68 \pm 0,15$ mV) y MIV ($4,76 \pm 1,90$ mV), considerados aproximadamente neutrales por poseer valores de potencial ζ entre 10 mV y -10 mV [71].

3.3.7 Afinidad por el agua

Otra de las características superficiales que se evaluó fue la hidrofiliidad de los materiales, a partir de los espectros de NIRS y el análisis de los patrones de bandas correspondientes a las moléculas de agua adsorbidas en sus superficies (figura 3.12). En los espectros NIRS se observan pequeñas bandas de adsorción a 1380 nm y 1880 nm las cuales pueden ser asignadas a una combinación de modos vibracionales de estiramientos simétricos y asimétricos ($\nu_1 + \nu_3$) de agua poco estructurada (LHBW) [72]. También se observaron bandas anchas centradas en 1420 - 1450 nm y 1920 nm que corresponden a los modos vibracionales ($\nu_1 + \nu_3$) y a la combinación de flexión y estiramiento asimétrico ($\nu_2 + \nu_3$) de agua de estructuración intermedia (IHBW). Finalmente, se observa una banda ancha de menor intensidad a 2200 nm, similar a los modos vibracionales ($\nu_1 + \nu_3$) del hielo, por lo que se asocia con agua altamente estructurada (HHBW) [72].

En términos generales, los cuatro espectros mostraron un patrón similar de bandas atribuidas a diferentes estados de las moléculas de agua adsorbidas físicamente sobre los materiales, por lo tanto es posible afirmar que todos ellos son hidrofílicos.



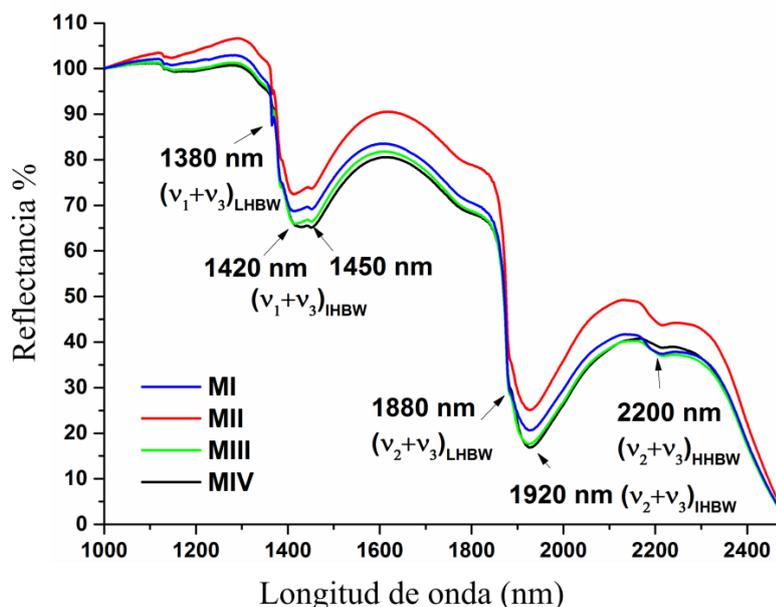


Figura 3.12: Espectros NIRS de los materiales en donde se pueden observar los modos vibracionales de las moléculas de agua adsorbidas sobre ellos. v_1 : estiramiento simétrico; v_2 : flexión; v_3 : estiramiento asimétrico; LHBW: del inglés “less hydrogen bonded water” asociación de agua con menos hidrógenos; IHBW: del inglés “intermediate hydrogen bonded water” asociación de agua con número intermedio de hidrógenos; HHBW: del inglés “high hydrogen bonded water” agua asociada con alta cantidad de hidrógenos.

3.4 Conclusión

A partir de la exhaustiva caracterización de los materiales obtenidos se ha concluido que los mismos presentaron una composición química y cristalina, morfología y tamaño similar a la apatita biológica.

De forma análoga a lo que ocurre en la naturaleza durante la mineralización dirigida por las fibrillas de colágeno y demás proteínas no colágenas, donde polímeros solubles actúan como unidades de restricción cristalina y ejercen un control exquisito de la morfología mineral, se utilizaron diferentes plantillas compuestas por redes formadas por micelas de CTAB y distintos polímeros a fin de manipular la nano- y micro-rugosidad de la superficie de los materiales. Las distancias entre los nanorodillos de HA generadas por las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de los polímeros ubicados sobre y entre los agregados micelares dieron como resultado materiales con topografías y cargas superficiales diferentes. Respecto a la rugosidad, el material MI es el de menor coeficiente de escarpadura, lo que representa una presencia reducida de picos agudos, que significan menores zonas de tensión en la

interfase hueso – material si se lo aplicara potencialmente como implante; además es el único con carga superficial ligeramente negativa.

Los resultados obtenidos son el punto de partida para el entendimiento de la interacción de los materiales preparados con diferentes sistemas biológicos que se detallarán en los capítulos siguientes del presente trabajo de investigación.

3.1 Referencias bibliográficas

- [1] Y. Cai, Y. Liu, W. Yan, Q. Hu, J. Tao, M. Zhang, Z. Shi, and R. Tang, “Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation,” *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 36, pp. 3780–3787, 2007.
- [2] S. C. Howard and V. S. J. Craig, “Adsorption of the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide to silica in the presence of sodium salicylate: surface excess and kinetics,” *Langmuir*, vol. 25, no. 22, pp. 13015–13024, 2009.
- [3] R. B. Dorshow, J. Briggs, C. a Bunton, and D. F. Nicoli, “Dynamic light scattering from cetyltrimethylammonium bromide micelles. Intermicellar interactions at low ionic strengths,” *J. Phys. Chem.*, vol. 86, no. 19, pp. 2388–2395, 1982.
- [4] C. Gamboa, H. Ríos, and L. Sepúlveda, “Effect of the nature of counterions on the sphere-to-rod transition in cetyltrimethylammonium micelles,” *J. Phys. Chem.*, vol. 93, no. 14, pp. 5540–5543, 1989.
- [5] T. Imae and S. Ikeda, “Sphere-rod transition of micelles of tetradecyltrimethylammonium halides in aqueous sodium halide solutions and flexibility and entanglement of long rodlike micelles,” *J. Phys. Chem.*, vol. 90, no. 21, pp. 5216–5223, 1986.
- [6] Y. Liu, W. Wang, Y. Zhan, C. Zheng, and G. Wang, “A simple route to hydroxyapatite nanofibers,” *Mater. Lett.*, vol. 56, no. 4, pp. 496–501, 2002.
- [7] N. M. Alves, I. B. Leonor, H. S. Azevedo, R. L. Reis, J. F. Mano, A. I. Rodrigues, and R. L. Reis, “Designing biomaterials based on biomineralization for bone repair and regeneration,” in *Biomineralization and Biomaterials: Fundamentals and Applications*, vol. 20, no. 15, Woodhead Publishing, 2015, pp. 377–404.
- [8] Y. Fujishiro, H. Yabuki, K. Kawamura, T. Sato, and A. Okuwaki, “Preparation of needle-like hydroxyapatite by homogeneous precipitation under hydrothermal

- conditions.," J. Chem. Technol. Biotechnol., vol. 57, no. 4, pp. 349–353, 1993.
- [9] D. A. Herold, K. Keil, and D. E. Bruns, "Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase," Biochem. Pharmacol., vol. 38, no. 1, pp. 73–76, 1989.
- [10] Y. Liu, D. Hou, and G. Wang, "A simple wet chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods," Mater. Chem. Phys., vol. 86, no. 1, pp. 69–73, 2004.
- [11] C. Qiu, X. Xiao, and R. Liu, "Biomimetic synthesis of spherical nano-hydroxyapatite in the presence of polyethylene glycol," Ceram. Int., vol. 34, no. 7, pp. 1747–1751, 2008.
- [12] R. Contreras-Caceres, C. Dawson, P. Formanek, D. Fischer, F. Simon, A. Janke, P. Uhlmann, and M. Stamm, "Polymers as templates for Au and Au@Ag bimetallic nanorods: UV–Vis and surface enhanced Raman spectroscopy," Chem. Mater., vol. 25, no. 2, pp. 158–169, 2013.
- [13] F. B. Gebretsadik, P. Salagre, and Y. Cesteros, "Use of polymer as template in microwave synthesis of saponite. Study of several factors of influence," Appl. Clay Sci., vol. 87, pp. 170–178, 2014.
- [14] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, "Image processing with ImageJ Part II," Biophotonics Int., vol. 11, no. 7, pp. 36–43, 2005.
- [15] G. Chinga, "Structural studies of LWC paper coating layers using SEM and image analysis techniques," Norwegian University of Science and Technology, 2002.
- [16] D. Chappard, "Image analysis measurements of roughness by texture and fractal analysis correlate with contact profilometry," Biomaterials, vol. 24, no. 8, pp. 1399–1407, Apr. 2003.
- [17] "Roughness (2D) parameter," Olympus, 2016. [Online]. Available: http://www.olympus-ims.com/en/knowledge/metrology/roughness/2d_parameter/.
- [18] E. S. Gadelmawla, M. M. Koura, T. M. A. Maksoud, I. M. Elewa, and H. H. Soliman, "Roughness parameters," J. Mater. Process. Technol., vol. 123, no. 1, pp. 133–145, 2002.
- [19] A. B. Meireles, F. de S. Bastos, T. P. Cornacchia, J. A. Ferreira, and E. B. de Las Casas, "Enamel wear characterization based on a skewness and kurtosis surface roughness evaluation," Biotribology, vol. 1–2, pp. 35–41, 2015.
- [20] M. Müller, F. F. Hennig, T. Hothorn, and R. Stangl, "Bone–implant interface shear modulus and ultimate stress in a transcortical rabbit model of open-pore Ti6Al4V implants," J. Biomech., vol. 39, no. 11, pp. 2123–2132, 2006.
- [21] K. N. Hansson and S. Hansson, "Skewness and Kurtosis: Important Parameters in the

- Characterization of Dental Implant Surface Roughness—A Computer Simulation,” *ISRN Mater. Sci.*, vol. 2011, pp. 1–6, 2011.
- [22] N. Tayebi and A. A. Polycarpou, “Modeling the effect of skewness and kurtosis on the static friction coefficient of rough surfaces,” *Tribol. Int.*, vol. 37, no. 6, pp. 491–505, 2004.
- [23] C. A. Simmons and J. A. Hipp, “Method-based differences in the automated analysis of the three-dimensional morphology of trabecular bone,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 942–947, 1997.
- [24] T. J. Haire, R. Hodgkinson, P. S. Ganney, and C. M. Langton, “A comparison of porosity, fabric and fractal dimension as predictors of the Young’s modulus of equine cancellous bone,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 20, no. 8, pp. 588–593, 1998.
- [25] T. Suganuma, “Measurement of surface topography using SEM with two secondary electron detectors,” *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, vol. 34, no. 4, pp. 328–337, 1985.
- [26] H. Sato and M. O-hori, “Surface roughness measurement using scanning electron microscope with digital processing,” *J. Manuf. Sci. Eng.*, vol. 109, no. 2, pp. 106–111, 1987.
- [27] B. Bhushan, *Principles and applications of tribology*. John Wiley & Sons, 2013.
- [28] N. Ibaseta and B. Biscans, “Fractal dimension of fumed silica: Comparison of light scattering and electron microscope methods,” *Powder Technol.*, vol. 203, no. 2, pp. 206–210, 2010.
- [29] E. Sancaktar and R. Gomatam, “A study on the effects of surface roughness on the strength of single lap joints,” *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 15, no. 1, pp. 97–117, 2001.
- [30] K. J. Stout, “Surface roughness: Measurement, interpretation and significance of data,” *Mater. Des.*, vol. 2, no. 6, pp. 287–295, 1981.
- [31] Rubert & Co Ltd, “The Home Of Surface Measurement,” 2016. [Online]. Available: <http://www.rubert.co.uk/faqs/roughness-parameters/>.
- [32] N. Hassan, A. Soltero, D. Pozzo, P. V. Messina, and J. M. Ruso, “Bioinspired templates for the synthesis of silica nanostructures,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 37, pp. 9553–9562, 2012.
- [33] K. Foroutan-pour, P. Dutilleul, and D. . Smith, “Advances in the implementation of the box-counting method of fractal dimension estimation,” *Appl. Math. Comput.*, vol. 105, no. 2–3, pp. 195–210, 1999.
- [34] S. Bau, O. Witschger, F. Gensdarmes, O. Rastoix, and D. Thomas, “A TEM-based method as an alternative to the BET method for measuring off-line the specific surface

- area of nanoaerosols,” *Powder Technol.*, vol. 200, no. 3, pp. 190–201, 2010.
- [35] H. Akkari, I. Bhourri, P. Dubois, and M. H. Bedoui, “On the Relations Between 2D and 3D Fractal Dimensions: Theoretical Approach and Clinical Application in Bone Imaging,” *Math. Model. Nat. Phenom.*, vol. 3, no. 6, pp. 48–75, 2008.
- [36] S. Ganguly, S. Basu, and S. Sikdar, “Determination of the aggregate fractal dimensions in colloidal nanofluids,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part N J. Nanoeng. Nanosyst.*, vol. 226, no. 1, pp. 3–7, 2012.
- [37] S. K. Padmanabhan, A. Balakrishnan, M. C. Chu, Y. J. Lee, T. N. Kim, and S. J. Cho, “Sol-gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods,” *Particuology*, vol. 7, no. 6, pp. 466–470, 2009.
- [38] R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science*. Elsevier, 1981.
- [39] G. W. Snedegor and W. G. Cochran, *Statistical methods*, no. 6. Ames: Iowa State University Press, 1967.
- [40] A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, and C. Paluszkiwicz, “FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods,” *J. Mol. Struct.*, vol. 744, pp. 657–661, 2005.
- [41] M. J. Datile, E. A. Johnson, and R. E. McCarty, “Inhibition of the ATPase activity of the catalytic portion of ATP synthases by cationic amphiphiles,” *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1777, no. 4, pp. 362–368, 2008.
- [42] Z. Sui, X. Chen, L. Wang, Y. Chai, C. Yang, and J. Zhao, “An improved approach for synthesis of positively charged silver nanoparticles,” *Chem. Lett.*, vol. 34, no. 1, pp. 100–101, 2005.
- [43] W. J. Shih, M. C. Wang, and M. H. Hon, “Morphology and crystallinity of the nanosized hydroxyapatite synthesized by hydrolysis using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) as a surfactant,” *J. Cryst. Growth*, vol. 275, no. 1–2, pp. 2339–2344, 2005.
- [44] J. Barralet, J. C. Knowles, S. Best, and W. Bonfield, “Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 6, pp. 529–533, 2002.
- [45] S. N. Danilchenko, O. G. Kukharenko, C. Moseke, I. Y. Protsenko, L. F. Sukhodub, and B. Sulcio-Cleff, “Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening,” *Cryst. Res. Technol.*, vol. 37, no. 11, pp. 1234–1240, 2002.
- [46] J. I. Langford and A. J. C. Wilson, “Scherrer after sixty years: A survey and some new

- results in the determination of crystallite size,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 11, no. 2, pp. 102–113, 1978.
- [47] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, and X. Wang, “Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template,” *Mater. Lett.*, vol. 60, no. 12, pp. 1484–1487, 2006.
- [48] E. F. Bräs, P. Steuer, J. C. Voegel, R. M. Frank, and F. J. G. Cuisinier, “Observation of the loss of the hydroxyapatite sixfold symmetry in a human fetal tooth enamel crystal,” *J. Microsc.*, vol. 170, pp. 147–154, 1993.
- [49] W. I. Schmidt, “Über die Orientierung der Kristallite im Zahnschmelz,” *Naturwissenschaften*, vol. 24, no. 23, p. 361, 1936.
- [50] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. N. Suarez, and L. Moro, “Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 68, no. 1, pp. 45–51, 1997.
- [51] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine,” *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 399–498, 2009.
- [52] K. Tasaki, S. Louis, R. V March, V. Re, M. Recci, and V. May, “Poly (oxyethylene) - Water Interactions : A Molecular Dynamics Study,” vol. 7863, no. 118, pp. 8459–8469, 1996.
- [53] M. L. Sierra and E. Rodenas, “CTAB/Poly (propylene glycol) Mixed Micelles: Characterization and Its Properties as a Reaction Medium,” *J. Phys. Chem.*, vol. 97, no. 47, pp. 12387–12392, 1993.
- [54] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, and L. Sturba, “Nanocrystalline hydroxyapatite coatings on titanium: a new fast biomimetic method,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 19, pp. 4085–4089, 2005.
- [55] S. Raynaud, E. Champion, and D. Bernache-Assollant, “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1073–1080, 2002.
- [56] C. Jager, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, and M. Epple, “A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite,” *Magn. Reson. Chem.*, vol. 44, no. 6, pp. 573–580, 2006.
- [57] M. Fernández-Leyes, V. Verdinelli, N. Hassan, J. M. Ruso, O. Pieroni, P. C. Schulz, and P. Messina, “Biomimetic formation of crystalline bone-like apatite layers on spongy materials templated by bile salts aggregates,” *J. Mater. Sci.*, vol. 47, no. 6, pp. 2837–2844, 2012.

- [58] R. Nagarajan and C. C. Wang, "Theory of surfactant aggregation in water/ethylene glycol mixed solvents," *Langmuir*, vol. 16, no. 12, pp. 5242–5251, 2000.
- [59] P. Alexandridis and T. Alan Hatton, "Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 96, no. 1–2, pp. 1–46, 1995.
- [60] R. G. Chaudhuri, S. Sunayana, and S. Paria, "Wettability of a PTFE surface by cationic-non-ionic surfactant mixtures in the presence of electrolytes," *Soft Matter*, vol. 8, no. 20, pp. 5429–5433, 2012.
- [61] W. Meier, "Structured Polymer Networks from O/W-Microemulsions and Liquid Crystalline Phases," *Langmuir*, vol. 12, no. 26, pp. 6341–6345, 1996.
- [62] G. Fleury, G. Schlatter, C. Brochon, C. Travelet, A. Lapp, P. Lindner, and G. Hadziioannou, "Topological polymer networks with sliding cross-link points: The 'Sliding gels'. Relationship between their molecular structure and the viscoelastic as well as the swelling properties," *Macromolecules*, vol. 40, no. 3, pp. 535–543, 2007.
- [63] S.-H. Yu and H. Colfen, "Bio-inspired crystal morphogenesis by hydrophilic polymers," *J. Mater. Chem.*, vol. 14, no. 14, pp. 2124–2147, 2004.
- [64] S. J. Hoshaw, J. B. Brunski, and G. V. B. Cochran, "Mechanical Loading of Brånemark Implants Affects Interfacial Bone Modeling and Remodeling.," *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, vol. 9, no. 3, pp. 345–360, 1994.
- [65] S. Hansson and M. Werke, "The implant thread as a retention element in cortical bone: the effect of thread size and thread profile: a finite element study," *J. Biomech.*, vol. 36, no. 9, pp. 1247–1258, 2003.
- [66] S. Hansson, "Surface roughness parameters as predictors of anchorage strength in bone: A critical analysis," *J. Biomech.*, vol. 33, no. 10, pp. 1297–1303, 2000.
- [67] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, "Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–767, 2011.
- [68] M. Nakamura, K. Niwa, S. Nakamura, Y. Sekijima, and K. Yamashita, "Interaction of a blood coagulation factor on electrically polarized hydroxyapatite surfaces," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 82, no. 1, pp. 29–36, 2007.
- [69] K.-Y. Kwon, E. Wang, A. Chung, N. Chang, and S.-W. Lee, "Effect of Salinity on Hydroxyapatite Dissolution Studied by Atomic Force Microscopy," *J. Phys. Chem. C*, vol. 113, no. 9, pp. 3369–3372, 2009.

- [70] F. Gao, S. Yang, P. Hao, and J. R. G. Evans, "Suspension stability and fractal patterns: A comparison using hydroxyapatite," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 94, no. 3, pp. 704–712, 2011.
- [71] J. Clogston and A. Patri, "Zeta Potential Measurement," in *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery SE - 6*, vol. 697, Humana Press, 2011, pp. 63–70.
- [72] M. Takeuchi, G. Martra, S. Coluccia, and M. Anpo, "Investigations of the structure of H₂O clusters adsorbed on TiO₂ surfaces by near-infrared absorption spectroscopy," *J. Phys. Chem. B*, vol. 109, no. 15, pp. 7387–7391, 2005.



Capítulo 4

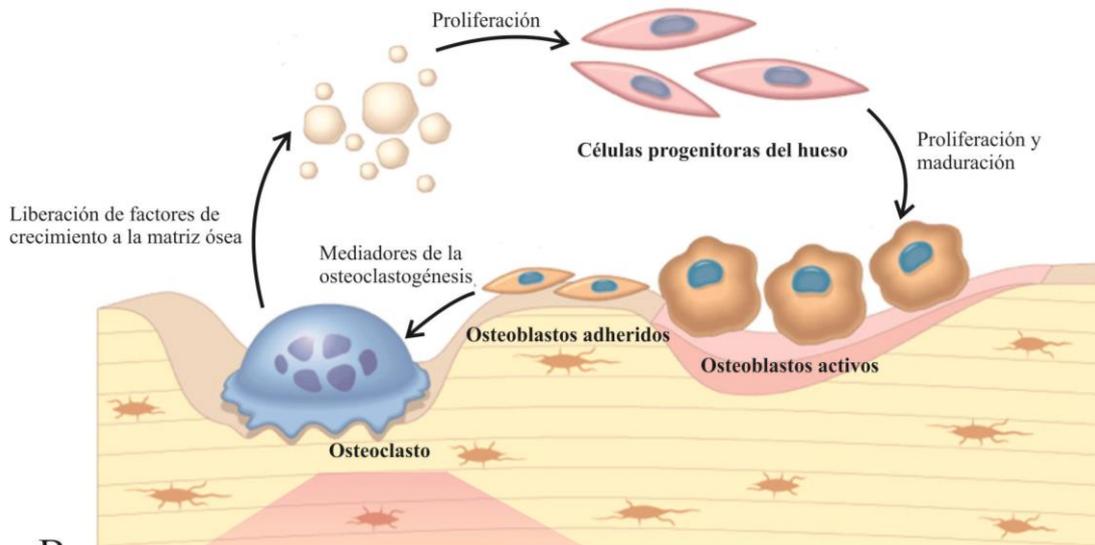
Biodegradación in vitro

4.1. Introducción

Resulta un gran desafío para los investigadores el diseño de nuevos materiales con características específicas capaces de reemplazar las propiedades y funcionalidad del tejido óseo; aunque actualmente se ha planteado un reto aún mayor, la obtención de biomateriales que puedan ser reemplazados completamente por el tejido óseo del paciente, esto quiere decir que permitan que se repare y regenere hueso *de novo* a medida que el material se degrada. En consecuencia, el material constituyente de un implante de última generación debería ser lo suficientemente estable como para acompañar el proceso regenerativo del tejido sano manteniendo sus propiedades estructurales, y al mismo tiempo degradarse durante los procesos de remodelación natural del tejido sin generar residuos perjudiciales.

Naturalmente el tejido óseo se halla expuesto a procesos continuos de remodelación mediante degradación ácida por parte de los osteoclastos. Este mecanismo no ocurre de manera aleatoria sino que es balanceado por la homeostasis ósea, en donde la remoción por parte de los osteoclastos se alterna con la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos [1]. La membrana plegada de los osteoclastos está en contacto directo con la zona a remodelar, y es responsable de acidificar el microambiente formado entre la membrana y el hueso a un pH entre 4 y 5 [2]–[4]. Este entorno ácido genera que se disuelva la matriz mineral ósea, mientras que simultáneamente estimula la acción enzimática necesaria para degradar a la matriz orgánica (figura 4.1).

A.



B.

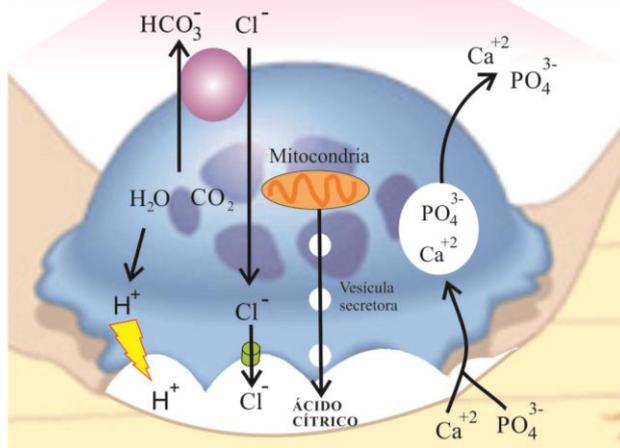


Figura 4.1: (A) El ciclo de remodelación y resorción ósea se compone de fases secuenciales, incluyendo la liberación factores de crecimiento al medio por parte de los osteoclastos, la estimulación de la maduración de las células progenitoras del hueso, su posterior diferenciación a osteoblastos maduros, y la liberación de reguladores de la osteoclastogénesis por parte de los osteoblastos maduros adheridos. (B) Los osteoclastos maduros se encargan de acidificar el microambiente extracelular mediante varios procesos: (i) la liberación de H^+ a través de la acción de la anhidrasa carbónica y bombas de protones vacuolares ATPasa, en dónde el pH intracelular se mantiene mediante intercambio HCO_3^-/Cl^- ; (ii) los iones Cl^- que pasan a través de la membrana plegada por un canal de aniones; y (iii) la liberación de distintos tipos de ácidos, como el ácido cítrico y el ácido láctico, por parte de las mitocondrias y vesículas secretoras. El medio ácido degrada la fase mineral del hueso y proporciona un ambiente óptimo para la degradación de matriz orgánica. Imagen adaptada de la publicación de Teitelbaum [1].

En términos generales, se considera que a partir de los 7 días de implantación se forma el hueso nuevo y la herida sana completamente luego de los 21 días [5] (capítulo 1, figura 1.4), aunque es importante tener en cuenta que la velocidad óptima de degradación, así como el periodo de estabilidad del implante, debe diseñarse específicamente a los efectos de la zona que se desea restaurar. Si no se proporciona el material con las características de degradación adecuadas en una zona específica del cuerpo humano, su rápida resorción podría dar como resultado la formación de hueso nuevo de baja calidad con propiedades mecánicas desfavorables [5], [6]. Para ciertas aplicaciones como por ejemplo la craneoplastia, la resorción rápida del implante y su reemplazo por tejido sano no es tan importante como su estabilidad e integridad. Sin embargo, para otras aplicaciones como la reparación del hueso en defectos periodontales o aumento del seno maxilar, el reemplazo rápido del implante por hueso nuevo es ampliamente deseado [6]. Estas observaciones sugieren que la tasa de resorción apropiada del material a implantar se debe evaluar cuidadosamente con el fin de lograr resultados clínicos óptimos para cada aplicación.

Actualmente, se han realizado muchos estudios de degradación de materiales cerámicos de fosfato de calcio en diferentes medios, entre ellos se ha encontrado que la HA y el β -TCP son los únicos capaces de degradarse luego de comience el proceso de regeneración del tejido [7], [8]. En este capítulo se estudió la disolución de los biomateriales de HA en fluidos fisiológicos humanos utilizando soluciones similares a los fluidos fisiológicos para determinar la cinética de degradación de los mismos [8]. En el presente capítulo se describen los ensayos de degradación *in vitro* a los que fueron sometidos los materiales obtenidos a fin de corroborar si los mismos pueden actuar como plantillas temporales, proveyendo inicialmente un soporte mecánico y estructural adecuado para el crecimiento de tejido sano, y finalmente ser completamente degradados bajo condiciones de resorción ósea.

4.2. Métodos experimentales

4.2.1. Reactivos

Ácido acético glacial (CH_3COOH , PM = 60,05 g/mol, $\delta = 1,05 \text{ g/cm}^3$, 99,5 %, Cicarelli), acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, PM = 82,03 g/mol, 99,86%, Mallinckrodt Baker, Inc.), cloruro de sodio (NaCl , PM = 58,44 g/mol, 99,5 % Sigma), cloruro de potasio (KCl , PM = 74,55 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), fosfato disódico (Na_2HPO_4 , PM = 141,96 g/mol,

99,5% Sigma-Aldrich), fosfato monopotásico (KH_2PO_4 , PM = 141,96 g/mol, 99,5 %, Merck Millipore).

4.2.2. Ensayo de biodegradación

Los ensayos de degradación de los materiales se realizaron a diferentes pH (7,4 - 4,2) y temperaturas (25 - 37 °C) a fin de comprobar su estabilidad en condiciones de almacenaje, a pH fisiológico de la sangre y en condiciones de resorción ósea. Para simular las dos condiciones de pH mencionadas se prepararon las siguientes soluciones reguladoras: (i) pH fisiológico de la sangre (pH = 7,4) para lo cual se preparó una solución reguladora de fosfato salino (1X PBS) y (ii) pH interfacial al cual ocurre la remodelación por parte de los osteoclastos (pH = 4,2) para lo cual se preparó una solución reguladora de acetato de sodio / ácido acético siguiendo la metodología utilizada por Matsumoto y col. [3].

Se colocaron 200 mg de cada material en tubos de ensayo y luego se agregaron 100 ml de la solución reguladora de pH. Los tubos se mantuvieron a 25 y 37 °C en baños termostáticos durante 3, 12, 16 y 25 días. Luego, para calcular la cantidad de material degradado se realizó un ensayo gravimétrico. La degradación de los material se calculó a partir del porcentaje de peso perdido (% P_L) utilizando la ecuación propuesta por Tampieri y col. [9]:

$$\% P_L = \frac{(P_0 - P_t)}{P_0} \times 100 \quad 4.1$$

En donde P_0 y P_t son, respectivamente, los pesos secos al inicio y luego de la inmersión en soluciones reguladoras a diferentes tiempos, t.

4.3. Resultados y discusión

Los gráficos de los ajustes de la pérdida de peso *versus* tiempo en 1X PBS (pH = 7,4; 37 °C) muestran que los materiales se degradan en un 1,5 a 2,25 % al final del tratamiento (25 días) (figura 4.2). En ensayos *in vivo* se ha demostrado que luego de la incorporación del

implante óseo, la densidad mineral del hueso trabecular aumenta alrededor de un 80 % entre 7 a 14 días, mostrando una curación funcional casi completa luego de aproximadamente 14 a 28 días [10], [11]. Como se mencionó anteriormente, bajo estas condiciones de estudio la estabilidad y lenta degradación en condiciones fisiológicas de la sangre de los materiales es una característica deseada debido a que la velocidad de biodegradación debe ser comparable a la de formación de hueso nuevo, el cual recubrirá al biomaterial 14 a 21 días después de su implantación [12], [13].

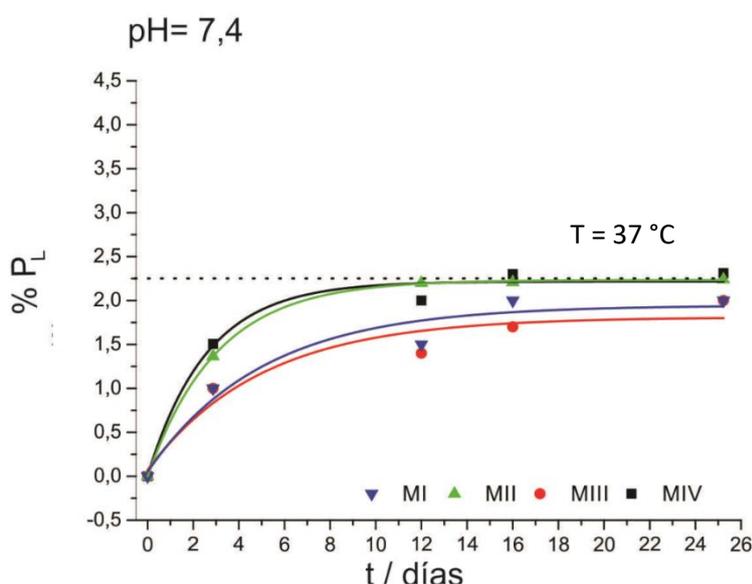


Figura 4.2: Degradación a pH fisiológico de la sangre (PBS, pH 7,4, 37 °C).

Por el contrario, en condiciones ácidas y a 25 °C el 50 % de los materiales se degradaron entre los primeros 4 y 8 días de tratamiento. Luego de finalizado el tiempo de estudio los materiales tuvieron una degradación máxima de entre el 64 y 70 %. El aumento en la temperatura causó un considerable incremento de la velocidad de degradación de los nanomateriales de HA sintetizados. Como se muestra en la figura 4.3, a 37 °C los materiales se degradaron en un 50 % dentro del primero y segundo día de tratamiento, mostrando un 98 a 100 % de degradación el día 25. Considerando las últimas condiciones mencionadas se obtuvo el siguiente orden de degradación: MII > MIV > MIII > MI.

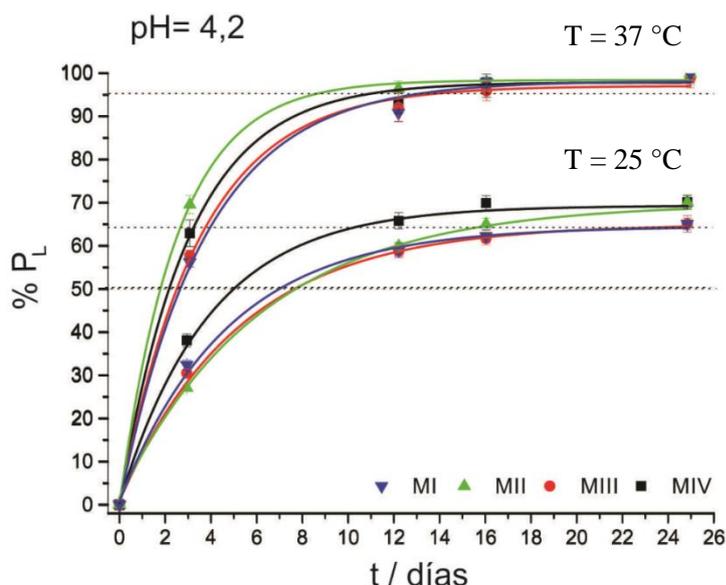


Figura 4.3: Degradación en condiciones de resorción ósea (solución reguladora acetato de sodio / ácido acético, pH= 4,2) de las nanopartículas de HA a dos temperaturas diferentes (37 °C y 25 °C).

Los resultados obtenidos sugieren que existe una relación entre las velocidades de degradación con algunas de las características topográficas y la hidrofiliicidad que presentan los materiales; mientras que no se encontraron relaciones con las dimensiones fractales y la relación Ca/P. Todos los materiales tienen valores positivos de los parámetros asimetría, R_{sk} (capítulo 3, sección 3.3.4), indicando la existencia de superficies asimétricas respecto a la media del plano. Sin embargo, realizando un análisis profundo de los perfiles de rugosidad se observó que la asimetría difiere en cada uno de los materiales, y para dicha comparación se utilizaron los parámetros de profundidad de la rugosidad máxima ($R_{z,max}$) y profundidad de la rugosidad media (R_z) (tabla 4.1) [14]. La descripción y cálculo de los mencionados parámetros se encuentra descrito en el capítulo 3 sección 3.2.3.1.

Tabla 4.1: Parámetros de profundidad de los cuatro materiales.

	MI	MII	MIII	MIV
$R_{z,media} \pm DE$ (I %)	$56,7 \pm 14,4$	$42,9 \pm 28,1$	$38,7 \pm 11,7$	$40,8 \pm 21,6$
$R_{z,máx}$ (I %)	$85,0 \pm 3,1$	$91,5 \pm 2,4$	$71,7 \pm 2,6$	$90,7 \pm 2,8$

Los materiales MI y MIII tienen valores menores de los desvíos estándar (DE) de $R_{z,media}$, lo que se encuentra asociado a superficies formadas por profundidad de rugosidad individual ($R_{z,i}$) menos variables y por lo tanto perfiles de picos altos y valles profundos de dimensiones comparables. Los mayores valores de DE de $R_{z,media}$ correspondieron a los materiales MII y MIV y son característicos de superficies con picos y valles de dimensiones disímiles (figura 4.4).

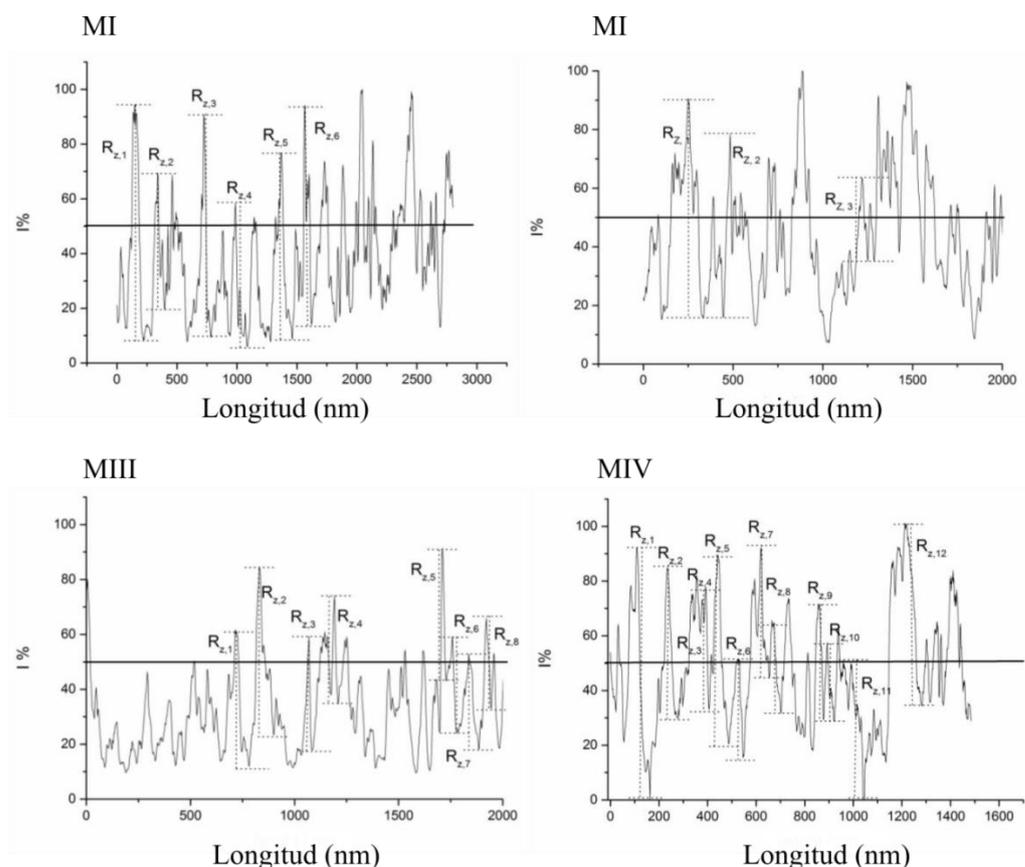


Figura 4.4: Perfiles de rugosidad de los materiales MI, MII, MIII y MIV, en donde se indican los parámetros de profundidad de la rugosidad individual ($R_{z,i}$) expresados como la intensidad de la altura del perfil porcentual (I %), 100 % = distancia entre el valle más profundo y el pico más alto.

4.3.1. Mecanismo propuesto para la biodegradación *in vitro*

Inmediatamente después de la implantación la transformación superficial de los materiales de HA podrían ser fundamentales para los procesos biológicos sucesivos, como la producción de hueso nuevo y la integración del implante con el tejido (figura 4.5 D). Un estudio profundo de la solubilidad de la HA en condiciones fisiológicas fue realizado por

Bertazzo y col. [15]. Como resultado de sus experiencias propusieron un mecanismo de disolución de la superficie del material mediada por la liberación de iones Ca^{2+} a la solución que comienza con la formación de fosfato tricálcico, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (figura 4.5 A y B). Finalmente, se llega a un equilibrio entre la superficie de la HA modificada y la solución acuosa de fluido biológico en el cual ocurre un intercambio de iones Ca^{2+} y HPO_4^{2-} para formar un nuevo fosfato de calcio de formulación química CaHPO_4 (figura 4.5 C). Estos fenómenos podrían justificar la rápida degradación inicial de los materiales en PBS (pH 7,4) y luego su estabilización cuando llegan a un porcentaje de aproximadamente 1,2 a 2,5 % de pérdida de peso (figura 4.2).

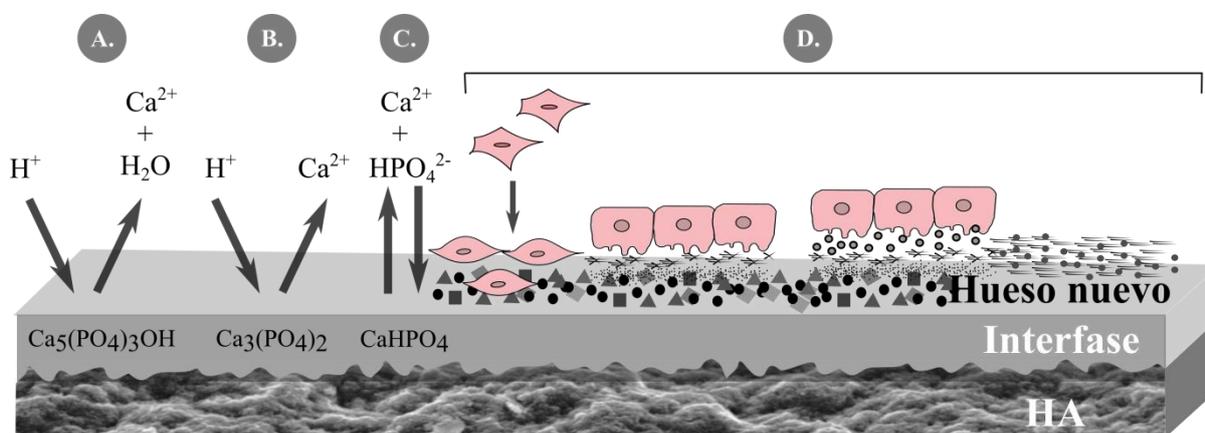


Figura 4.5: Representación esquemática de los fenómenos que se producen en la superficie de la HA después de la implantación. **(A-B)** Una vez implantado el material de HA comienza su disolución superficial, **(C)** hasta que se llega a un equilibrio entre la superficie modificada y la solución fisiológica. **(D)** Luego se adsorben diferentes proteínas de la matriz y se adhieren, proliferan y diferencian las células osteogénicas. Sobre esta superficie modificada, los osteoblastos formarán hueso nuevo. Esquema adaptado de la publicación de Bertazzo y col. [15].

En cuanto a la disolución de la HA en medios ácido acuosos, se encuentra generalmente aceptado que la disolución de apatita se desencadena de la siguiente manera: (i) difusión de agentes químicos (H^+ y iones ácidos) desde el seno de la solución hacia la interfase sólido – líquido; (ii) adsorción de H^+ y iones ácidos en la superficie de la apatita; (iii) transformación química de superficie; (iv) desorción de productos químicos de la superficie (iones Ca^{2+} , PO_4^{3-}); y (v) difusión al seno de la solución [16]. Algunos autores enfatizan en el hecho de que luego de la adsorción de agua el intercambio de iones Ca^{2+} por dos iones H^+ se ve energéticamente favorecido [17]; teniendo en cuenta que todos los materiales son hidrofílicos

(capítulo 3 sección 3.1.2) se considera que este proceso tiene lugar en la superficie de los mismos. Inmediatamente después de ponerse en contacto con las moléculas de agua, los iones ácidos son adsorbidos a la superficie de los cristales de apatita formando una interfase sólido – líquido y varios estratos adyacentes, como la capa de difusión de Nernst o doble capa electrolítica. El transporte de químicos a la interfase sólido – líquido siempre ocurre por difusión a través de la capa de Nernst [17], y el espesor de la capa depende de la solución hidrodinámica y de las dimensiones de disolución del cristal, la cual decrece con el aumento de la agitación y con la reducción del tamaño del cristal [16]. Bajo las condiciones experimentales testeadas, el espesor de la capa de difusión se reduce debido a la presencia de nanopartículas. Sin embargo, en ninguno de los casos el espesor se vuelve igual a cero y como consecuencia, hay siempre un gradiente de concentración cerca de la interfase sólido – líquido; por lo que las leyes de difusión siempre se validan.

Por otro lado, vale la pena resaltar que varios modelos de control de la difusión son aplicables a la disolución de apatita, los cuales son consistentes en el hecho de que ocurre una mayor degradación a temperaturas superiores [16]. El aumento de la temperatura intensifica la agitación térmica de los iones en solución y, por lo tanto, la difusión a través de la capa de Nernst. Un enfoque similar es correcto para los fenómenos de superficie; cuando las disoluciones ocurren, la adsorción y desorción de los iones y las moléculas de agua, así como el transporte de compuestos químicos, siempre ocurre en la superficie independientemente de las condiciones experimentales elegidas. Por tal motivo es lógico que exista una relación entre la degradación y las propiedades superficiales de los materiales, tales como la rugosidad y la hidrofiliidad.

4.4. Conclusión

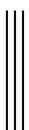
Este estudio de degradación se desarrolló en ausencia de enzimas y células, y por lo tanto no puede ser considerado como un modelo de predicción de resorción ósea *in vivo*, sin embargo de él se desprende la siguiente información importante: (i) los materiales nanoestructurados de HA obtenidos no se disuelven a pH fisiológico de la sangre (37 °C, pH = 7,4) durante el tiempo suficiente como para actuar como soporte del tejido en crecimiento; (ii) solo se degradan en condiciones de resorción ósea (37 °C, pH = 4.2) mediante el siguiente orden MII > MIV > MIII > MI; (iii) la velocidad de degradación de los materiales es función de sus propiedades superficiales, siendo los de menor velocidad los materiales con superficies

regulares formadas por picos altos y valles profundos de dimensiones comparables (MI y MIII).

4.5. Referencia bibliográficas

- [1] S. L. Teitelbaum, “Bone Resorption by Osteoclasts,” *Science*, vol. 289, no. 5484, pp. 1504–1508, 2000.
- [2] S. Hayakawa, T. Kanaya, K. Tsuru, Y. Shirosaki, A. Osaka, E. Fujii, K. Kawabata, G. Gasqueres, C. Bonhomme, and F. Babonneau, “Heterogeneous structure and in vitro degradation behavior of wet-chemically derived nanocrystalline silicon-containing hydroxyapatite particles,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4856–4867, 2013.
- [3] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, and J. Takahashi, “Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3807–12, 2004.
- [4] R. Baron, “Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast,” *Anat. Rec.*, vol. 224, no. 2, pp. 317–24, 1989.
- [5] Z. Schwartz and B. D. Boyan, “Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 56, no. 3, pp. 340–347, 1994.
- [6] L. C. Chow, “Next generation calcium phosphate-based biomaterials,” *Dent. Mater. J.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–10, 2009.
- [7] H. Wang, J.-K. Lee, A. Moursi, and J. J. Lannutti, “Ca/P ratio effects on the degradation of hydroxyapatite in vitro,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, no. 2, pp. 599–608, 2003.
- [8] S. Hayakawa, *In vitro degradation behavior of hydroxyapatite*. Elsevier Ltd., 2015.
- [9] A. Tampieri, M. Iafisco, M. Sandri, S. Panseri, C. Cunha, S. Sprio, E. Savini, M. Uhlarz, and T. Herrmannsdörfer, “Magnetic bioinspired hybrid nanostructured collagen-hydroxyapatite scaffolds supporting cell proliferation and tuning regenerative process,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 18, pp. 15697–15707, 2014.
- [10] B. A. Uthgenannt, M. H. Kramer, J. A. Hwu, B. Wopenka, and M. J. Silva, “Skeletal Self-Repair: Stress Fracture Healing by Rapid Formation and Densification of Woven Bone,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 22, no. 10, pp. 1548–1556, 2007.
- [11] P. R. T. Kuzyk and E. H. Schemitsch, “The basic science of peri-implant bone healing,” *Indian J. Orthop.*, vol. 45, no. 2, p. 108, 2011.

- [12] L. T. Ciocan, F. Miculescu, M. Miculescu, and I. Patrascu, "Retrieval analysis on dental implants biointegration phases," *Rom. J. Morphol. Embryol.*, vol. 51, no. 1, pp. 117–122, 2010.
- [13] T. Kobayashi, S. Nakamura, and K. Yamashita, "Enhanced osteobonding by negative surface charges of electrically polarized hydroxyapatite," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 57, no. 4, pp. 477–484, 2001.
- [14] K. J. Stout, "Surface roughness: Measurement, interpretation and significance of data," *Mater. Des.*, vol. 2, no. 6, pp. 287–295, 1981.
- [15] S. Bertazzo, W. F. Zambuzzi, D. D. P. Campos, T. L. Ogeda, C. V. Ferreira, and C. A. Bertran, "Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 78, no. 2, pp. 177–184, 2010.
- [16] S. V Dorozhkin, "Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature," *World J. Methodol.*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2012.
- [17] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, "Cell Viability Assays," in *Assay Guidance Manual*, 1st ed., G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. W. Iversen, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, J. M. Peltier, T. Riss, O. J. O. J. Trask, and J. Weidner, Eds. Bethesda (MD), 2004.



Capítulo 5

Bioactividad *in vitro*

5.1 Introducción

El depósito de una capa de apatita sobre la superficie del implante asegura la formación de enlaces químicos fuertes entre el biomaterial y el hueso nuevo [1], probablemente debido a que esta cubierta podría activar proteínas de señalización y células involucradas en la osteogénesis por contacto [2]. Los materiales capaces de inducir mencionada respuesta biológica en su interfase se los denomina bioactivos [3] y fueron descritos por primera vez en 1972 por Hench y col. [4]. En contraste, muchos materiales implantables no forman esta capa superficial y como consecuencia sufren osteogénesis distal [2] o encapsulación por tejido conectivo fibrosa [4] dando lugar al aislamiento del mismo con respecto al hueso circundante, lo que conlleva al rechazo del implante.

Casi 20 años después de la descripción de los primeros materiales bioactivos, Kokubo y col. desarrollaron un ensayo para testear la bioactividad *in vitro* como método de reemplazo de los estudios de bioactividad en animales [5]. Dichas investigaciones proponen que la bioactividad *in vivo* puede reproducirse *in vitro* sumergiendo el material en suero fisiológico simulado o SBF (del inglés “simulated body fluid”) con concentraciones iónicas similares a los del plasma sanguíneo humano (tabla 5.1) [5].

Tabla 5.1: Comparación de la composición iónica del plasma sanguíneo humano y del suero fisiológico simulado (SBF).

	Concentración iónica (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ₂ ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo Humano (pH 7,2 – 7,4)	142	5	1,5	2,5	103	27,0	1	0,5
Suero Fisiológico Simulado (pH 7,4)	142	5	1,5	2,5	147,8	4,2	1	0,5

Distintos grupos de investigación han comprobado, por medio de diversidad de combinaciones de técnicas espectroscópicas y microscópicas, que luego de sumergir los llamados “materiales bioactivos” en SBF la apatita depositada en su superficie tiene características químicas y estructurales similares a las de los cristales que conforman la matriz inorgánica del hueso [6]–[8]. Por ésta razón, actualmente este ensayo de bioactividad *in vitro* está destinado a la detección de materiales bioactivos como paso previo a su aplicación *in vivo*, con el objetivo de identificar a aquellos materiales potencialmente útiles para el diseño de implantes y reducir significativamente el número de animales manipulados durante la experimentación así como la duración de los ensayos. Más aun, Kokubo y col. afirmaron que este método es útil para predecir la bioactividad de los materiales no solo de manera cualitativa sino también cuantitativa [1], por lo que permite realizar comparaciones entre diferentes biomateriales. Debido a su amplia aceptación y luego de años de experimentación utilizando este ensayo, que pudo ser corroborado con estudios *in vivo*, en la actualidad se encuentra validado y estandarizado mediante la norma ISO 23317:2014 [9].

En el proceso de biomineralización ósea, la precipitación de HA no ocurre espontáneamente ya que el fluido extracelular circundante no se encuentra suficientemente sobresaturado de iones como para iniciar la precipitación de los cristales de apatita biológica. Por el contrario, las vesículas formadas por los condrocitos y osteoblastos generan un microambiente en el que la concentración de calcio y el fosfato aumenta suficientemente como para que inicie la nucleación heterogénea de mencionados cristales [10]. Experimentalmente, a modo de simular este entorno sobresaturado se utiliza una solución metaestable y 1,5 veces más concentrada de SBF para evaluar la manera en que se depositan los cristales de apatita [11]. Los ensayos de bioactividad *in vitro* encontrados en literatura muestran que la precipitación de HA sobre materiales bioactivos es termodinámicamente más favorable; sin embargo también pueden precipitar otros fosfatos de calcio como el fosfato octacálcio (OCP) que, según deducciones teóricas, su deposición se encuentra cinéticamente más favorecida (tabla 5.2) [12]–[14]. Debido a la naturaleza heterogénea de la composición química de los depósitos, por convención se utiliza la abreviatura “Ca-P” para nombrar a las cubiertas de fosfato de calcio.

Tabla 5.2: Composición de las cubiertas de fosfato de calcio (Ca-P) formadas sobre materiales bioactivos. Revisado por Dorozhkin y col. [15] y Panjian y col. [13]

Nombre	Formulación química	Relación Ca/P
Fosfato dicálcico dihidrato (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
Fosfato dicálcico anhidro (DCPA)	CaHPO_4	1
Fosfatos de calcio amorfo	$\text{Ca}_x\text{Hy}(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3 - 4,5$	1,2-2,2
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Fosfato tricálcico alfa (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato tricálcico beta (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Hidroxiapatita deficiente en Ca	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $x = 0$ $< x < 1$	1,5-1,67
Hidroxiapatita estequiométrica (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0

Las interacciones biológicas que ocurren *in vivo* en la interfase del implante son muy complejas y resulta difícil reproducirlas en el laboratorio. Por esta razón, como ensayo preliminar que permite comprender el comportamiento de los materiales en un entorno biológico, se sumergieron en 1,5X SBF a fin de evaluar si las diferencias en las características superficiales de los materiales, descritas en capítulo 3 de este trabajo de investigación, afectan de manera diferente a la nucleación, formación y crecimiento de depósitos de Ca-P, siendo este proceso un indicador de la bioactividad *in vivo*.

5.2 Métodos experimentales

5.2.1 Reactivos

Cloruro de sodio (NaCl , PM= 58,4 g/mol, 99,5 % Sigma), bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , PM= 84,007 g/mol, 99, 5% Sigma-Aldrich), cloruro de potasio (KCl , PM=

74,5513 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), fosfato dipotásico trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, PM= 228,23 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl \cdot 6H_2O$, PM= 197,211 g/mol, 98 % Sigma-Aldrich), cloruro de calcio ($CaCl_2$, PM= 110,98 g/mol, 95 % Sigma-Aldrich), sulfato sódico (Na_2SO_4 , PM= 142,04 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), Tris ($(CH_2OH)_3CNH_2$, PM= 121,1350 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl, PM= 36,46 g/mol, 30 - 34 % Cicarelli), óxido de titanio (IV) anatasa (TiO_2 , PM= 79,87 g/mol, 99,5 %, Sigma-Aldrich), agua bidestilada.

5.2.2 Ensayo de bioactividad

Para realizar el ensayo de bioactividad los materiales MI, MII, MIII y MIV se mantuvieron en contacto con SBF siguiendo el procedimiento estándar previamente descrito y estudiado por Kokubo y col. [16]. Se colocaron y pesaron los materiales dentro de tubos de polipropileno previamente esterilizados y se sumergieron en 1,5X SBF durante períodos de 1 a 65 días en baño termostático a temperatura fisiológica (37 °C). Luego de descartar los sobrenadantes, los materiales se lavaron con agua destilada. Finalmente, se secaron en estufa a 50 °C. Como control de la posible precipitación espontánea de los depósitos se reprodujeron las mismas condiciones pero sin el material, y como control negativo se utilizó óxido de titanio anatasa que se ha publicado en la literatura como un material no bioactivo [17].

5.2.3 Microscopía electrónica de barrido, cálculo de los parámetros de rugosidad y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

El estudio de la morfología de superficie de los depósitos formados sobre los materiales se realizó utilizando SEM y EDX en las mismas condiciones y utilizando las mismas metodologías que fueron descritas previamente en el capítulo 3 sección 3.2.3.1 y 3.2.3.2.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Caracterización de las cubiertas

Luego de sumergir los materiales en 1,5X SBF en períodos de 1 a 65 días a temperatura fisiológica se examinaron las muestras a través de micrografías SEM. Allí se observó que a partir de los 10 días de incubación se formó una capa de recubrimiento mineral sobre todos los materiales, confirmando la deposición espontánea en la interfase del material (figuras 5.1).

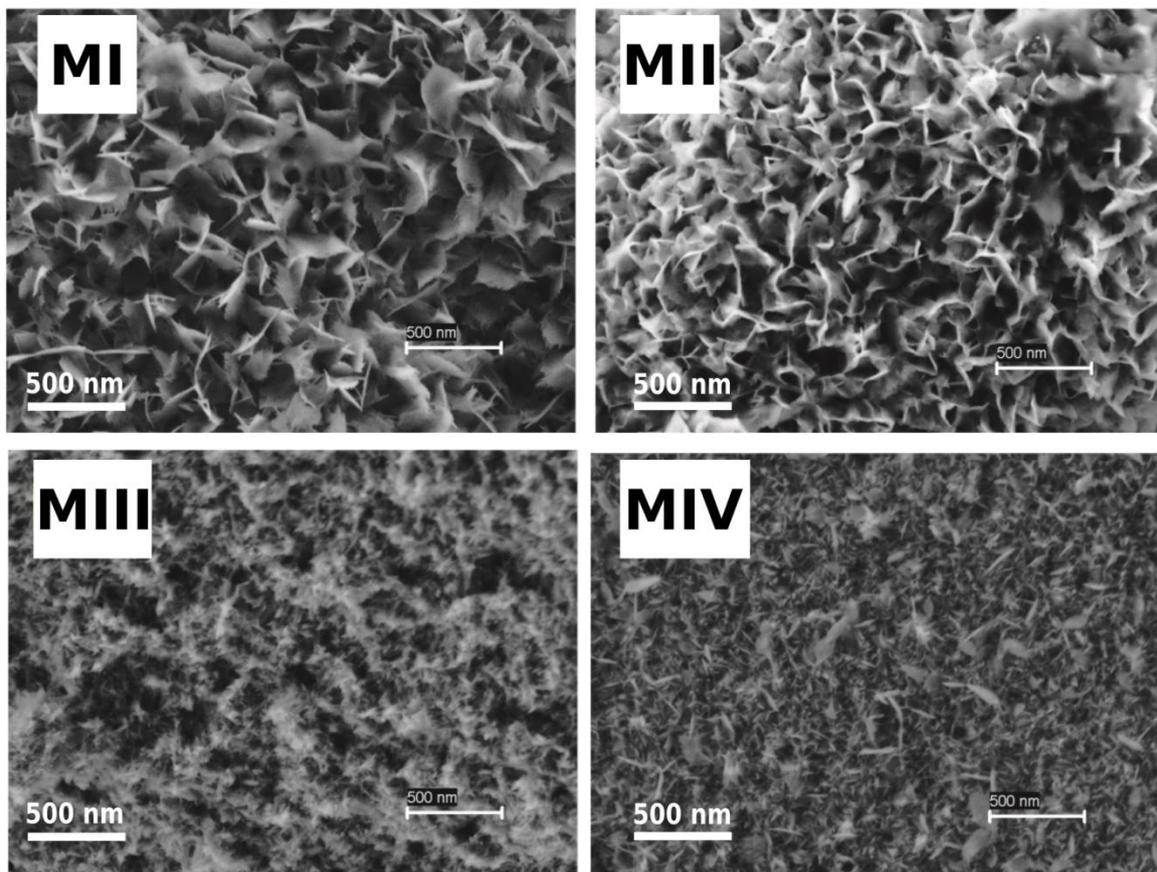


Figura 5.1: Ensayo de bioactividad sobre los materiales MI, MII, MIII y MIV. Las micrografías SEM muestran los depósitos de Ca-P a nanoescala formados luego de 10 días de incubación en 1,5X SBF a 37 °C.

Al comparar la morfología de los depósitos de Ca-P sobre MI y MII a microescala se pudieron observar estructuras esferoidales (figura 5.2), a diferencia de las cubiertas sobre MIII y MIV que mantuvieron un patrón homogéneo aplanado con aspecto de red formada por estructuras alargada o aciculares. Sobre la superficie de MI se formaron depósitos con forma

de esferas uniformes de $3,62 \pm 0,99 \mu\text{m}$ de diámetro. Estas esferas están constituidas por aglomerados de estructuras aplanadas de aproximadamente $109,83 \pm 23,32 \text{ nm}$ de longitud, con nanohilos lisos y rectos en sus bordes. Sobre el material MII se observaron algunos depósitos esferoidales aislados de mayor tamaño ($4,48 \pm 0,93 \mu\text{m}$ de diámetro) conformados por estructuras aplanadas de bordes lisos.

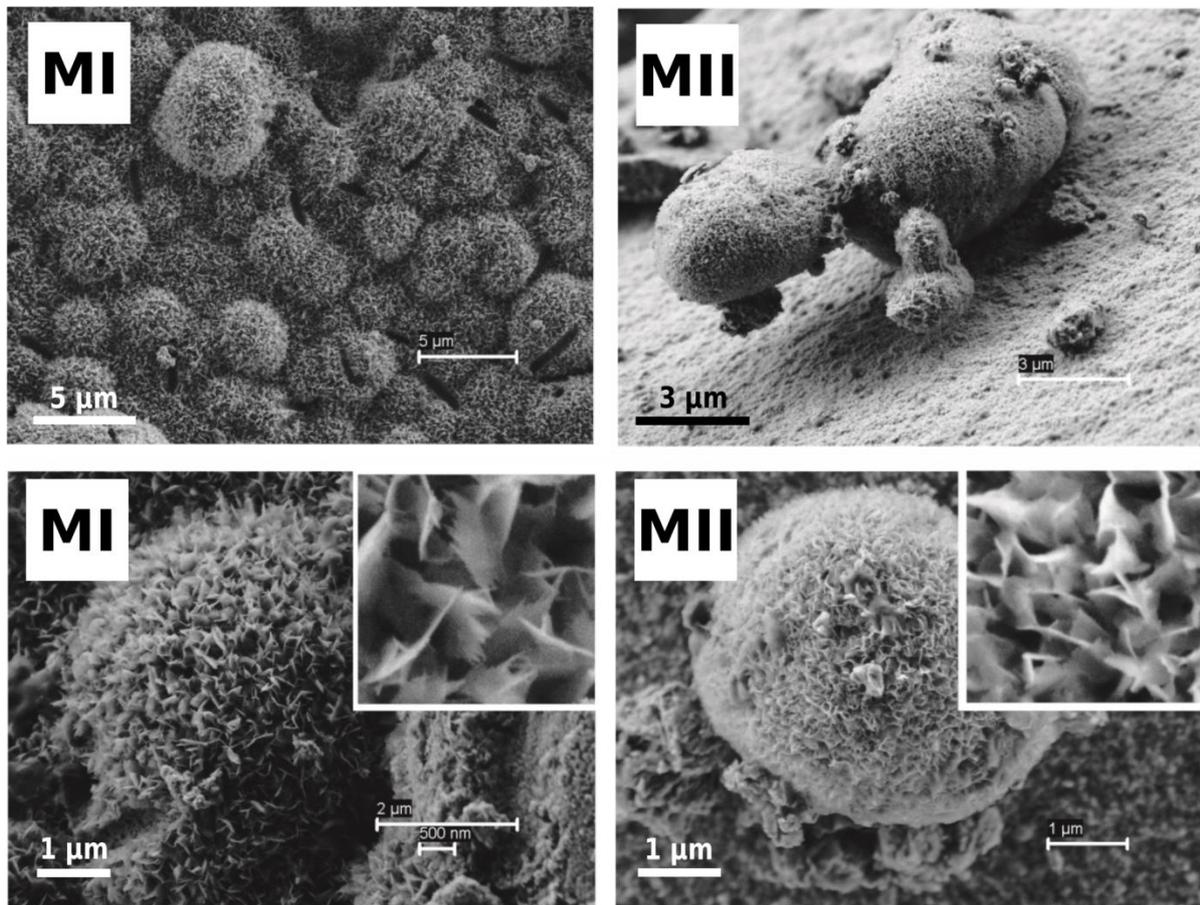


Figura 5.2: Ensayo de bioactividad sobre los materiales MI y MII. Las micrografías SEM muestran los depósitos esferoidales observados a microescala formados luego de 10 días de incubación en 1,5X SBF. En la esquina derecha de las micrografías inferiores se observan en detalle las estructuras aplanadas que conforman a las esferas.

Como control de la estabilidad de la solución de 1,5 SBF se realizó una inspección visual de los tubos de polipropileno, que fueron sujetos a las mismas condiciones de tratamiento ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ en 1,5X SBF durante 65 días) pero sin la presencia del material, en el cual no se observaron precipitados. Por otro lado, se utilizó como control negativo óxido de titanio anatasa comercial sobre el cual no se formaron depósitos de Ca-P al finalizar el ensayo (figura 5.3). Esto último coincide con lo publicado por Kobayashi y col. en donde se afirma

que es necesaria un agente de nucleación efectivo para que ocurra la deposición de cristales de HA en condiciones fisiológicas [18].

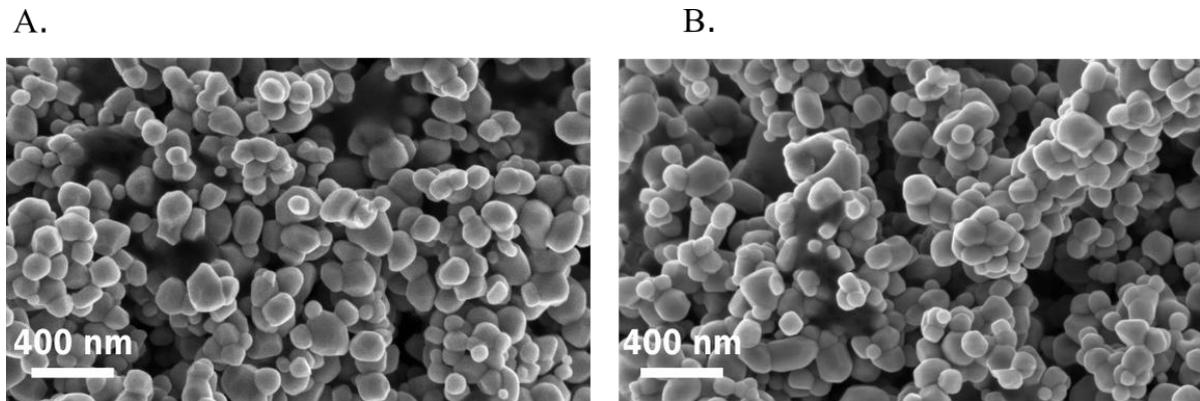


Figura 5.3: Micrografías SEM del control negativo de óxido de titanio anatasa comercial (A) antes y (B) después de 65 días de incubación con 1,5X SBF a 37 °C.

La composición elemental de los materiales luego del ensayo de bioactividad se analizó mediante la técnica de EDX asociado al SEM, con la cual se obtuvo la relación Ca/P luego de la mineralización de los materiales (figura 5.4).

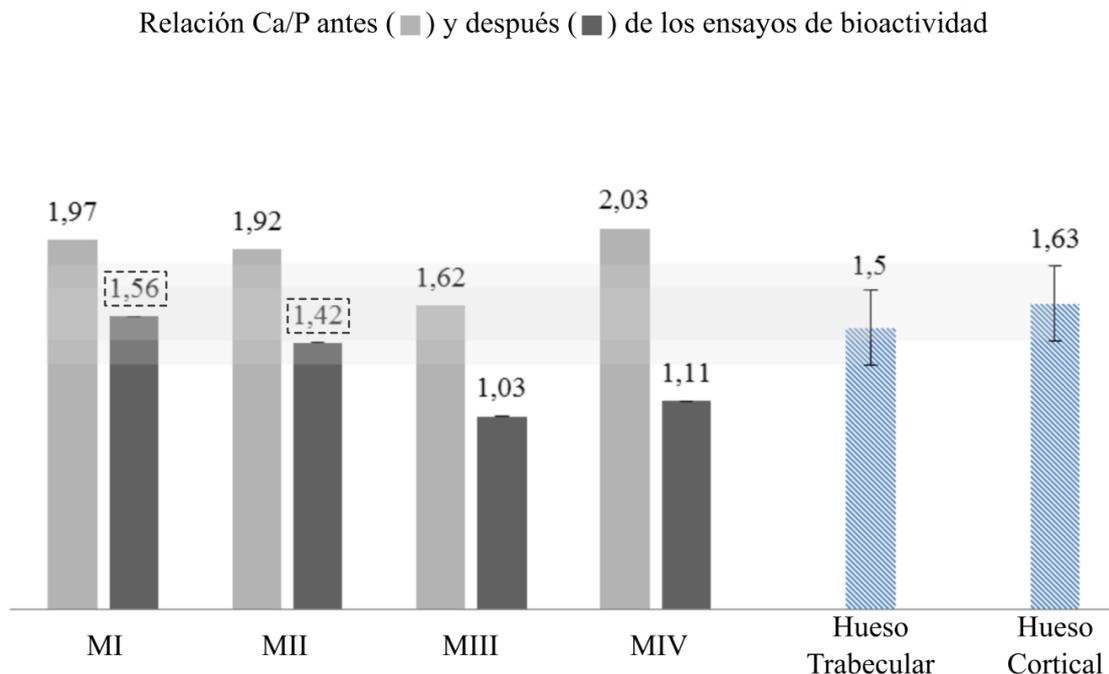


Figura 5.4: Relación molar Ca/P de los materiales (MI, MII, MIII y MIV) antes y después del ensayo de bioactividad (37 °C en 1,5X SBF durante 10 días). Dichos valores se comparan con las relaciones encontradas en el hueso humano trabecular y cortical [19].

Debido a que la técnica de emisión de rayos X utilizada tiene una penetración de la muestra que ronda entre los 0,1 μm y 5 μm , esta información no es útil para detectar la composición elemental exacta de la cubierta ubicada superficialmente [20]; en contraste la relación Ca/P que se obtiene va a estar influenciada por la composición elemental de la superficie de los materiales, aunque su estudio es útil para realizar una comparación de cómo se modifican la proporciones de ciertos elementos. Los resultados arrojados demostraron que luego de la mineralización la relación Ca/P del material MI y MII se encuentra dentro del rango del hueso trabecular y cortical; $1,50 \pm 0,20$ y $1,63 \pm 0,20$ respectivamente (figura 5.4) [19]. Por otro lado, la relación Ca/P de las cubiertas homogéneamente formadas sobre MIII y MIV son cercanas a 1, siendo este valor típico de otros fosfatos de calcio (tabla 5.2) que también suelen encontrarse en tejidos calcificados en menor proporción ya que algunos de ellos forman parte de las fases transitorias durante la formación de apatita biológica en mamíferos como el DCPA, DCPD y OCP [15]. En general, se observó una tendencia en la disminución de la relación Ca/P luego de la mineralización de aproximadamente un 20, 26, 37 y 45 %, para MI, MII, MIII y MIV respectivamente. Resulta importante destacar que en este caso no fue posible detectar la identidad cristalina de la cubierta ya que la técnica de DRX no permite diferenciar entre la HA que compone a los material y los fosfatos de calcio que forman parte de las cubiertas.

Como se mencionó en la introducción del presente capítulo, la fijación biológica de un implante va a estar determinado por la formación de una cubierta mineral con características similares al hueso [6]–[8]. Cabe resaltar que las esferas formadas sobre MI y MII son similares a las vesículas minerales secretadas por los osteoblastos en el proceso de mineralización ósea en cuanto a su relación Ca/P (figura 5.4) y morfología (figura 5.5) [21] [19].

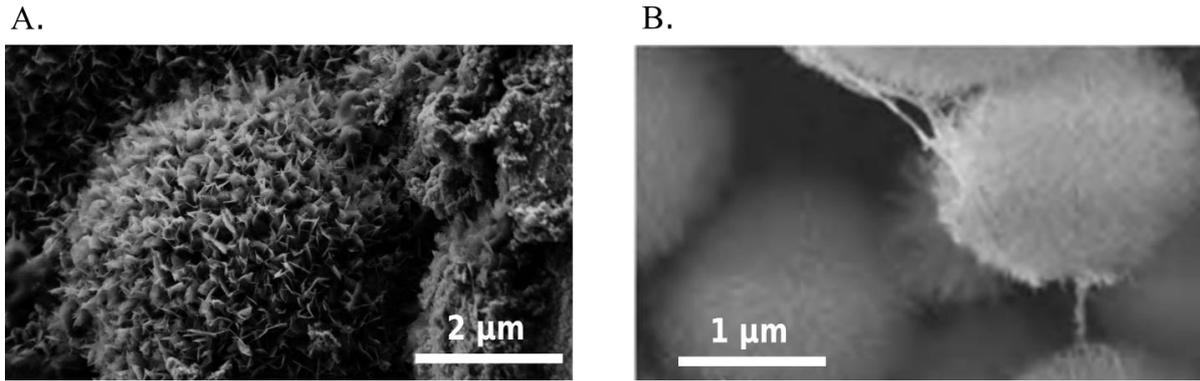


Figura 5.5: Comparación de los depósitos esferulíticos de MI y los formados *in vivo*. **(A)** Micrografías SEM de los depósitos de Ca-P sobre MI. **(B)** Vesículas de matriz mineral secretadas por los osteoblastos durante la osteoinducción, micrografía reproducida de la publicación de Uddin y col. [21]

Respecto a la nanotopografía de los depósitos de Ca-P, la rugosidad media R_a y las dimensiones fractales de la cubiertas esferulíticas formada sobre MI, son menores que las que los depósitos con aspecto de red acicular formados sobre MIII y MIV. Por otro lado, MII, que presenta una morfología de la cubierta con esferas aisladas, tiene parámetro de rugosidad superficial intermedios. Únicamente el depósitos formado sobre MI tiene un perfil de rugosidad con distribución leptocúrtica, $R_{ku} > 3$, característico de perfiles donde predominan los picos altos [22] (tabla 5.3).

Tabla 5.3: Parámetros de rugosidad de los depósitos de Ca-P formados sobre los materiales.

	Morfología de la cubierta	D_{3D}	R_q (nm)	R_a (nm)	R_{sw}	R_{ku}
MI	Esferulítica	2,555	133,81	69,34	1,891	3,573
MII	Esferulítica y red acicular	2,576	150,28	88,51	1,691	2,871
MIII	Red acicular	2,608	170,03	113,26	1,493	2,241
MIV	Red acicular	2,591	150,69	89,02	1,686	2,857

5.3.2 Cinética de crecimiento de las cubiertas

Se analizó la evolución en el tiempo del crecimiento de los recubrimientos de Ca-P mediante micrografías SEM. El aumento del espesor de los revestimientos en el tiempo alcanza un punto de saturación después de los 10 días. Suponiendo que la tasa de crecimiento

del recubrimiento mineral es controlada por las velocidades de difusión de los iones calcio y fósforo del SBF a la superficie del material, la cinética de crecimiento de los depósitos sobre materiales porosos se pueden expresar utilizando una ecuación empírica aplicada al crecimiento de fosfatos de calcio sobre materiales silíceos utilizada en un trabajo de investigación publicado por M. Fernández Leyes y col. [23]:

$$d^2 = kt \tag{5.1}$$

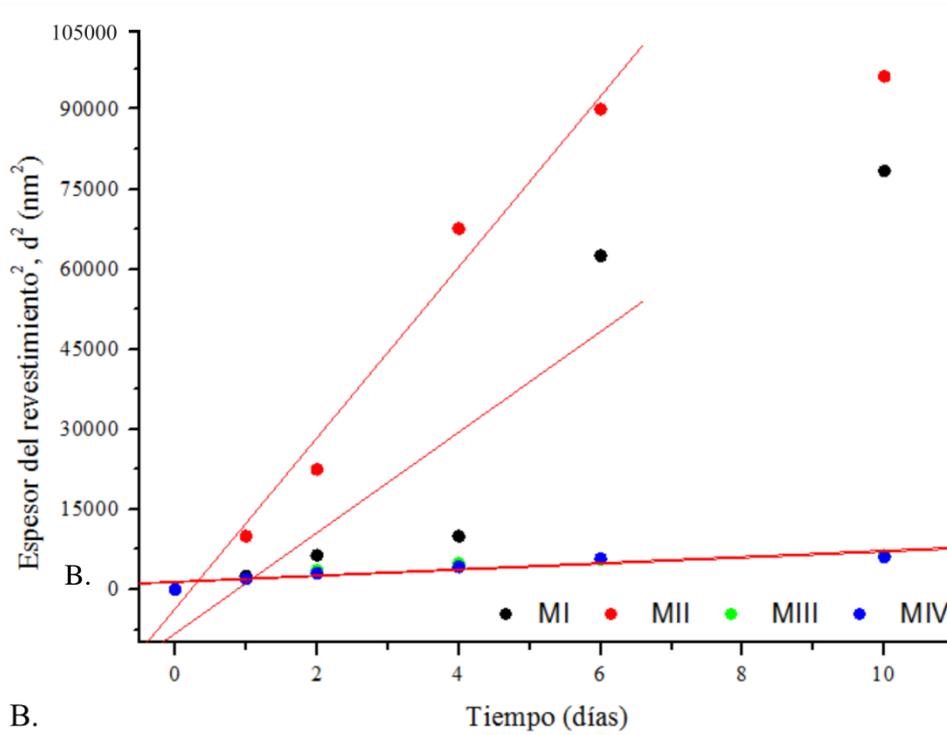
donde d es el espesor del revestimiento evaluado a partir de micrografías SEM, t es el tiempo de tratamiento con SBF y k es la constante de velocidad de crecimiento. En el gráfico de la figura 5.6 A se observa que los datos experimentales se ajustan a la ecuación 5.1 a MI y MII a tiempos iniciales de crecimiento y a MIII y MIV en todo el rango de tiempo evaluado.

A lo largo de los años se han descrito en detalle modelos de nucleación, crecimiento y aglomeración de partículas en solución bajo diferentes condiciones [24]. Sin embargo, la mayoría de estos modelos son complejos e incluyen tantos términos que resulta difícil su aplicación experimental. Una versión muy simplificada para este análisis es la ecuación de Avrami [24]:

$$d = d_{max}(1 - \exp(-k_{Av}t)^n) \tag{5.2}$$

donde d_{max} es el recubrimiento que alcanzó el espesor máximo, k_{Av} es la constante cinética Avrami y n el orden de reacción. Esta ecuación utiliza la geometría general del precipitado en crecimiento y tiene en cuenta el efecto de agotamiento de la fase de la matriz durante la conducción de la reacción. Como tal, proporciona una descripción cuantitativa de la cinética de la transformación del medio donde la cantidad total de los reactivos está restringida, pero es lo suficientemente simple para ser utilizada durante el análisis de la mayoría de los datos experimentales [24]. Por lo tanto, a modo de analizar la cinética de crecimiento de los cristales a mayor profundidad se aplicó esta ecuación (figura 5.6 B).

A.



B.

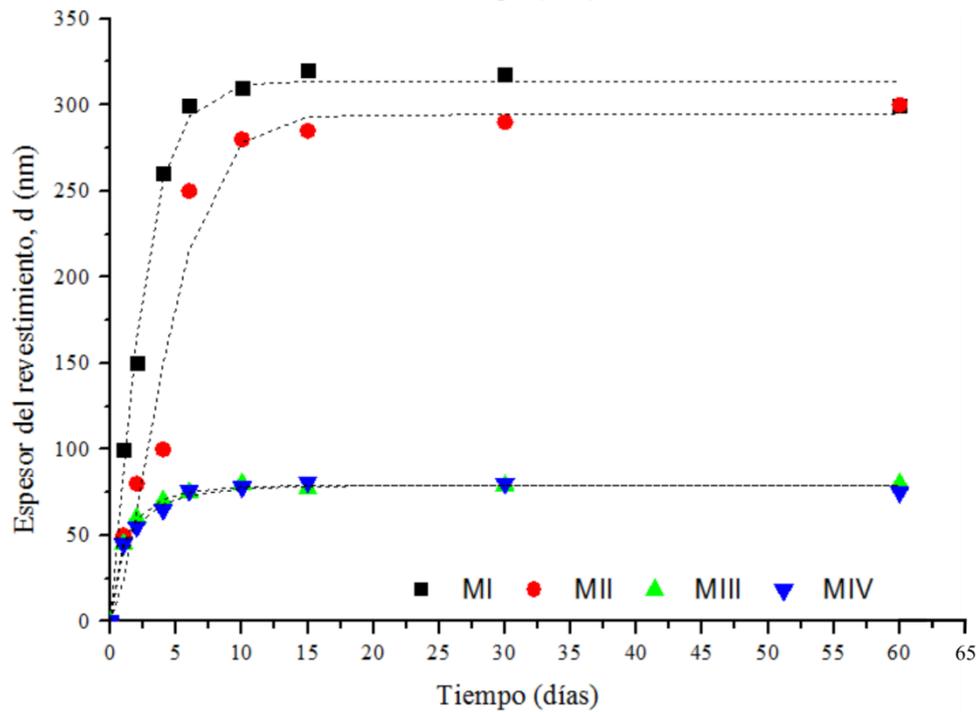


Figura 5.6: Cinética de crescimento de las cubiertas de Ca-P sobre los materiales MI, MII, MIII y MIV calculada utilizando la ecuación: (A) Empírica y (B) Avrami.

En todos los materiales ensayados la cinética de crecimiento de las capas de Ca-P se describe apropiadamente con la ecuación cinética de Avrami (tabla 5.4). Para los revestimientos compuestos por fases completamente esferulíticas o completamente reticulares, la ecuación ajusta con los datos experimentales con un $R^2 \sim 0,99$. Un valor menor $R^2 \sim 0,96$ se obtuvo para la cinética de crecimiento del recubrimiento sobre el material MII, probablemente porque los depósitos presentan dos morfologías diferentes, cada uno con una tasa de crecimiento distinta. Se observaron constantes cinéticas $n < 1$ para los materiales MIII y MIV que tuvieron recubrimientos homogéneos con aspecto de red formada por estructuras aciculares; mientras que para los recubrimientos esferulíticos (sobre MI y MII), la constante de Avrami (k_{Av}) fue 1,75 veces inferior y el orden de reacción n superior a 1. En términos generales, los gráficos utilizando las ecuaciones empírica y de Avrami demuestran que la cinética de nucleación y crecimiento de los depósitos fue mayor sobre MI y MII.

Tabla 5.4: Parámetros de la cinética de crecimiento de las cubiertas de Ca-P sobre los materiales.

	d_{exp} (nm)	Ecuación cinética de Avrami				Ecuación empírica	
		d_{max} (nm)	k_{Av} (día ⁻¹)	n	R^2	K (nm ² día ⁻¹)	R^2
MI	300	313 ± 5	0,39 ± 0,02	1,18 ± 0,11	0,994	15997 ± 108	0,990
MII	250 - 300	294 ± 16	0,20 ± 0,03	1,53 ± 0,38	0,960	8742 ± 200	0,943
MIII	75 - 80	79 ± 1	0,79 ± 0,04	0,70 ± 0,05	0,998	583 ± 125	0,899
MIV	60 - 75	79 ± 2	0,70 ± 0,08	0,67 ± 0,10	0,991	573 ± 89	0,9146

5.3.3 Influencia de las características superficiales de los materiales en la nucleación y crecimiento de las cubiertas

La cinética de deposición en la interfase de los materiales está estrechamente relacionada con las características superficiales de los mismos. Por consiguiente, como primer paso se procedió a correlacionar la morfología de los depósitos con los parámetros de rugosidad de cada material detallados en el capítulo 3 sección 3.3.4 de esta disertación. El parámetro de asimetría R_{sw} es positivo para todos los materiales, y se ha informado que

superficies con el parámetro R_{sw} ligeramente positivos favorece la nucleación de depósitos ricos en calcio en los ensayos de bioactividad [25]. En cuanto al parámetro de escarpadura (R_{ku}), los materiales MI y MII tienen un $R_{ku} \leq 2,32$; mientras que MIII y MIV es $R_{ku} \geq 2,62$. Esto indica que los dos primeros tienen más cantidad de valles profundos en comparación con MIII y MIV. Por lo tanto, la presencia de valles podría haber favorecido la formación de depósitos de Ca-P esferoidales, lo que coincide con lo publicado por Vanzillotta y col. en donde se afirma que en superficies rugosas los valles parecen ser el lugar preferencial para la nucleación y crecimiento de fosfatos de calcio [25]. El hecho de que los materiales más rugosos y con mayor cantidad de valles (MI y MII) sean los más bioactivos lleva a inferir que estos parámetros son factores clave durante el proceso de biomineralización; posiblemente la presencia de interrupciones de la red cristalina de la HA genera que queden expuestos grupos funcionales Ca^{2+} y PO_4^{3-} que actúan como centros de nucleación efectivos.

Se debe tener en cuenta que la identidad y cantidad de los iones expuestos en la superficie del material es dependiente de la composición del medio en el que se sumergen debido al intercambio iónico y [26] a la disolución gradual [27]. Es sabido que en solución acuosa los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} forman fosfatos de calcio de carga superficial positiva conocidos por su nombre en inglés como “*Posner’s clusters*” ($Ca_9(PO_4)_6$), que algunos autores los describen como los precursores de la HA hexagonal, y por consiguiente la unidad de crecimiento del cristal de HA [28], [29]. Retomando lo descrito en el capítulo 1 sección 1.3.1, los cristales de HA hexagonales tienen dos superficies cristalinas principales: el plano “c”, negativo por la presencia de grupos fosfato y el plano “a”, positivo con iones calcio expuestos en su superficie [30]. Los cristales de HA crecen más fácilmente a lo largo del eje c debido a la presencia de un sitio fuerte de unión a los *Posner’s clusters* en dirección [001], mientras que en la dirección [010] este sitio de unión no se encuentra presente. Por lo tanto, los diferentes depósitos observados sobre los materiales en los ensayos de biomineralización podrían estar influenciados en primer lugar por la velocidad de disolución y los iones liberados al entorno inmediato y, luego la cantidad y tipo de planos cristalinos expuestos en la superficie. Considerando la carga superficial de los materiales medido por potencial ζ el material MI es el único con carga negativa (capítulo 3 sección 3.3.5), lo que daría lugar a la nucleación de mayor cantidad de precursores amorfos de HA “*Posner’s clusters*”, por presentar más cantidad de planos “c” negativos expuestos.

5.3.4 Análisis termodinámico de la deposición de las cubiertas

El suero fisiológico simulado es una solución altamente sobresaturada con respecto a HA y estable por su alta energía de nucleación. Una vez que ocurre la nucleación sobre los materiales bioactivos la HA precipita del siguiente modo:



La fuerza impulsora termodinámica para la reacción anterior se calculan en base a la ecuación clásica de la variación de energía libre [31] en soluciones sobresaturadas que se expresa como:

$$\Delta G = -\frac{RT}{n} \ln(S) = -\frac{RT}{n} \ln(\text{PI}/K_{ps})^{1/9} \quad 5.3$$

donde ΔG es la energía libre de Gibbs, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, n es el número de iones y S es la sobresaturación, que se define como la relación del producto de las actividades iónicas del precipitado de HA ($\text{PI} = (\text{Ca}^{2+})^5(\text{PO}_4^{3-})^3(\text{OH}^-)$) y la constante de solubilidad (K_{ps}). A temperatura fisiológica normal se calcula que la energía libre de Gibbs de la precipitación de HA en SBF es de -13,2 KJ/mol, lo que significa que una vez que ocurre la nucleación la HA precipita espontáneamente, por lo tanto el factor determinante de la deposición es la nucleación [14]. La velocidad de nucleación de la HA se puede determinar utilizando la del modelo clásico de nucleación heterogénea [32]:

$$J = K \exp\left(-\frac{\Delta G^*}{kT}\right) = K \exp\left(-\frac{16\pi v^2 \gamma^3 f(\theta)}{3k^3 T^3 (\ln S)^2}\right) \quad 5.4$$

donde J es la velocidad de nucleación, k es la constante de Boltzmann, K es un factor cinético y ΔG^* es la energía libre de activación de la nucleación, que para núcleos esféricos puede ser expresado por v el volumen molar de apatita, γ la tensión interfacial entre la apatita y la solución y $f(\theta)$ es una función del ángulo de contacto entre el núcleo y el sustrato [33].

El modelo de nucleación heterogénea demuestra que en SBF la nucleación de HA se encuentra termodinámicamente más favorecida cuando el ángulo de contacto entre el núcleo y el material es menor y por lo tanto, cuando existe una mayor afinidad del sustrato por el núcleo [14], este efecto es más pronunciado sobre MI. Se deduce que los defectos

superficiales y la carga negativa del material MI aumenta eficazmente la velocidad de nucleación mediante la reducción de la energía de activación en la interfase, hecho que favorece la nucleación, crecimiento y aglomeración de depósitos de Ca-P esferoidales de composición química y estructura similar a la apatita biológica.

5.4 Conclusión

Luego de 10 días de inmersión de los materiales MI, MII, MIII y MIV en SBF se observó la formación de una cubierta de Ca-P en su superficie, lo que sugiere su naturaleza bioactiva. A diferencia del resto, la totalidad de la superficie de MI estaba cubierta por estructuras esferulíticas micrométricas, aunque sobre MII se observaron depósitos esferoidales aislados. La relación Ca/P de los materiales luego de los tratamientos se modificó y alcanzó el mismo valor que en el hueso trabecular y cortical humano en los materiales MI y MII, mientras que sobre los otros dos la relación Ca/P disminuyó por debajo de estos valores, posiblemente debido a la formación de depósitos de Ca-P deficientes en calcio.

Se propone que la hidrofiliidad, la carga superficial negativa y la presencia de mayor cantidad de valles profundos y topografía heterogénea de MI son características favorables para la nucleación y cinética de crecimiento de los depósitos minerales esferoidales. La deposición radial dio forma a cada glóbulo, y cada núcleo se convirtió en el centro de una esfera de morfología y composición química similar a la fase mineral ósea.

5.5 Revisión bibliográfica

- [1] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [2] J. Davies, “Understanding peri-implant endosseous healing.,” *J. Dent. Educ.*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [3] J. P. Davim, *Biomedical Composites: Materials, Manufacturing and Engineering*. 2014.
- [4] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 5, no. 6, pp.

- 117–141, 1971.
- [5] T. Kokubo, “Bioactive glass ceramics: properties and applications,,” *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155–163, 1991.
- [6] E. Mavropoulos, N. C. C. da Rocha, M. H. M. Rocha-Leão, and A. M. Rossi, “BSA Adsorption on Hydroxyapatite after Thermal Treatment,” *Key Eng. Mater.*, vol. 361–363, pp. 127–130, 2008.
- [7] S. M. Salman, S. N. Salama, and H. a. Abo-Mosallam, “The crystallization behaviour and bioactivity of wollastonite glass-ceramic based on $\text{Na}_2\text{O}-\text{K}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{F}$ glass system,” *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 3, no. 3, pp. 255–261, 2015.
- [8] R. Choudhary, S. Koppala, and S. Swamiappan, “Bioactivity studies of calcium magnesium silicate prepared from eggshell waste by sol–gel combustion synthesis,” *J. Asian Ceram. Soc.*, vol. 3, no. 2, pp. 173–177, 2015.
- [9] “ISO 23317 : 2014,” 2014.
- [10] B. Clarke, “Normal bone anatomy and physiology,,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 3 Suppl 3, pp. 131–139, 2008.
- [11] A. Pittrof, S. Bauer, and P. Schmuki, “Micropatterned TiO_2 nanotube surfaces for site-selective nucleation of hydroxyapatite from simulated body fluid,,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 1, pp. 424–31, Jan. 2011.
- [12] X. Lu and Y. Leng, “Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 10, pp. 1097–1108, 2005.
- [13] L. Panjian, R. Levy, T. Kokubo, P. Calvert, and C. Scheid, *Mineralization in Natural and Synthetic Biomaterials*. Boston, Massachusetts, USA: Materials Research Society, 1999.
- [14] J.-M. Wu and M. Wang, “Bioactive Bioceramic Coatings : Part I . Coatings on Non-Metallic Biomaterials,” in *Metal Oxide Nanostructures and Their Applications*, vol. 4, A. Umar and Y.-B. Hahn, Eds. American Scientific Publishers, CA, USA, 2010, pp. 1–28.
- [15] S. V. Dorozhkin, “Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine,” *Materials (Basel)*, vol. 2, no. 2, pp. 399–498, 2009.
- [16] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W3,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 721–734, 1990.
- [17] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga, and K. de Groot, “The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants,” *J. Biomed.*

- Mater. Res., vol. 28, no. 1, pp. 7–15, 1994.
- [18] T. Kobayashi, S. Ono, S. Hirakura, Y. Oaki, and H. Imai, “Morphological variation of hydroxyapatite grown in aqueous solution based on simulated body fluid,” *CrystEngComm*, vol. 14, pp. 1143–1149, 2012.
- [19] A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, A. Ripamonti, N. Roveri, M. Romanello, K. N. Suarez, and L. Moro, “Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 68, no. 1, pp. 45–51, 1997.
- [20] U. S. Pharmacopeia, “USP31-NF26 General chapter (official 12/1/08-4/30/09) <1181> Scanning Electron Microscopy,” 2009.
- [21] M. Uddin, T. Matsumoto, and M. Okazaki, “Biomimetic fabrication of apatite related biomaterials,” in *Biomimetics Learning from Nature*, INTECH Open Access Publisher, 2010, pp. 289–305.
- [22] K. . Stout, “Surface roughness,” *Mater. Des.*, vol. 2, no. 6, pp. 287–295, 1981.
- [23] M. Fernández-Leyes, V. Verdinelli, N. Hassan, J. M. Ruso, O. Pieroni, P. C. Schulz, and P. Messina, “Biomimetic formation of crystalline bone-like apatite layers on spongy materials templated by bile salts aggregates,” *J. Mater. Sci.*, vol. 47, no. 6, pp. 2837–2844, 2012.
- [24] W. M. Mullins and C. R. Elsass, “An Avrami analysis of the effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth,” *Biochem. J.*, vol. 291, no. 1, pp. 863–868, 1993.
- [25] P. S. Vanzillotta, M. S. Sader, I. N. Bastos, and G. De Almeida Soares, “Improvement of in vitro titanium bioactivity by three different surface treatments,” *Dent. Mater.*, vol. 22, no. 3, pp. 275–282, 2006.
- [26] P. Somasundaran and Y. H. C. Wang, “Surface chemical characteristics and adsorption properties of apatite,” in *Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite*, Springer, 1984, pp. 129–149.
- [27] T. Suzuki, T. Yamamoto, M. Toriyama, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, M. R. Mucalo, Y. Kawamoto, F. Nagata, and T. Kameyama, “Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 507–517, 1997.
- [28] X. Liu, K. Lin, and J. Chang, “Modulation of hydroxyapatite crystals formed from α -tricalcium phosphate by surfactant-free hydrothermal exchange,” *CrystEngComm*, vol. 13, no. 6, pp. 1959–1965, 2011.

- [29] A. S. Posner and F. Betts, "Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure," *Acc. Chem. Res.*, vol. 8, no. 8, pp. 273–281, 1975.
- [30] T. Kawasaki, "Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing," *J. Chromatogr. A*, vol. 544, pp. 147–184, 1991.
- [31] A. E. Nielsen, "Electrolyte crystal growth mechanisms," *J. Cryst. Growth*, vol. 67, no. 2, pp. 289–310, 1984.
- [32] J. W. Mullin, *Crystallization*. Butterworth-Heinemann, 2001.
- [33] K. Wang, Y. Leng, X. Lu, F. Ren, X. Geb, and Y. Ding, "Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid," *Biomaterials*, vol. 26, no. 10, pp. 1097–1108, 2005.

Capítulo 6

Adsorción de la proteína BSA e influencia en la bioactividad in vitro

6.1 Introducción

Gran cantidad de literatura científica se halla enfocada en el estudio de los mecanismos de adsorción de proteínas sobre materiales de aplicación biomédica. Su importancia radica en que el contacto de la sangre con un material extraño resulta en la adsorción de las proteínas del plasma sanguíneo en su superficie, causando reacciones inflamatorias y frecuentemente la formación de trombos, siendo esto un obstáculo para la aplicación de dispositivos implantables [1]. Sumado a esto, como se hizo mención en el capítulo 1 sección 1.3.2, el tipo y estructura conformacional de las proteínas adsorbidas determina la posterior adhesión de las células circundantes mediada por integrinas [2], [3].

Ha sido demostrado que la secuencia dominante de adsorción en suero empieza con la albúmina, seguido por la inmunoglobulina G, fibrinógeno y finalmente las proteínas de alto peso molecular [4]. La albúmina es la proteína más abundante del plasma sanguíneo humano y desempeña un rol fundamental en el transporte de ligandos endógenos y exógenos en la sangre, tales como ácidos grasos, esteroides e iones metálicos como el Ca^{2+} [5]. Al mismo tiempo, cumple una función importante en el mantenimiento del pH sanguíneo y contribuye a la presión osmótica de la sangre. La albúmina es capaz de migrar desde la sangre a los fluidos extravasculares del resto de los tejidos tales como el intestino, riñón, piel, músculo y hueso. En el hueso, a diferencia del resto de los tejidos esta proteína se encuentra mayormente adherida a la matriz y alrededor de un 27 % está disponible en el fluido extravascular para retornar al torrente sanguíneo [6].

En cuanto a su estructura, la albumina tiene forma globular asimétrica formada por tres dominios lineares principales (I, II y III), cada uno de ellos compuestos por dos subdominios (A y B). Su peso molecular es de 66,5 kDa y su punto isoeléctrico es 4,7, por tanto se carga negativamente al pH fisiológico de la sangre [7]. Generalmente para el estudio de la interacción albúmina – biomaterial se utiliza como modelo experimental a la albúmina sérica

bovina o BSA (del inglés “bovine serum albumin”) debido a que un 88% de su secuencia es homóloga [8], [9] (figura 6.1).

A.



B.



Figura 6.1: Comparación de la estructura de albúmina sérica (A) humana (HSA) y (B) bovina (BSA). Los diferentes dominios de las proteínas se indican con colores. Las imágenes fueron adaptadas de la publicación de Bekale y col. [10].

La adsorción de proteínas en los biomateriales es un proceso muy complejo en el cual se ven involucradas distintas fuerzas entre las proteínas y la superficie del material, incluyendo las fuerzas de van der Waals, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. En las investigaciones realizadas por Dee y col. [11] se han clasificado las principales propiedades intervinientes en dicha interacción en dos grupos: (i) las propiedades de las proteínas y (ii) las propiedades de la superficie. Dentro de las primeras se encuentra el tamaño de la proteína, la carga, la estabilidad estructural y la velocidad de desdoblamiento [11], siendo altamente influenciadas por el pH, concentración iónica y temperatura del medio en el que se encuentran. También resulta muy influyente la presencia de proteínas del mismo o de distinto tipo debido a que se genera una competencia por los sitios de unión originando un efecto de unión – desplazamiento denominado “efecto Vroman” [4]. En el segundo grupo, las propiedades superficiales del biomaterial, se encuentran la topografía (rugosidad, porosidad, tamaño de poro y tamaño de partícula, etc), hidrofiliicidad, composición química y carga [12]. Respecto a la topografía, los nanobiomateriales demandan un entendimiento profundo de los factores que afectan las interacciones con cualquier molécula del entorno debido a que tienen dimensiones similares y a que son capaces de adsorber gran cantidad de biomoléculas por su mayor relación superficie/volumen. Específicamente, las nanopartículas de HA han sido un

foco de considerable atención debido a que tienen adsorción selectiva a proteínas, enzimas y ADN, entre otras [13]–[15]. Tal es así que se encuentra ampliamente estudiada su interacción con proteínas como la albúmina sérica bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y soluciones iónicas [16]–[18].

Como se profundizó en el capítulo 5, la bioactividad de un implante depende, entre otros factores, de su capacidad para inducir la deposición de una capa de fosfatos de calcio (Ca-P) al tomar contacto con fluidos corporales. Sin embargo, un enfoque más realista a las condiciones fisiológicas exige la adición de proteínas al medio. La adhesión de las moléculas de BSA sobre la superficie de un material puede inhibir o inducir la deposición de fosfato de calcio en condiciones fisiológicas (pH 7,4 y 37 °C) y el efecto es altamente dependiente de la superficie del biomaterial estudiado [19]–[21]. Por esta razón, en el presente capítulo se evaluó el comportamiento de la BSA en la interfase con el material de HA y su efecto en el proceso de biomineralización. Para la realización de estas experiencias se seleccionó el material MI por ser el de características de bioactividad superiores (capítulo 5), para lo que se determinó previamente su superficie expuesta así como el volumen y tamaño de los poros.

6.2 Métodos experimentales

6.2.1 Reactivos

Albúmina sérica bovina-Fracción V (BSA, PM = ~66 000 g/mol, 95 %, Carl Roth), cloruro de sodio (NaCl, PM= 58,4 g/mol, 99,5 % Sigma), bicarbonato de sodio (NaHCO₃, PM= 84,007 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), cloruro de potasio (KCl, PM= 74,5513 g/mol, 99,5 % Sigma-Aldrich), fosfato dipotásico trihidratado (K₂HPO₄·3H₂O, PM= 228,23 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O, PM= 197,211 g/mol, 98 % Sigma-Aldrich), cloruro de calcio (CaCl₂, PM= 110,98 g/mol, 95 % Sigma-Aldrich), sulfato sódico (Na₂SO₄, PM= 142,04 g/mol, 99% Sigma-Aldrich), Tris (CH₂OH)₃CNH₂, PM= 121,1350 g/mol, 99 % Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl, PM= 36,46 g/mol, 30 - 34 % Cicarelli) y agua bidestilada.

6.2.2 Obtención de la superficie específica y porosimetría de MI

Las isothermas de adsorción de N₂ se realizaron a 77,6 K en un instrumento Micrometrics Modelo Accelerated Surface Area and Porosimetry System (ASAP) 2020. La muestra fue desgaseada a 373 K por 720 min a una presión de 10⁻⁴ Pa. La superficie específica del material (S_{BET}) se determinó usando el modelo de Brunauer-Emmet-Teller (BET), en donde se consideraron moléculas de nitrógeno con 0,43 nm de diámetro que ocupan un área (a_m) de 0,1620 nm² [22]. El análisis de la porosimetría se realizó mediante el modelo de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) a partir de los valores correspondientes a la rama de desorción de N₂ [23], [24]. Finalmente, el volumen de poro total se calculó mediante el método de Gurvitch [25].

6.2.3 Isotherma de adsorción de BSA

Para evaluar la adsorción de la proteína BSA sobre la superficie del material se empleó la técnica de espectrofotometría de absorción ultravioleta / visible, la misma es muy sensible para la cuantificación de proteínas, no destruye la muestra y asegura un resultado preciso y reproducible. El espectrofotómetro permite medir la concentración de las proteínas disueltas en solución a lo largo del tiempo mientras la misma se adsorbe - desorbe de la superficie del material que se encuentra en el fondo de la cubeta.

El experimento de adsorción se realizó con concentraciones de BSA en solución reguladora de fosfato (1X PBS, pH 7,4) entre 0,1 y 3 mg/ml. Para cada medida se colocaron 20 mg de MI en la cubeta e inmediatamente luego de agregar 2 ml de la solución de proteína se colocó la cubeta en el espectrofotómetro. Las medidas se hicieron en un espectrofotómetro Varian Cary 100 Bio con control de temperatura (UV09005M013) utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El ensayo se realizó a temperatura fisiológica (37 °C), durante 120 min cada 0,2 seg y a una longitud de onda de 278 nm, que permite la detección específica de los aminoácidos con anillos aromáticos triptófano y tirosina presentes en la estructura de la molécula de BSA [26]. Las concentraciones de la proteína en el sobrenadante fueron calculadas utilizando el coeficiente de extinción molar determinado experimentalmente $\epsilon = 43,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mediante la confección de una curva de calibrado utilizando concentraciones crecientes de BSA. Luego, la densidad (Γ) de BSA adsorbida sobre la superficie del material MI se determinó con la siguiente ecuación:

$$\Gamma = \frac{C_{ads} V}{m S_{BET}} \quad 6.3$$

donde C_{ads} es la cantidad de proteína adsorbida en el material MI, V el volumen de la solución, m la masa adsorbente y S_{BET} el área superficial BET de material. Las curvas obtenidas fueron realizadas por triplicado siendo altamente reproducibles, con una desviación estándar estimada de la la densidad de adsorción de $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^2$.

6.2.4 Ensayo de bioactividad en presencia de BSA

Se colocaron 20 mg de MI en un tubo polietileno a los cuales se les agregó 0,5 mg/ml de BSA en solución reguladora de fosfato (1X PBS), concentración en fase líquida en la cual se adsorbió mayor cantidad de proteína. Las muestras se colocaron en un baño hidrotérmico a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 min (tubo 1) y 45 min (tubo 2), correspondientes al tiempo en que tarda en llegar al equilibrio y a la mitad de este, respectivamente. Después de descartar el sobrenadante y lavar el material con agua tridestilada se agregaron 3 ml de suero fisiológico simulado (SBF) y los tubos se colocaron en un baño hidrostático a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 días, tiempo suficiente para la deposición de estructuras esferulíticas sobre MI en presencia de SBF (capítulo 5). Finalmente, el SBF se descartó y las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente.

6.2.5 Microscopía electrónica de barrido, cálculo de los parámetros de rugosidad y espectroscopia de energía dispersiva de rayos X

El estudio de la morfología de superficie de los depósitos formados sobre los materiales se realizó utilizando SEM y EDX en las mismas condiciones y con la misma metodología descrita previamente en el capítulo 3 secciones 3.2.3.1 y 3.2.3.2.

6.3 Resultados y discusión

6.3.1 Superficie, volumen y tamaño de poro del material MI

El estudio de la cantidad de BSA que se adsorbe sobre MI en el tiempo requiere del cálculo de la superficie expuesta del mismo, la cual se obtuvo mediante la técnica de adsorción de nitrógeno. Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 sobre el material MI fueron del tipo IVa con una histéresis del “loop” del tipo H1 (según clasificación IUPAC) característico de materiales porosos con una distribución de poro estrecha formados por aglomerados o empaquetamiento de partículas uniformes y ordenadas (figura 6.2 A) [27], lo cual coincide con lo observado en la micrografías TEM del material (capítulo 3, sección 3.3.1). La superficie específica del material calculado usando el método de BET fue de $80 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$. La distribución de diámetro de poro de la muestra utilizando el modelo de BJH fue aguzada, en concordancia con el tipo de isoterma obtenida. El volumen total de poro calculado mediante el modelo de Gurvitch fue de $0,35 \text{ cm}^3/\text{g}$ y el diámetro de poro promedio de aproximadamente $17,5 \text{ nm}$ (figura 6.2 B).

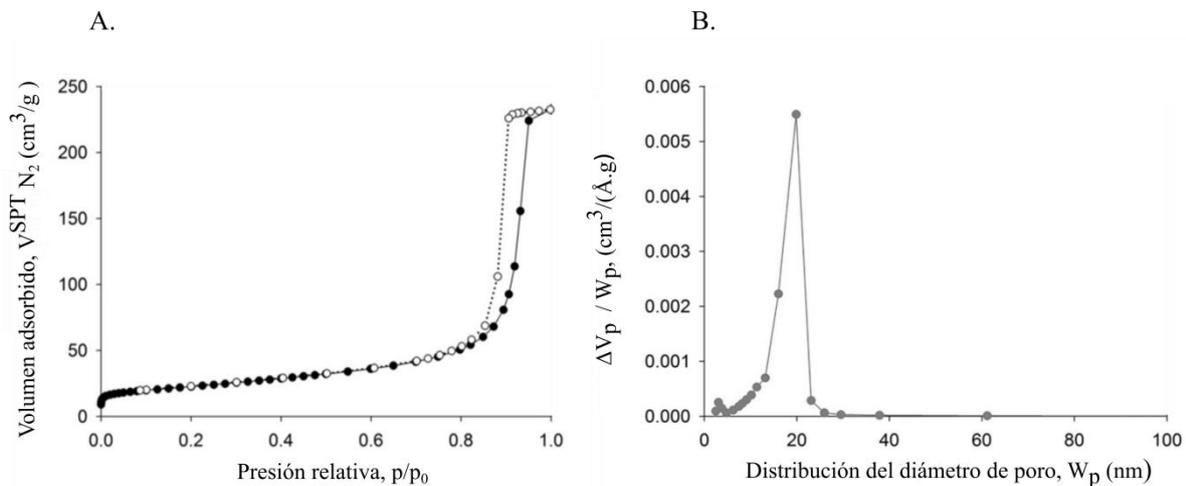


Figura 6.2: (A) Isothermas de adsorción (puntos llenos) y desorción (puntos vacíos) de N_2 y (B) distribución del diámetro de poro del material MI.

6.3.2 Adsorción de BSA sobre la HA MI

Para calcular la concentración de proteína adsorbida sobre el material se realizó una curva de calibrado utilizando distintas diluciones de BSA en 1X PBS. Allí se observó una dependencia lineal de la absorbancia con las concentraciones diluidas de proteína de acuerdo

con la ley de Lambert y Beer [26], y el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 43,824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) obtenido mediante la curva coincide con la información bibliográfica [28] (figura 6.3).

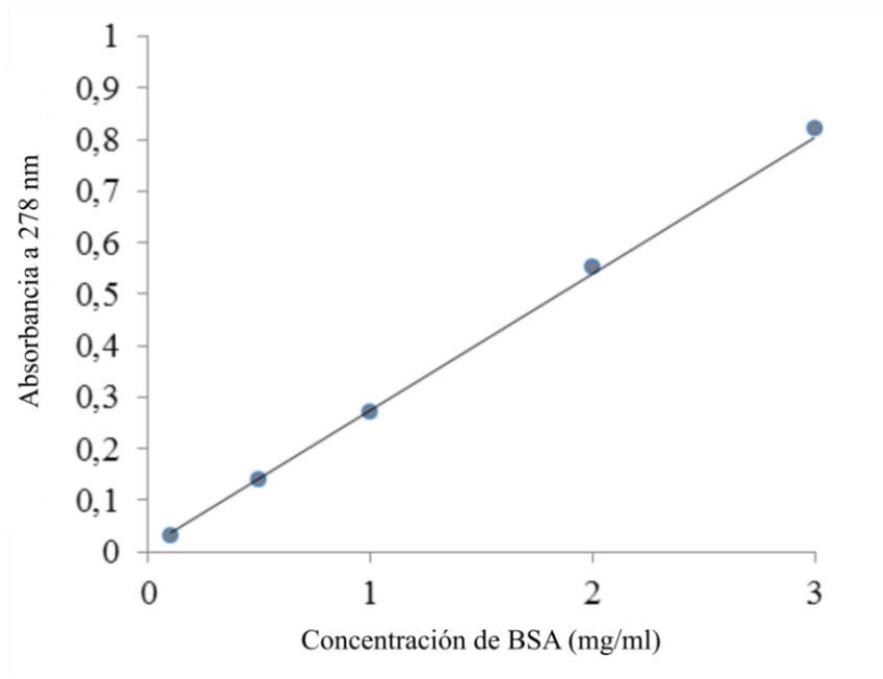


Figura 6.3: Curva de calibrado de la proteína BSA en solución reguladora 1X PBS a temperatura fisiológica (37 °C) y $\lambda = 278 \text{ nm}$. La curva se ajustó un modelo lineal $y = a+bx$ ($R^2 = 0,9995$).

La densidad de la proteína modelo BSA adsorbida (Γ) en el tiempo se graficó a partir de la utilización de diferentes concentraciones iniciales de BSA (C_i) que se mantuvieron en contacto con la superficie del absorbente durante 120 min (figura 6.4). La mayor cantidad de proteína adsorbida en el equilibrio, $2,79 \mu\text{g}/\text{dm}^2$, se observó utilizando $0,5 \text{ mg}/\text{ml}$ de C_i de BSA; adsorciones máximas similares de BSA sobre HA en el equilibrio se han encontrado en ensayos realizados por otros grupos de investigación [19], [29], [30].

En todos los perfiles se observó el mismo comportamiento; inicialmente hay una adsorción rápida seguida de otra más lenta hasta llegar a una densidad de proteína adsorbida constante a los 90 min aproximadamente, lo que corresponde al tiempo de equilibrio. Desde el comienzo del ensayo ($t = 0$) hasta su finalización (120 min) no se observan desorciones de la proteína siendo éste un comportamiento característico de los procesos irreversible [31].

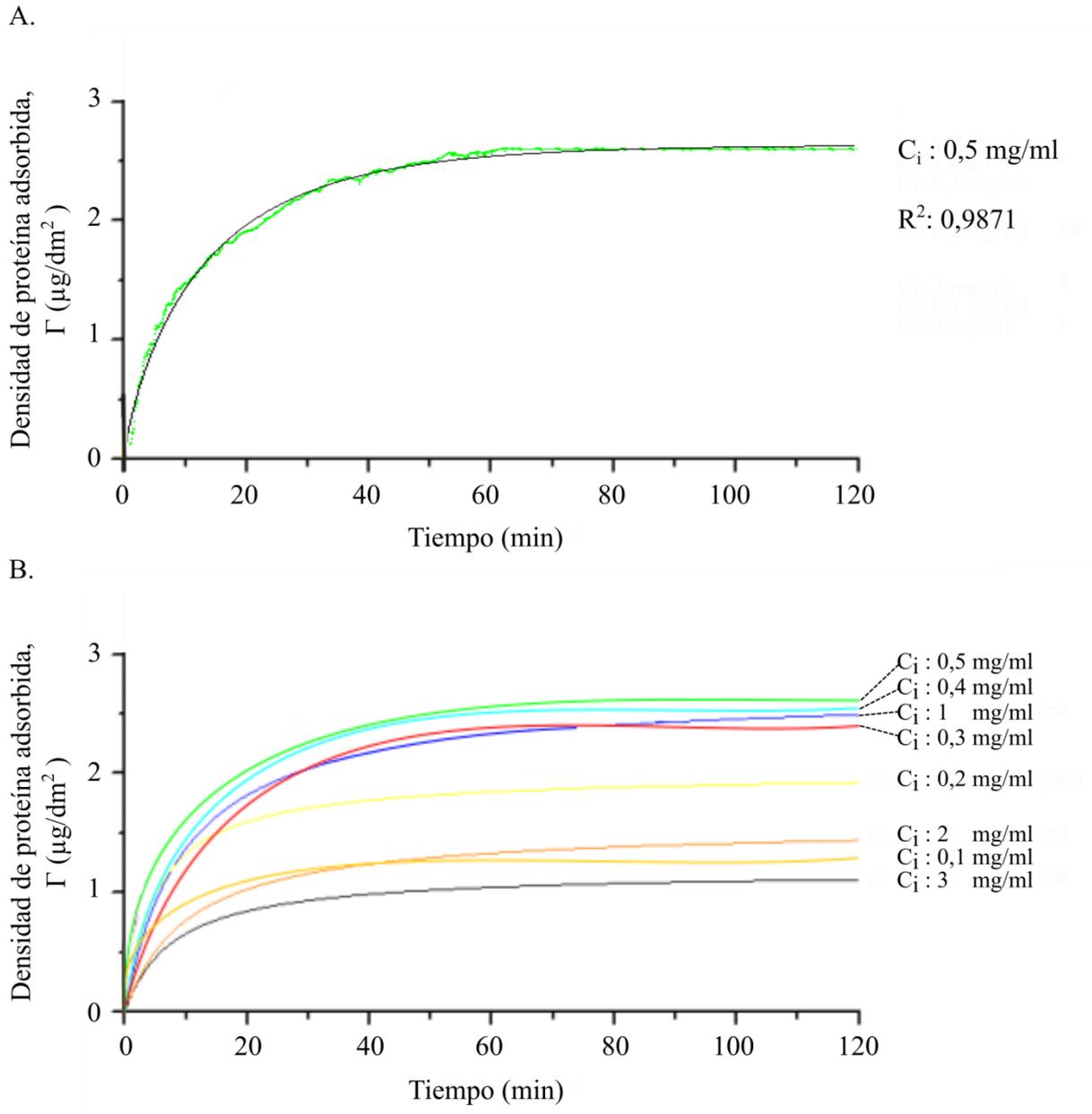


Figura 6.4: (A) Perfil de adsorción y ajuste de la curva de la proteína BSA sobre MI, $C_i = 0,5$ mg/ml. (B) Curvas de adsorción obtenidas utilizando C_i desde 0,1 a 3 mg/ml. Los perfiles de adsorción se ajustaron a un modelo asintótico $y = a - b \cdot c^x$, donde “a” es la asíntota horizontal del modelo y representa la adsorción máxima. Los R^2 obtenidos en todos los casos fueron superiores a 0,97.

A partir de las cantidades máximas de proteína presente en la superficie del material en el equilibrio se realizó la isoterma de adsorción de BSA. En el gráfico se muestra la capacidad de adsorción de MI en el equilibrio ($t = 90$ min) utilizando diferentes C_i de BSA

(figura 6.5), en donde se observó una adsorción de BSA aumentada a $C_i \leq 0,5$ mg/ml, sin embargo a $C_i > 0,5$ mg/ml la cantidad de proteína adsorbida en el equilibrio disminuye.

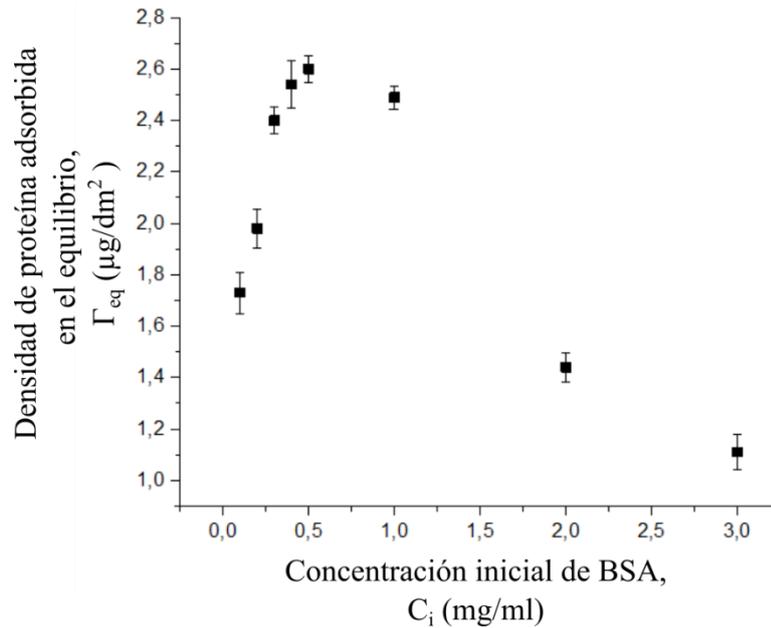


Figura 6.5: Isoterma de adsorción sobre MI utilizando diferentes concentraciones iniciales (C_i) de BSA.

Generalmente, el total de proteína adsorbida aumenta cuanto mayor sea la concentración inicial de proteína en solución, como lo que pudimos observar en el sistema estudiado a $C_i \leq 0,5$ mg/ml. La explicación de este fenómeno es que al aumentar la C_i en el sobrenadante la superficie va a ser ocupada por las proteínas más rápidamente, las moléculas adsorbidas tienden a sufrir menores grados de desdoblamiento en superficie, ocupando menores áreas, y por lo tanto dando lugar a la adsorción de más moléculas [32]. Sin embargo, en ciertas ocasiones esto no ocurre debido a la diversidad de interacciones que tienen lugar en el sistema tanto en solución como en la interfase, tales como (i) la interacción de las proteínas con los iones en solución, (ii) la interacción entre proteínas vecinas y (iii) la interacción de la proteína con el sustrato [33]. Cuando una proteína se encuentra en la interfase, puede someterse a cambios conformacionales debido a las fuerzas ejercidas por la superficie, estos cambios estructurales afectan la interacción entre las moléculas adsorbidas y como consecuencia se desarrollan asociaciones intermoleculares [34]. Estas interacciones pueden llevarse a cabo en escalas de tiempo muy variables, por lo que el estudio de la adsorción de proteínas resulta muy complejo [32].

A diferencia del comportamiento esperado, a $C_i > 0,5$ mg/ml se observa una disminución de la cantidad de proteína adsorbida al aumentar la C_i en el sobrenadante; resultados comparables fueron encontrados en otras investigaciones [34]. El mecanismo planteado en este rango de concentraciones es que la velocidad de desnaturalización de la proteína en la interfase podría ser mayor que la velocidad de adsorción, haciendo que el área ocupada por la albúmina sea más extensa impidiendo así la adhesión de otras moléculas y llegando más rápidamente a la saturación interfacial [35].

Un análisis detallado la molécula de BSA en solución ha demostrado que presenta forma de elipsoide prolato ($a = b < c$) con $a = b = 4$ nm y $c = 14$ nm [36]. Asumiendo que cada molécula está confinada en un paralelepípedo de $a = b = 4$ nm de lado y $c = 14$ nm de largo, y que puede ubicarse en la superficie del material sin desnaturalizarse en dirección perpendicular o paralelo, la densidad de adsorción en el equilibrio necesaria para completar una monocapa de BSA sería de 19,7 y 69 $\mu\text{g}_{\text{BSA}}/\text{dm}^2$ respectivamente. Teniendo en cuenta estos valores, incluso la cantidad máxima de BSA adsorbida en el equilibrio sobre MI (2,79 $\mu\text{g}/\text{dm}^2$) es menor a los valores teóricos, indicando que se forma una capa incompleta de proteínas sobre su superficie o, como se mencionó previamente, que las moléculas de BSA pierden su estructura lo que la lleva a ocupar un volumen mayor.

Cabe destacar que la adsorción de albúmina existe, incluso cuando las interacciones electrostáticas BSA – hidroxiapatita deberían ser desfavorables ya que, en condiciones fisiológicas (37 °C y pH = 7,4), tanto BSA [16] como MI (capítulo 3, sección 3.3.5) se encuentran cargados negativamente. Lo que se observa en nuestro sistema es que, luego de 120 min de tratamiento con distintas concentraciones de BSA, se llega a un equilibrio en la adsorción, indicando que existen sitios específicos de unión BSA – HA que se verían beneficiados posiblemente por la similitud de tamaño entre la proteína y las nanopartículas [37]. Sumado a esto, los cristales de HA tienen dos superficies principales de unión a proteínas: sobre el plano “a” los iones Ca^{2+} expuestos en solución acuosa son aptos para la unión a las regiones ácidas ($\text{HA}-\text{Ca}^+ \dots \text{OOC}-\text{Proteína}$); por otro lado, los planos “c”, que no presentan iones Ca^{2+} expuestos, se unen a los grupos básicos ($\text{HA}-\text{PO}^- \dots \text{H}_3\text{N}-\text{Proteína}$) [7], [19]. A pesar de que la BSA puede unirse a ambos sitios del cristal, las investigaciones realizadas por Kandori y col. [15] revelaron que a pH fisiológico las fuerzas de atracción electrostáticas entre la proteína BSA y materiales con una relación Ca/P alta es mucho mayor en comparación con los de menor relación Ca/P. De esta manera se propone que, debido a la

carga negativa de las moléculas de BSA a pH fisiológico del plasma sanguíneo, la unión BSA-MI ocurre en los planos “a” de los cristales, con iones Ca^{2+} expuestos.

6.3.3 Influencia de la adsorción de BSA en la bioactividad *in vitro*

Para el análisis de la influencia de la BSA en la bioactividad se compararon los resultados con los obtenidos en el capítulo 5 de “Bioactividad *in vitro*”, en donde se estudió la deposición de Ca-P sin pretratamiento con la proteína. En las micrografías SEM de las muestras previamente mencionadas se observó que luego de sumergir el material MI durante 10 días con SBF los depósitos de fosfato de calcio son de estructura esferulítica y cubren la totalidad de la superficie del material (figura 6.6 A). Sin embargo, cuando las muestras son pretratadas con 0,5 mg/ml BSA (90 min) y luego sumergidas en SBF durante 10 días, se observa una cubierta mineral aplanada y uniforme formada por depósitos aciculares (figura 6.6 B). No se encontraron diferencias notables entre el pretratamiento de 45 min (figura 6.7 C) y en el que se utilizó el tiempo de equilibrio de adsorción, 90 min (figura 6.7 D). Además, en ninguno de los tratamientos se observó la presencia de proteína BSA adherida.

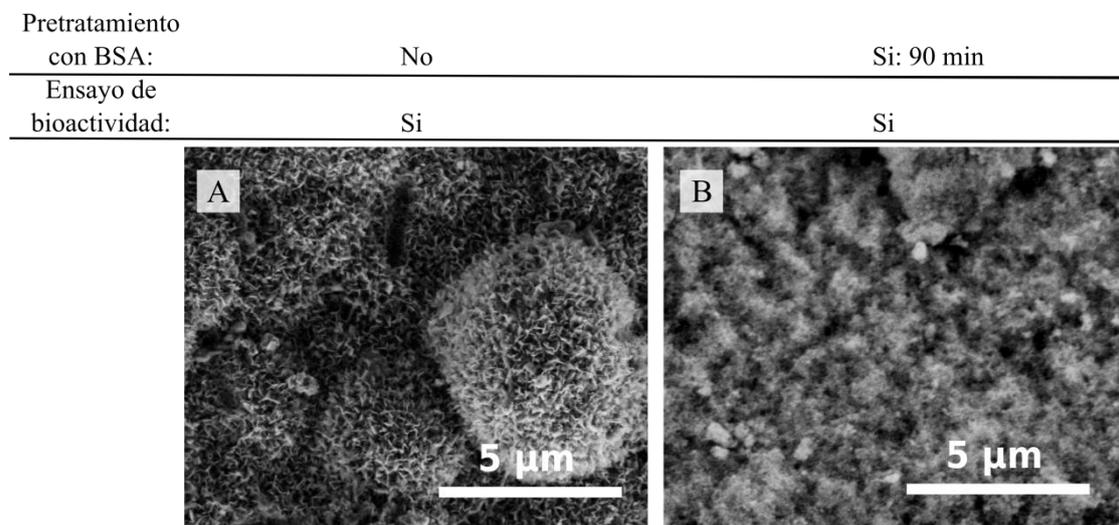


Figura 6.6: Micrografías SEM en donde se compara la micromorfología (A) luego del ensayo de bioactividad *in vitro* sobre MI y (B) después del ensayo de bioactividad *in vitro* sobre MI pretratado durante 90 min con BSA (0,5 mg/ml).

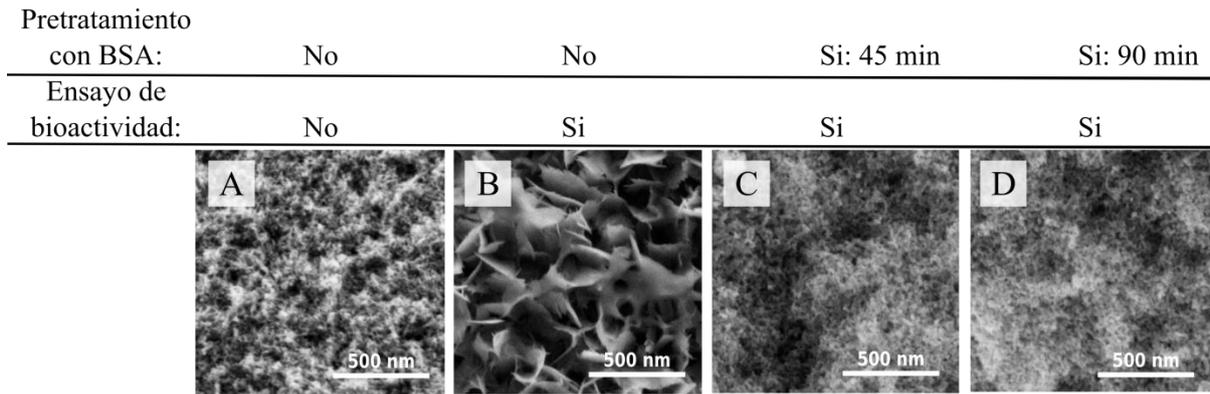


Figura 6.7: Micrografías SEM en donde se compara la nanomorfología de (A) el material MI sin tratamiento, (B) ensayo de bioactividad *in vitro* sobre MI, (C) ensayo de bioactividad *in vitro* sobre MI pretratado durante 45 min y (D) 90 min con BSA (0,5 mg/ml).

Confirmando lo analizado mediante inspección visual, los depósitos de las muestras pretratadas con BSA (a 45 y 90 min) mostraron valores de rugosidad media, R_a , similares al de la superficie del material sin tratar, y mayores en comparación con la de los depósitos esferulíticos sin pretratamiento con BSA. Además, mencionados depósitos esferulíticos tiene un perfil de rugosidad con distribución leptocúrtica, $R_{ku} > 3$, característico de perfiles donde predominan los picos altos [21]. En cuanto a la relación Ca/P, se observó que los depósitos de fosfato de calcio formados luego de los tratamientos con BSA son deficientes en calcio (tabla 6.1).

Tabla 6.1: Comparación de la composición química y los parámetros de rugosidad de los depósitos de Ca-P de los distintos tratamientos.

Pretratamiento con BSA:	No	No	Si, t = 45 min	Si t = 90 min
Ensayo de bioactividad <i>in vitro</i> :	No	Si	Si	Si
Aspecto general	Reticular	Esferas	Reticular	Reticular
R_a (nm)	119,75	67,22	118,96	120,25
R_{sw}	1,45	1,995	1,55	1,65
R_{ku}	2,12	3,422	2,25	2,46
Relación Ca/P (% atómico)	1,97	1,56	1,39	1,25
Carbono (% atómico)	12,12	19,17	14,8	14,98

Al igual que lo observado por otros grupos de investigación [20], [38], los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que la proteína BSA preadsorbida durante 45 y 90 min de algún modo desaceleró o inhibió la deposición de esferas de Ca-P.

6.3.3.1 Mecanismo propuesto para la inhibición de los depósitos generado por la BSA

Como se mencionó anteriormente, los eventos que tienen lugar durante la adsorción de proteínas es complejo y pueden influir en la mineralización de biomateriales de manera diferente. Según Serro y col. la albúmina interviene en el proceso de mineralización mediante dos fenómenos: (i) el balance entre la cantidad de moléculas de albúmina adsorbidas y las moléculas en solución; y (ii) la conformación de las moléculas de albúmina adsorbidas en la superficie. Estos factores influyen en la disponibilidad de los sitios de unión a calcio y fosfato que pueden actuar como centros de nucleación para los depósitos de Ca-P [19].

Algunos investigadores afirman que la albúmina es un inhibidor de la nucleación mineral en el hueso [38], lo que coincide con la inhibición de los depósitos esferulíticos en las muestras pretratadas con albúmina. Por otro lado, estudios similares realizados en materiales de óxido de titanio demostraron que la proteína BSA y los depósitos pueden coexistir formando un film mixto [20], lo cual podría estar ocurriendo en nuestro sistema a los 10 días de tratamiento.

Resulta importante tener en cuenta que el microanálisis elemental de las muestras pretratadas con BSA no muestran un aumento en el porcentaje atómico de los átomos de carbono (tabla 6.1); tampoco se observó la presencia de la proteína en las micrografías SEM (figura 6.7 C y D). Estos ensayos comprueban la hipótesis de que, luego de 10 días de incubación con SBF, sólo una cantidad relativamente baja de proteína BSA queda finalmente adsorbida en la interfase, la cual genera un efecto suficiente para desacelerar la nucleación esferoidal de Ca-P. Sin embargo, la existencia de depósitos de Ca-P reticulares luego del ensayo de bioactividad en presencia de BSA (figura 6.7 C y D) es un indicio de que la mineralización es, si bien retardada, posible.

Un análisis teórico profundo de la influencia de la BSA en la bioactividad fue realizado por Wang y col [39], en sus investigaciones exponen que la adición de BSA en SBF desfavorece termodinámicamente a la nucleación heterogénea ya que genera un aumento en la energía libre de activación de la nucleación (ΔG^*) mediada por la disminución de la cantidad de iones efectivos en solución, y por lo tanto reduciendo la velocidad de nucleación (J) (capítulo 5, ecuación 5.1). Además, la proteína adherida en la superficie del material afecta la tensión interfacial (γ), por aumento del ángulo de contacto. Luego de que se logra

sobrepasar la barrera energética que permite el inicio de la nucleación, el posterior crecimiento de los cristales es inhibido por un incremento de la viscosidad que aumenta la resistencia a la difusión de los iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} [39].

El ensayo realizado en el presente capítulo implica un pretratamiento con BSA y posterior adición de SBF, por lo tanto se plantea que en primer lugar hay un desplazamiento de las moléculas de BSA adsorbidas en los planos “a” de los cristales de HA por parte de los iones PO_4^{3-} presentes en la solución de SBF, haciendo que la proteína quede en el sobrenadante (figura 6.8). Luego, principalmente dos factores podrían estar disminuyendo la nucleación heterogénea y posterior crecimiento de los depósitos de Ca-P en la interfase del material: la unión de la BSA con los iones de la solución y el aumento de la viscosidad del sobrenadante generado por la presencia de proteína.

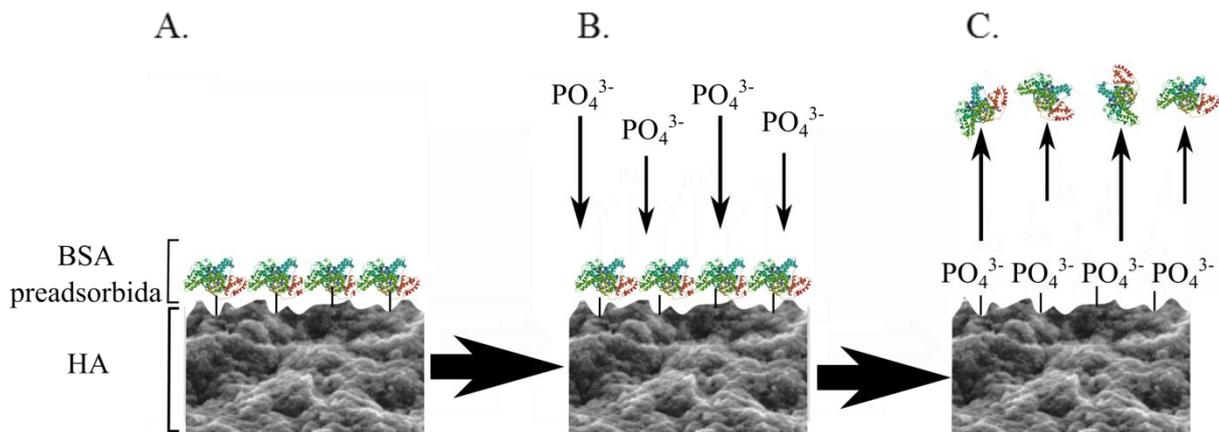


Figura 6.8: Mecanismo de acción propuesto: (A) La BSA se adsorbe sobre la superficie del material de HA. (B) Luego, cuando se sumerge el material en SBF los iones fosfato son atraídos a la interfase, (C) de este modo la proteína BSA es desplazada al sobrenadante. Adaptado de Yang y col. [16].

El efecto de desorción de la proteína BSA en presencia de SBF demuestra que el material no tiene una gran afinidad por la misma en condiciones fisiológicas, lo cual es una respuesta deseada ya que es ampliamente reconocido que la albúmina bloquea la unión de otras proteínas “pro-adherentes” de la matriz extracelular que presentan la secuencia de aminoácidos arginina - glicina - asparagina (RGD), como la fibronectina, el colágeno y la vitronectina. Estas proteínas RGD son reconocidas por los receptores de integrina celulares, permitiendo el reconocimiento, adhesión y proliferación celular, y finalmente asegurando la aceptación del implante [7].

6.4 Conclusión

Durante este estudio se determinó que la adsorción de la proteína BSA sobre MI (superficie específica BET = $80 \pm 3 \text{ m}^2/\text{g}$) aumenta hasta una C_i de BSA de 0,5 mg/ml, llegando al equilibrio a los 90 min con un máximo de proteína adsorbida de $2,79 \mu\text{g}/\text{dm}^2$. Por otro lado, cuando se utilizaron C_i de BSA entre 0,5 y 3 mg/ml, la cantidad de proteína adsorbida en el equilibrio fue disminuyendo, posiblemente debido a la interacción de las proteínas con los iones en solución y las proteínas vecinas, y a cambios conformacionales de la molécula que ocurren en la interfase con el material. Se propone que a $C_i > 0,5 \text{ mg/ml}$ la velocidad de desnaturalización de la proteína en la interfase haya sido mayor que la velocidad de adsorción, haciendo que el área ocupada sea más extensa y no permita la adhesión de otras moléculas, llegando más rápidamente a la saturación de la superficie.

Los ensayos de bioactividad *in vitro* demostraron que la proteína BSA preadsorbida durante 45 y 90 min se desorbió al estar sumergido en SBF durante 10 días. Se propone que existe una competencia por los sitios de anclaje a la HA entre la BSA y los iones del SBF que desplazan a la proteína al sobrenadante. Allí la BSA disminuye la cantidad de iones efectivos y aumenta en la viscosidad de la solución de SBF generando la desaceleración de la nucleación y crecimiento de los depósitos de Ca-P, pero no la inhibición total de la mineralización.

Es importante destacar la importancia de los resultados preliminares obtenidos, ya que la baja afinidad del material MI con la proteína BSA, ambos cargados negativamente en condiciones fisiológicas, es un buen indicio ya que se sabe que la albúmina sérica humana no permite la unión de otras proteínas necesarias para la adhesión celular [38], factor clave para la posterior osteoinducción y osteointegración del implante.

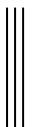
6.5 Referencias bibliográficas

- [1] M. Beragoui, C. Aguir, M. Khalfaoui, E. Enciso, M. J. Torralvo, L. Duclaux, L. Reinert, M. Vayer, and A. Ben Lamine, “Bovine serum albumin adsorption onto functionalized polystyrene lattices: A theoretical modeling approach and error analysis,” *Prog. Theor. Exp. Phys.*, vol. 2015, no. 3, pp. 1–25, 2014.
- [2] M. M. Stevens and J. H. George, “Exploring and engineering the cell surface interface,” *Science (80-.)*, vol. 310, no. 5751, pp. 1135–1138, 2005.
- [3] R. Langer and D. A. Tirrell, “Designing materials for biology and medicine,” *Nature*, vol. 428, no. 6982, pp. 487–492, 2004.
- [4] S. M. Slack and T. A. Horbett, “The Vroman effect-A critical review,” *Proteins interfaces II*, vol. 602, pp. 112–128, 1995.
- [5] X. M. He and D. C. Carter, “Atomic structure and chemistry of human serum albumin,” *Nature*, vol. 358, no. 6383, pp. 209–215, 1992.
- [6] M. Owen and J. T. Triffitt, “Extravascular albumin in bone tissue,” *J. Physiol.*, vol. 257, no. 2, pp. 293–307, 1976.
- [7] M. Tagaya, T. Ikoma, T. Takemura, N. Hanagata, T. Yoshioka, and J. Tanaka, “Effect of interfacial proteins on osteoblast-like cell adhesion to hydroxyapatite nanocrystals,” *Langmuir*, vol. 27, no. 12, pp. 7645–7653, 2011.
- [8] F. F. Tian, F. L. Jiang, X. Le Han, C. Xiang, Y. S. Ge, J. H. Li, Y. Zhang, R. Li, X. L. Ding, and Y. Liu, “Synthesis of a novel hydrazone derivative and biophysical studies of its interactions with bovine serum albumin by spectroscopic, electrochemical, and molecular docking methods,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 46, pp. 14842–14853, 2010.
- [9] P. Bolel, N. Mahapatra, and M. Halder, “Optical Spectroscopic Exploration of Binding of Cochineal Red A with Two Homologous Serum Albumins,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, pp. 3727–3734, 2012.
- [10] L. Bekale, D. Agudelo, and H. A. Tajmir-Riahi, “The role of polymer size and hydrophobic end-group in PEG–protein interaction,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 130, pp. 141–148, 2015.
- [11] K. C. Dee, D. A. Puleo, and R. Bizios, “Biomaterials,” *An Introd. to Tissue-Biomaterial Interact.*, vol. 4, pp. 1–13, 2002.
- [12] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, “Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants,”

- Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–767, 2011.
- [13] J. W. Shen, T. Wu, Q. Wang, and H. H. Pan, “Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 5, pp. 513–532, 2008.
- [14] K. Kandori, K. Murata, and T. Ishikawa, “Microcalorimetric study of protein adsorption onto calcium hydroxyapatites,” *Langmuir*, vol. 23, no. 4, pp. 2064–2070, 2007.
- [15] K. Kandori, a. Masunari, and T. Ishikawa, “Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 76, no. 3, pp. 194–206, 2005.
- [16] Z. Yang and C. Zhang, “Adsorption/desorption behavior of protein on nanosized hydroxyapatite coatings: A quartz crystal microbalance study,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 8, pp. 4569–4574, 2009.
- [17] J. Sun and L. Wu, “Adsorption of protein onto double layer mixed matrix membranes,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 123, pp. 33–38, 2014.
- [18] K. Kandori, A. Masunari, and T. Ishikawa, “Study on adsorption mechanism of proteins onto synthetic calcium hydroxyapatites through ionic concentration measurements,” *Calcif. Tissue Int.*, vol. 76, no. 3, pp. 194–206, 2005.
- [19] A. P. Serro, M. Bastos, J. C. Pessoa, and B. Saramago, “Bovine serum albumin conformational changes upon adsorption on titania and on hydroxyapatite and their relation with biomineralization,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 70, no. 3, pp. 420–427, 2004.
- [20] A. P. Serro, A. C. Fernandes, B. Saramago, J. Lima, and M. A. Barbosa, “Apatite deposition on titanium surfaces—the role of albumin adsorption,” *Biomaterials*, vol. 18, no. 14, pp. 963–968, 1997.
- [21] P. A. Marques, A. P. Serro, B. J. Saramago, a. C. Fernandes, M. C. . F. Magalhães, and R. N. Correia, “Mineralisation of two phosphate ceramics in HBSS: Role of albumin,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 3, pp. 451–460, 2003.
- [22] B. . Lippens, B. . Linsen, and J. H. d. Boer, “Studies on pore systems in catalysts I. The adsorption of nitrogen; apparatus and calculation,” *J. Catal.*, vol. 3, no. 1, pp. 32–37, 1964.
- [23] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. M. Haynes, N. Pernicone, J. D. F. Ramsay, K. S. W. Sing, and K. K. Unger, “Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 66, no.

- 8, pp. 1739–1758, 1994.
- [24] E. P. Barrett, L. G. Joyner, and P. P. Halenda, “The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from nitrogen isotherms,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 73, no. 1, pp. 373–380, 1951.
- [25] L. J. Gurvich, “Physico-chemical attractive force,” *Zh. Russ. Fiz-Khim. Obs. Chem*, vol. 47, pp. 805–827, 1915.
- [26] F. Schmid, “Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry,” *eLS*, 2001.
- [27] K. S. W. Sing, “Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 603–619, 1985.
- [28] F. Putnam, *The Plasma Proteins V3: Structure, Function, and Genetic Control*. Elsevier, 2012.
- [29] D. T. H. Wassell, R. C. Hall, and G. Embery, “Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite,” *Biomaterials*, vol. 16, no. 9, pp. 697–702, 1995.
- [30] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, K. L. Van, a. V. Zavgorodniy, and R. Rohanizadeh, “Modulating protein adsorption onto hydroxyapatite particles using different amino acid treatments,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 70, pp. 918–927, 2012.
- [31] N. Hassan, V. Verdinelli, J. M. Ruso, and P. V. Messina, “Assessing structure and dynamics of fibrinogen films on silicon nanofibers: towards hemocompatibility devices,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 24, pp. 6582–6592, 2012.
- [32] R. a. Latour, “The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 103, no. 3, pp. 949–958, 2015.
- [33] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger, “Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 162, no. 1–2, pp. 87–106, 2011.
- [34] M. van der Veen, M. C. Stuart, and W. Norde, “Spreading of proteins and its effect on adsorption and desorption kinetics,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 54, no. 2, pp. 136–42, 2007.
- [35] J. Lyklema, *Fundamentals of interface and colloid science: soft colloids*. Academic press, 2005.
- [36] J. L. Wehmeyer, R. Synowicki, R. Bizios, and C. D. García, “Dynamic adsorption of albumin on nanostructured TiO₂ thin films,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 30, no. 2, pp. 277–282, 2010.
- [37] M. S. Lord, M. Foss, and F. Besenbacher, “Influence of nanoscale surface topography

- on protein adsorption and cellular response,” *Nano Today*, vol. 5, no. 1, pp. 66–78, 2010.
- [38] M. Tijima, “In vitro crystal growth of octacalcium phosphate on type I collagen fiber,” vol. 137, pp. 153–160, 1994.
- [39] K. Wang, Y. Leng, X. Lu, F. Ren, X. Geb, and Y. Ding, “Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 10, pp. 1097–1108, 2005.



Capítulo 7

Biocompatibilidad en osteoblastos

7.1. Introducción

La biocompatibilidad se define como la habilidad de un material a estar en contacto con los tejidos vivos sin causar daño, y por lo tanto promover una respuesta favorable en el hospedador [1]. La reacción del tejido huésped hacia la presencia de un material exógeno es un proceso muy complejo que depende fundamentalmente de las características fisicoquímica del material. Si el material es biocompatible estas características promoverán las reacciones iniciales de las células circundantes y las secuencias de eventos culminarán en la restauración del tejido dañado. En particular los materiales utilizados para sustitución ósea deberán contar con una semejanza estructural y funcional con el hueso, y además evitar complicaciones tales como el rechazo inmunológico y/o la transferencia de patógenos [2]–[4]. Un paso importante para el estudio de la biocompatibilidad de materiales implantables es la evaluación de la viabilidad de las células formadoras de la matriz ósea, los osteoblastos. En el caso de que el material utilizado resulte citotóxico el número de células disminuirá por la inducción de necrosis y/o apoptosis.

La formación de tejido óseo nuevo sobre la superficie del implante no solo implica la supervivencia de los osteoblastos sino también el desencadenamiento de una secuencia de eventos que intervienen en el crecimiento, maduración y diferenciación de los mismos. La diferenciación de osteoblastos, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ve reflejada en la expresión de niveles máximos de ciertos genes que se caracteriza por tres eventos principales: (i) proliferación celular, (ii) maduración de la matriz extracelular, y (iii) mineralización de la matriz [5]. Durante la fase de maduración de la matriz hay una máxima expresión de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) que es un indicador de la diferenciación osteoblástica temprana (figura 7.1). Un incremento de su actividad equivale a un aumento de la actividad de los osteoblastos maduros, en consecuencia se utiliza como indicador *in vitro* de maduración e inicio de la osteogénesis [6].

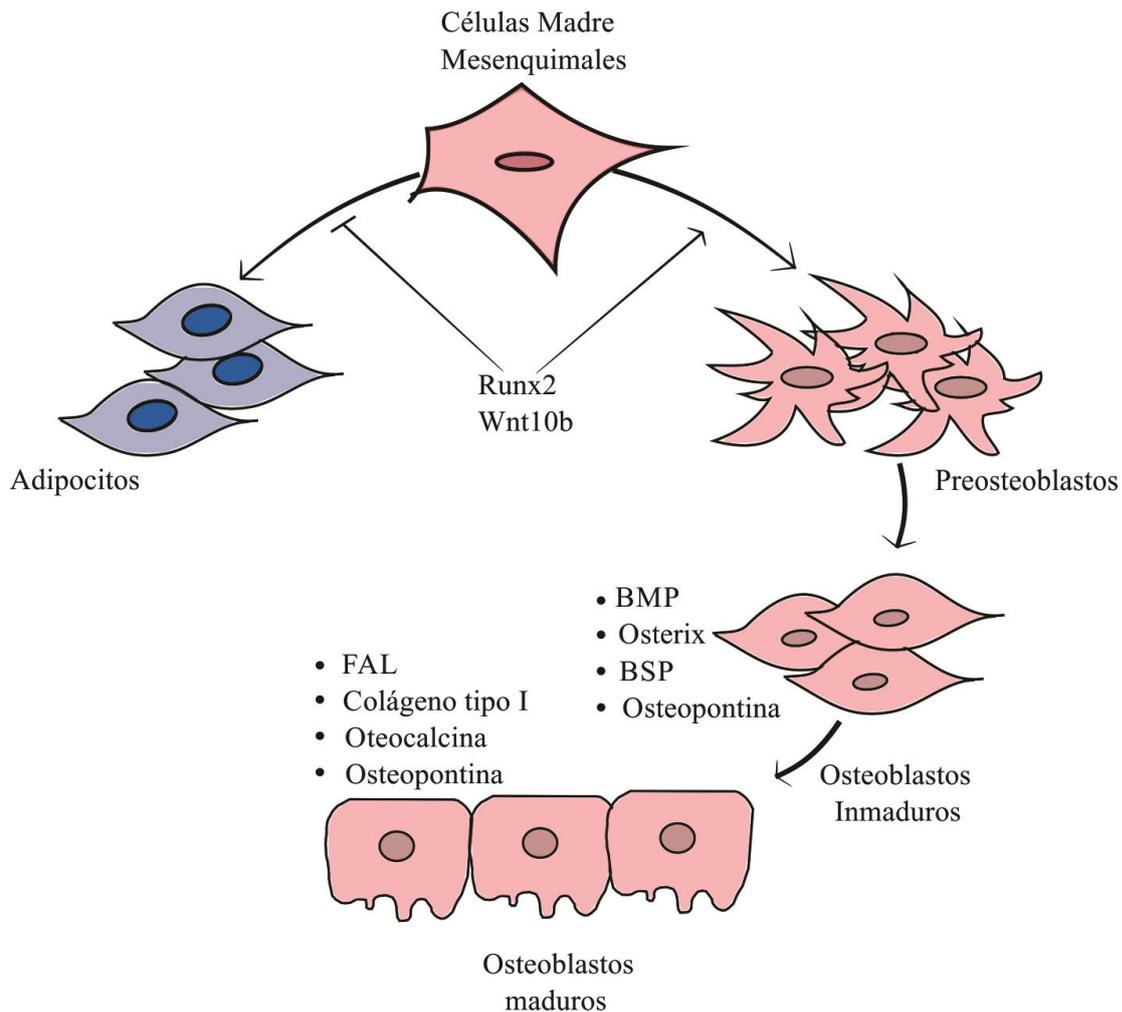


Figura 7.1: Principales proteínas expresadas en diferentes etapas de la diferenciación de las células madre mesenquimales o MSC (del inglés "mesenchymal stem cells"). Abreviaciones: Runx2 (factor de transcripción relacionados con Runt-2), Wnt10b (familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas), BMPs (proteínas morfogénicas óseas); BSPs (siloproteínas del hueso) y FAL (fosfatasa alcalina). Esquema adaptado de la publicación de Yu Zhang y col. [7].

El mecanismo por el cual la enzima FAL lleva a cabo su función en el organismo no se encuentra totalmente dilucidado, pero parece actuar en el aumento de la concentración local de fosfato inorgánico elevando su concentración en el medio extracelular, promoviendo la mineralización mediante la generación de centros de nucleación para el depósito de las sales minerales y disminuyendo la concentración de pirofosfato extracelular, un inhibidor de la formación mineral. La enzima FAL se localiza en el exterior de la membrana plasmática de las células y en el exterior de las membranas de las vesículas de la matriz que éstos liberan [8], por lo cual su actividad puede ser cuantificada mediante ensayos colorimétricos.

En capítulos previos se demostró como las diferentes características superficiales de los materiales influyen en la degradación, bioactividad y adsorción de proteínas. En el presente capítulo se abordaron ensayos con el objetivo de evaluar si las características fisicoquímicas y topográficas de los materiales influyen sobre la viabilidad, morfología y actividad de la proteína FAL en osteoblastos de calvaria de rata.

7.2. Métodos experimentales

7.2.1. Reactivos

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, PM = 292,24 g/mol, Sigma-Aldrich), Medio esencial mínimo α suplementado con suero fetal bovino o FBS (del inglés “fetal bovine serum”) al 15 % y 10 % (α -MEM-15 % FBS, Sigma-Aldrich y α -MEM-10 % FBS, Sigma-Aldrich), solución reguladora de fosfato salino o PBS (1X, Sigma-Aldrich), colorante azul de tripán (0,4 %, Gibco), tinción Giemsa ($C_{14}H_{14}ClN_3S$, PM = 291,80, Sigma), kit de actividad de la fosfatasa alcalina (FAL) (Wiener Lab., Rosario, Argentina), cloruro de calcio ($CaCl_2$, PM = 91 g/mol, 94 %, Anedra).

7.2.2. Aislamiento y cultivo de los osteoblastos de calvaria de rata

Los ensayos se realizaron utilizando un cultivo primario de preosteoblastos y osteoblastos inmaduros aislados de calvarias de ratas neonata. Cabe destacar que a diferencia de las líneas celulares inmortalizadas, el cultivo primario tiene como ventaja su similitud genética, fenotípica y funcional con las células del organismo brindando resultados más fiables y por tanto resultan reproducibles *in vivo* [9].

Para extraer las calvarias, las ratas fueron sacrificadas por decapitación rápida siguiendo los protocolos de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” publicado por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos o NIH (del inglés “National Institutes of Health”, publicación No. 85-23, revisado 1996). Brevemente, las calvarias se incubaron a 37 °C en 1X PBS que contenía 4 mM de EDTA durante dos períodos de 10 min, y los sobrenadantes fueron descartados. Posteriormente, las calvarias se lavaron en 1X PBS para luego realizar una digestión enzimática en una solución de 200 U/ml de

colagenasa (U/ml: unidades de enzima por mililitro de disolución) en 1X PBS durante cuatro períodos de 15 min. Las células liberadas durante la primera digestión fueron descartadas, mientras que las digestiones posteriores se recolectaron y se separaron de la solución enzimática mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm. Luego, los osteoblastos fueron cultivados en α -MEM – 15 % FBS, 1 % de penicilina y estreptomicina (α -MEM – 15 % FBS, 1 % P-E) a 37°C en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂). El medio de cultivo se descartó luego de 24 h y se sustituyó por α -MEM – 10 % FBS, 1 % P-E, en el cual las células se cultivaron durante 2 ó 3 días hasta llegar a aproximadamente un 80 % de confluencia. Finalmente, las células se almacenaron congeladas en nitrógeno líquido hasta su uso. El día del ensayo se descongelaron y se cultivaron en α -MEM – 15 % FBS, 1 % P-E, luego se incubaron a 37 °C en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂). Después de 24 h, el medio fue sustituido por α -MEM – 10 % de FBS, 1 % P-E, y las células se cultivaron hasta aproximadamente un 80 % de confluencia luego de 2 ó 3 días.

7.2.3. Tratamientos de osteoblastos de calvaria de rata

Los tratamientos realizados para los ensayos de viabilidad y morfología fueron los siguientes: T1) Los osteoblastos se sembraron en placas de 48 pocillos en presencia de los materiales (71,42 mg/ml) y luego se cultivaron durante 48 y 72 h en α -MEM – 10 % de FBS, 1 % P-E en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂) a 37 °C; T2) Los osteoblastos se sembraron en placas de 48 pocillos durante 24 h en α -MEM – 10 % de FBS, 1 % P-E en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂) a 37 °C y luego se agregaron los materiales (71,42 mg/ml) sobre las células previamente adheridas y se continuó la incubación durante 48 y 72 h. Como controles se utilizaron células sometidas a los mismos tratamientos pero en ausencia de material.

7.2.4. Ensayo de viabilidad

El estudio del efecto de los nanomateriales en la viabilidad de preosteoblastos y osteoblastos inmaduros de calvaria de rata se realizó mediante el método de tinción excluyente azul de tripán. Esta técnica se basa en el principio de que las células que presentan la membrana plasmática íntegra, y por lo tanto viables, no incorporan el colorante; por el contrario la molécula atraviesa las membranas de las células muertas por lo que se colorean de azul. Los cultivos controles y los tratados con los materiales se lavaron con solución

reguladora 1X PBS y se tiñeron con 0,1 % de colorante azul de tripán. Las células se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente en agitación lenta utilizando un agitador orbital, y a continuación se observaron en un microscopio invertido y se contaron las células por campo [10]. La cantidad de células se obtuvo cuantificando las que excluían el colorante (células viables) y luego se compararon con la muestra control (sin material).

7.2.5. Estudio de la morfología celular

Para evaluar la morfología de las células en presencia de los materiales, se montaron en un portaobjetos de microscopio, se secaron al aire, se fijaron con etanol absoluto y se tiñeron utilizando la técnica de Giemsa [11]. Finalmente, se observaron con un microscopio Nikon Eclipse TE 300 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS U2.

7.2.6. Cuantificación de la actividad de la fosfatasa alcalina

Para cuantificar la actividad FAL los osteoblastos de calvaria de rata neonata se cultivaron durante 4 y 7 días en α -MEM – 10 % de FBS, 1 % P-E en ausencia y presencia del material (71,42 mg/ml) en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂) a 37 °C. Como controles positivos de actividad FAL se adicionó 4 mM de CaCl₂ al medio de cultivo de las células y teniendo en cuenta que el medio de cultivo utilizado para los ensayos contiene 1,8 mM de Ca²⁺ [12], en total estuvieron expuestos a 5,8 mM de Ca²⁺. La justificación de la adición de CaCl₂ en los controles positivos se basa en que se ha encontrado en literatura científica que la proliferación y maduración de cultivos primarios de osteoblastos son estimuladas cuando se cultivan en presencia de concentraciones similares de calcio [13].

Una vez finalizados los tratamientos, los osteoblastos se lisaron según los procedimientos descritos por Ayala - Peña y col. [14]. La actividad FAL se midió utilizando un kit comercial de Wiener Laboratorios, el cual permite calcular la cantidad de enzima de manera indirecta mediante el siguiente proceso: (i) La fosfatasa alcalina libera fenol en presencia de la solución reguladora aminometil propanol (pH= 10). (ii) Luego, el fenol liberado se determina por reacción con 4-aminoantipirina y ferricianuro como agente oxidante. (iii) Finalmente, los resultados se basaron en el aumento de la absorbancia a 520 nm de densidad óptica (OD) medidas utilizando un espectrofotometro. También se midió una

muestra blanco (B) y un estándar (S) (200 UI/l de fenol) para poder realizar los cálculos correspondientes mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad FAL } \left(\frac{\text{UI}}{\text{l}} \right) = 200 \frac{\text{UI}}{\text{l}} \cdot \frac{DO - B}{S_f - B} \quad 7.1$$

donde DO es la densidad óptica de las muestras, B la del blanco y S_f la de la muestra estándar de fenol. La actividad FAL es expresada en unidades internacionales o UI (del inglés “international unit”) por litro.

7.2.7. Análisis estadístico de los datos

La significación estadística de los datos se evaluó utilizando t-test de Student y se consideraron significativos los valores por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) [15]. Los datos cuantitativos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) del conjunto de experimentos.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Viabilidad y morfología de osteoblastos

La biocompatibilidad de los materiales se analizó mediante el estudio de la viabilidad de osteoblastos de rata luego de 48 y 72 h de tratamiento con el material antes (T1) y después (T2) del sembrado de las células en los pocillos de cultivo. Los resultados demostraron que no hay diferencias significativas en ambos tratamientos respecto a los controles en la concentración y a los tiempos de tratamiento estudiados (71,42 mg/ml, 48 y 72 h) (figura 7.2).

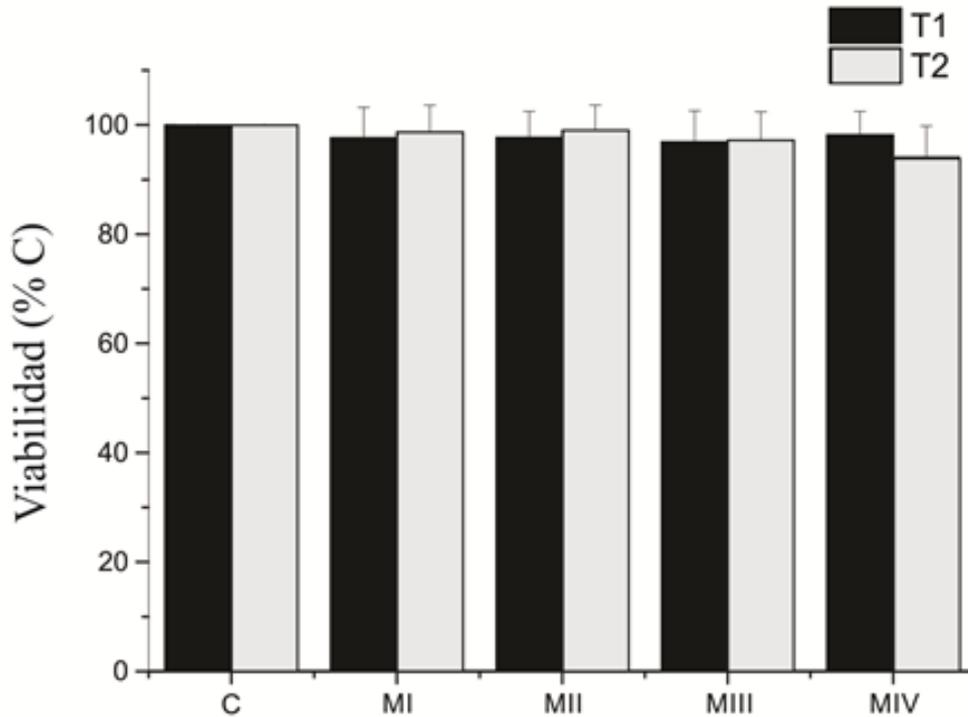


Figura 7.2: Cuantificación de las células viables a 72 h con el tratamiento 1 (T1) y 2 (T2) utilizando los materiales MI, MII, MIII y MIV. Los resultados están expresados como porcentajes del control (C = 100%).

Dependiendo de las condiciones externas las células pueden adoptar diferentes morfologías, lo que se encuentra relacionado con la función que están realizando en ese momento, como por ejemplo la osteoinducción [16], [17]. Lo que se pudo observar en las micrografías fue que las células sometidas a ambos tratamientos mantuvieron su forma poliédricas con largas y delgadas elongaciones citoplasmáticas típicas (Figura 7.3). La presencia de elongaciones citoplasmáticas es un buen indicador de biocompatibilidad ya que muestran la interacción con la matriz circundante [17]. Además, tampoco se encontraron diferencias morfológicas en las células tratadas con los diferentes materiales, tanto a 24 como a 72 h.

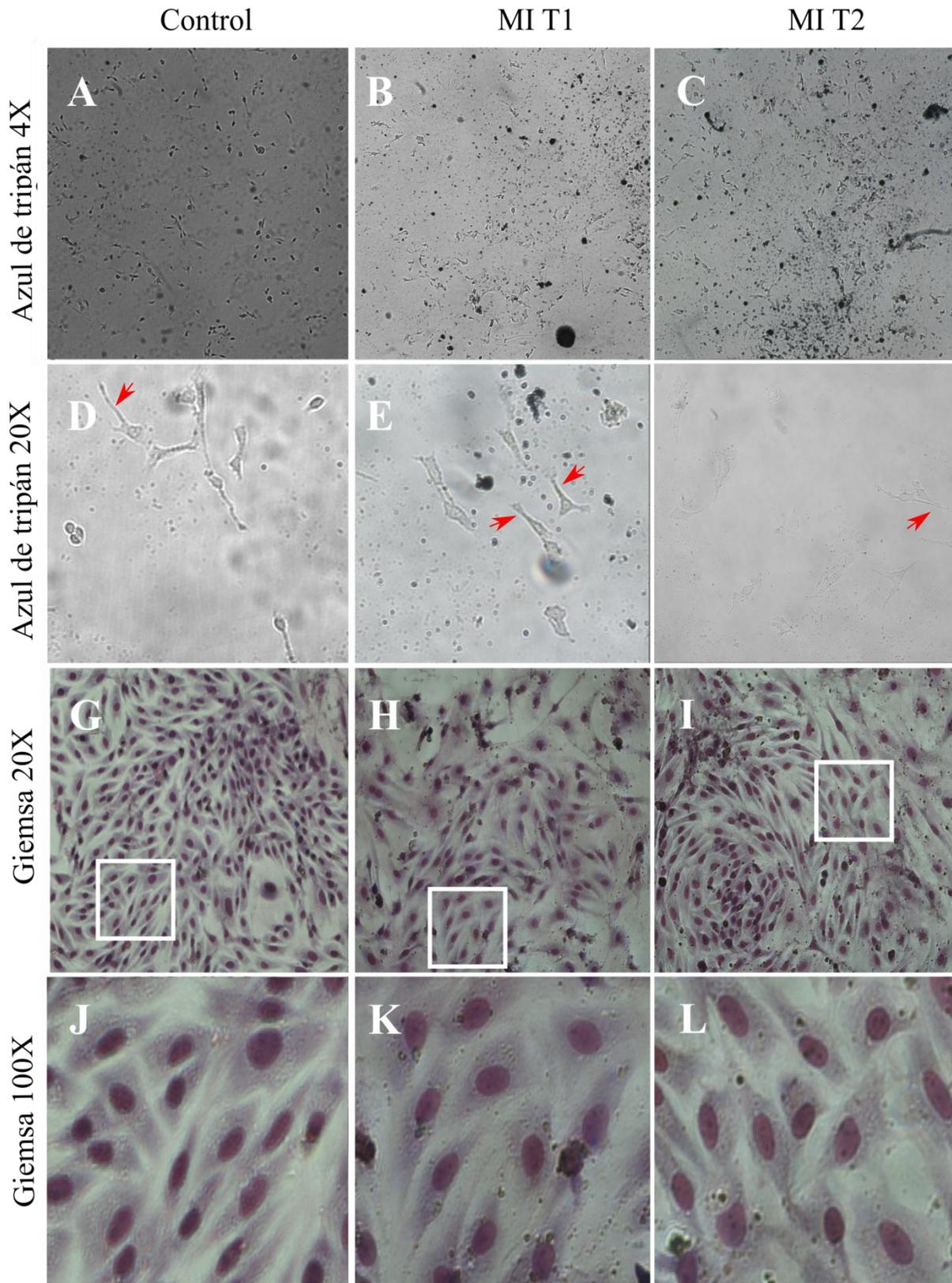


Figura 7.3: Estudio de la viabilidad y morfología en osteoblastos cultivadas en presencia de MI según el tratamiento T1 y T2 durante 72 h. (A-F) Células teñidas con azul de tripán y (G-L) con Giemsa. Las flechas indican las elongaciones citoplasmáticas.

7.3.2. Diferenciación de osteoblastos: influencia de la degradación y la topografía de los materiales

Como parte de los estudios de interacción célula - material se cuantificó la actividad FAL, un parámetro de la maduración *in vitro* de los osteoblastos, después de 4 y 7 días de tratamiento en medio de cultivo con y sin la adición de calcio (4 mM).

En las muestras a las que no se agregó calcio, luego de 4 días de tratamiento se observó que los materiales MI y MII no modificaron la actividad FAL respecto a las muestras control, pero con MIII y MIV se notó una disminución de dicha actividad enzimática (figura 7.4 A). El día 7 de tratamiento los efectos fueron ligeramente más pronunciados. Allí, únicamente el material MI favoreció la actividad FAL respecto al control; mientras que los tratamientos con MII, MIII y MIV la disminuyeron significativamente (figura 7.4 B).

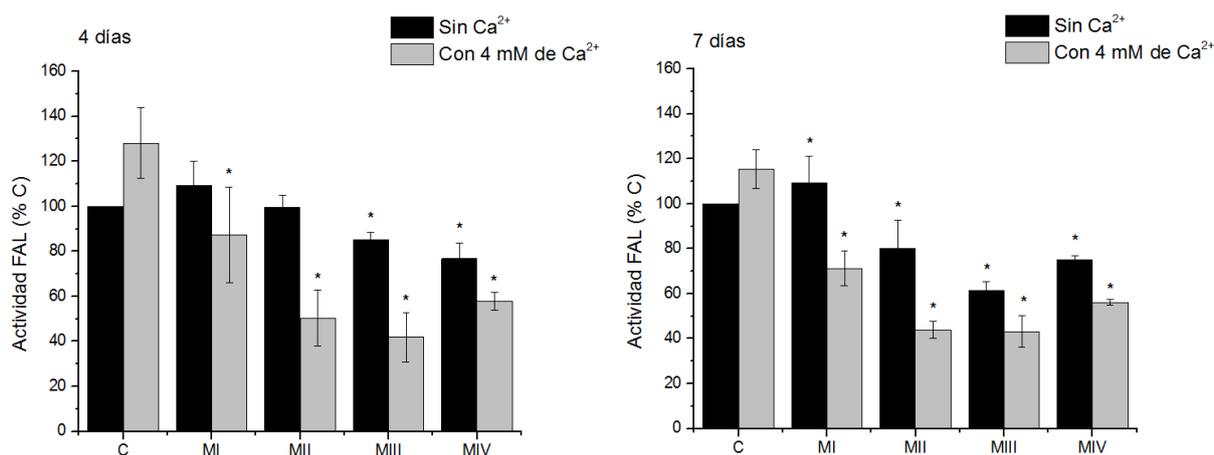


Figura 7.4: Actividad de la enzima FAL de los osteoblastos luego de (A) 4 días y (B) 7 días sin tratamiento (C) y tratados con los cuatro materiales (MI, MII, MIII y MIV) con y sin la adición de calcio (4 mM). Los resultados están expresados como porcentaje control (C = 100%). Las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras y su respectivos C se indican con asteriscos, * $p < 0,05$.

Cuando se comparan las muestras control entre sí (con y sin calcio) se observa que a ambos tiempos (4 y 7 días) la actividad FAL es favorecida por la presencia de calcio extra. Esto coincide con lo publicado por Maeno y col. [13], en donde se afirma que bajas concentraciones de Ca²⁺, en un rango entre 2 a 6 mM, pueden proporcionar condiciones adecuadas para la proliferación y diferenciación de cultivos celulares de osteoblastos. Pero este efecto no se observó cuando, además de los 4 mM de Ca²⁺, se agregaron al medio de

cultivo los materiales de HA (71,42 mg/ml); los experimentos mostraron una disminución estadísticamente significativa de la actividad FAL en todos los casos.

Los resultados obtenidos pueden estar asociados a una ligera disminución del pH del fluido intersticial causado por gradientes iónicos complejos dependiendo de la actividad metabólica de las células [18]; además como se esquematizó en el capítulo 4 figura 4.5, luego de la implantación los materiales sufren modificaciones de su superficie las cuales implican la liberación de iones Ca^{2+} . Se ha demostrado que la enzima FAL se ve estimulada por un rango de concentraciones de calcio determinado, y pequeñas desviaciones en esta concentración pueden inhibir su actividad e incluso inducir la muerte celular [13], [19]. El aumento de la concentración de Ca^{2+} en el entorno de los materiales MII, MIII y MI podría encontrarse por encima de la concentración que promueve la diferenciación celular debido a sus mayores velocidades de degradación, en comparación con MI (capítulo 4). Considerando esto último, se propone que MI, el material de degradación ácida más lenta, no generaría ese aumento desfavorable de mencionados iones, haciendo que la actividad FAL no se vea afectada luego de 4 días de tratamiento e incluso la aumente a los 7 días. Cabe destacar que el mecanismo por el cual los iones calcio de los materiales de HA pueda estar afectando a los osteoblastos resulta de gran importancia *in vivo*, debido a que se postula que este ion no solo interviene en la actividad de la enzima FAL, sino también en la regulación de una variedad de procesos relacionados con la homeostasis mineral ósea, tanto en el crecimiento de cristales de HA como en la prevención de la mineralización excesiva [19].

Por otro lado, las propiedades superficiales de los biomaterial de HA podrían estar regulando el fenotipo celular de los osteoblastos a través de su capacidad de soportar y distribuir contactos de adhesión focal. Como se mencionó en el capítulo 1 sección 1.3.2, las células interactúan con las proteínas del medio adsorbidas en el biomaterial a través de los receptores de adhesión de integrinas, que activan una cascada de señalización celular y conducen al montaje de los contactos de adhesión focal y a la activación de vías de señalización que regulan el fenotipo de los osteoblastos, siendo la proteína FAL un indicador de este proceso [20], [21]. Con respecto a las características topográficas analizadas en el capítulo 3 sección 3.3.4, el material MI se diferencia a los otros tres por ser el de mayor rugosidad media (R_a) y por presentar pocos picos agudos y predominantes valles profundos, lo que podría favorecer la adhesión, proliferación y posterior maduración de los osteoblastos.

7.4. Conclusión

Se ha demostrado que ninguno de los materiales de HA (71,42 mg/ml) afectan la viabilidad de cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de ratas cuando son cultivados en presencia de los mismos antes y después de ser sembradas durante 48 y 72 h. Además, el estudio de la morfología de los osteoblastos demostró que se mantuvo su forma poliédrica y se observó la presencia de elongaciones citoplasmáticas, indicadores de la interacción de las células con el entorno.

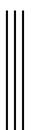
De los cuatro materiales sintetizados, únicamente MI favoreció la actividad de la proteína FAL, indicador de la diferenciación de osteoblastos, luego de 7 días de tratamiento y este efecto podría deberse a su lenta degradación, y por consiguiente menor liberación de iones calcio, y a sus características topográficas específicas que le otorgan un mayor efecto osteoinductor.

7.5. Referencias bibliográficas

- [1] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [2] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-generation biomedical materials," *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, 2002.
- [3] Z. Yang and C. Zhang, "Adsorption/desorption behavior of protein on nanosized hydroxyapatite coatings: A quartz crystal microbalance study," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 255, no. 8, pp. 4569–4574, 2009.
- [4] L. Zhang and T. J. Webster, "Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration," *Nano Today*, vol. 4, no. 1, pp. 66–80, 2009.
- [5] J. B. Lian and G. S. Stein, "Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation.," *Iowa Orthop. J.*, vol. 15, pp. 118–40, 1995.
- [6] M. Hatta, H. Daitoku, H. Matsuzaki, Y. Deyama, Y. Yoshimura, K. Suzuki, A. Matsumoto, and A. Fukamizu, "Regulation of alkaline phosphatase promoter activity by forkhead transcription factor FKHR.," *Int. J. Mol. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 147–152, 2002.
- [7] Y. Zhang, D. Khan, J. Delling, and E. Tobiasch, "Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells," *Sci. World J.*, vol. 2012, pp. 1–14, 2012.
- [8] Y. Nakano, W. Beertsen, T. Vandenbos, T. Kawamoto, K. Oda, and Y. Takano, "Site-

- specific localization of two distinct phosphatases along the osteoblast plasma membrane: Tissue non-specific alkaline phosphatase and plasma membrane calcium ATPase,” *Bone*, vol. 35, no. 5, pp. 1077–1085, 2004.
- [9] C. Pan, C. Kumar, S. Bohl, U. Klingmueller, and M. Mann, “Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 8, no. 3, pp. 443–450, 2009.
- [10] P. Scodelaro Bilbao, R. Boland, A. Russo de Boland, and G. Santillán, “ATP modulation of mitogen activated protein kinases and intracellular Ca²⁺ in breast cancer (MCF-7) cells,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 466, no. 1, pp. 15–23, 2007.
- [11] G. Giemsa, “Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenazur-Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nochtschen Chromatinfärbung,” *Zentabl Bakteriol Parasitenkd Infectkrankh*, vol. 37, p. 308, 1904.
- [12] Sigma–Aldrich, “Minimum Essential Medium Eagle (MEM) Alpha modifications.,” 2014. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [13] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, and J. Tanaka, “The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 23, pp. 4847–4855, 2005.
- [14] V. B. Ayala-Peña, L. A. Scolaro, and G. E. Santillán, “ATP and UTP stimulate bone morphogenetic protein-2,-4 and -5 gene expression and mineralization by rat primary osteoblasts involving PI3K/AKT pathway.,” *Exp. Cell Res.*, vol. 319, no. 13, pp. 2028–36, 2013.
- [15] G. W. Snedegor and W. G. Cochran, *Statistical methods*, no. 6. Ames: Iowa State University Press, 1967.
- [16] K. J. Burg, S. Porter, and J. F. Kellam, “Biomaterial developments for bone tissue engineering.,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2347–2359, 2000.
- [17] O. F. Zouani, C. Chollet, B. Guillotin, and M. C. Durrieu, “Differentiation of pre-osteoblast cells on poly(ethylene terephthalate) grafted with RGD and/or BMPs mimetic peptides,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 32, pp. 8245–8253, 2010.
- [18] C. Heinemann, S. Heinemann, A. Bernhardt, H. Worch, and T. Hanke, “Novel textile chitosan scaffolds promote spreading, proliferation, and differentiation of osteoblasts,” *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 10, pp. 2913–2920, 2008.
- [19] M. M. Dvorak, A. Siddiqua, D. T. Ward, D. H. Carter, S. L. Dallas, E. F. Nemeth, and D. Riccardi, “Physiological changes in extracellular calcium concentration directly

- control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones.," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 101, no. 14, pp. 5140–5, 2004.
- [20] F. G. Giancotti and E. Ruoslahti, "Integrin signaling.," Science, vol. 285, no. 5430, pp. 1028–1032, 1999.
- [21] A. S. Badami, M. R. Kreke, M. S. Thompson, J. S. Riffle, and A. S. Goldstein, "Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates.," Biomaterials, vol. 27, no. 4, pp. 596–606, 2006.



Capítulo 8

Biocompatibilidad de MSC sobre cubiertas biomiméticas

8.1 Introducción

Las células madre mesenquimales o MSC (del inglés “mesenchymal stem cells”) son células adultas multipotentes, capaces de diferenciarse en más de un tipo de célula especializada del cuerpo humano, como los adipocitos, condrocitos y osteoblastos, dependiendo de los factores del entorno [1]. La importancia de su estudio radica en que son las primeras células en colonizar el implante [2], como se esquematizó en el capítulo 1 figura 1.4. Inmediatamente después de que el hueso se fractura por la incorporación de un implante ocurre la hemorragia, las plaquetas de la sangre impactan sobre su superficie y se comienzan a liberar múltiples factores de crecimiento celular y citoquinas que forman un gradiente de concentración [3]. Estos factores son reconocidos por las MSC activando su migración hacia la superficie del biomaterial a través de la proteína fibrina que forma parte de la red tridimensional del coágulo que rodea el implante. Allí adheridas, las MSC cambian su forma, se polarizan, se diferencian a osteoblastos y se inicia la formación de la matriz ósea [2]; los materiales capaces de estimular a las MSC para que se desencadenen estos mecanismos se los denomina osteoinductivos [4].

Descubrimientos actuales han reconocido que las propiedades superficiales y mecánicas del entorno tienen una fuerte influencia en estos acontecimientos [3], [5]. Propiedades del entorno celular tales como la rigidez, geometría y las tensiones externas juegan un rol importante en la mecanotransducción celular que luego define su funcionamiento [6]. Tal es así que se ha demostrado que pueden influir en la forma y orientación celular dirigiendo el desarrollo y organización de los tejidos [6]. En relación a esto, la naturaleza elástica del citoesqueleto celular es importante no sólo para la estabilidad mecánica de la célula, sino también para transmitir señales en forma de campos de tensiones y deformaciones elásticas, desde el medio, a través del citoesqueleto hacia el núcleo celular [7]. El citoesqueleto es una red compleja de actina, filamentos intermedios, y los microtúbulos que interactúan con una gran variedad de motores moleculares y proteínas de adhesión. Estas proteínas, colectivamente responsables de la mecanotransducción celular, tienen dimensiones

nanométricas y por lo tanto se encuentran fuertemente influenciadas por la nanotopografía superficial del material implantado (figura 8.1).

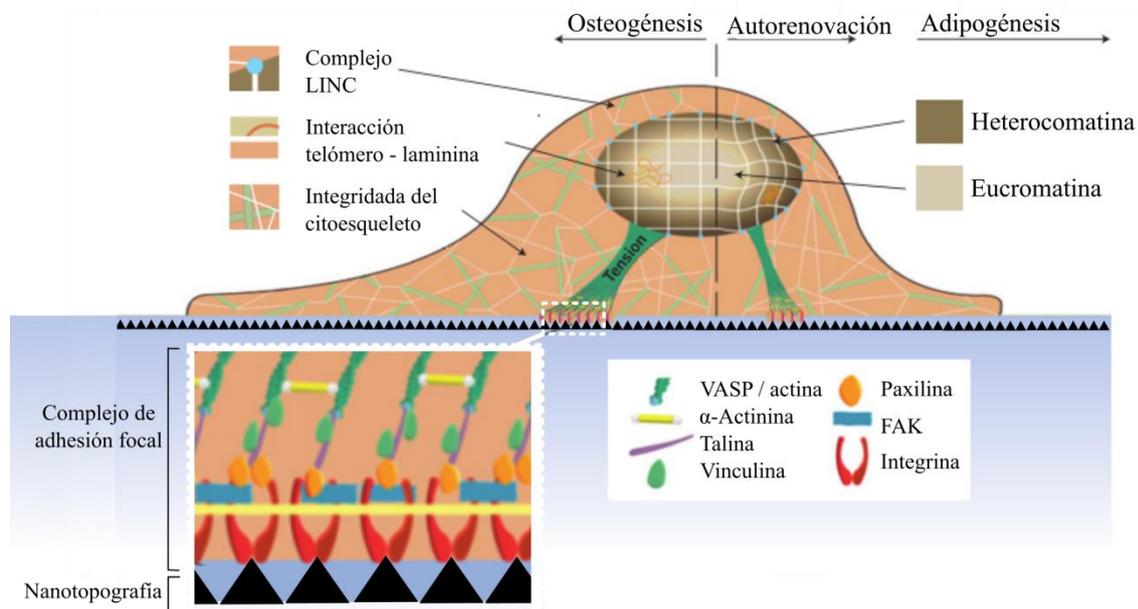


Figura 8.1: Organización del citoesqueleto celular y mecanotransducción. La ilustración muestra una MSC adherida a través de un complejo de adhesión focal a un material con nanotopografía. Las adhesiones focales se comunican con el núcleo a través del citoesqueleto y del complejo enlazador de citoesqueleto y núcleo o LINC (del inglés “Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton”). Esto altera la organización del nucleoesqueleto y afecta la transcripción del genoma, modula la expresión de proteínas y por lo tanto interviene en las funciones celulares tales como la supervivencia, proliferación y diferenciación. Abreviaciones: Fosfoproteína estimulada por vasodilatador o VASP (del inglés “Vasodilator-stimulated phosphoprotein”), quinasa de adhesión focal o FAK (del inglés “focal adhesión kinase”). Esquema adaptado de las publicaciones de Dalby y col. [8] y Tsimbouri [9].

Estudios recientes han identificado en osteoblastos, así como en muchas otras células del tejido conectivo musculoesquelético, la expresión de una isoforma de actina de músculo liso, la proteína α -SMA (del inglés “ α -smooth muscle actin”) [10]. Investigaciones relacionadas mostraron que los osteoblastos que expresan la proteína α -SMA son capaces de contraer un análogo de colágeno - glicosaminoglicano de la matriz extracelular *in vitro*; por esta razón se propuso que las contracciones en donde interviene la proteína α -SMA podrían ser responsables de la retracción de los osteoblastos en la superficie del hueso durante el

inicio del ciclo de remodelación [11]. La contracción celular mediada por α -SMA permite la generación de las grandes fuerzas que son requeridas para el modelado de la matriz extracelular recientemente formada, por lo que esta proteína podrían estar contribuyendo a la formación de la arquitectura específica del tejido [12]. Por lo tanto, una elevada expresión de la proteína α -SMA estaría asociada a procesos osteogénicos [13]. En consecuencia, la expresión de esta isoforma de actina en las MSC es un indicador interesante no solo para el estudio de la integridad del citoesqueleto sino también del potencial osteoinductivo del material.

Los experimentos realizados en el presente capítulo fueron diseñados a modo de imitar el entorno óseo en el cual las MSC se adhieren, proliferan y finalmente se diferencian en osteoblastos. Con este fin, la biocompatibilidad de las MCS fue estudiada sobre cubiertas de: (i) HA y (ii) colágeno tipo I, el principal componente orgánico del hueso [14], con y sin la incorporación de nanopartículas de HA. Las células cultivadas sobre estas cubiertas fueron sujetas a estudios de viabilidad, adhesión, expresión de las proteínas α -SMA, como indicador de la integridad del citoesqueleto celular, y genotoxicidad.

8.2 Métodos experimentales

8.2.1 Reactivos

Solución de pentobarbital sódico IV (240 mg/ml, Euthanyl, CDMV) , xilacina (20 mg/ml, Rompun, CDMV), ketamina (100 mg/ml, Rogarsetic, CDMV), Mezcla de Medio Eagle modificado por Dulbecco y nutrientes F12 o DMEM/F12 (del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12”) (Gibco) suplementado con bicarbonato de (2,438 g, Sigma-Aldrich) y con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, solución reguladora de fosfato salino (PBS) con Ca/Mg (1X, Sigma-Aldrich), Tritón X-100, paraformaldehído ($\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, Sigma-Aldrich), suero de cabra (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich), FluoromountG (Southern), Colágeno tipo I de cola de rata o Co I (3,9 mg/ml, Sigma- Aldrich), Alexa Fluor® 488 de cabra anti ratón IgG (H + L) (2 mg/ml, Molecular Probes), anticuerpo anti actina monoclonal de ratón, α -actina del músculo liso (, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clon 1A4, Isotipo IgG2a, Sigma-Aldrich); Hoechst 33342 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Gibco); Fluoromount-G (Southern biotech), 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,bromuro de 5-difeniltetrazolio o MTT (5 mg/ml, Sigma-Aldrich).

8.2.2 Aislamiento de células madre mesenquimales de conejo (MSC)

Las MCS se obtuvieron de conejos blancos raza Nueva Zelanda de 9 a 11 meses de edad a los cuales se les administró 150 mg/ kg de solución de pentobarbital sódico (Euthanyl) por vía intravenosa bajo el efecto de los anestésicos xilacina – ketamina. Para ellos se siguieron protocolos aprobados por comités éticos institucionales de cuidado y uso de animales. Se extrajeron fragmentos de hueso subcondral de la región distal del fémur y se realizó una digestión con la enzima colagenasa a modo de obtener un pellet de células del estroma óseo. Las células se cultivaron en placas de cultivo con medio completo DMEM/F12 – 10 % FBS, 1 % de penicilina y estreptomocina (DMEM/F12 – 10 % FBS, 1 % P-E) dentro de incubador a 37 °C en atmósfera húmeda (5 % CO₂). Las células obtenidas se cultivaron durante 5 días y el medio de cultivo se renovó cada 2 días para remover células no adherentes, y de este modo seleccionar las adherentes. Las MCS (pasaje 0 y 1) se almacenaron en nitrógeno líquido a - 196 °C para ser descongeladas en el momento de la realización de cada ensayo.

8.2.3 Ensayos de adhesión de MSC de conejo

8.2.3.1 Ensayo de viabilidad y proliferación de MSC sobre cubiertas de HA

La reducción de sales de tetrazolio es uno de los métodos más fiables y comunes de la determinación de la viabilidad y la proliferación celular. Específicamente, MTT es una sal de tetrazolio que se utiliza para determinar la actividad de las enzimas deshidrogenasas de las células. Dichas enzimas, esenciales en el ciclo de Krebs, catalizan la oxidación o reducción de un sustrato por sustracción o adición de átomos de hidrógeno, y pueden ser detectadas en células metabólicamente activas, siendo una medida indirecta de la viabilidad celular [15] (figura 8.2).

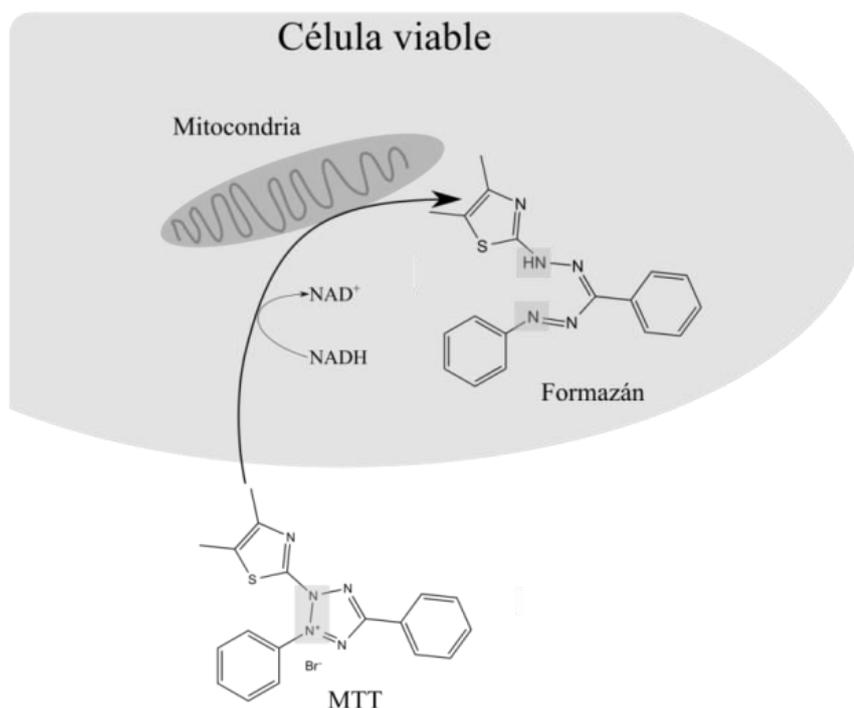


Figura 8.2: Esquema de la reducción de MTT en las células metabólicamente activas, en parte por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial y NADH citoplasmática; el producto resultante es formazán de color púrpura [16].

Antes de cultivar las MSC, se realizaron recubrimientos homogéneos de los materiales MI, MII, MIII y MIV mediante secado por evaporación. Para ello, los materiales fueron previamente esterilizados en autoclave durante 30 min a 120 °C. Luego se prepararon dispersiones de los mismos en agua utilizando un mezclador rotativo durante 5 min. Seguidamente se llenaron placas de 96 pocillos con las distintas dispersiones de nanopartículas a modo de obtener cantidades finales entre 15 a 3100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Finalmente, las cubiertas de materiales se dejaron secar durante toda la noche dentro de una cabina de seguridad biológica sobre un agitador orbital a modo de obtener cubiertas homogéneas en el fondo de cada pocillo. Al día siguiente se sembraron 10.000 células en cada pocillo y se cultivaron durante 24 y 48 h en medio de cultivo completo (DMEM/F12 – 10 % FBS, 1 % P-E). La distribución homogénea de las nanopartículas en el fondo de cada pocillo se evaluó antes y después de cultivar las células mediante microscopía óptica. Luego de transcurrido el tiempo de tratamiento se agregó la solución de MTT en cada pocillo a una concentración final de 0,5 mg/ml, luego las placas se incubaron durante 3 h en atmósfera húmeda (5 % CO_2). Después de aspirar el medio de cultivo junto con el MTT, se agregaron 200 μl del solvente DMSO al 100 % para extraer el formazán. La densidad óptica del formazán presente

en las muestras se leyó a 570 nm en un lector de placas de ELISA. Como controles se utilizaron pocillos con la misma cantidad de células pero sin cubiertas (control positivo) y como blancos se utilizaron los pocillos cubiertos con material pero sin células.

8.2.3.2 Ensayo de viabilidad de MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas HA MI/Co I

A modo de imitar la composición del tejido óseo se estudió la adhesión y actividad metabólica de las MCS cultivadas sobre cubiertas de HA MI / colágeno tipo I (Co I). Para ello se recubrieron placas de 96 pocillos con cuatro relaciones en peso diferentes (MI/Co I: 0/1; 0,5/1; 1/1 y 2/1, con Co I = 31 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). Para preparar las soluciones para las cubiertas se utilizó colágeno tipo I de cola de rata disuelto en ácido acético (20 mM), el cual se neutralizó previene con una solución 20 mM de NaOH. Luego, se dispersaron cantidades diferentes de MI en agua con soluciones de Co I con el fin de obtener cubiertas con las diferentes relaciones de MI/Co I. Las cubiertas y el ensayo de MTT se realizaron utilizando la misma técnica descrita en la sección anterior.

8.2.3.3 Expresión de la proteína α -SMA en MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas HA MI/Co I

El material MI se seleccionó para ser combinado con colágeno tipo I (Co I) y formar revestimientos que imiten la matriz ósea con el fin de evaluar indirectamente su uso potencial en la reparación del tejido óseo. La razón por la cual se utilizó dicho material se debe a que se observó una bioactividad superior (capítulo 5) y fue el único que indujo la diferenciación de osteoblastos (capítulo 6). Los recubrimientos MI/Co I se prepararon de acuerdo a las proporciones presentes en el tejido óseo, en donde el contenido mineral promedio de una persona adulta sana puede variar entre el 50 al 75% en peso dependiendo de la localización, entre otros factores [17].

Con el fin de estudiar si las cubiertas de MI/Co I afectan al citoesqueleto celular de las MSC, se analizó de manera cualitativa y semicuantitativa la expresión de la proteína α -SMA. En primer lugar se cultivaron 10.000 MCS de conejo por pocillo en cámaras individuales de cultivo con portaobjetos de vidrio (Falcon®, Corning) (figura 8.3) previamente recubiertos

con Co I y MI/Co I utilizando la metodología descrita en la sección anterior del presente capítulo. Como controles positivo se utilizaron cámaras de cultivo sin cubiertas. Las células se incubaron durante 29 h en incubador con atmósfera húmeda y 5 % CO₂, luego se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 5 min y se lavaron tres veces durante 5 min con PBS. El bloqueo para que ocurra la unión en sitios inespecíficos y la permeabilización de las muestras se realizó con 20 % v/v suero de cabra/PBS/0.1 % Tritón X-100 durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de lavar las muestras durante 5 min con 1% BSA/PBS/0,1% Tritón X-100, se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente con un anticuerpo primario anti α -SMA (1 μ g/ml) en 1 % BSA/PBS/0,1 % Tritón X-100. Después de tres lavados con 1 % BSA/PBS/0,1 % Tritón X-100 durante 10 min los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa 488 (1,3 μ g/mL) en 1 % BSA/PBS/0,1 % Tritón X-100 durante 30 min a temperatura ambiente. Luego de dos lavados de 10 min con PBS incubaron las muestras con una tinción de cromatina Hoechst 33342 (2 μ g/ml) por 1 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos de vidrio se lavaron dos veces con PBS durante 10 min y se separaron de las cámaras. Se utilizó la solución FluoromountG para montar los cubreobjetos y luego los portaobjetos se cubrieron con papel de aluminio y se dejaron secar durante 24 h. Se tomaron imágenes de las muestras utilizando un microscopio de barrido láser confocal Olympus FluoView™ FV1000 con la longitud de onda del láser operativa ajustada a 405 nm para la señal azul de la tinción de Hoechst que detecta los núcleos celulares y a 488 nm para la señal verde que indica la expresión de la proteína α -SMA. Todas las imágenes fueron analizados con la ayuda del software ImageJ® 1.77v. El número de células se determinó mediante el recuento de núcleos positivos para la tinción Hoechst y la expresión de α -SMA se cuantificó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%P_v = \frac{P_v}{P_T} 100 \quad 8.1$$

donde P_v es el número de píxeles verdes por imagen y P_T el número total de píxeles por imagen. Además, la expresión la proteína α -SMA se cuantificó con el valor medio del brillo de los píxeles verdes determinados a partir de la intensidad de todos los píxeles verdes por campo en imágenes monocromáticas del láser fijado en 488 nm.



Figura 8.3: Cámaras individuales de cultivo con portaobjetos de vidrio (Falcon®, Corning) utilizadas para los ensayos de microscopio láser confocal de fluorescencia. Fotografía tomada de la página web de Fisher Scientific® [18].

8.2.3.4 Estudio de genotoxicidad en MSC de conejo sobre cubiertas biomiméticas de HA MI/ Co I

Las micrografías de amplificación 10 X obtenidas por microcopia láser confocal de fluorescencia de muestras teñidas con Hoechst 33342 (2 µg/ml) fueron utilizadas para detectar y cuantificar la presencia de células binucleadas y micronúcleos. Se consideraron micronúcleos válidos a los situados en la zona celular citoplasmática, individuales, de intensidad similar a los núcleos principales y con un diámetro de menos de 33 % de los núcleos principales. La cuantificación se realizó analizando 2.000 células para cada condición con la ayuda del software ImageJ® 1.47v acoplado al paquete de procesamiento de imágenes “Cell Counter”.

8.2.4 Análisis estadístico de los datos

La significación estadística de los datos se evaluó utilizando la prueba “t” de Student y se consideraron significativos los valores por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) [19]. Los datos cuantitativos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) del conjunto de experimentos.

8.3 Resultados y discusión

8.3.1 Adhesión de MCS sobre cubiertas de HA: Ensayo de viabilidad y proliferación

Para estudiar si existen diferencias significativas en la viabilidad y adhesión celular de las MSC utilizando los materiales MI, MII, MIII y MIV se realizaron cubiertas con cantidades crecientes de los mismos ($15 - 3100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Los resultados demostraron que a 48 h existe un efecto inhibitorio producido por las partículas dependiente de la dosis y del tipo de material utilizado (figura 8.4).

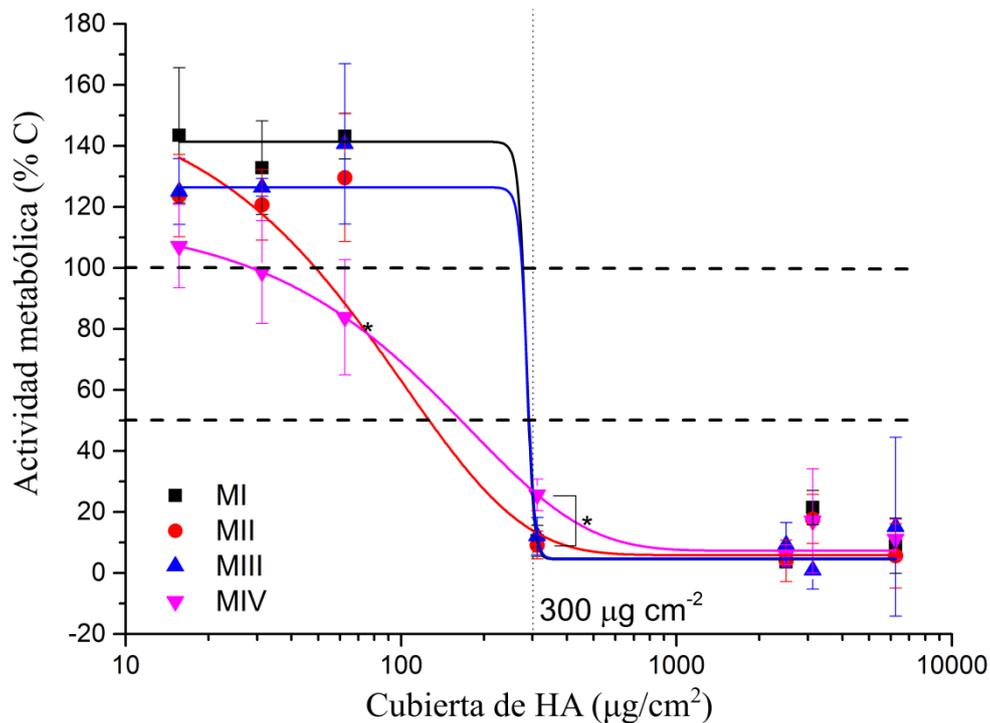


Figura 8.4: Actividad metabólica de las MSC adheridas a cubiertas de HA durante 48 h. Los resultados experimentales se ajustaron a la curva sigmoideal de Boltzmann. Las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras y el control (C, sin cubierta) se indican con asteriscos y entre las muestras se indican con corchetes ($p < 0,05$).

Las células incubadas sobre cubiertas de MI y MIII exhibieron una inhibición de la actividad metabólica celular del 50 % cuando se utilizaron aproximadamente $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$;

mientras que el mismo porcentaje se alcanzó con $162 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ en presencia de MIV siendo el material MII el de mayor efecto inhibitorio de la actividad metabólica de las MSC (50 % de viabilidad utilizando $124 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Por encima de los $300 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de recubrimiento, la inhibición de la actividad metabólica celular es similar para todos los materiales ensayados. Probablemente en estas cantidades la presencia de los materiales altera la adecuada adhesión de las células sobre la superficie, haciendo que las mismas queden suspendidas en el medio y no puedan ser detectadas en el estudio de MTT.

Para analizar la proliferación celular se comparó la variación de la actividad metabólica entre las 24 y 48 h de incubación sobre cubiertas con 15, 30 y $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de material (figura 8.5). Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la actividad metabólica en el tiempo en todos los tratamientos excepto con $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de MIV que permaneció constante. Cabe destacar que se observó un aumento de la actividad metabólica luego de 48 h en las células cultivadas sobre MI, MII y MIII ($15, 30$ y $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) comparadas con las muestras control, en cambio los tratamientos con $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de MIV no la afectaron y con 30 y $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ se vio una inhibición de dicha actividad.

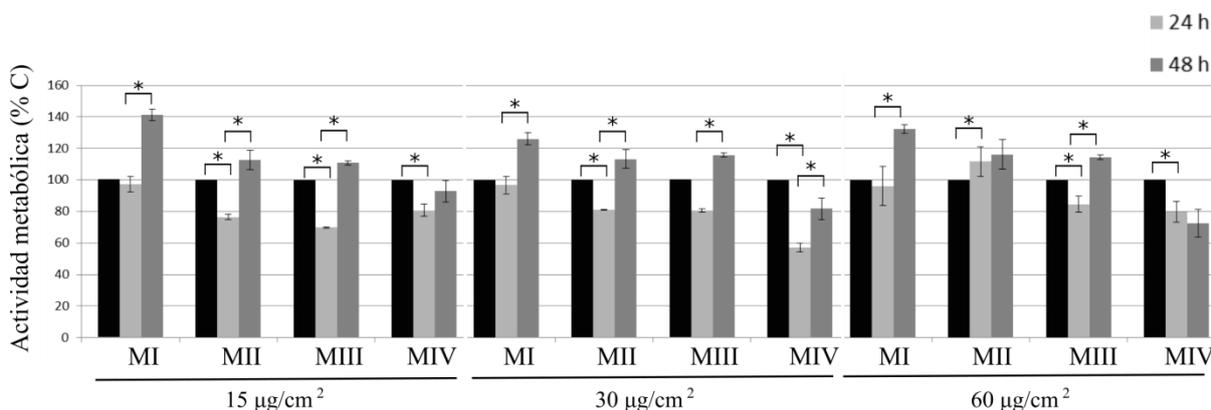


Figura 8.5: Ensayo de proliferación de MSC sembradas sobre cubiertas con 15, 30 y $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de los materiales MI, MII, MIII y MIV durante 24 y 48 h. Los resultados están expresados como porcentajes del control (barras negras, C = 100 %). Las diferencias estadísticamente significativas entre 24 y 48 h se indican con corchetes ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos demostraron en términos generales que, en las condiciones testeadas, los materiales MI, MII y MIII tienen influencia más positiva sobre la viabilidad y proliferación de las MSC que MIV. El material MIV, de topografía asimétrica con predominantes picos agudos y pocos valles profundos (capítulo 3 sección 3.3.4), genera el mayor efecto citotóxico sobre las MCS. Esto coincide con otros grupos de investigación que

encontraron una correlación entre las propiedades superficiales de los materiales y la citotoxicidad [20]–[22]. Por otro lado, como se mencionó en la discusión del capítulo 7 sección 7.3.2, vale la pena considerar que la rápida degradación del material MIV podría estar causando un aumento en la concentración de calcio intracelular, que no solo inhibe la actividad de la enzima FAL sino que también influye en la citotoxicidad [23].

8.3.2 Adhesión de MCS sobre cubiertas biomiméticas: HA MI/Co I

8.3.2.1 Ensayo de viabilidad e integridad del citoesqueleto

La figura 8.6 muestra la actividad metabólica de las MCS luego de ser cultivadas en presencia de recubrimientos con diferentes relaciones en peso de MI/Co I. Los resultados demostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la adhesión y viabilidad de las MCS con los diferentes tratamientos.

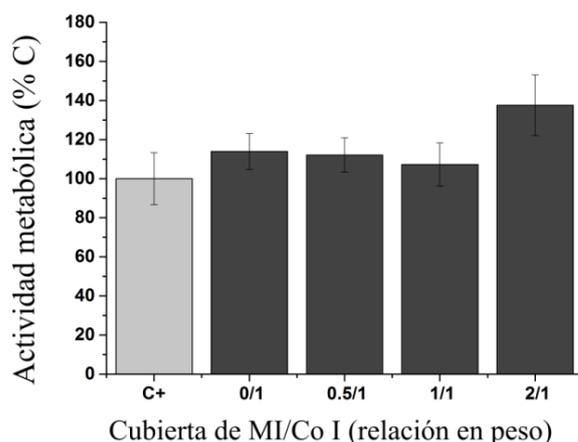


Figura 8.6: Actividad metabólica de las MSC de conejo adheridas a cubiertas con diferentes relaciones en peso de MI/Co I. Como controles positivos (C+) se utilizaron pocillos sin cubierta. Los resultados están expresados como porcentajes del control (C = 100 %)

Como se hizo mención al principio de este capítulo, el citoesqueleto juega un rol muy importante en los pasos que intervienen en la mecanotransducción celular [24]. Entre las proteínas involucradas en este proceso se encuentra la α -SMA, que además es utilizada para estudiar la presencia y maduración de los complejos de adhesión focal ya que se ha demostrado que un aumento en su expresión indica una mayor fuerza de adhesión [25].

Debido a esto se evaluó la expresión y morfología de la proteína α -SMA en la MSC cultivadas sobre recubrimientos de MI/Co I. Los resultados indican que las MCS de conejo se adhieren a todos los recubrimientos de MI/Co I de la misma manera que en los controles (C+: vidrio y Co I). En todos los casos los filamentos de α -SMA mantienen el tamaño y la morfología característica, incluso en los contactos de adhesión focal (figura 8.7).

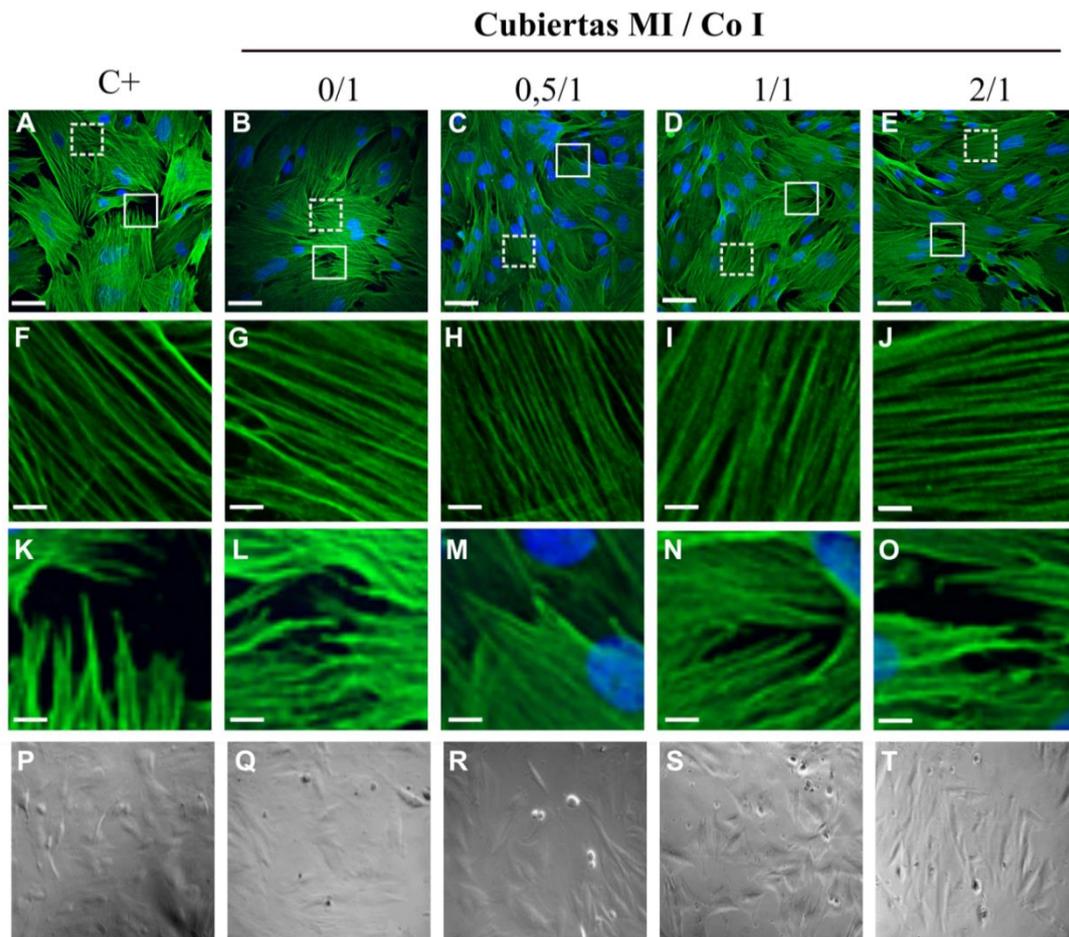


Figura 8.7: (A-E) Microfotografías confocal láser que muestra los núcleos celulares y la expresión de α -SMA marcada con inmunofluorescencia, azul y verde respectivamente, magnificación 40 X, barra de escala: 50 μ m. (F-J) Microfotografías láser confocal que muestran el tamaño y forma de los filamentos de α -SMA, (K-O) y los contactos de adhesión focal, magnificación 400 X, barra de escala: 5 μ m. (P-T) Imágenes de microscopía óptica de contraste de fase que muestran la morfología de las MSC adheridas. Se utilizaron como controles positivos (C+) portaobjetos de vidrio no recubierto.

Al igual que lo observado en el ensayo de viabilidad, la cuantificación del número de células no presentó ninguna diferencia significativa respecto al control (figura 8.8 A). Tampoco se observaron diferencias en el estudio semicuantitativo de la expresión de la

proteína α -SMA, tanto al ser comparados directamente con el control (figura 8.8 B) como la medición de la intensidad por célula (figura 8.8 C). La inspección visual de las células adheridas proporcionó información sobre la capacidad de las mismas para cubrir uniformemente los revestimientos de MI/Co I (figura 8.8 D).

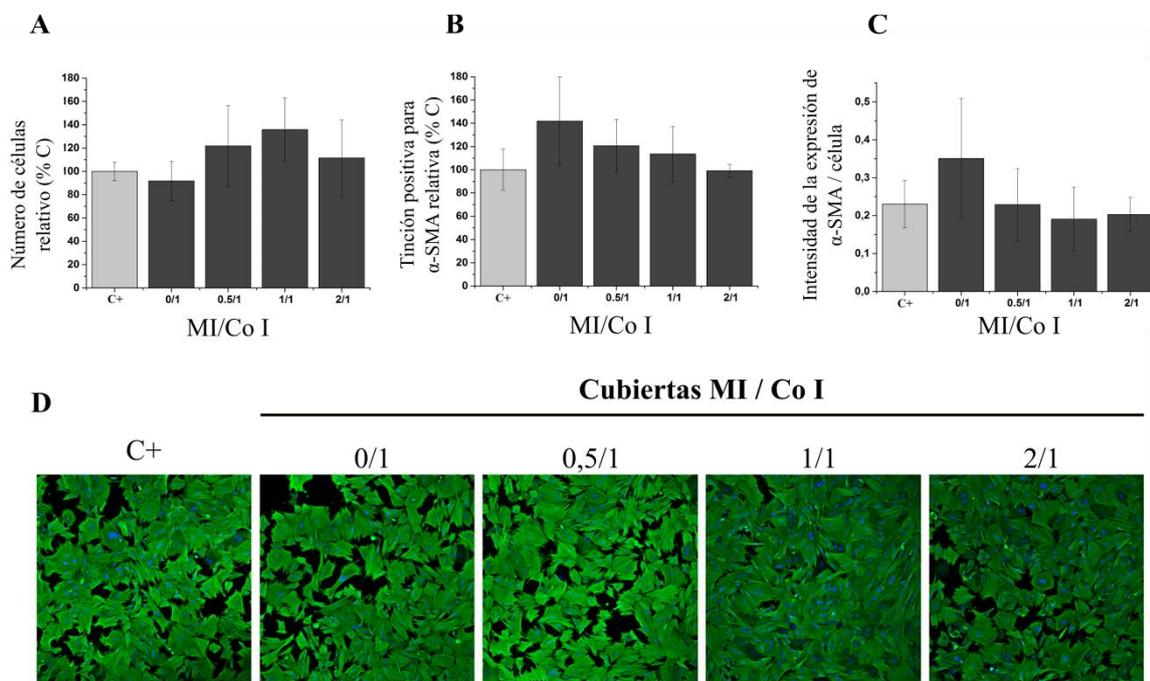


Figura 8.8: (A) Porcentaje de MSC adheridas sobre las diferentes cubiertas (C+ = 100%). (B) Cuantificación de la tinción positiva para α -SMA como medida de la expresión de la proteína (C + = 100%). (C) Intensidad de los píxeles verdes como medida de la cantidad de α -SMA expresada por célula. (D) Imágenes de microfotografía láser confocal con el fin de mostrar la expresión α -SMA, magnificación 10 X. Se utilizaron como controles positivos (C+) portaobjetos de vidrio no recubierto.

8.3.2.2 Estudio de genotoxicidad

La tinción de cromatina Hoechst 33342 permite visualizar alteraciones en los núcleos celulares [26], [27], tales como cambios de tamaño, densidad y distribución de la cromatina, las cuales son indicadores de daño en el ADN, citotoxicidad y muerte celular. Entre estas anomalías se encuentran la cromatina condensada y la presencia de núcleos lobulados; ninguna de ellas presenta un mecanismo de formación ni significado biológico del todo esclarecido hasta el momento [2].

La inspección visual de las micrografías de fluorescencia permitió determinar que no hay diferencias en cuanto al tamaño y morfología de los núcleos entre controles y tratados. Mayormente se trata de núcleos característicos de células mesenquimales [28]; redondeados u ovals, uniformemente teñidos, sin indicios de cromatina condensada, y de tamaño más pequeño en relación al citoplasma (figura 8.9).

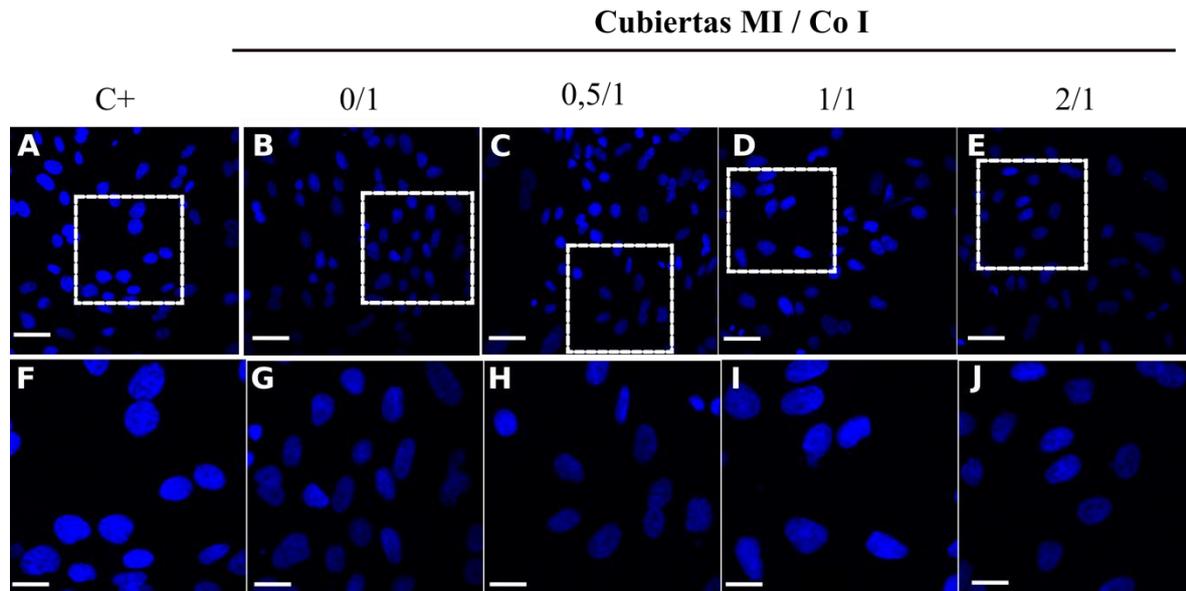


Figura 8.9: Estudio de la genotoxicidad. (A-E) Las micrografías de fluorescencia confocal muestran los núcleos celulares teñidos con Hoechst, magnificación 40 X, barra de escala: 50 μm . (F-J) Microfotografías láser confocal que muestran el tamaño y forma de los núcleos, magnificación 80 X, barra de escala: 25 μm .

Otra de las utilidades de esta tinción nuclear es la identificación de la presencia de células binucleadas y la detección de micronúcleos, indicadores de alteraciones cromosómicas o disfunción del huso acromático [29]. Los micronúcleos son cuerpos que contienen cromatina que representan fragmentos o incluso cromosomas enteros que no fueron incorporadas en un núcleo de la célula hija durante el proceso de división celular, la mitosis [29] (figura 8.10 A). Por otro lado, las células binucleadas son células que contienen dos núcleos principales, usualmente los núcleos están muy próximos e incluso podrían hacer contacto, ambos con morfología y tinción similar a un núcleo normal (figura 8.10 B). Este hecho podría ocurrir por interferencia en los sucesos que ocurren durante la finalización de la mitosis [30].

Los resultados de la cuantificación de ambos biomarcadores, los micronúcleos y las células bilobuladas, en las micrografías de fluorescencia mostraron que se encuentran en la misma proporción tanto en las muestras control como en las células cultivadas sobre los diferentes recubrimientos con y sin MI, por lo que no hay indicios de que las cubiertas induzcan genotoxicidad en las MSC (figura 8.10 C).

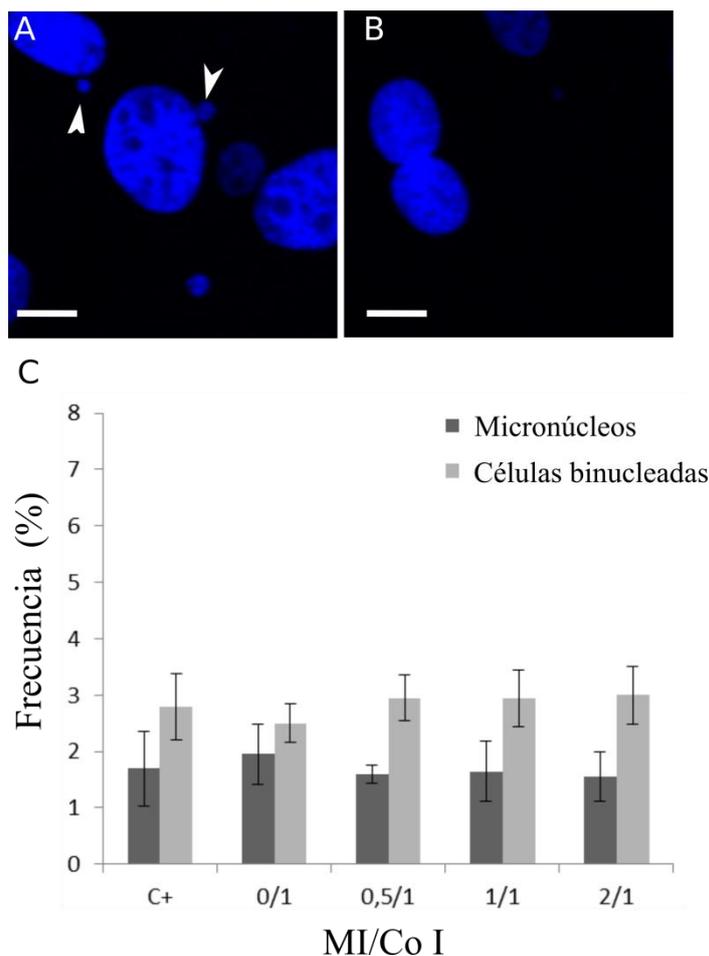


Figura 8.9: Estudio de la genotoxicidad. (A) Micronúcleos de la muestra control (C+) se marcan con flechas. (B) Célula binucleada de la cubierta de colágeno tipo I (0/1), magnificación: 200 X, barra de escala: 10 μ m. (C) Cuantificación de la frecuencia de micronúcleos y células binucleadas en las microfotografías láser confocal de fluorescencia. El porcentaje fue calculado sobre un total de 2000 células (100 %).

Se observaron con anterioridad frecuencias similares de estas anomalías nucleares en cultivos primarios de células madre mesenquimales humanas [28], [31], sin embargo hasta el momento no se han estudiado en MSC de conejo para realizar una comparación más

específica. La presencia de estas alteraciones nucleares no solo podría estar influenciada por la especie, sino también a la sensibilidad de las mismas a cambios exógenos causadas por la conservación y cultivo *in vitro*, como por ejemplo el tiempo y las condiciones de criopreservación [28].

8.4 Conclusión

Los datos obtenidos demuestran que la utilización de cubiertas de más de 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ generó una inhibición de la actividad metabólica de las MCS mayor al 50 %, probablemente debido a la imposibilidad de las células a adherirse. Por otro lado, la adhesión, viabilidad y proliferación celular es favorecida cuando se cultivan sobre cubiertas formadas por los materiales MI, MII y MIII (48 h, 15, 30 y 60 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), por el contrario este efecto no se observa con MIV, lo que podría estar relacionado con sus características topográficas y a la mayor velocidad de degradación.

Los recubrimientos biomiméticos MI/Co I no afectaron la viabilidad y permitieron la correcta adhesión de las MSC (29 h, hasta 62 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de MI). La expresión de la proteína α -SMA tampoco se alteró por los tratamientos, indicando que se mantiene la integridad del citoesqueleto celular y además el posible efecto osteoinductor de las cubiertas. Por último, la morfología nuclear observada fue en su mayoría característica del tipo celular. A pesar de que se detectó la presencia de micronúcleos y células binucleadas, están se encuentran en la misma frecuencia que en las muestras control, por lo que en principio las cubiertas no generan un efecto genotóxico.

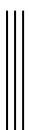
8.5 Referencias bibliográficas

- [1] S. Oughlis, S. Lessim, S. Changotade, F. Poirier, F. Bollotte, J. Peltzer, H. Felgueiras, V. Migonney, J. J. Lataillade, and D. Lutomski, “The osteogenic differentiation improvement of human mesenchymal stem cells on titanium grafted with polyNaSS bioactive polymer,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 2, pp. 582–589, 2013.
- [2] K. H. Kraus and C. Kirker-Head, “Mesenchymal stem cells and bone regeneration,” *Vet. Surg.*, vol. 35, no. 3, pp. 232–242, 2006.

- [3] J. Davies, “Understanding peri-implant endosseous healing,” *J. Dent. Educ.*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [4] P. V Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, “Bone substitutes: an update,” *Injury*, vol. 36, no. 3, pp. S20–S27, 2005.
- [5] D. R. Carter, G. S. Beaupré, N. J. Giori, and J. A. Helms, “Mechanobiology of skeletal regeneration,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 355 Suppl, pp. S41-55, 1998.
- [6] R. De, A. Zemel, and S. A. Safran, “Theoretical concepts and models of cellular mechanosensing,” *Methods Cell Biol.*, vol. 98, pp. 143–175, 2010.
- [7] N. Wang, J. D. Tytell, and D. E. Ingber, “Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 75–82, 2009.
- [8] M. J. Dalby, N. Gadegaard, and R. O. C. Oreffo, “Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate,” *Nat. Mater.*, vol. 13, no. 6, pp. 558–69, 2014.
- [9] P. M. Tsimbouri, “Adult Stem Cell Responses to Nanostimuli,” *J. Funct. Biomater.*, vol. 6, no. 3, pp. 598–622, 2015.
- [10] Z. Kalajzic, H. Li, L. P. Wang, X. Jiang, K. Lamothe, D. J. Adams, H. L. Aguila, D. W. Rowe, and I. Kalajzic, “Use of an alpha-smooth muscle actin GFP reporter to identify an osteoprogenitor population,” *Bone*, vol. 43, no. 3, pp. 501–510, 2008.
- [11] J. M. Zaleskas, B. Kinner, T. M. Freyman, I. V Yannas, L. J. Gibson, and M. Spector, “Contractile forces generated by articular chondrocytes in collagen-glycosaminoglycan matrices,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 7–8, pp. 1299–1308, 2004.
- [12] M. Spector, “Musculoskeletal connective tissue cells with muscle: expression of muscle actin in and contraction of fibroblasts, chondrocytes, and osteoblasts,” *Wound Repair Regen.*, vol. 9, no. 1, pp. 11–18, 2001.
- [13] B. Kinner, D. M. Pacicca, L. C. Gerstenfeld, and C. A. Lee, “Expression of smooth muscle actin in cells involved in distraction osteogenesis in a rat model,” *J. Orthop. Res.*, vol. 21, no. 1, pp. 20–27, 2003.
- [14] E. Beniash, “Biomaterials- hierarchical nanocomposites : the example of bone,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 3, no. 1, pp. 1–41, 2012.
- [15] T. L. Riss, R. A. Moravec, A. L. Niles, H. A. Benink, T. J. Worzella, and L. Minor, “Cell Viability Assays,” in *Assay Guidance Manual*, 1st ed., G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, H. Nelson, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, P. W. Iversen, Z. Li, J. McGee, O. McManus, L. Minor, A. Napper, J. M.

- Peltier, T. Riss, O. J. O. J. Trask, and J. Weidner, Eds. Bethesda (MD), 2004.
- [16] T. Riss, “Is Your MTT Assay Really the Best Choice ? How the MTT Assay Works,” in *Scientific Style and Format*, 7th ed., Promega, Ed. 2006, pp. 1–7.
- [17] P. Fratzl, H. S. Gupta, E. P. Paschalis, and P. Roschger, “Structure and mechanical quality of the collagen mineral nano-composite in bone,” *J. Mater. Chem.*, vol. 14, no. 14, pp. 2115–2123, 2004.
- [18] Fisher Scientific, “Fisher Scientific,” 2016. [Online]. Available: <https://www.fishersci.com/us/en/home.html>.
- [19] G. W. Snedegor and W. G. Cochran, *Statistical methods*, no. 6. Ames: Iowa State University Press, 1967.
- [20] L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac, and C. Martelet, “Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 23, no. 4, pp. 551–560, 2003.
- [21] H. H. Huang, C. T. Ho, T. H. Lee, T. L. Lee, K. K. Liao, and F. L. Chen, “Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion,” *Biomol. Eng.*, vol. 21, no. 3–5, pp. 93–97, 2004.
- [22] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, “Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, 2000.
- [23] M. Motskin, D. M. Wright, K. Muller, N. Kyle, T. G. Gard, A. E. Porter, and J. N. Skepper, “Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 19, pp. 3307–3317, 2009.
- [24] A. D. Bershadsky, N. Q. Balaban, and B. Geiger, “Adhesion-dependent cell mechanosensitivity,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 677–695, 2003.
- [25] B. Hinz, V. Dugina, C. Ballestrem, B. Wehrle-Haller, and C. Chaponnier, “ α -Smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 14, no. 6, pp. 2508–2519, 2003.
- [26] Z. Zhou, C. Wang, H. Liu, Q. Huang, M. Wang, and Y. Lei, “Cadmium induced cell apoptosis, DNA damage, decreased DNA repair capacity, and genomic instability during malignant transformation of human bronchial epithelial cells,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 10, no. 11, pp. 1485–1496, 2013.
- [27] J. Grawé, M. Nüsse, and I.-D. Adler, “Quantitative and qualitative studies of

- micronucleus induction in mouse erythrocytes using flow cytometry. I. Measurement of micronucleus induction in peripheral blood polychromatic erythrocytes by chemicals with known and suspected genotoxicity,” *Mutagenesis*, vol. 12, no. 1, pp. 1–8, 1997.
- [28] S. Sharma and R. Bhonde, “Influence of nuclear blebs and micronuclei status on the growth kinetics of human mesenchymal stem cells,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 230, no. 3, pp. 657–666, 2015.
- [29] M. Fenech, “Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes - A biomarker for DNA damage in human populations,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 404, no. 1–2, pp. 155–165, 1998.
- [30] B. A. Weaver, A. D. Silk, and D. W. Cleveland, “Cell biology: nondisjunction, aneuploidy and tetraploidy,” *Nature*, vol. 442, no. 7104, pp. 9–10, 2006.
- [31] D. A. Cornélio, J. C. M. Tavares, T. V. C. D. A. Pimentel, G. B. Cavalcanti, and S. R. Batistuzzo de Medeiros, “Cytokinesis-block micronucleus assay adapted for analyzing genomic instability of human mesenchymal stem cells,” *Stem Cells Dev.*, vol. 23, no. 8, pp. 823–38, 2014.



Capítulo 9

Influencia en el proceso de coagulación

9.1 Introducción

Con el fin de controlar la hemorragia en respuesta a la lesión generada por el implante, se requieren mecanismos hemostáticos complejos que involucran la formación de una red de fibrina para detener el sangrado y mantener el flujo sanguíneo normal, proceso denominado coagulación [1]. Por otro lado, la importancia de la inducción de la coagulación por parte de los materiales implantables radica en que la secuencia que dará lugar a la osteoinducción inicia con la formación del coágulo [2]. Como se detalló en el capítulo 8 sección 8.1, la formación de esta la red de fibrina es fundamental para que ocurra la migración celular hacia la superficie del implante.

Los procesos que se desencadenan instantáneamente luego de que una herida daña el endotelio de un vaso sanguíneo se pueden explicar mediante el “modelo celular de la coagulación” que consta de tres fases, cada una asociada a proteínas, denominadas “factores de coagulación”, que se activan en un orden específico y requieren de cofactores de activación como el calcio y fosfolípidos [3] (figura 9.1). En los últimos años se ha estudiado el potencial rol en la activación de la coagulación por parte de micropartículas de distintos orígenes, tales como pequeños fragmentos de células derivadas de leucocitos, plaquetas, células endoteliales [4], aunque cuyo papel aún no está claro. Además, cuando la sangre se expone a superficies artificiales, propiedades tales como el tamaño, forma [5], rugosidad, carga [6] e hidrofiliidad [7], [8] juegan un rol clave. Sin embargo, hoy en día los mecanismos de activación de la coagulación propuestos resultan controversiales debido a que algunos experimentos han demostrado que tanto superficies aniónicas hidrofílicas como hidrófobas tienen la misma capacidad de activar *in vitro* la formación del coágulo [9], [10].

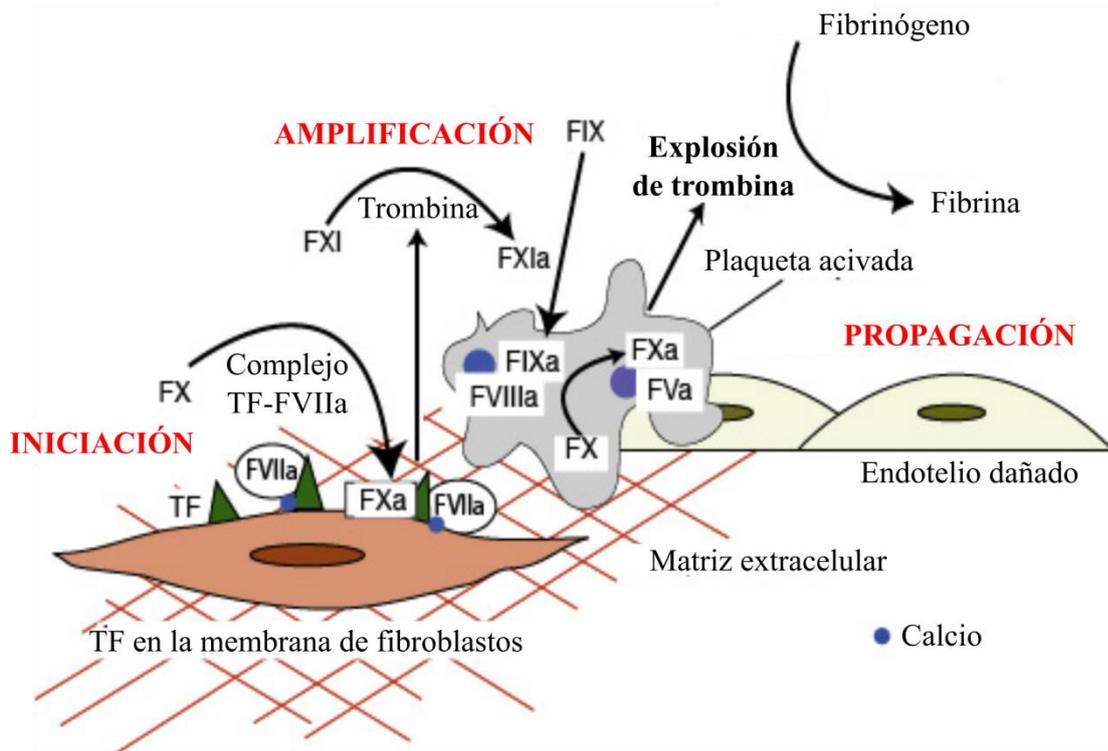


Figura 9.1: Modelo celular de la coagulación con sus tres fases: iniciación, amplificación y propagación. En la fase de iniciación la lesión vascular deja expuesta al factor tisular o TF (del inglés “tissue factor”) en la superficie celular; luego el factor VII se une a TF formando el complejo “TF-FVIIa” que a su vez activa a FX transformando pequeñas cantidades de protrombina en trombina, insuficientes para completar el proceso de formación de fibrina. La trombina es un ávido reclutador de plaquetas, en el proceso denominado “activación plaquetaria”, y retroalimenta de manera positiva al sistema ya que posee la capacidad de activar los factores V, VIII y IX. De esta manera se amplifica y propaga la formación de más cantidad de trombina, evento denominado “explosión de trombina”. La explosión de trombina es un proceso esencial para el clivaje proteolítico de fibrinógeno para formar fibrina que se polimeriza para dar lugar al coágulo firme. La trombina, a su vez, activa al factor XIII encargado de entrecruzar las fibras de fibrina, volviendo al coágulo más estable, mientras que al mismo tiempo inhibe la fibrinólisis. Adaptado de Villiers y col. [3]

Actualmente es posible predecir la influencia de los biomateriales en la coagulación sin la necesidad de protocolos extensos en animales, utilizando un método de reemplazo rápido y eficaz denominado tromboelastografía. El tromboelastógrafo (TEG) es un instrumento que mide los cambios en las propiedades viscoelásticas de la sangre en el tiempo en presencia de un material, detectando la formación inicial de fibrina, la velocidad de formación del coágulo y eventual lisis del mismo [6]. Los valores convencionales que proporciona una tromboelastografía son: (i) el tiempo de reacción (R): periodo transcurrido entre la colocación de la sangre en el equipo y el comienzo de la formación de fibrina; (ii) el tiempo desde el

comienzo de la formación del coágulo hasta los 20 mm (K); (iii) la amplitud máxima del coágulo (MA); (iv) tiempo en llegar a la MA (TMA); (v) el ángulo α : es el ángulo formado por el brazo de R y la pendiente de K (figura 9.2) [11].

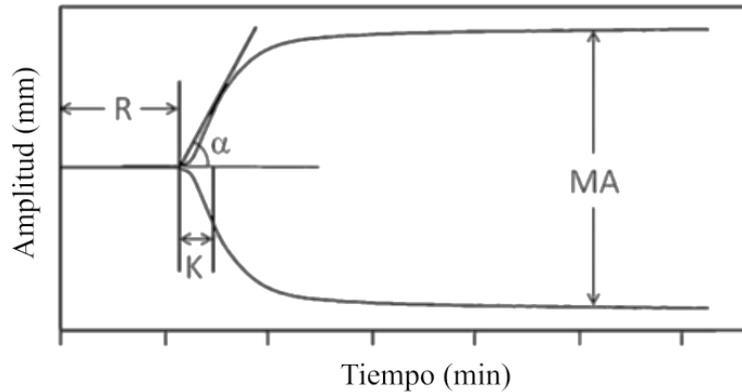


Figura 9.2: Esquema de una tromboelastografía normal en donde se indica cómo se calculan los tiempos R y K y los parámetros de amplitud del coágulo MA y α . Adaptado de Contreras – García y col. [6].

Para el estudio de tromboelastografía se seleccionó el material de hidroxiapatita MI por presentar características de bioactividad, biodegradación y biocompatibilidad favorables. El efecto del material en la coagulación se realizó utilizando plasma sanguíneo humano pobre en plaquetas (PPP) y PPP sin micropartículas, vesículas lipídicas ni exosomas (PPP sin MP), con el objetivo de dilucidar si sus características fisicoquímicas intervienen en el proceso de formación del coágulo y proponer el mecanismo por el cual ocurre.

9.2 Métodos experimentales

9.2.1 Reactivos

Cloruro de calcio anhídrido (Sigma), pool de plasma citratado (CRYOcheck CCN-15, lot#A1151, de Precision BioLogic, Dartmouth, Nueva Escocia, Canadá), microesferas de vidrio borosilicato (10 μm de diámetro, Spherical).

9.2.2 Ensayos de tromboelastografía

Se prepararon tres diluciones del material MI en agua, para obtener las siguiente concentraciones finales: 0,25, 2,5 y 25 mg/ml. Para el ensayo se utilizó plasma sanguíneo humano citratado recalcificado pobre en plaquetas (PPP) almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ que fue previamente descongelado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de su uso. La elección del PPP, en lugar de la sangre entera, se hizo para proporcionar una mayor reproducibilidad del ensayo, y para corroborar si los efectos observados se deban a las características fisicoquímicas del material. Además se utilizó plasma sanguíneo sin micropartículas, exosomas ni vesículas lipídicas (PPP sin MP), el cual fue obtenido por ultracentrifugación a 50.000 RPM (136.000xg) durante 3 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando una centrífuga Optima Max-E, Beckman[®] (figura 9.3).

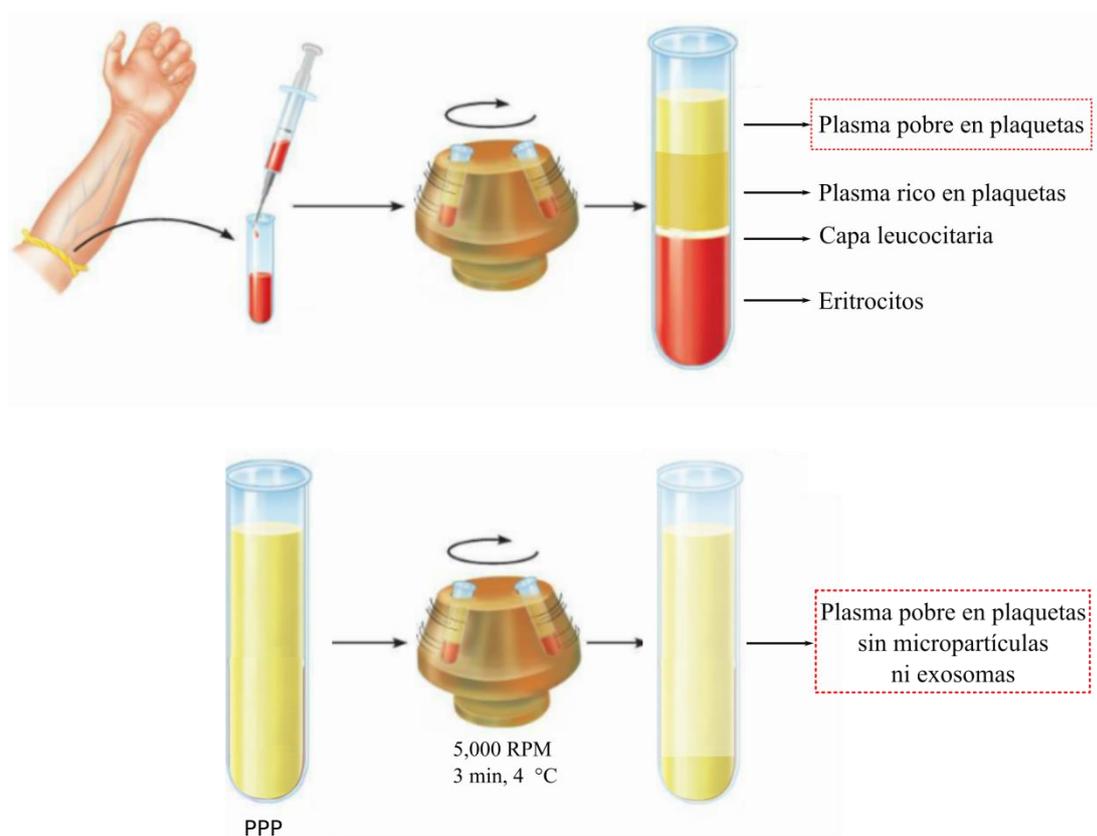


Figura 9.3: Obtención de los dos tipos de plasma utilizados durante el ensayo (PPP y PPP sin MP) mediante centrifugaciones sucesivas.

Las medidas se realizaron en un tromboelastógrafo Modelo 5000 (Haemonetics Corporation, Niles, IL, USA) (figura 9.4). Este instrumento se compone principalmente por

una taza que contiene la sangre (360 ml a 37 °C) que oscila a través de un ángulo de 4 ° 45 ’’, y de un pin con control de movimiento, con un extremo conectado a un cable de torsión y otro inmerso en la sangre. Una vez que el coágulo comienza a formarse el torque de la taza rotatoria es transmitido al pin. Cuando ocurre la lisis del coágulo, los enlaces se rompen y la transferencia de movimiento a la taza disminuye. La rotación del pin es convertido por un transductor mecánico - eléctrico en una señal eléctrica, luego la información es registrada por una computadora [6].

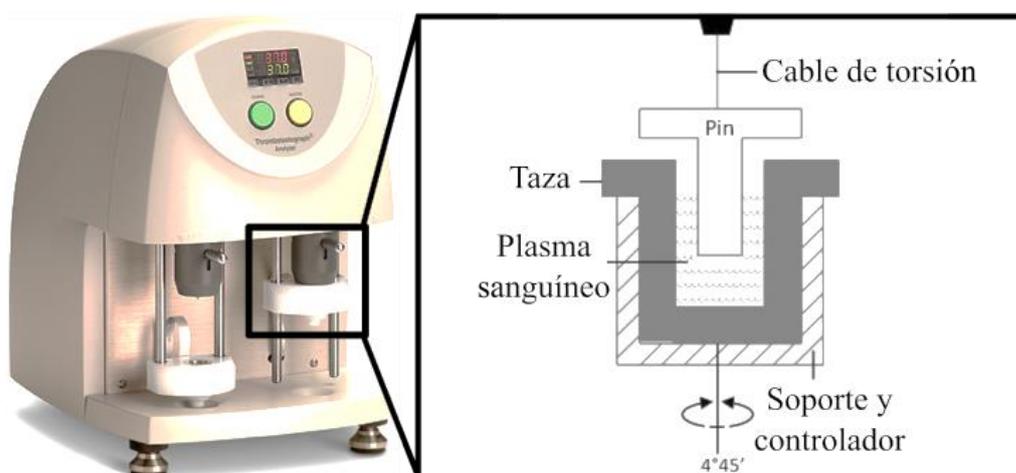


Figura 9.4: Fotografía de un TEG Modelo 5000 (Haemonetics Corporation, Niles, IL, USA) y sus componentes. Adaptado de Contreras – García y col. [6].

Para realizar las medidas en primer lugar se agregaron 20 μl de solución 200 mM de CaCl_2 (500 mOsm) en la taza del TEG; luego 20 μl de material en diferentes concentraciones finales 0,25, 2,5 y 25 mg/ml e inmediatamente después 320 μl de PPP o PPP sin MP; seguidamente el instrumento TEG comenzó a registrar los datos. Se llevaron a cabo entre 3 y 6 pruebas independientes para cada condición. Como control negativo se utilizó agua bidestilada y como control positivo 2,5 mg/ml de esferas de vidrio borosilicato de 10 μm de diámetro, cuyo efecto promotor de la coagulación fue previamente estudiado por Ostomel y col [12].

9.2.3 Análisis estadístico de los datos

La significación estadística de los datos se evaluó utilizando t-test de Student y se consideraron significativos los valores por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) [13]. Los datos cuantitativos se expresan como la media \pm desviación estándar (DE) del conjunto de experimentos.

9.3 Resultados y discusión

Los perfiles obtenidos por TEG utilizando PPP con 0,25, 2,5 y 25 mg/ml de HA MI se muestran en la figura 9.5. Al analizar los mismos se observó que 0,25 mg/ml de MI no son suficientes para inducir efectos en la coagulación, mientras que 2,5 mg/ml de MI generan un efecto ligeramente mayor, aunque el análisis estadístico de los parámetros demostró que no difiere significativamente con el control negativo. Sin embargo, 25 mg/ml de MI fueron suficientes para promover la formación del coágulo del mismo modo que el control positivo, 2,5 mg/ml de esferas de vidrio borosilicato.

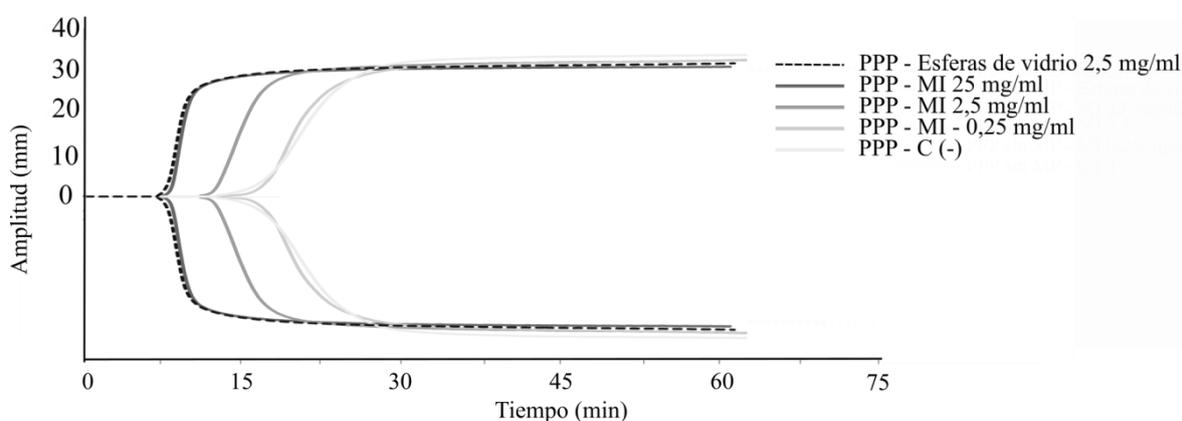


Figura 9.5: Tromboelastografía utilizando 0,25, 2,5 y 25 mg/ml de HA MI. Como control negativo se utilizó agua bidestilada, C (-), y como control positivo 2,5 mg/ml de esferas de vidrio borosilicato.

A partir de los parámetros de TEG calculados para 25 mg/ml de MI se obtuvieron tiempos TMA, R y K menores que el control negativo y estadísticamente comparables al

control positivo (figuras 9.6), lo que refleja mayor acción de los factores que interviene en la coagulación [11], especialmente la actividad de los factores XII, XI y VIII [14].

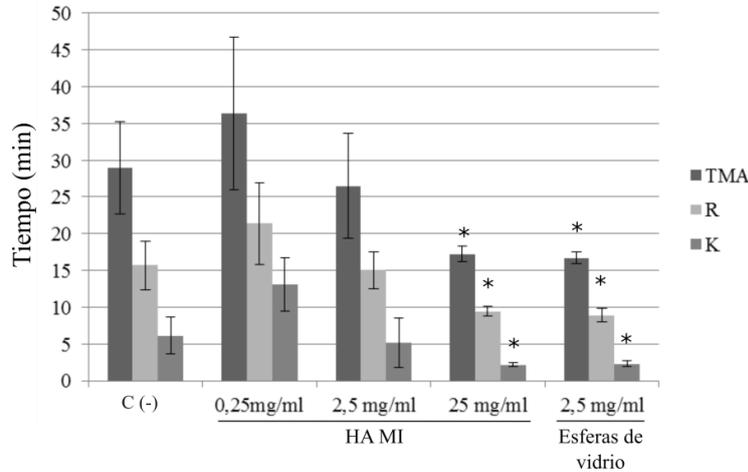


Figura 9.6: Gráfico del tiempo de reacción (R), tiempo para llegar a los 20 mm (K) y a la máxima amplitud del coágulo (TMA). Las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras y el control negativo (C-) se indican con asteriscos, * $p < 0,05$.

Por otro lado, el parámetro relacionado con la velocidad de formación del coágulo, el ángulo α , se vio aumentado y comparable al control positivo, cuando se realizó el ensayo con 25 mg/ml de MI HA (figura 9.7). Esto último indica un inicio de la formación del coágulo mucho más abrupto causado por una mayor explosión de trombina durante la formación del coágulo estable de fibrina [14].

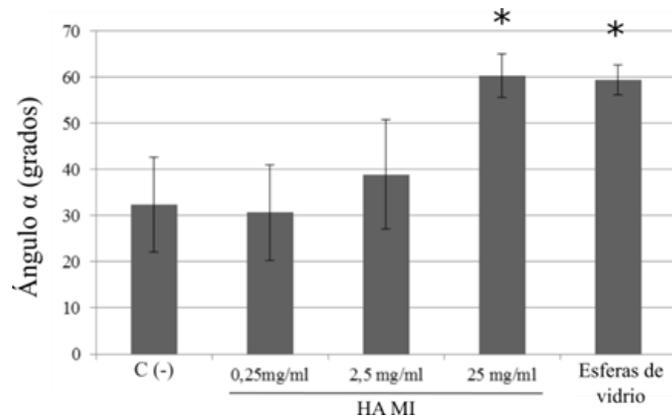


Figura 9.7: Gráfico del ángulo α . Las diferencias estadísticamente significativas entre las muestras y el control negativo (C-) se indican con asteriscos, * $p < 0,05$.

En cuanto a MA no se encontraron diferencias significativas bajo los distintos tratamientos (figura 9.8). Este parámetro se encuentra estrechamente relacionado con la elasticidad del coágulo y la funcionalidad del fibrinógeno y del factor XIII [14].

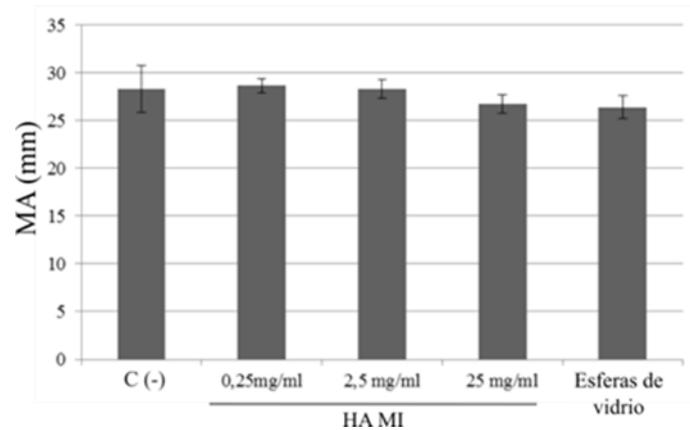


Figura 9.8: Gráfico de la máxima amplitud del coágulo (MA).

En la figura 9.9 se muestran los perfiles de TEG utilizando PPP sin MP para estudiar si las nanopartículas de hidroxiapatita MI puede sustituir el efecto inductor de la coagulación producido por vesículas lipídicas aniónicas, exosomas y micropartículas. Allí se observó que las concentraciones de MI 2,5 y 0,25 mg/ml no fueron suficientes para iniciar el proceso de coagulación. Por el contrario, la formación del coágulo fue inducida por 25 mg/ml de MI aunque no de manera comparable al control positivo, promoviendo un efecto menos pronunciado respecto a 2,5 mg/ml de esferas de vidrio borosilicato (figura 9.9).

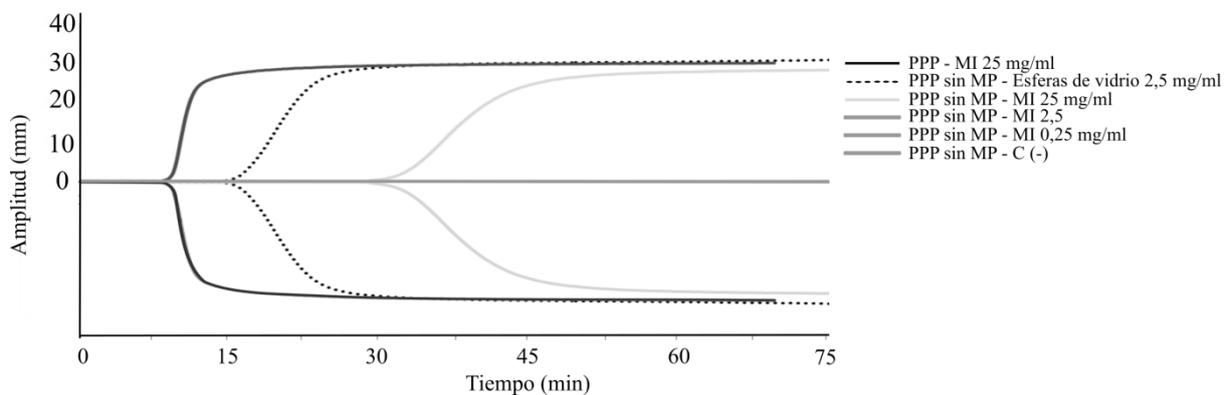


Figura 9.9: Tromboelastografía utilizando PPP con 25 mg/ml de HA MI y PPP sin MP con 0,25, 2,5 y 25 mg/ml de HA MI. Como control negativo se utilizó agua bidestilada, C (-), y como control positivo 2,5 mg/ml de esferas de vidrio borosilicato.

En comparación con el estudio mencionado anteriormente en PPP con 25 mg/ml de MI, se requirió más tiempo para el comienzo de la formación del coágulo (R), lo cual era un resultado esperable debido a la ausencia de MP (figura 9.10 A). En cuanto a la amplitud máxima del coágulo (MA) no se encontraron diferencias (figura 9.10 B), demostrando que se obtienen coágulos de la misma elasticidad en plasma con o sin micropartículas.

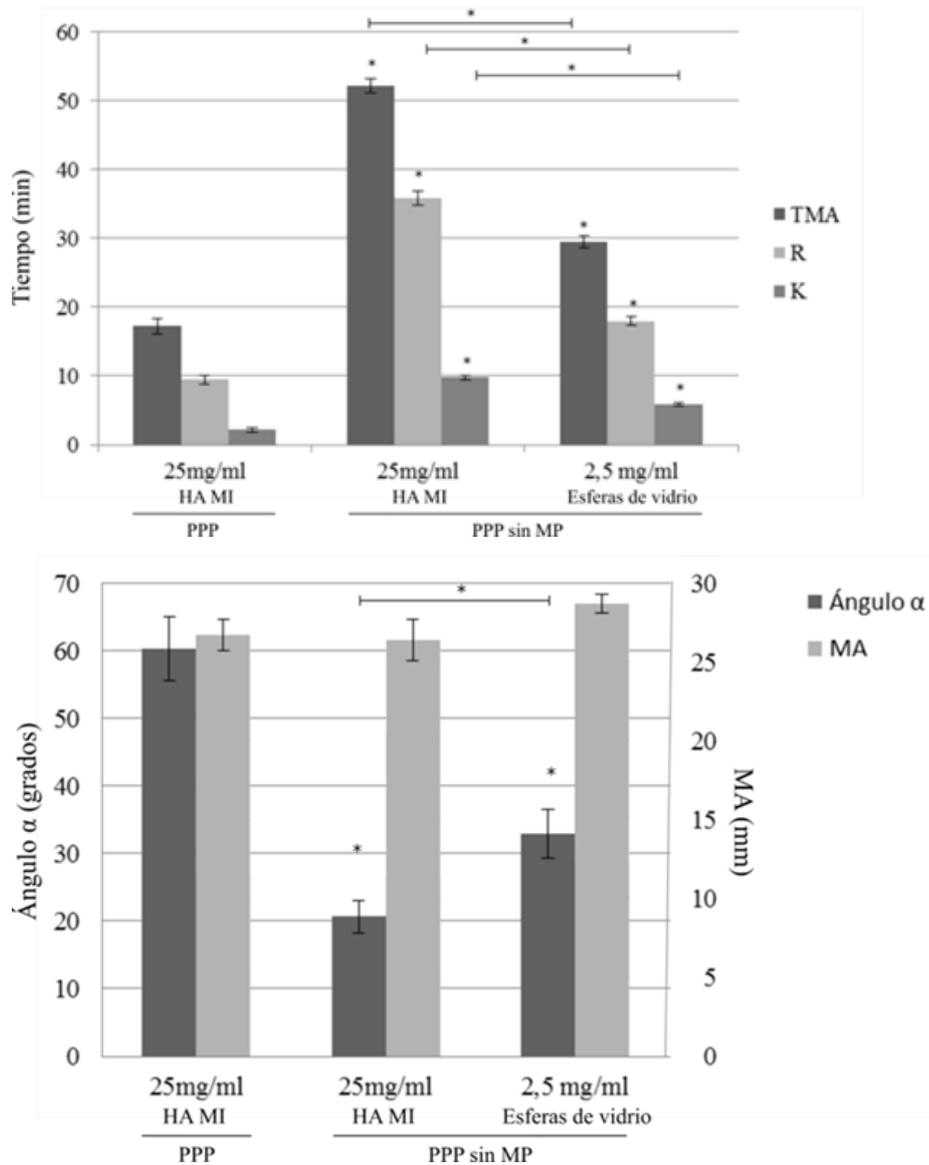


Figura 9.9: (A) Gráfico los tiempos K, R y TMA. (B) Gráfico del ángulo α y MA. Las diferencias estadísticamente significativas entre PPP sin y con MP se indican con asteriscos. En el caso de las diferencias entre las dos muestras de PPP sin MP se utilizaron llaves, * $p < 0,05$

9.3.1 Mecanismo propuesto para la activación de la coagulación inducido por la HA

A la vista de los resultados obtenidos, se propone que la HA MI tiene un rol en el proceso de coagulación similar al generado por vesículas lipídicas aniónicas, exosomas y micropartículas. La inducción de la formación del coágulo generado por la nanopartículas de HA podría estar relacionado con sus características superficiales. Ensayos de tromboelastografía realizados por otros grupos de investigación demostraron que las partículas cargadas negativamente, característica que coincide con la HA MI (capítulo 3, sección 3.3.5), son promotoras de la formación por favorecer la activación de los factores de coagulación [6].

Al mismo tiempo, se sabe que la hidroxiapatita tiene una gran afinidad por proteínas que contienen ácido glutámico gamma carboxilado (Gla) como la osteocalcina, proteína no colágena presente en el hueso y la dentina [15]. La interacción osteocalcina – HA ocurre a través de las fuertes uniones iónicas de los residuos Gla con los iones Ca^{2+} expuestos en la superficie de la cara (100) del cristal de HA (correspondiente al denominado plano “a”) [15]. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de TEG se propone que este mismo tipo de interacción podría estar ocurriendo entre las nanopartículas de HA y los factores de coagulación que contiene residuos Gla, tal es el caso del factor VII, IX, X, la protrombina (o factor II), la proteína C (o factor IV), la proteína S y la proteína Z [16].

Hasta el momento no hay estudios que muestren el mecanismo exacto por el cual las partículas de HA afectan el proceso de coagulación, sin embargo se ha visto que este tipo de partículas [2], al igual que diferentes materiales cerámicos de calcio como CaO y CaCO_3 [5], pueden influenciar el proceso de coagulación posiblemente mediante su disolución en el medio y posterior liberación de iones Ca^{2+} , fundamental para la unión de los factores de coagulación a las membranas. Durante la coagulación, en un proceso similar a la unión osteocalcina – HA, los puentes calcio entre la HA y los residuos Gla de los factores de coagulación permitirán su unión con la superficie de las membranas fosfolipídicas y por lo tanto, la correcta alineación e inmovilización de los factores de coagulación necesario para que ocurran diferentes reacciones enzimáticas requeridas para la producción de fibrina y formación del coágulo [16].

Por lo tanto, la activación de la coagulación del plasma inducida por 25 mg/ml de MI podría ser mediante tres procesos diferentes que actuarían de manera sinérgica y que

permitirían la unión de factores de coagulación con residuos Gla: (i) el aumento de la concentración de calcio local debido a la disolución de MI, permitiendo la unión de los factores de coagulación con superficies fosfolípídicas, (ii) la unión al plano “c” del cristal con grupos PO_4^- expuestos mediada por Ca^{2+} (presentes en el medio o como producto de la disolución del material) y (iii) la unión directa de las proteínas que presentan este aminoácido al plano “a” del cristal con iones Ca^{2+} expuestos. Los mecanismos (ii) y (iii) propuestos explican la inducción de la coagulación aún en ausencia de células, vesículas lipídicas aniónicas, exosomas y micropartículas (PPP sin MP).

En cuanto al tamaño de partícula, cabría esperar que en PPP sin MP se observe una mayor velocidad de coagulación utilizando nanopartículas de HA (8 nm de diámetro) en comparación con las micropartículas de vidrio borosilicato ($1 \cdot 10^4$ nm de diámetro), debido a la mayor relación superficie / volumen del material que permitiría la unión de mayor cantidad de factores de coagulación. No obstante se observa el efecto contrario, incluso utilizando una concentración de microesferas diez veces menor (2,5 mg/ml).

9.4 Conclusión

En los ensayos de TEG se pudo observar que utilizando plasma humano con y sin micropartículas con 0,25, 2,5 mg/ml de MI no hubo inducción de la coagulación promovida por el material. Por otro lado, a concentraciones mayores de MI (25 mg/ml) en PPP se obtuvieron efectos comparables al control positivo, 2,5 mg/ml de micropartículas de vidrio borosilicato. Cuando se utilizó plasma sin micropartículas, MI a una concentración de 25 mg/ml también indujo la formación del coágulo de fibrina, aunque a menor velocidad que cuando se utilizaron micropartículas de borosilicato diez veces menos concentradas, a pesar de que la HA tiene mayor relación superficie volumen lo que permitiría mayor activación de los factores de coagulación. Por esta razón es importante realizar más estudios de la interacción de los materiales de HA con proteínas del plasma sanguíneo de manera individual para dilucidar qué mecanismos están interviniendo y la influencia de características superficiales tales como la rugosidad, tamaño, forma y carga.

La inducción generada por 25 mg/ml de HA MI podría deberse a la liberación local de Ca^{2+} debido a su disolución. El efecto inductor de la coagulación observado en PPP sin micropartículas es un indicador de que además funciona como estructura de soporte que permite la correcta alineación de factores de coagulación con residuos Gla, y de este modo amplifica indirectamente la producción de fibrina.

9.5 Referencias bibliográficas

- [1] J. C. Vanegas-Acosta, D. A. Garzón-Alvarado, and V. Lancellotti, “Numerical investigation into blood clotting at the bone-dental implant interface in the presence of an electrical stimulus,” *Comput. Biol. Med.*, vol. 43, no. 12, pp. 2079–2088, 2013.
- [2] M. Nakamura, K. Niwa, S. Nakamura, Y. Sekijima, and K. Yamashita, “Interaction of a blood coagulation factor on electrically polarized hydroxyapatite surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 82, no. 1, pp. 29–36, 2007.
- [3] E. Villiers and L. Blackwood, *BSAVA manual of canine and feline clinical pathology*. British Small Animal Veterinary Association, 2005.
- [4] K. a High, “Coaxing coagulation with RNA and cell fragments,,” *Nat. Med.*, vol. 9, no. 8, pp. 991–992, 2003.
- [5] T. A. Ostomel, Q. Shi, and G. D. Stucky, “Oxide hemostatic activity,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 26, pp. 8384–8385, 2006.
- [6] A. Contreras-García, Y. Merhi, J. C. Ruiz, M. R. Wertheimer, and C. D. Hoemann, “Thromboelastography (TEG) cups and pins with different PECVD coatings: Effect on the coagulation cascade in platelet-poor blood plasma,” *Plasma Process. Polym.*, vol. 10, no. 9, pp. 817–828, 2013.
- [7] E. A. Vogler, “Water and the acute biological response to surfaces,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 10, pp. 1015–1045, 1999.
- [8] E. A. Vogler, “Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 69–117, 1998.
- [9] R. Zhuo, C. A. Siedlecki, and E. A. Vogler, “Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 24, pp. 4325–4332, 2006.
- [10] Y. Wu, “Contact pathway of coagulation and inflammation,” *Thromb. J.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–9, 2015.
- [11] F. E. Gempeler R., A. H. Perea B., and L. Díaz B., “Tromboelastografía,” *Rev. Colomb. Anestesiología*, vol. 39, no. 3, pp. 410–423, 2011.
- [12] T. A. Ostomel, Q. Shi, C. K. Tsung, H. Liang, and G. D. Stucky, “Spherical bioactive glass with enhanced rates of hydroxyapatite deposition and hemostatic activity,” *Small*, vol. 2, no. 11, pp. 1261–1265, 2006.
- [13] G. W. Snedegor and W. G. Cochran, *Statistical methods*, no. 6. Ames: Iowa State

- University Press, 1967.
- [14] K. Galvez and C. Cortes, “Tromboelastografía: Nuevos conceptos en la fisiología de la hemostasia y su correlación con la coagulopatía asociada al trauma,” *Rev. Colomb. Anesthesiol.*, vol. 40, no. 3, pp. 224–230, 2012.
- [15] Q. Q. Hoang, F. Sicheri, A. J. Howard, and D. S. C. Yang, “Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure.,” *Nature*, vol. 425, no. 6961, pp. 977–980, 2003.
- [16] S. A. Smith, “The cell-based model of coagulation: State-Of-The-Art Review,” *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, vol. 19, no. 1, pp. 3–10, 2009.

Capítulo 10

Conclusiones generales y perspectivas a futuro

Durante este trabajo de investigación se han logrado obtener cuatro materiales (MI, MII, MIII y MIV) de composición química, morfología y tamaño similar a la apatita biológica. El control de la nano y microrugosidad de la superficie de los materiales se consiguió utilizando sistemas autoagregados de CTAB, que actuaron como nanoreactores dirigiendo la nucleación y estructura de las nanopartículas, y distintos polímeros. La utilización de diferentes sistemas híbridos formados por las micelas de CTAB/polímero y las sales inorgánicas en solución dieron lugar a materiales con diferentes características topográficas y composiciones químicas; hecho que se evidencia en las diferencias en relaciones Ca/P, las micromorfologías y las cargas superficiales entre los materiales.

Cuando un material es implantado ocurre un contacto inmediato con los fluidos corporales dando lugar a la adhesión de biomoléculas como las proteínas. Para estudiar el comportamiento de los materiales en un entorno biológico simulado se realizaron ensayos de degradación en condiciones de resorción ósea, ensayos de bioactividad *in vitro* y adsorción de albúmina sérica bovina. Los resultados del primer ensayo expusieron que los materiales con superficies formadas por picos altos y valles profundos de dimensiones comparables, MI y MIII, se degradaron más lentamente. Por otro lado, los ensayos de bioactividad *in vitro* demostraron que los defectos superficiales y la carga negativa del material MI favorecieron la nucleación, crecimiento y aglomeración de depósitos de fosfatos de calcio esferoidales, de composición química y morfología que coincide con las vesículas de matriz mineral secretadas por los osteoblastos siendo esto un indicador de las buenas características osteoinductivas del material. Cuando el material MI fue preincubado con albúmina sérica bovina, una cantidad relativamente baja de proteína se adsorbió en la interfase, la cual generó un efecto suficiente para desacelerar la nucleación esferoidal de fosfatos de calcio en SBF, posiblemente por competencia por los sitios de unión con los iones de la solución y por el aumento de la viscosidad de la misma. Este comportamiento apoya a las conclusiones obtenidas previamente por otros grupos de investigación que exponen a la albúmina retarda e inhibe la biomineralización.

Un material biocompatible debe tener la habilidad de estar en contacto con los tejidos vivos sin causar daño, por lo tanto como ensayos preliminares de biocompatibilidad se estudió la viabilidad y adhesión en cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de ratas, en los cuales no se encontraron diferencias entre las muestras control y los tratamientos con los materiales. Sin embargo, los ensayos de diferenciación celular, en los cuales se cuantificó la expresión de la proteína fosfatasa alcalina, mostraron que el material MI fue capaz de inducir la diferenciación de los osteoblastos inmaduros a 7 días de tratamiento.

Es sabido que las propiedades superficiales de implante tienen una fuerte influencia en la migración, adhesión y diferenciación de las MSC. Para probar la hipótesis de que los materiales podrían afectar de algún modo este comportamiento se llevaron a cabo ensayos con MSC de conejo. Para cumplir con este objetivo se hicieron recubrimientos con los cuatro materiales y se observaron respuestas más favorables de adhesión, viabilidad y proliferación de MSC cuando se cultivan sobre cubiertas formadas por el material MI. Consecuentemente se realizaron cubiertas biomiméticas de hidroxiapatita MI y fibras de colágeno tipo I, y se llevaron a cabo los siguientes estudios en MSC: (i) adhesión, (ii) análisis de la integridad del citoesqueleto celular mediante la localización por inmunofluorescencia de la proteína α -SMA y (iii) estudio de la genotoxicidad. En todos ellos no se observaron diferencias de los tratamientos respecto a las muestras control, lo que demostró su biocompatibilidad y potencial efecto osteoinductivo.

Luego de la inserción de un implante la secuencia que dará lugar a la osteoinducción inicia con la coagulación; proceso hemostático complejo que involucra la formación de una red de fibrina que detiene el sangrado y mantiene el flujo sanguíneo normal. Para los estudios de coagulación *in vitro* mediante tromboelastografía se seleccionó el material MI por haber presentado bioactividad mejorada y respuestas favorables en los ensayos de biocompatibilidad. Los resultados llevaron a inferir que la hidroxiapatita MI tiene efectos inductores en la coagulación posiblemente gracias a la unión mediada por iones calcio a los factores de coagulación del plasma sanguíneo que contienen residuos de ácido glutámico, proceso que favorece la alineación y posterior activación de dichos factores inductores de la formación del coágulo de fibrina.

Las experiencias realizadas en la presente disertación dieron lugar a la obtención de un material nanocristalino de hidroxiapatita que podría ser aplicado en ingeniería de tejidos por su potencial capacidad de osteoconducción, osteoinducción y osteointegración. Al mismo

tiempo se resalta como las características fisicoquímicas y de rugosidad superficial de los biomateriales influyen en la biodegradación, bioactividad, biocompatibilidad celular e inducción de la coagulación.

Actualmente existe una gran demanda de nuevos avances en el diseño de materiales para su empleo en tecnologías de regeneración de tejidos óseos en lugar de su reparación o reemplazo. La necesidad de regeneración de tejido óseo a nivel mundial es clara y realizarlo es un reto científico tan ambicioso como trascendente. Desde la perspectiva de América latina el acceso a dichas tecnologías resulta muy costoso, los materiales son mayormente importados, y por tal motivo no son accesibles a la mayoría de los pacientes. El presente trabajo de investigación realiza un aporte substancial en el campo de la investigación y desarrollo tecnológico biomédicas. En principio se logró obtener y caracterizar un biomaterial nanocristalino de HA con bajos costos de fabricación y utilizando tecnologías limpias, como paso siguiente se requiere continuar con los ensayos de compatibilidad biológica así como la validación de los protocolos de fabricación para su posterior aplicación clínica. En función de los resultados obtenidos, se plantean algunas líneas de trabajo futuro posibles que permitirían afianzar las conclusiones obtenidas y ampliar el conocimiento logrado.

En primer lugar se propone continuar con los ensayos de biocompatibilidad y diferenciación celular *in vitro*. Al tratarse de materiales nanoparticulados, principalmente resulta interesante poder determinar si existe internalización y degradación citoplasmática de las nanopartículas y, en el caso de que esto ocurra, que mecanismos intervienen. Además, es importante profundizar en la inducción en la transcripción y expresión de otras proteínas específicas que se expresan durante el proceso de diferenciación de células madre y osteoblastos como la osteocalcina, osteopontina, osteonectina, Runx2 (factor de transcripción relacionados con Runt-2) y BMPs (proteínas morfogénicas óseas), entre otras.

A pesar de que los cultivos celulares primarios aportan información preliminar relevante acerca de la biocompatibilidad de los biomateriales, para progresar con los resultados resulta necesario realizar ensayos en un entorno biológico real mediante experimentación animal. Las nanopartículas de hidroxiapatita en polvo, tal como fueron obtenidas, pueden ser aplicadas como relleno de fracturas o defectos óseos en diferentes intervenciones quirúrgicas como osteotomías, y reconstrucción acetabular de cadera, entre otras, tal como se aplican en medicina clínica hidroxiapatitas comerciales tales como OSIQ[®], Ostim[®] 35 e hidroxiapatita Bionnovation[®]

Para un estudio riguroso de la influencia de las propiedades mecánicas de los materiales en la mecanotransducción celular se podrían construir andamios formados, en su totalidad o en parte, por las nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas. El material que se diseñe debe reproducir las características mecánicas del tejido óseo ya que las propiedades del entorno celular (rigidez, geometría y las tensiones externas, entre otras) juegan un rol crítico en la mecanotransducción celular dirigiendo el desarrollo y organización de los tejidos. El próximo paso es determinar si el material satisface las propiedades mecánicas del tejido óseo, tanto a nivel macroscópico como a nivel celular; es decir, si es capaz de tolerar los estímulos de estrés mecánico y físico al cual se ve sometido el hueso en relación a su función y, frente a estos estímulos, inducir una respuesta celular que permita la regeneración idónea de dicho tejido.

En virtud de su estabilidad en condiciones fisiológicas, alta relación superficie/volumen y su afinidad diferencial por diferentes moléculas se propone que las nanopartículas de HA podrían ser utilizadas en diversidad de aplicaciones tales como purificación de proteínas, terapia génica y direccionamiento de fármacos. En términos de su aplicabilidad biofarmacéutica es necesario realizar estudios exhaustivos su biodistribución, actividad metabolismo y excreción como paso previo para el diseño de ensayos clínicos. Es preciso señalar que ciertas características de las nanopartículas de HA obtenidas resultan atractivas para dichas aplicaciones como ser su distribución homogénea de tamaño y forma. Además, la degradación diferencial dependiente del pH resulta interesante a la hora de ser aplicado en direccionamiento de fármacos, y su superficie hidrofílica y relativamente baja afinidad por la albúmina, resultan críticos para el bloqueo y retardo de la acción del sistema fagocítico mononuclear.

Capítulo 11

Producción científica

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

- 2016** **Albumin Corona on Hydroxyapatite and Ce-doped TiO₂ Nanoparticles and its Effect on Biom mineralization.** NL. D'Elía, AN. Gravina, JM. Ruso, JL. Marco-Brown, JM. Sieben, PV. Messina. *Manuscrito enviado para su publicación.*
- Anionic surfaces with minimal charge density can restore burst coagulation of microparticle/exosome-depleted blood plasma.** A. Contreras-Garcia, D. Maxime, NL. D'Elia, CH. Lafantaisie-Favreau, JC. Ruiz, GE. Rivard, M. Wertheimer, PV. Messina, CD. Hoemann. *Frontiers*. Nro: 2632.
- 2015** **Study of rMSC viability, morphology and adhesion on different bone mimetic surfaces.** NL. D'Elía, C. Mathieu, CD. Hoemann, AN. Gravina, J. Sartuqui and PV. Messina. *Bone*. Vol. 89, Pág. 68.
- Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rods superstructures.** NL. D'Elía, C. Mathieu, C. Hoemann, JA. Laiuppa, GE. Santillán, PV. Messina. *Nanoscale*. Vol. 7, Pág. 18751–18762.
- Analyzing the Hydrodynamic and Crowding Evolution of Aqueous Hydroxyapatite-Gelatin Networks: Digging Deeper into Bone Scaffold Design Variables.** J. Sartuqui, NL. D'Elía, AN. Gravina, PV. Messina. *Biopolymer*. Vol. 103, Pág. 393 – 405.
- Nano-hydroxyapatite for use in bone tissue repair.** NL. D'Elía, NA. Gravina, JM. Laiuppa, GE. Santillán, PV. Messina. *Bone*. Vol. 71, Pág. 260.
- 2013** **Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic.** NL. D'Elía, AN. Gravina, JM. Ruso, JA. Laiuppa, GE. Santillán, PV. Messina. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Vol.

1830, fascículo 11. Pág. 5014 – 5026.

Nano-hydroxyapatite for use in bone tissue repair. NL. D'Elía, AN. Gravina, JA. Laiuppa, GE. Santillán, PV. Messina. Bone. Vol. 71, Pág. 260.

Presentaciones en reuniones científicas:

- 2016** **Obtención de nanocristales de hidroxiapatita mediante el empleo de diferentes sistemas bioiméticos.** NL. D'Elía, S. Kharman, AN. Gravina, J. Sartuqui y PV. Messina. XVI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Anionic surfaces with minimal charge density can restore burst coagulation of microparticle/exosome-depleted blood plasma.** A. Contreras-Garcia, D. Maxime, NL. D'Elía, CH. Lafantaisie-Favreau, JC. Ruiz, GE. Rivard, M. Wertheimer, PV. Messina, CD. Hoemann. 10th World Biomaterials Congress. Montreal, Canadá.
- 2015** **Utilización de diferentes análisis de datos para estudiar la viabilidad y adhesión de células madres mesenquimales de conejo sobre cubiertas biomiméticas.** NL. D'Elía, C. Mathieu, CD. Hoemann, AN. Gravina, J. Sartuqui and PV. Messina. XXXII Reunión Anual Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Sierra de la Ventana, Argentina. Resumen publicado en revista: BIOCELL ISSN: 0327 – 9545.
- Materiales Nano-estructurados para tratamientos óseos y dentales.** PV. Messina, L. Benedini, NL. D'Elía, AN. Gravina, J. Sartuqui. 5to Congreso Interdisciplinario de la Salud de Bahía Blanca. Bahía Blanca.
- 2014** **Efecto de la presencia de nanorodillos de hidroxiapatita (HA) en la evolución hidrodinámica y organización de soluciones acuosas de gelatina.** J. Sartuqui, AN. Gravina, NL. D'Elía y PV. Messina. V Encuentro Argentino de Materia Blanda. La Plata.
- 2013** **Nano - Hidroxiapatita cristalina: influencia de su topografía en la bioactividad.** NL. D'Elía, AN. Gravina, J. Sartuqui, PV. Messina. IX Reunión Anual de la AACr y I Reunión Latinoamericana de Cristalografía. Córdoba.

Nano-hidroxiapatita para su aplicación en reparación de tejido óseo.

NL. D'Elía, AN. Gravina, JA. Laiuppa, GE. Santillán, PV. Messina. XXX Reunión Anual Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral. Buenos Aires. Resumen publicado en revista: Actualizaciones en osteología: AAOMM.

2012

Síntesis biomimética de hidroxiapatita. NL. D'Elía, A N. Gravina, PV.

Messina. II Reunión Nanocórdoba 2012. Villa Carlos Paz.

