



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO**

**DESARROLLO DE MATERIALES COMPUESTOS DE
POLIMERO BIODEGRADABLE/VIDRIO BIOACTIVO DOPADO
CON Cu y/o Zn PARA SU USO POTENCIAL COMO BIOMATERIAL OSEO**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
MENCIÓN CIENCIA DE LOS MATERIALES**

JULIAN BEJARANO NARVAEZ

**PROFESOR GUÍA:
Dr. HUMBERTO PALZA CORDERO**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
Dr. RAUL QUIJADA ABARCA
Dr. JOSE LUIS ARIAS BAUTISTA
Dr. CRISTIAN COVARRUBIAS GALLARDO
Dr. JORGE RAMOS GREZ**

**SANTIAGO DE CHILE
MARZO DE 2015**

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE: Doctor en Ciencias de la
Ingeniería, Mención Ciencia de los Materiales
POR: Julian Bejarano Narvaez
FECHA: Marzo 13 de 2014
PROFESOR GUÍA: Dr. Humberto Palza Cordero**

**DESARROLLO DE MATERIALES COMPUESTOS DE
POLIMERO BIODEGRADABLE/VIDRIO BIOACTIVO DOPADO
CON Cu y/o Zn PARA SU USO POTENCIAL COMO BIOMATERIAL OSEO**

El desarrollo de biomateriales para regenerar huesos es un gran desafío, debido a que los materiales de ingeniería convencionales no logran replicar exactamente todas las funciones biológicas del tejido natural. Además, los biomateriales usados presentan alto riesgo de generar infecciones debido a biopelículas bacterianas. En este sentido, esta tesis doctoral pretende desarrollar materiales compuestos porosos (scaffolds) de matriz polimérica biodegradable con micropartículas de vidrio bioactivo dopado con iones metálicos terapéuticos y antibacteriales, como una alternativa de gran potencial para reparar tejido óseo.

Se sintetizaron por el proceso sol-gel, vidrios bioactivos ternarios ($60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ %mol, 58S) y cuaternarios ($60\text{SiO}_2\text{-}25\text{CaO-}11\text{Na}_2\text{O-}4\text{P}_2\text{O}_5$ %mol, NaBG) dopados con 1, 5 y 10 %mol de CuO y/o ZnO. Los resultados mostraron que las propiedades de los vidrios dopados dependieron del tipo de ion metálico y su porcentaje de incorporación. En particular, los vidrios mostraron bioactividad por la formación de apatita, sin embargo la incorporación de Cu y Zn disminuyó la bioactividad, con el Zn inhibiendo en mayor magnitud. La liberación de iones dependió del tipo de vidrio bioactivo (58S o NaBG) y para el caso de los iones metálicos, la liberación de Cu^{+2} fue hasta 30 veces mayor a la de Zn^{+2} . La citocompatibilidad de los vidrios a células óseas dependió de la liberación iónica de los vidrios, siendo los vidrios NaBG más citocompatibles que los 58S. A mayor incorporación de Cu y Zn disminuyó la citocompatibilidad de los vidrios. Sin embargo, los vidrios basados en el NaBG dopados con 1%mol de metal fueron bioactivos, citocompatibles y presentaron propiedades antibacteriales, por ello fueron usados como relleno en la fabricación de scaffolds de poli(D,L-láctico), PDLA, por incorporación de 10 y 30% en peso de vidrio usando un proceso de liofilización con lixiviado de partículas de NaCl como porógeno. Los scaffolds preparados presentaron porosidad interconectada de 100-400 μm , adecuada para el crecimiento óseo y vascular. Se logró un incremento hasta del 130% en el módulo de Young de los scaffolds con la incorporación de 10% de vidrio, sin embargo, la resistencia a la compresión no mejoró significativamente. La incorporación de vidrio bioactivo permitió la formación de apatita y moduló la degradación del scaffold de PDLA, evaluada por absorción de agua, pérdida de peso y cambio de pH en el medio. En general, todos los scaffolds presentaron buena citocompatibilidad a células madres. Además, los scaffolds con Cu promovieron mejor la angiogénesis (actividad VEGF) y los scaffolds con Zn la osteogénesis (actividad ALP), mientras que el scaffold con Cu y Zn mostró un efecto sinérgico en ambas propiedades. Estos iones metálicos también le proporcionaron capacidad antibacteriana al scaffold de PDLA, frente a la bacteria *S. aureus*.

En esta investigación se demostró que es posible, mediante la incorporación de iones metálicos, diseñar un biomaterial poroso multifuncional, con degradación adecuada, capacidad antibacteriana, y potencial osteogénico y angiogénico para su uso en regeneración ósea, por ejemplo, en defectos craneofaciales.

DEDICATORIA

*Este trabajo esta dedicado a mis padres **James** y **Alexandra** y a mi hermano **James** por regalarme el mejor estimulo para alcanzar metas, que es el amor incondicional de la familia. A mi novia **Vanessa** por su apoyo y amor. A **Dios** por hacer que mi vida esté llena de cosas maravillosas.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis no hubiese sido posible sin la participación de grandes personas. Entre ellas quiero agradecer especialmente a:

Mi Profesor Guía Dr. Humberto Palza, por acogerme en su grupo desde el inicio de esta etapa y entregarme todas las facilidades y herramientas para llevar a cabo un gran trabajo de investigación. Especialmente, gracias por educarme en la investigación y ayudarme a desarrollar habilidades para hacer mejor las actividades profesionales.

Agradezco a la Comisión Evaluadora: Dr. Raul Quijada, Dr. Jorge Ramos, Dr. Cristian Covarrubias y Dr. Jose Luis Arias, por aportar sus conocimientos y experiencia para lograr un mejor desarrollo de este proyecto.

En este trabajo multidisciplinar quisiera agradecer al personal de varios laboratorios donde desempeñe actividades de esta tesis. Principalmente, a todos los compañeros y Jefe del Laboratorio de Ingeniería de Polímeros, Juan Benavides, por su gran apoyo en la ejecución de varias etapas de esta tesis. Al Grupo del Laboratorio de Terapia Celular del profesor Pablo Caviedes, por su apoyo y facilidades necesarias para las evaluaciones celulares. Al Grupo del Laboratorio de Nanomateriales de los profesores Cristian Covarrubias y Mario Diaz por permitirme preparar los materiales compuestos en sus instalaciones. Al Laboratorio de Hidrometalurgia del profesor Tomas Vargas y Emma Fonseca por facilitarme la preparación de reactivos y la medición de iones. A Cristian Nievas de Geología, Andres Ibañez de Cristalografía y Francisco Diaz de Catálisis de la FCFM, donde realicé algunas caracterizaciones de materiales.

Quisiera agradecer al profesor Aldo Boccaccini de la University of Erlangen-Nuremberg en Alemania por recibirme amablemente en su Instituto para llevar a cabo mi pasantía y aportar con su enorme experiencia al desarrollo de algunos ensayos de gran aporte para esta investigación. También a grandes compañeros de su Grupo de Investigación por su invaluable ayuda.

Mi gran agradecimiento a CONICYT y el Gobierno de Chile por su apoyo económico para llevar a cabo los estudios de doctorado. También al proyecto Fondecyt N° 1110078 del profesor Humberto Palza por el soporte económico aportado a esta tesis.

A mis colegas del Doctorado de Materiales gracias por sus aportes y trabajo colaborativo durante los estudios doctorales. Especialmente a mis amigos Alejandro Vargas, Cristhian Garzon, Tatiana Gomez, Paula Zapata, Katherine Paredes y Gerardo Correa, por su valioso apoyo, consejos y amistad.

Grandes agradecimientos al Grupo de Profesores del Programa de Doctorado de Materiales por los conocimientos y experiencias transmitidas, que fueron de mucho aporte a mi formación como investigador en el área de los materiales.

Quiero agradecer a todo el personal administrativo de los Departamentos de Materiales e Ingeniería Química por sus gestiones y ayuda en diversas actividades.

Finalmente, mis sinceros agradecimientos a todos los amigos en Colombia y Chile por su gran apoyo y estímulo entregado para lograr alcanzar mis metas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
1.1. Motivación	1
CAPITULO 2. FUNDAMENTOS Y ESTADO DEL ARTE	2
2.1. Hueso Humano	2
2.1.1. Macro y microestructura del hueso	2
2.1.2. Formación de hueso (osteogénesis y angiogénesis)	3
2.2. Ingeniería de tejidos y regeneración ósea	4
2.1. Biomateriales óseos	5
2.1.1. Materiales para reparación craneofacial	6
2.2. Vidrios y cerámicos vítreos bioactivos	7
2.2.1. Iones metálicos como agentes dopantes	9
2.3. Polímeros como material óseo	11
2.3.1. Poliésteres biodegradables: poli (D,L-láctido), PDLLA	12
2.4. Materiales compuestos PDLLA/vidrio bioactivo	13
2.4.1. Preparación de los scaffolds compuestos	14
CAPITULO 3. PROPUESTA Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	15
3.1. Hipótesis	15
3.2. Objetivo general	15
3.3. Objetivos específicos	15
CAPITULO 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	17
4.1. Etapa I. Síntesis sol-gel y caracterización de micropartículas de vidrio con incorporación de Cu y/o Zn	17
4.1.1. Síntesis de los vidrios bioactivos	17
4.1.2. Caracterización de los vidrios sintetizados	18
4.1.3. Caracterización de los vidrios usados en los scaffolds	20
4.2. Etapa II. Preparación y caracterización de materiales compuestos porosos PDLLA/vidrio con Cu y/o Zn usando liofilización con lixiviado de NaCl	21

4.2.1.	Fabricación del material compuesto poroso (Scaffold)	21
4.2.2.	Caracterización de la porosidad de los scaffolds	22
4.3.	Etapa III. Evaluación del efecto de la incorporación de las micropartículas de vidrio bioactivo con Cu y/o Zn sobre la bioactividad, degradación y control bacterial <i>in vitro</i> de una matriz porosa de PDLLA	23
4.3.1.	Formación de apatita en SBF	23
4.3.2.	Degradación en PBS	24
4.3.3.	Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los scaffolds	25
4.3.4.	Citocompatibilidad y propiedades osteogénicas	25
4.3.5.	Evaluación antibacterial	28
CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		29
5.1.	Síntesis y caracterización de vidrios bioactivos	29
5.1.1.	Caracterización de textura y microestructura de las partículas sintetizadas	29
5.1.2.	Formación de apatita y disolución en SBF	33
5.1.3.	Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , y cambios de pH en el medio de cultivo	40
5.1.4.	Evaluación de la citocompatibilidad	42
5.1.5.	Vidrio co-dopado con Cu y Zn	43
5.1.6.	Procesamiento y caracterización de los vidrios usados en los scaffolds	45
5.2.	Preparación y caracterización de materiales compuestos porosos PDLLA/vidrio bioactivo con Cu y/o Zn	50
5.2.1.	Porosidad teórica de los scaffolds	52
5.2.2.	Morfología y tamaño de poro	53
5.2.3.	Propiedades a compresión	55
5.3.	Evaluación de la bioactividad, degradación y control bacterial <i>in vitro</i> de los scaffolds	57
5.3.1.	Formación de apatita en SBF	57
5.3.2.	Degradación en PBS	63
5.3.3.	Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los scaffolds en medio de cultivo celular	69
5.3.4.	Citocompatibilidad con células madres	70
5.3.5.	Propiedades osteogénicas y angiogénicas	74
5.3.6.	Capacidad antibacterial	77
CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS		79
6.1.	Conclusiones	79
6.2.	Trabajos futuros	80
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN		81
BIBLIOGRAFÍA		82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las propiedades mecánicas y porosidad del hueso. Tomada de [11] y modificada.	3
Tabla 2. Composición teórica de los vidrios sintetizados por sol-gel.	18
Tabla 3. Composiciones teórica y medida por espectroscopia para los vidrios sintetizados.	30
Tabla 4. Propiedades de las partículas de vidrio sintetizadas.	31
Tabla 5. Propiedades de los vidrios derivados del NaBG usados en los materiales compuestos.	45
Tabla 6. Densidades y porosidad total de los scaffolds.	52
Tabla 7. Propiedades a compresión de los scaffolds.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura microscópica del hueso humano. Tomado de [19] y modificado.....	2
Figura 2. Interacción de elementos usados en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa para generar tejidos e implantes. Tomado de [26], modificado.....	4
Figura 3. Tomografía computarizada de los huesos craneofaciales. Las flechas rojas indican que estos huesos están compuestos por capas externas densas de hueso cortical y una estructura interna porosa como el hueso trabecular.....	6
Figura 4. Estructura del PDLA.....	13
Figura 5. Metodología del proyecto de tesis.....	17
Figura 6. Diagrama del proceso sol-gel para la síntesis de los vidrios bioactivos.....	18
Figura 7. Diagrama del proceso de preparación de los materiales compuestos porosos (scaffolds).....	22
Figura 8. Diagrama esquemático del montaje usado para la inmersión completa de los scaffolds en el SBF para el ensayo de formación de apatita <i>in vitro</i>	24
Figura 9. Imagen SEM de las partículas de vidrio sintetizadas (Vidrio NaBG).....	29
Figura 10. Difractogramas de rayos X de los vidrios 58S (a) y NaBG (b) no dopados y dopados con Cu y Zn. Las fases cristalinas con sus códigos JCPDS fueron etiquetadas de la siguiente forma: (□) CuO (01-089-5899), (■) Ca ₂ SiO ₄ (00-029-0369), (◆) Na ₂ Ca ₄ (PO ₄) ₂ SiO ₄ (32-1053), (●) Na ₂ Ca ₃ Si ₆ O ₁₆ (00-023-0671), (▣) Na ₂ CaSiO ₄ (01-073-1726), (▢) CaSiO ₃ (01-072-2284), (∇) CaCO ₃ (01-085-1108), (°) Cristobalita (SiO ₂ ,01-082-0512).....	32
Figura 11. Estructura propuesta para los vidrios bioactivos sintetizados basados en el sistema cuaternario NaBG. a) Estructura de los vidrios NaBG, b) NaBG dopado con Cu y c) NaBG dopado con Zn.....	33
Figura 12. Formación de apatita después de la inmersión en SBF por 1, 7 y 14 días. a) DRX y b) ATR-FTIR del vidrio 58S, c) DRX y d) ATR-FTIR del vidrio NaBG. Las fases cristalinas en el DRX están etiquetadas como sigue: (▼) HA and (∇) CaCO ₃	34
Figura 13. Imágenes SEM de los vidrios no dopados y dopados con Cu y Zn después de 7 días en SBF. a) 58S, b) NaBG, c) 1Cu-58S, d) 1Cu-NaBG, e) 1Zn-58S and 1Zn-NaBG.....	35
Figura 14. Liberación de Ca y adsorción de P durante la inmersión por 1, 7 y 14 días en SBF. a) liberación de Ca desde los vidrios derivados del 58S, b) liberación de Ca desde los vidrios derivados del NaBG, c) adsorción de P desde los vidrios derivados del 58S y d) adsorción de P desde los vidrios derivados del NaBG.....	36
Figura 15. DRX de los vidrios durante el ensayo de bioactividad <i>in vitro</i> por inmersión en SBF a 7 días. Vidrios derivados del a) 58S y b) NaBG, dopados con Cu. Vidrios derivados del c) 58S y d) NaBG, dopados con Zn.....	37
Figura 16. Esquema resumen de la participación de los iones Cu ⁺² y Zn ⁺² dentro de la estructura del vidrio (Zn preferiblemente formador y Cu modificador del vidrio) y de las principales reacciones superficiales después de SBF, para formar la capa de apatita cristalina con las características propias del tipo de vidrio.....	39
Figura 17. Liberación de iones Cu ⁺² y Zn ⁺² desde los vidrios bioactivos para 1, 3, 7 y 14 días. Liberación de Cu desde los vidrios derivados del a) 58S y b) del NaBG. Liberación de Zn desde los vidrios derivados del c) 58S y d) del NaBG.....	40
Figura 18. Cambios de pH en el medio DMEM/F12 después de la disolución de los vidrios bioactivos. a) Vidrios derivados del 58S y b) vidrios derivados del NaBG. Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=4).....	42

Figura 19. Citocompatibilidad de los vidrios no dopados y los dopados con Cu y Zn. (**) Diferencia significativa estadísticamente entre los grupos experimentales con el control con $p < 0.01$.	43
Figura 20. Propiedades del vidrio co-dopado 1Cu1Zn-NaBG. a) DRX y b) SEM para evaluar formación de HA, c) liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , d) cambio de pH en DMEM (Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=4)) y e) citocompatibilidad del 1Cu1Zn-NaBG comparada con los vidrios NaBG, 1Cu-NaBG y 1Zn-NaBG. * Diferencia significativa estadísticamente entre los grupos experimentales y el control ($p < 0.01$). Las fases cristalinas fueron etiquetadas como sigue: (□) CuO, (■) Ca_2SiO_4 , (▼) HA, (▣) $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, (▢) CaSiO_3 , (▽) CaCO_3 , (°) Cristobalita (SiO_2).	43
Figura 21. DRX de los vidrios derivados del NaBG (<38 μm) después de la inmersión por 1, 3 y 7 días en SBF. a) NaBG, b) 1Cu-NaBG, c) 1Zn-NaBG y d) 1Cu1Zn. Las fases cristalinas fueron etiquetadas como sigue (□) CuO, (■) Ca_2SiO_4 , (▼) HA, (▣) $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, (▽) CaCO_3 , (°) Cristobalita (SiO_2), (◆) SiP_2O_7 .	46
Figura 22. Imágenes SEM de la superficie de los vidrios derivados del NaBG (<38 μm) después de la inmersión por 7 días en SBF. a) NaBG, b) 1Cu-NaBG, c) 1Zn-NaBG (flechas blancas indicando algunas zonas con apatita) y d) 1Cu1Zn-NaBG.	47
Figura 23. Liberación de iones metálicos desde los vidrios derivados del NaBG (<38 μm) en DMEM durante 1, 3, 7 y 14 días. a) Liberación de Cu^{+2} y b) liberación de Zn^{+2} .	48
Figura 24. Cambios de pH en el medio DMEM/F12 después de la disolución de los vidrios bioactivos. Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=4).	48
Figura 25. Citocompatibilidad a células SaOS-2 de los vidrios derivados del NaBG (<38 μm). (**) Diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p < 0.01$). Todas las muestras a los diferentes tiempos de exposición con las células tuvieron diferencia significativa ($p < 0.01$) con el control sin células el cual tuvo 100% de viabilidad (barra no mostrada).	49
Figura 26. Efecto antibacterial de los vidrios derivados del NaBG a 1, 3 y 7 días de exposición a la bacteria <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina. Diferencia significativa entre grupos con (*) $p < 0.05$ y (**) con $p < 0.01$.	50
Figura 27. Imágenes SEM de los scaffolds producidos por liofilización. a) Superficie superior y b) sección transversal de la matriz PDLLA. c) superficie superior y d) sección transversal del scaffold con 30% en peso de vidrio bioactivo NaBG.	51
Figura 28. Fotografía de los scaffolds compuestos preparados por liofilización y lixiviado de NaCl. No se observa un cambio de color significativo por efecto de la incorporación de los vidrios con Cu, conservando un tono casi blanco.	52
Figura 29. Imágenes SEM de la estructura de poro y la incorporación de las partículas de vidrio en los scaffolds fabricados por liofilización con lixiviado de NaCl. Porosidad estratificada en tres zonas (Z1, Z2 y Z3) en la sección transversal de los scaffolds a) PDLLA y c) PDLLA/30-NaBG. Poros pequeños (10-60 μm , señalizados con flechas blancas) interconectando a los poros de mayor tamaño (100-400 μm) en los scaffold b) PDLLA y d) PDLLA/30-NaBG. e) Partículas de vidrio expuestas en la superficie de los poros y f) partículas embebidas en las paredes del material compuesto PDLLA/30-NaBG (señalizadas con flechas blancas con su análisis composicional por EDS).	53
Figura 30. Esquema de una sección de los poros mostrando la distribución de las partículas de vidrio. La imagen 3D de un scaffold fue tomada como referencia de [184] y modificada. Se observan las partículas totalmente embebidas en la matriz en el corte de las paredes de los poros, mientras que otras partículas dejaron expuestas parte de su superficie dentro del volumen de los poros.	55

Figura 31. Curva esfuerzo vs. deformación del ensayo a compresión a los scaffolds con a) 10% y b) 30% de vidrio bioactivo.	56
Figura 32. Evaluación por DRX de la formación de la capa de apatita en la superficie de los scaffolds con NaBG después de la inmersión en SBF por 1, 7, 14 y 28 días. Scaffolds a) PDLLA/10-NaBG y b) PDLLA/30-NaBG. Las fases cristalinas están etiquetadas: (▼) apatita, (∇) CaCO ₃ y (♠) Halita (NaCl).....	58
Figura 33. DRX de los scaffolds compuestos para evaluar la formación de apatita después de la inmersión en SBF por 7 y 28 días. Scaffolds con 10% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Scaffolds con 30% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Las fases cristalinas están etiquetadas como: (▼) apatita, (∇) CaCO ₃ y (♠) NaCl.....	59
Figura 34. Espectros ATR-FTIR de los scaffolds compuestos para evaluar la formación de apatita después de la inmersión en SBF por 7 y 28 días. Scaffolds con 10% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Scaffolds con 30% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF.....	60
Figura 35. Imágenes SEM de la superficie de los scaffolds después de inmersión en SBF por 28 días. a) PDLLA, b) PDLLA/30-NaBG, c) PDLLA/30-1CuBG, d) PDLLA/30-1ZnBG, e) PDLLA/30-1Cu1ZnBG. f) Espectro XEDS representativo de las zonas donde se formó apatita. 61	
Figura 36. Esquema de las etapas de reacción propuestas para los scaffolds compuestos durante la formación de apatita en SBF. La bioactividad es promovida por las partículas de vidrio de alta reactividad.	63
Figura 37. Absorción de PBS registrada por los scaffolds durante, 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio.....	64
Figura 38. Imágenes SEM de la pared de poro de los scaffolds a) PDLLA y b) PDLLA/10-NaBG, después de 60 días en PBS.	65
Figura 39. Pérdida de peso de los scaffolds inmersos en PBS por 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio.....	66
Figura 40. Imágenes SEM de las diferencias en degradación a 60 días en PBS de los vidrios a) NaBG y b) el vidrio dopado 1CuBG embebidos en el scaffold de PDLLA. Las flechas negras indican los vidrios bioactivos y las flechas rojas las interfaces polímero-vidrio.	67
Figura 41. Cambio de pH en el PBS por efecto de la liberación de iones desde los scaffolds. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio bioactivo.....	68
Figura 42. Fotografía de los scaffolds después de la inmersión en PBS por 1, 28, 60 y 120 días.	69
Figura 43. Liberación de iones metálicos desde los scaffolds en medio de cultivo DMEM durante 1, 3, 10 y 21 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio bioactivo.	70
Figura 44. Citocompatibilidad de los scaffolds a células madres ST-2 evaluada por los ensayos a) WST-8 y b) LDH.....	71
Figura 45. Imágenes SEM del scaffold a) PDLLA sin células y la interacción de las células madres ST-2 con los scaffolds b) PDLLA, c) PDLLA/10-NaBG, d) PDLLA/10-1CuBG, e) PDLLA/10-1ZnBG y f) PDLLA/10-1Cu1ZnBG.	73
Figura 46. Imágenes SEM de la interacción de las células madres ST-2 con el scaffold sin vidrio, con 10% y 30% de vidrio. a) PDLLA, b) PDLLA/10-1CuBG y c) PDLLA/30-1CuBG, respectivamente.	74
Figura 47. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de las células madres en contacto con los scaffolds. (**) Diferencia significativa entre los scaffolds con vidrio bioactivo y el scaffold de PDLLA usando un p<0.01.....	75

Figura 48. Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por las células madres en contacto con los scaffolds. (**) Diferencia significativa entre los scaffolds con vidrio bioactivo y el scaffold de PDLLA usando un $p < 0.01$	76
Figura 49. Viabilidad bacteriana después del ensayo de contacto directo de los scaffolds con la bacteria <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina (ATCC33591).	77

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1. Motivación

El hueso es una estructura altamente especializada y rígida que cumple funciones de soporte y protege los órganos vitales.[1] En los huesos se pueden generar defectos cuyas causas incluyen las fracturas por traumas, resección de un tumor, periodontitis y desordenes musculo-esqueléticos.[2] Una de las regiones óseas con mayor demanda por biomateriales óseos es la craneofacial.[3] Aunque existe potencial de auto-reparación ósea en nuestro cuerpo, la regeneración no se daría para defectos mayores a 25 mm, incluso podrían existir problemas en defectos de solo 500 μm . [4] Algunas estadísticas anuales en el mundo muestran que alrededor del 40% de los niños tiene daños en sus huesos antes de los 16 años. Entre 23 y 34 millones de personas sufren traumas por accidentes de tráfico. Alrededor del 25% de las personas mayores de 50 años sufren de fracturas por osteoporosis.[5] Esta demanda clínica de tejido óseo ha estado en constante crecimiento en los últimos años en relación directa al incremento en la población mundial y al aumento en la esperanza de vida.[6, 7] En este contexto, los defectos óseos representan un problema severo de salud global de gran impacto clínico y socioeconómico.[8]

La selección del material ideal para regenerar tejido óseo es un gran reto, debido a que los materiales convencionales no logran replicar exactamente todas las funciones biológicas del tejido a reparar.[9] Además, los biomateriales usados presentan alto riesgo de generar infecciones por bacterias, lo que produce complicaciones para el paciente y costos adicionales.[10] La alternativa más usada para injertos y reparación ósea es la reconstrucción con autoinjertos (tejido del mismo paciente). Sin embargo, la limitación de la cantidad de tejido, mayor tiempo de cirugía, infecciones y la morbilidad en el sitio de extracción ha generado un alto interés en materiales artificiales.[6, 11, 12] Una estrategia muy usada en regeneración ósea es el uso de soportes porosos (scaffold), que replican la porosidad natural del hueso para que el nuevo tejido pueda crecer y generar vascularización. Hoy en día el diseño de biomateriales óseos se enfoca en materiales activos capaces de estimular las funciones celulares. Por consiguiente, el scaffold debe ser multifuncional combinando propiedades osteogénicas (estimular crecimiento óseo), angiogénicas (estimular crecimiento vascular) y antibacteriales.[13]

La fabricación de materiales compuestos de matriz polimérica y vidrio bioactivo representa una alternativa de gran potencial para el desarrollo de biomateriales óseos.[14] De esta forma se proporciona la gran biocompatibilidad que tienen los vidrios bioactivos por su similitud química con el mineral natural del hueso (hidroxiapatita), alta resistencia a compresión y rigidez, junto con la flexibilidad, facilidad de conformación y resistencia a la fractura de los polímeros.[6, 15, 16] Por otro lado, el uso de métodos como el sol-gel permite sintetizar vidrios bioactivos dopados con iones metálicos terapéuticos (propiedades osteogénicas y angiogénicas) y antibacteriales como los del cobre (Cu) y el zinc (Zn).[17] A la fecha no hay estudios que hayan comparado el efecto biológico del Cu y el Zn como agentes dopantes en vidrios, ni su efecto sinérgico en un vidrio co-dopado. Tampoco se han incorporado vidrios sintetizados por sol-gel dopados con estos iones en un scaffold de polímero biodegradable, para proporcionarle bioactividad y características multifuncionales terapéuticas. Es por ello, que surge la motivación de desarrollar scaffolds multifuncionales (osteogénicos, angiogénicos y antibacteriales) por la incorporación de vidrios sol-gel dopados con Cu y/o Zn en un scaffold de poli (D,L-láctido), con el fin de obtener un soporte que permita una regeneración ósea mas efectiva, minimizando costos extras y complicaciones por las infecciones asociadas al implante.

CAPITULO 2. FUNDAMENTOS Y ESTADO DEL ARTE

2.1. Hueso Humano

El hueso es una estructura altamente especializada y rígida que cumple funciones de soporte en el cuerpo. Además protege los órganos vitales, proporciona un ambiente para la médula, participa en el balance ácido-base y actúa como un reservorio de minerales, factores de crecimiento y citosinas. El hueso constantemente sufre modelamiento durante la vida para ayudarlo a adaptar a los cambios en fuerzas biomecánicas, como también remodelamiento para remover el hueso viejo y dañado, y reemplazarlo por uno nuevo y mecánicamente más fuerte que permita preservar la resistencia de la estructura ósea.[1]

2.1.1. Macro y microestructura del hueso

El hueso tiene varios niveles en su organización estructural, los cuales se pueden clasificar en: (1) la macroestructura: hueso cortical (denso) y hueso trabecular (poroso); (2) la microestructura (10-500 μm): sistema Harversiano, osteones y trabéculas; (3) la sub-microestructura (1-10 μm): lamelas; (4) la nanoestructura (desde unos pocos cientos de nanómetro a 1 μm): colágeno fibrilar y mineral embebido; y (5) la sub-nanoestructura (por debajo de unos pocos cientos de nanómetros): estructura molecular de elementos constituyentes, tales como mineral, colágeno, y proteínas orgánicas no colágenas.[18] El hueso trabecular esta compuesto de circonvoluciones de lamelas onduladas e irregulares, por otro lado, la microestructura del hueso cortical esta compuesta de lamelas cilíndricas.[1] La Figura 1 muestra la estructura microscópica del hueso trabecular y cortical.

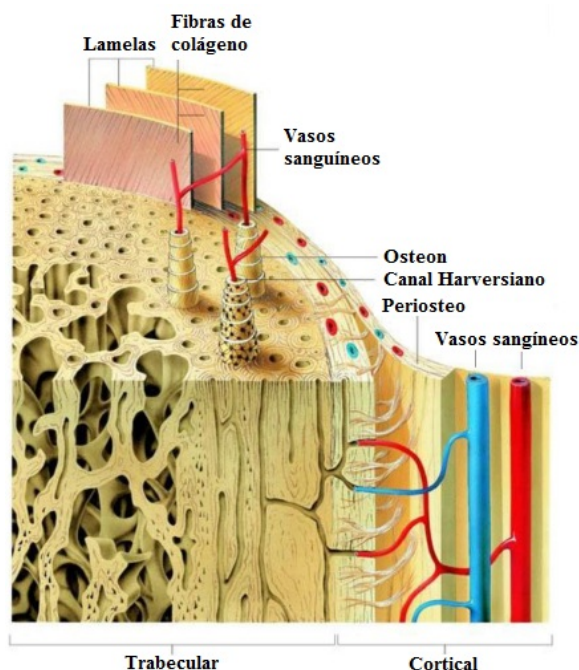


Figura 1. Estructura microscópica del hueso humano. Tomado de [19] y modificado.

El osteon, o sistema Harversiano esta construido de lamelas (fibras de colágeno organizada en planos, 3-7 μm de espesor) formando una estructura cilíndrica de 200-250 μm de diámetro. En el centro de cada osteon hay acanales Harversianos que contienen los vasos

sanguíneos y los nervios. Una sola lamela consiste de fibrillas de colágeno (1 μm) las cuales tienen cristales nanométricos de hidroxapatita (HA) en forma de placas dentro de los espacios discretos entre las fibras de colágeno. Esta HA de fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ es la parte inorgánica del hueso y corresponde al 70% de la composición del hueso, mientras que el otro 30% corresponde a la fase orgánica, de la cual entre el 90-95% es colágeno tipo I y el resto son otro tipo de proteínas (osteopontina, sialoproteína, osteonectina y osteocalcina). La HA es preferiblemente cristalina, aunque se pueden presentar formas amorfas de fosfato de calcio (CaP). Se puede generar recristalización de la HA por mecanismos de intercambio catiónico reemplazando el Ca^{+2} o adsorbiendo nuevos iones en el cristal.[18]

La estructura del hueso es altamente anisotrópica, lo cual resulta en una amplia variación de sus propiedades mecánicas. Es decir, que las propiedades mecánicas van a depender de la porosidad, nivel de mineralización y organización de la matriz sólida. En el hueso trabecular las diferencias en propiedades mecánicas pueden variar en un rango más amplio (factor de 2-5) que en el hueso cortical, dependiendo del origen del hueso. Las propiedades mecánicas y porosidad del hueso humano son mostradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de las propiedades mecánicas y porosidad del hueso. Tomada de [11] y modificada.

Tipo de hueso	Resistencia a compresión (MPa)	Resistencia a flexión (MPa)	Resistencia a tensión (MPa)	Módulo (GPa)	Tenacidad a fractura ($\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$)	Porosidad (%)
Cortical	100-150	135-193	50-151	10-20	2-12	5-10
Trabecular	2-12	10-20	1-5	0.1-5	0.1-0.8	50-90

2.1.2. Formación de hueso (osteogénesis y angiogénesis)

El proceso de formación de hueso es conocido como osificación u osteogénesis. En el desarrollo de nuevo hueso se dan dos tipos de procesos: (1) la osificación intramembranosa que se caracteriza por el establecimiento óseo en el tejido conectivo primitivo a través de la diferenciación de células madres mesenquimales, resultando en la formación de huesos (cráneo, clavícula, mandíbula); y (2) osificación endocondral donde se involucra cartílago como precursor, el cual se convierte en hueso por medio de la degradación del cartílago y deposición de la matriz ósea desde las células osteoblastos (ej: fémur, tibia, humero, radio). Este es el proceso más importante que ocurre durante la curación de las fracturas cuando son tratadas por inmovilización. La osteogénesis involucra tres etapas básicas: (a) síntesis de matriz orgánica extracelular (osteóide), (b) mineralización de la matriz conduciendo a la formación de hueso y (c) remodelamiento del hueso por el proceso de resorción y reformación. En el proceso de remodelamiento participan las células formadoras de hueso (osteoblastos) y las células que resorben hueso (osteoclastos).[1]

Durante la formación del hueso, es necesario la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) para proporcionarle al nuevo tejido óseo los nutrientes y el oxígeno. La neovascularización, incluye dos componentes: i) vasculogénesis, que es formación de capilares desde las células endoteliales no diferenciadas y ii) angiogénesis, corresponde al brote de capilares desde vasos sanguíneos preexistentes. La vascularización tiene un papel importante en el remodelamiento del hueso, ya que actúa como reservorio y conducto para las células óseas, factores de crecimiento y proporciona señales claves en el metabolismo óseo. Por consiguiente, la angiogénesis no solo precede a la osteogénesis, sino también es necesaria para que ocurra. Considerando lo anterior, el éxito de la aplicación clínica de las construcciones óseas diseñadas

depende grandemente de una red vascularizada funcional la cual podría generar el aumento en el metabolismo y formación de hueso. Existen diferentes estrategias para lograr la vascularización en construcciones de tejido óseo tales como: liberación de factores de crecimiento angiogénicos (ej: VEGF, bFGF), microfabricación de vasos sanguíneos, técnicas microquirúrgicas y prevascularización in vitro. Otra posibilidad de gran potencial es la estimulación de la vascularización en los biomateriales, por medio de la inclusión de agentes angiogénicos.[20] Por ejemplo, una aproximación incluye la carga y subsecuente liberación de iones inorgánicos terapéuticos en los materiales para scaffolds. El potencial angiogénico y otras propiedades de los iones terapéuticos serán discutidas en el subcapítulo 2.2.1.

2.2. Ingeniería de tejidos y regeneración ósea

La ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa son dos campos multidisciplinarios complementarios y en expansión que involucran la química, física, ingeniería, biología y ciencias clínicas para desarrollar soluciones a problemas médicos críticos, como la pérdida de tejido o la falla de un órgano. La ingeniería de tejidos puede considerar tres variables principales: i) soportes porosos tridimensionales o scaffolds, ii) células (diferenciadas o no diferenciadas), y iii) agentes bioactivos, es decir, estímulos físicos y/o factores de crecimiento, para crear tejidos funcionales. [21–23] Estos aspectos claves para la formación de nuevo tejido, también han sido considerados en el llamado concepto del diamante donde se considera al scaffold uno de los factores importantes en curación de fracturas óseas.[24] Por otro lado, la medicina regenerativa es un concepto mas amplio que incluye a la ingeniería de tejidos, pero también incorpora la investigación sobre autocuración (el mismo cuerpo usa su sistema para regenerar tejido) asistida por materiales y biomoléculas bioactivas externas. En esta estrategia también se usan tecnologías inyectables, estrategias terapéuticas genéticas, nanomateriales y dispositivos médicos.[25] La Figura 2 muestra un esquema de las estrategias usadas en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

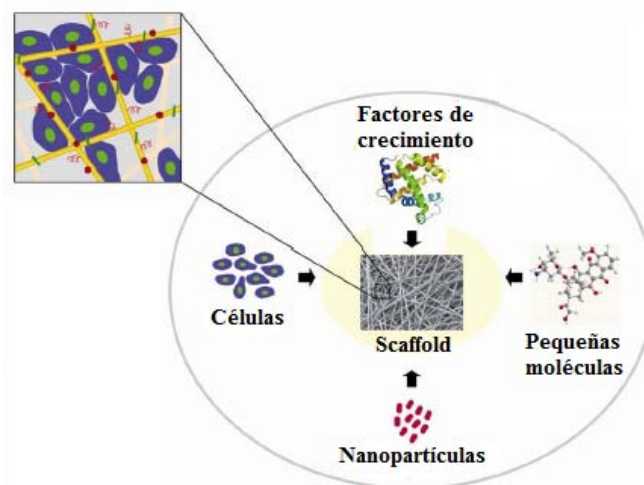


Figura 2. Interacción de elementos usados en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa para generar tejidos e implantes. Tomado de [26], modificado.

La reparación y regeneración de tejido óseo ha sido una de las áreas de mayor interés clínico debido a que los huesos son susceptibles de fracturas como un resultado de resorción fisiológica, daños por traumas, patologías óseas, infección y envejecimiento. Aunque existe potencial de auto-reparación ósea en nuestro cuerpo, la regeneración no se daría para defectos

mayores a 25 mm, incluso podrían existir problemas de auto-regeneración para defectos de solo 500 μm , dependiendo de la ubicación, vascularización y el entorno de esfuerzos mecánicos.

Un factor clave para la reconstrucción del tejido óseo es la selección del material apropiado, donde se han utilizado una gran variedad de materiales naturales y sintéticos entre los que están los autógenos (hueso tomado del propio cuerpo del paciente), aloinjertos (hueso de un donante), xenoinjertos (hueso procedente de animales) y aloplásticos (materiales sintéticos).[14] La alternativa mas usada para injertos y reparación es la reconstrucción con autoinjertos. Sin embargo, la limitación de la cantidad de tejido, mayor tiempo de cirugía, infecciones y la morbilidad en el sitio de extracción ha generado un alto interés en materiales artificiales.[6, 11, 12] Una estrategia muy usada en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa es el uso de materiales para soporte celular con una estructura porosa interconectada 3D, llamada scaffold, que replica la porosidad natural del hueso para que el nuevo tejido pueda crecer dentro de los poros y generar vascularización conforme avanza la degradación del biomaterial.

2.1. Biomateriales óseos

Hoy en día el diseño de biomateriales óseos se enfoca en materiales activos capaces de estimular las funciones celulares en pro de una regeneración más efectiva, sin dejar a un lado otros aspectos claves relacionados con: a) biocompatibilidad (no generar respuestas inflamatorias o citotoxicidad en el sitio de implantación), b) facilidad de esterilización para evitar infecciones, c) facilidad de conformación por el cirujano para defectos irregulares, d) adecuadas propiedades mecánicas, e) biodegradación a una velocidad apropiada para la regeneración del tejido óseo, f) porosidad interconectada que pueda dirigir a la células óseas (osteoblastos) durante su crecimiento y soportar la vascularización.[9] Por consiguiente, el scaffold debe ser multifuncional combinando propiedades osteogénicas, angiogénicas y liberación de agentes terapéuticos (ej: antiinflamatorios).[13]

Otra propiedad de gran interés para los materiales de scaffolds usados en regeneración ósea es la capacidad antibacterial, debido a que las cirugías de reconstrucción o implante óseo tienen asociadas riesgos como las infecciones centradas en el implante generadas por películas bacterianas (ej *S. aureus* y *S. epidermis*).[14, 27, 28] La infección se considera como la más severa y devastadora complicación asociada al uso de biomateriales y puede generar diversas complicaciones de salud, además, también acarrea altos costos extras en tratamientos médicos y quirúrgicos (U.S\$ 36.000 en promedio por caso).[10, 29, 30] A la fecha, no hay una sola estrategia capaz de eliminar totalmente la incidencia de infecciones asociadas al implante. El uso recurrente de antibióticos puede generar riesgos de alergias, toxicidad, y posible resistencia de las bacterias. Sumado a lo anterior, los antibióticos intravenosos es un tratamiento inespecífico e ineficiente debido a la pobre circulación sanguínea del hueso y a la alta resistencia de las biopelículas bacterianas (1000 veces mas resistentes que si estuvieran en suspensión).[29, 31, 32] En los últimos años ha ganado mayor importancia la estrategia de usar materiales que son menos susceptibles o incluso resistentes a infecciones bacterianas. El fin es que estos materiales tengan superficies autodesinfectantes, por medio de la liberación local de agentes antimicrobianos, incluso se esta trabajando en materiales que eliminen infecciones preexistentes.[10] Una alternativa de gran interés es incorporar en los biomateriales iones provenientes de la plata, el cobre, y el zinc quienes tienen alta actividad antibacterial (múltiples mecanismos y amplio espectro),[33, 34] baja toxicidad, bajo costo, estabilidad química y resistencia térmica, lo que los convierte en una alternativa mas favorable comparada con los antibióticos.[35] Con esta alternativa se podría lograr un control eficiente de infecciones y evitar efectos adversos

sistémicos de los antibióticos.[36, 37]

2.1.1. Materiales para reparación craneofacial

Una de las regiones óseas con mayor demanda por biomateriales óseos es la craneofacial.[3] Los huesos de esta región están conformados por capas externas densas de hueso cortical y una estructura interna porosa como la del hueso trabecular (Figura 3). Debido a la estructura de estos huesos y a los requerimientos para los diferentes tipos de defectos, aun no existe un material multifuncional que logre estimular de forma efectiva la regeneración ósea.

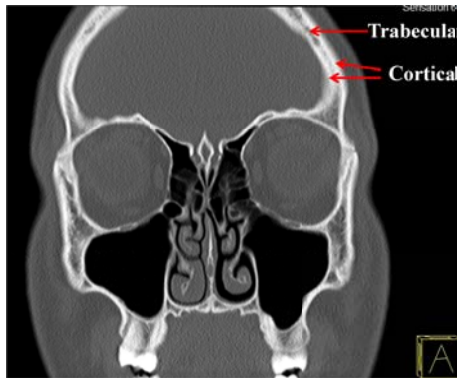


Figura 3. Tomografía computarizada de los huesos craneofaciales. Las flechas rojas indican que estos huesos están compuestos por capas externas densas de hueso cortical y una estructura interna porosa como el hueso trabecular.

Los tipos de materiales que se han usado para reparación craneofacial y en general para varias regiones óseas, son los alogénicos como el hueso desmineralizado proveniente de humanos o animales (ej: Grafton®, Osteotech) y los aloplásticos tales como, las aleaciones de titanio (ej: MatrixORBITAL®) y cobalto (ej: Vitallium®), polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno de alta densidad (HDPE, ej: Medpor®), politetrafluoroetileno (PTFE) expandidos (ej: Gore-Tex®), hidroxiapatita (HA), fosfatos de calcio y poliésteres biodegradables (Lactosorb®). Los implantes alogénicos son bastante usados porque presentan buena biocompatibilidad y osteoinducción, pero se podrían registrar problemas como inmunogenicidad, riesgo de transmisión de enfermedades, resorción variable y no generan soporte estructural para el crecimiento celular.[12, 27, 38, 39] Los implantes aloplásticos pueden ser bioinertes o biodegradables y dentro de sus ventajas están el control de sus propiedades a través de la composición y procesamiento. Sin embargo, los materiales bioinertes pueden generar problemas como toxicidad por corrosión (desgaste), efecto “stress shielding” (osteopenia por el módulo de elasticidad del material es mayor al del hueso), sensibilidad térmica (implantes metálicos), extrusiones, encapsulación fibrosa, mal crecimiento óseo en niños y posibilidad de infección.[4, 27, 39, 40] Con el fin de superar las falencias de los materiales bioinertes, se desarrollaron alternativas biodegradables, que entre las más usadas están las de poliésteres sintéticos, como el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL) y sus copolímeros (ej: PLGA, PDLLA). Aunque los poliésteres sintéticos biodegradables presentan biocompatibilidad, buenas propiedades mecánicas y perfiles de degradación controlables, no poseen la capacidad de inducir patrones de señalización en las células óseas para estimular el crecimiento de tejido (osteoinducción), al igual que los materiales bioinertes.[4] Además, durante su fijación y degradación pueden generar residuos y subproductos ácidos que generan reacciones de cuerpo extraño e inflamaciones.[39]

Materiales de carácter cerámico (biocerámicos) como la HA han tenido un uso extensivo en reparación ósea, presentando característica biodegradable y propiedades osteoconductoras. Sin embargo, presenta baja osteoinducción y ha mostrado algunos casos de infección. Otro cerámico importante son los fosfatos de calcio (ej: β -TCP) quienes presentan mayor bioactividad y resorción, pero puede presentar encapsulación por fibrosis.[39] Por ello, en las últimas décadas han ganado gran atención los vidrios bioactivos (ej: Bioglass®) ya que se ha mostrado la gran capacidad de unión al hueso por su bioactividad, además sus productos de degradación son iones con capacidad de estimular la expresión genética en las células óseas, lo cual explica la más alta velocidad de formación de hueso comparado a otros cerámicos tales como la HA sinterizada.[7, 41] Clínicamente han mostrado resultados satisfactorios en reparación facial.[42] La desventaja de estos materiales cerámicos son la fragilidad, su dificultad para ser conformados en secciones irregulares, dificultad de conformación y posicionamiento por el cirujano, posible extrusión o desplazamiento debido a su rigidez y en defectos grandes generan pobre vascularización.[27, 43] También se comercializan sistemas que combinan las propiedades de los materiales independientes, por ejemplo el HDPE poroso y las mallas de titanio (Medpor® Titan™) y el material compuesto de HDPE con partículas de HA embebidas (HAPEX™).[44]

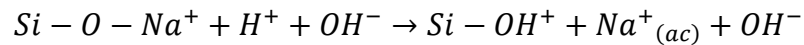
Como fue descrito, en las últimas décadas se ha venido usando un rango de materiales para reparar y regenerar defectos óseos craneofaciales. Estos materiales han sido aprobados por la FDA y tienen años de uso clínico con buenos resultados. Aun así, los materiales de ingeniería tienen falencias que los aleja de ser el material ideal para reparar y regenerar hueso. Con los materiales multifuncionales se quiere desarrollar sistemas que controlen los patrones de señalización celular para estimular la regeneración ósea, a través de la osteogénesis y angiogénesis. Además, de tener otras propiedades importantes como la capacidad antiinflamatoria y antibacteriana.[3] Estas propiedades multifuncionales son el reto que tienen los biomateriales para regeneración ósea y en específico los usados para la reparación craneofacial, sin olvidar los requerimientos a nivel estructural (porosidad), morfológico y mecánico. Es por ello, que el desarrollo de nuevos materiales con propiedades terapéuticas multifuncionales representa una motivación para llevar a cabo esta investigación. Tomando en cuenta que estudios avalan a los materiales compuestos de vidrios bioactivos y polímeros biodegradables como los potenciales candidatos para reunir los requerimientos en reparación y regeneración craneofacial por la versatilidad que se puede tener en sus propiedades,[14] estos materiales serán el objeto de estudio de este trabajo.

2.2. Vidrios y cerámicos vítreos bioactivos

El uso de vidrios bioactivos y cerámicos vítreos en aplicaciones de sustitución, reparación y regeneración de tejido óseo ha ganado gran aceptación a través de los años debido a que una de sus principales ventajas es su alta compatibilidad con los osteoblastos. El vidrio bioactivo tiene una estructura amorfa, mientras que los cerámicos vítreos son vidrios cristalizados, que consisten de una fase cristalina y una fase residual amorfa. El primer vidrio bioactivo fue inventado por L. Hench en la University of Florida en 1969 y a la fecha se comercializa con el nombre de Bioglass® 45S5. Este es un vidrio de silicato biodegradable de composición 46.1SiO₂, 24.4Na₂O, 26.9CaO y 2.6P₂O₅ en %mol y es producido por un proceso en fundido.[15, 45] La bioactividad de los vidrios bioactivos es la habilidad del material para interactuar químicamente con medios biológicos y formar una capa superficial parecida a la HA del hueso. Esta capa es responsable del fuerte enlace entre los vidrios bioactivos y el hueso humano.[7, 46, 47] El desarrollo de esta capa de apatita biológicamente activa cuando el vidrio está inmerso en un fluido corporal simulado (SBF) *in vitro* a menudo se toma como un indicador de bioactividad. Además, ha sido sugerido

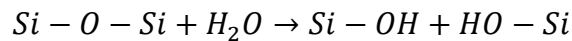
que esta bioactividad *in vitro* es un indicativo del potencial bioactivo de un material *in vivo*. [47] Los detalles de los cambios químicos y estructurales no son completamente claros, la capa de HA carbonatada se cree que se forma en la superficie del vidrio producto de las siguientes reacciones como lo describe Hench. [15, 16]

Etapa 1: se produce una rápida difusión iónica (dependiente de $t^{0.5}$) por intercambio de sodio (Na^+) y calcio (Ca^{+2}) desde el vidrio con los protones de la solución (H^+ o H_3O^+) con el fin de producir silanoles (Si-OH) en la superficie del vidrio.



El pH de la solución aumenta y se produce una región enriquecida de sílice (baja en cationes) cerca de la superficie del vidrio. Los grupos fosfatos también salen del vidrio.

Etapa 2: el alto pH local produce genera un ataque del OH^- a la red de SiO_2 . La sílice soluble se libera a la solución en forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$ y se producen más silanoles en la superficie del vidrio mostrando una dependencia con el tiempo de $t^{1.0}$. Se piensa que esta etapa no es secuencial.



Etapa 3: se produce condensación de los grupos Si-OH en la superficie del vidrio, repolimerizando la capa rica en sílice.

Etapa 4: Los iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} migran a través de la capa enriquecida en sílice y desde la solución, formando una capa amorfa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ sobre la superficie de sílice.

Etapa 5: se incorporan hidroxilos y carbonatos desde la solución y se da la cristalización de la capa de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ para formar apatita carbonatada. También se pueden incorporar otros iones desde la solución o el interior del vidrio a la estructura de la apatita o para formar otras fases cristalinas como fosfatos o silicatos.

La mayoría de la investigación ha sido conducida para los vidrios tradicionales producidos por fusión como el Bioglass® 45S5 y los cerámicos vítreos apatita-wollastonita. Sin embargo, existen varias desventajas de los vidrios convencionales producidos por fusión, por ejemplo, es difícil mantener una alta pureza para una bioactividad óptima debido a las altas temperaturas asociadas con la fusión y homogenización (1300 °C-1400 °C), lo que genera posibles riesgos de contaminación con cationes M^{+3} , M^{+4} y M^{+5} (Al^{+3} puede eliminar completamente la unión al hueso) proveniente de los crisoles u otros materiales durante las etapas de molienda pulido, tamizado, etc. La existencia de alta temperatura, crisoles de platino y múltiples etapas de proceso incrementan considerablemente los costos de producción de vidrios bioactivos por el proceso de fusión. [48]

Como una alternativa al proceso de fusión, el método sol-gel utiliza baja temperatura para la producción de vidrios bioactivos. La síntesis sol-gel básicamente involucra la síntesis de una red inorgánica por mezcla de alcóxidos metálicos (el precursor de silicato típico es el tetraetilortosilicato, TEOS) en solución, seguido por la hidrólisis, gelación y tratamiento a baja temperatura para producir un vidrio. Inherente a este proceso esta la habilidad para modificar la estructura de la red a través de hidrólisis controlada y reacciones de policondensación, de esta forma se puede lograr variaciones estructurales sin modificar la composición. Debido a que los

vidrios pueden ser preparados desde geles por tratamiento a relativamente bajas temperaturas (600 °C-700 °C), la mayoría de las desventajas del procesamiento a alta temperatura pueden ser eliminadas con un control mucho mayor sobre la pureza. Investigaciones de Li, Clark y Hench,[48] han mostrado que la preparación de vidrios bioactivos por el método sol-gel incrementa el rango de composiciones mostrando comportamiento bioactivo. Además, la resorción y la velocidad de formación de HA de vidrios sol-gel como el 58S (60SiO₂-36CaO-4P₂O₅, %mol) es más rápida que la del vidrio por fusión 45S5, lo que es debido a la nanoporosidad e incremento de área superficial específica de los vidrios sol-gel.[16, 49]

El sistema cuaternario como el vidrio 45S5 (SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅) ha sido poco estudiado por el método sol-gel.[50–53] Los sistemas cuaternarios con Na₂O tienden a desarrollar fases cristalinas de silicatos de sodio y calcio, las cuales hacen al vidrio más resistente mecánicamente sin perder la alta biodegradabilidad y bioactividad.[52] Estas características serían interesantes para partículas de vidrio embebidas en una matriz polimérica, aprovechando también la mayor estabilidad del vidrio para una liberación prolongada de iones terapéuticos. De acuerdo a esto, este estudio optó por la síntesis de estos sistemas cuaternarios aprovechando las ventajas del proceso sol-gel, como lo son: bajos costos y bajas temperaturas de obtención, pureza y facilidad de incorporación de otros iones con potencialidad terapéutica y antibacteriana.

2.2.1. Iones metálicos como agentes dopantes

La adición y liberación controlada de iones inorgánicos de calcio (Ca), fósforo (P), silicio (Si), cobre (Cu), zinc (Zn), estroncio, boro, vanadio, cobalto y magnesio está involucrada en el metabolismo del hueso y juega un papel fisiológico en la angiogénesis, crecimiento y mineralización del tejido óseo.[7] En particular, los iones metálicos actúan como cofactores enzimáticos y por consiguiente influyen en los patrones de señalización y estimulan los efectos metabólicos durante la formación del tejido. Esto lo logran porque tienen propiedades únicas (actividad hidrolítica y redox, acidez de Lewis, electrofilicidad, entre otras) que indican la habilidad para interactuar con otros iones que pueden alterar funciones celulares, metabolismo celular o funciones biológicas, por medio del enlace a macromoléculas tales como enzimas y ácidos nucleicos, y activando canales iónicos o señales secundarias. Los iones metálicos son usualmente estables para las condiciones de proceso típicas en la producción de un biomaterial (altas temperaturas, solventes, presiones, radicales libres, entre otros factores que son incompatibles con un fármaco orgánico). Además, los iones metálicos tienen menor costo y potencialmente más seguridad que las proteínas recombinadas o la ingeniería genética.

De los diferentes iones metálicos, podemos destacar los del Cu y el Zn dada su gran importancia biológica ya que son elementos traza necesarios para las funciones celulares del cuerpo humano. Las investigaciones relacionadas con la incorporación de Cu y Zn, están basadas en los efectos biológicos que han mostrado los iones de estos metales, su capacidad antimicrobiana y su importancia en la regeneración ósea.

El Zn en el cuerpo es un elemento traza de gran importancia que juega un papel crítico en varias funciones como por ejemplo la síntesis de ácidos nucleicos (DNA y RNA). El Zn inhibe la diferenciación osteoclástica y juega un papel importante en la formación y mineralización del hueso *in vivo* e *in vitro*. [54–56] Muestra efecto antiinflamatorio y regula la transcripción de los genes de diferenciación osteoblástica, por ejemplo colágeno I, Runx2, fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN). [7, 17, 56, 57] Los resultados sobre la bioactividad celular de los vidrios bioactivos dopados con Zn no son consistentes. Por ejemplo, Oki et al. [58]

encontraron que la incorporación del Zn en el vidrio permite el crecimiento de una capa de HA después de 14 días de inmersión en SBF, aun así, no hubo una conclusión si el Zn afecta o no la bioactividad del material debido a que no se comparó con el vidrio sin dopar. Por el contrario, varios estudios han mostrado que la incorporación de Zn reduce la liberación iónica del vidrio, inhibiendo la formación de la capa de HA sobre su superficie.[59–61] Los análisis de la literatura disponible indica que son necesarios mas estudios específicos sobre la relación entre la microestructura y las propiedades fisicoquímicas de los vidrios bioactivos dopados con Zn con el fin de controlar la cinética de liberación durante la disolución y el desempeño biológico.[7] Adicionalmente, los scaffold de vidrio bioactivo que liberan Zn han sido investigados en relación a sus posibles efectos osteogénicos.[58, 60, 62–65] Ha sido mostrado que los vidrios derivados del sol-gel que contienen Zn generan un aumento en la actividad de la ALP[58] lo que esta relacionado con la formación de hueso, e incrementan la proliferación de osteoblastos,[62] indicando el posible efecto estimulante del Zn-BG sobre las células osteoblastos. Por otro lado, autores como Haimi et al.[60] sugieren que el posible efecto estimulatorio del Zn puede ser inhibido por la disminución en el perfil de degradación del vidrio bioactivo causado por la adición del Zn. Resultados similares fueron obtenidos por Lusvardi et al.[64], quienes encontraron que el dopaje con Zn no proporciona un efecto significativo en la adhesión y proliferación de osteoblastos comparado a vidrios de control no dopados, probablemente debido a la degradación mas lenta del vidrio causada por la adición del Zn resultando en una cantidad despreciable de iones Zn liberados.

El Cu es esencial para la vida humana debido a que esta presente en enzimas de gran importancia para el normal funcionamiento del cuerpo. Es un agente angiogénico estimulando la expresión de factores de crecimiento pro-angiogénico (VEGF) en gran variedad de células, aumenta la angiogénesis *in vivo* y estimula la proliferación de células endoteliales humanas.[56, 66–68] El cobre se ha incorporado en diferentes materiales usados en aplicaciones biomédicas mostrando propiedades antibacteriales, angiogénicas, participación en la deposición de colágeno, actividad celular y proliferación de osteoblastos.[13, 57, 67, 69–79] Estudios han mostrado que la formación de la capa de HA disminuye con el aumento en la incorporación de Cu, al igual que incrementa la durabilidad química y resistencia mecánica de los vidrios. [74, 76] Por otro lado, Ewald et al.[78] y Milkovic et al.[80] han reportado un efecto positivo de los iones Cu^{+2} liberados desde un biocerámico en la actividad y crecimiento de osteoblastos. También se han dopado vidrios con Cu con fines multifuncionales, como lo realizó Wu et al.[13], quienes doparon por sol-gel un vidrio bioactivo logrando aumentar el potencial angiogénico (mayor expresión de VEGF), la osteoestimulación (mayor expresión de ALP, OPN y OCN) y actividad antibacterial. En la fabricación de materiales compuestos, iones Cu^{+2} fueron mezclados con nanopartículas de vidrio bioactivo y una matriz de alginato para promover la angiogénesis.[73] En otro estudio el alginato fue entrecruzado con iones Cu^{+2} para recubrir un scaffold de vidrio bioactivo también con potencial angiogénico.[75]

Además de los efectos mostrados por el Cu y el Zn asociados a la regeneración ósea, también se han reportado importantes propiedades antibacteriales de estos iones que ayudarían a controlar un problema de gran magnitud como lo son las infecciones centradas en el implante.[35, 69, 81–87] El mecanismo potencial de las propiedades antibacteriales podría ser que el Cu sirve como un donador/aceptor de electrones alternando entre los estados redox de los iones Cu^+ y Cu^{2+} . El potencial redox del cobre puede variar sobre un rango de 200-800mV, y este puede producir radicales hidroxilos extremadamente reactivos que pueden participar en un sinnúmero de reacciones nocivas para las moléculas, tales como oxidación de grupos funcionales de proteínas y lípidos (ej: desactivación de enzimas por oxidación del grupo-SH impidiendo la

respiración), degeneración de la membrana celular (cambio estructural y permeación), interacción con ácidos nucleicos previniendo la replicación, y por consiguiente resultando en un potencial efecto antibacterial.[35, 69, 87] El Zn también es un importante metal cuyo ion y óxido han mostrado propiedades antibacteriales.[81–86] Los mecanismos por los cuales tiene potencial antibacterial se explican de igual forma que los mencionados para el caso de los iones del Cu. Biocerámicos (hidroxiapatita, vidrios bioactivos y fosfatos de calcio) con los iones antibacteriales Cu^{+2} y Zn^{+2} , han mostrado resultados satisfactorios en aplicaciones biomédicas.[13, 72, 85, 88–93]

Como fue descrito a lo largo de este capítulo, los vidrios bioactivos presentan un gran potencial para la regeneración de hueso comparados con los otros biocerámicos, además el proceso sol-gel es una alternativa muy atractiva para la fabricación de vidrios bioactivos ya que permite una síntesis de bajo costo y con flexibilidad para producir vidrios dopados con iones terapéuticos y antibacteriales como el Cu^{2+} y el Zn^{2+} . No obstante, hay ciertas dificultades inherentes con el carácter cerámico de los vidrios y cerámicos vítreos para aplicaciones de reparación de tejido óseo, y están relacionadas con pobres desempeños en algunas propiedades mecánicas (baja resistencia a la flexión y a la fractura), y con la dificultad de conformación o moldeo por el cirujano durante la cirugía (relativamente duros).[14, 44] Otro factor que también requiere control en el caso de vidrios bioactivos, es que su disolución puede influenciar significativamente el microambiente biológico local por la liberación de iones, principalmente Na^+ y Ca^{2+} , lo que aumenta el pH y puede generar problemas de citotoxicidad.[47] Estas fallencias que presenta el uso independiente de cerámicos para la regeneración de hueso, hace necesario el desarrollo de materiales compuestos de matriz polimérica.[94]

2.3. Polímeros como material óseo

Los polímeros presentan propiedades atractivas para ser usados como matrices en la preparación de materiales compuestos para reparación de tejidos, por ejemplo su resistencia, rigidez y elongación pueden ser diseñadas según el tipo de tejido a sustituir o reparar, además tienen buena resistencia a la fractura y facilidad de conformación por el cirujano antes de la implantación. Los polímeros son de fácil procesamiento en diferentes formas, bajo costo, fácil esterilización, buena biocompatibilidad y tienen la capacidad de ser producidos en materiales porosos, lo que es benéfico para regenerar tejido óseo.[14, 95]

Desde hace varias décadas se han usado los polímeros inertes o no biodegradables para crear implantes permanentes con propiedades mecánicas similares al hueso (HDPE, nylon y PTFE). Estos materiales bioinertes han funcionado muy bien como implantes que soportan cargas mecánicas durante su uso, aun así al no presentar biodegradabilidad, son susceptibles a complicaciones a largo plazo como migración, desgaste, reacciones de cuerpo extraño e infecciones.[96] Lo anterior hace necesario el uso de alternativas para otorgarle a estos materiales cierto grado de bioactividad (ej: tratamientos superficiales) o usar alternativas biodegradables. Esta última opción tiene baja incidencia de complicaciones (menores costos médicos) a largo plazo porque los materiales se degradan conforme se va dando la regeneración de tejido.

Los polímeros biodegradables y bioresorbibles son una gran alternativa para regenerar hueso en defectos craneofaciales ya que no necesitan soportar altas cargas. Estos están clasificados por dos grupos: los polímeros naturales donde se encuentran los polisacáridos (almidón, alginato, quitosano, ácido hialurónico) y las proteínas (colágeno, fibrina, gelatina,

seda), y el segundo grupo son los polímeros sintéticos donde los más ampliamente usados para reparación ósea son los poliésteres biodegradables.[94]

2.3.1. Poliésteres biodegradables: poli (D,L-láctido), PDLA

Los poliésteres biodegradables comúnmente usados son el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli- ϵ -caprolactona (PCL), isómeros del PLA (PLLA, PDLA y PDLA), y el copolímero de PLA y PGA (PLGA). Estos polímeros sintéticos pertenecen a la familia de los poli- α -hidroxi-ésteres y han sido aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) para un amplio rango de aplicaciones médicas.[97] Presentan ventajas frente a los polímeros naturales como: a) mayores resistencias mecánicas, b) mayor control de absorción y perfiles de degradación, c) mayor sostenimiento de integridad estructural durante la degradación, d) posibilidad de ser termoformados por técnicas convencionales de procesamiento de plásticos para generar diferentes tipos de elementos y e) mayor disponibilidad de materias primas con propiedades físico-químicas controladas.[98] Los poliésteres biodegradables degradan químicamente después de cierto periodo de implantación (varias semanas hasta años) por escisión de cadena hidrolítica o hidrólisis, la cual es mediada simplemente por agua. Cada escisión ocurre por hidrólisis de un enlace éster, la cual crea grupos ácidos carboxílicos que posteriormente son metabolizados por el cuerpo a través del ciclo de Krebs en H₂O y CO₂. [99, 100] que son moléculas básicas del cuerpo humano.⁹⁵ Idealmente, la velocidad de degradación del scaffold debe ser similar con la velocidad de formación de nuevo tejido de tal forma que proporcione una transición moderada de transferencia de carga desde el scaffold al tejido.[101, 102]

De esta familia de poliésteres se destaca el ácido poli (D,L-láctido), PDLA (Figura 4), uno de los termoplásticos biodegradables más usados e investigados para la regeneración de hueso debido a su excelente combinación de propiedades mecánicas, perfil de degradación y biocompatibilidad. Es un polímero racémico (mezcla 50%-50% de dos estereoisómeros) de la familia del PLA y se origina por la quiralidad del carbono α que permite la síntesis de los compuestos enantiómeros: L y D. Debido a la distribución aleatoria de las unidades L y D en la cadena polimérica, el PDLA es un material amorfo con más baja rigidez comparado con el polímero semi-cristalino PLLA. Lo anterior permite que la hidrólisis del PDLA amorfo sea más rápida por la falta de regiones cristalinas llegando a velocidades de degradación más apropiadas para regeneración de hueso (12-16 meses) comparada con la lenta degradación (mayor a 24 meses) del PLLA y la PCL que dificulta la resorción del implante y genera complicaciones a largo plazo.[94] Se ha mostrado que las propiedades mecánicas del PDLA se mantienen al menos en un 70% entre 8-10 semanas, lo que es un tiempo aceptable de estabilidad estructural para regeneración ósea.[103] Estas excelentes características de biocompatibilidad *in vivo* y estabilidad mecánica del PDLA respecto a su desempeño como implante ha hecho que sea un material extensamente investigado para elementos y recubrimientos ortopédicos como también para hacer placas y tornillos usados en reparación craneofacial.[94, 103, 104] Sin embargo, como fue mencionado anteriormente, el PDLA tiene falencias como la generación de productos ácidos durante su degradación (genera cierto grado de inflamación), además no posee características que lo clasifiquen como un material de tercera generación (multifuncional para estimular genéticamente a las células), lo que hace necesario usarlo como matriz para desarrollar un material compuesto. El vidrio bioactivo también podría ejercer una acción de tampón que nivela el pH ácido generado en la degradación del poliéster.[16]

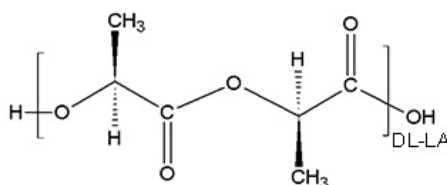


Figura 4. Estructura del PDLLA.

2.4. Materiales compuestos PDLLA/vidrio bioactivo

Varios tipos de biocerámicos se han incorporado en matrices poliméricas con el fin de generar materiales compuestos con propiedades mejoradas que potencien la regeneración de tejido óseo. Entre estos cerámicos se han incorporado principalmente HA,[105] wollastonita,[106] fosfatos de calcio[107] y vidrios bioactivos[108–110]. Con la incorporación de estos biocerámicos en el polímero, se ha logrado proporcionar bioactividad, aumentar propiedades mecánicas, hidrofiliicidad y adsorción de proteínas, y proporcionar propiedades terapéuticas al biomaterial. En los últimos años los vidrios bioactivos han sobresalido frente a los otros biocerámicos para ser usados en la preparación de materiales compuestos, debido a las ventajas mencionadas anteriormente.[111] Dentro de las matrices poliméricas usadas para la incorporación de vidrio bioactivo se tienen el quitosano,[112] poliésteres,[113] poliuretano,[114] alginato,[115] entre otras. La selección de la matriz dependerá de las características del defecto óseo a reparar. De acuerdo a lo descrito anteriormente, el poliéster PDLLA representa una gran alternativa para regeneración de hueso y específicamente apropiado para defectos craneofaciales.

Algunos grupos de investigación han estudiado los compuestos de matriz de PDLLA con partículas biocerámicas usando una incorporación entre 5-50% en peso con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas y estudiar el efecto del refuerzo en la bioactividad y degradación.[116–118] Unos de los mejores scaffolds compuestos basados en termoplásticos han sido fabricados con PDLLA y el vidrio 45S5 Bioglass®.[16, 119] La incorporación de partículas de 45S5 en el PDLLA aumentó la absorción de agua del material compuesto, permitió la formación *in vitro* de HA al sumergir los compuestos en SBF, incrementaron las propiedades mecánicas con el aumento en la cantidad de vidrio siendo cercanas a las del hueso trabecular y disminuyó la velocidad de degradación. Respecto a los resultados celulares, la incorporación de vidrio bioactivo 45S5 en scaffolds de PDLLA aumentó la adhesión, diferenciación y proliferación de osteoblastos, también incrementó el potencial angiogénico comparado al scaffold del polímero solo.[102, 120–126]

Pocos estudios han usado vidrios bioactivos dopados con iones metálicos para ser incorporados en scaffolds poliméricos. Para mejorar la osteoestimulación Ren et al.[127] usó micropartículas de un vidrio bioactivo dopado con Sr y las incorporó en fibras de PCL usando electrohilado, logrando mayor potencial osteogénico por un aumento en la actividad de la ALP. Vulpoi et al.[128] incorporaron vidrio bioactivo dopado con iones de plata en una matriz de poli-96L/4D-lactido conformada en tejido para obtener un material con capacidad antibacterial, logrando un efecto bactericida en las bacterias *E. coli* y *S. epidermis*. Por último, Beherei et al. [71] ha sido el único estudio encontrado en la literatura que sintetizó vidrios bioactivos sol-gel (base 58S) dopados con 10% en peso de Cu y Zn (no co-dopado) y los incorporó en una matriz de quitosano, logrando un aumento en la bioactividad y capacidad antibacterial del material compuesto. A la fecha, no se han registrado investigaciones relacionadas a materiales porosos (scaffolds) de PDLLA con incorporación de vidrios bioactivos dopados con Cu y Zn (incluyendo el vidrio co-dopado) para mejorar la capacidad osteogénica, angiogenica y el control bacterial.

2.4.1. Preparación de los scaffolds compuestos

Para la fabricación los scaffolds compuestos con matriz termoplástica biodegradable como el PDLLA, existen diferentes técnicas, entre ellas el vaciado con solvente y lixiviación de un porógeno, secado por congelación (freeze-drying), expansión en gas a alta temperatura, electrohilado y prototipado rápido.[101, 129] De todas estas técnicas se destaca el vaciado con solvente y secado por congelación (ej: liofilización) por ser económica y generar una estructura altamente porosa (>90%) por extracción del solvente previamente congelado. Los poros generados son alargados en dirección del enfriamiento del solvente lo que podría llevar a deficiencias mecánicas por la anisotropía en propiedades mecánicas[16] (mayor resistencia en la dirección de los poros), además cuando se realizan placas de scaffold, los poros alargados son verticales lo que limita la proliferación celular y vascularización en dirección horizontal (dirección de crecimiento celular en secciones del cráneo o cara). Por ello, es favorable combinarla con una técnica como el lixiviado de porógeno (ej: cristales de NaCl) ya que se pueden lograr poros mas regulares altamente interconectados por poros mas pequeños, lo que generaría un mejor crecimiento celular en la dirección horizontal de la placa. Combinando estas dos técnicas sería posible lograr que la morfología sea mas específica para una aplicación craneofacial, donde las secciones de hueso son placas en forma de sándwich con las capas externas de hueso mas denso y en el centro una estructura porosa, tal como fue mostrado en la tomografía de la Figura 3.

Estudios han preparado scaffolds compuestos de PDLLA usando la técnica de lixiviado de porógeno, logrando alto porcentaje de porosidad (80-95%) y poros de tamaños regulares según los cristales de porógeno usados.[130–133] Otros autores han preparado scaffolds de quitosano combinando las técnicas de liofilización con lixiviado de porógeno para lograr mayor interconectividad y una distribución de poros pequeños obtenidos por la liofilización y otros mas grandes y regulares por el lixiviado del porógeno.[97, 134] En la literatura no fueron encontrados estudios que usen liofilización y lixiviación de cristales de NaCl para obtener scaffolds de PDLLA con vidrio bioactivo.

CAPITULO 3. PROPUESTA Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Existe la necesidad de crear biomateriales con mayor similitud al tejido óseo desde el punto de vista morfológico, estructural y funcional, así mismo, que estos materiales interactúen con el tejido circundante para estimular su crecimiento, controlar infecciones y a la vez ser ocupado posteriormente por nuevo hueso producto de su degradación controlada.

El uso de vidrios bioactivos de forma individual como material para regeneración ósea tiene sus desventajas mecánicas y de conformación, por lo que esta investigación busca contribuir en el desarrollo de nuevos materiales compuestos porosos usando una matriz del polímero biodegradable (PDLA) y micropartículas del vidrio bioactivo dopadas con Cu y/o Zn. A la fecha no hay un estudio que incorpore vidrios bioactivos con iones Cu y/o Zn en una matriz de PDLA porosa con el fin de obtener un biomaterial multifuncional con aplicación potencial como soporte para una regeneración ósea mas efectiva, sin costos extras o complicaciones asociadas a las infecciones centradas en el implante. Es por ello que se plantearon las siguientes hipótesis y objetivos de investigación:

3.1. Hipótesis

Las hipótesis de este proyecto de tesis doctoral se han establecido como supuesto con base en la siguiente pregunta de investigación:

¿Es posible desarrollar un material compuesto polímero biodegradable/vidrio bioactivo adecuado como biomaterial óseo y con capacidad de liberación de iones terapéuticos y antibacteriales?

Para dar respuesta a la pregunta anterior se plantearon las siguientes hipótesis:

- I. La incorporación de iones de Zn y/o Cu en la estructura de vidrios bioactivos por el proceso sol-gel, otorga nuevas funcionalidades biológicas y antibacterianas al vidrio.
- II. La incorporación de micropartículas de vidrios bioactivos dopados con Cu y/o Zn en una matriz porosa de PDLA, genera un material compuesto con mayor bioactividad, desempeño antibacterial y capacidad terapéutica.

3.2. Objetivo general

Sintetizar vidrios bioactivos con Cu y/o Zn y estudiar el efecto de su incorporación en una matriz porosa de poli(D,L-láctido) (PDLA), sobre la bioactividad, degradación, y capacidad antibacterial del material compuesto.

3.3. Objetivos específicos

- i. Sintetizar micropartículas de vidrios bioactivos cuaternarios NaBG ($60\text{SiO}_2\text{-}25\text{CaO-}11\text{Na}_2\text{O-}4\text{P}_2\text{O}_5$, %mol) por sol-gel y evaluar el efecto de la incorporación de iones de Cu y/o Zn (1, 5 y 10%mol de CuO y/o ZnO sustituyendo al CaO) en la formación de apatita por inmersión en SBF, citocompatibilidad y capacidad antibacterial *in vitro*. Comparar las propiedades con el vidrio sol-gel estándar 58S ($60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$, %mol) dopado con los mismos iones metálicos.

- ii.** Desarrollar y caracterizar materiales compuestos porosos por incorporación (10 y 30% en peso) de micropartículas de vidrio bioactivo con Cu y/o Zn en una matriz de PDLLA, usando el proceso de liofilización combinado con lixiviado de cristales de NaCl para obtener placas orientadas a reparación craneofacial.
- iii.** Evaluar el efecto de la incorporación de las micropartículas de vidrio bioactivo con Cu y/o Zn sobre la bioactividad (formación de apatita en SBF, propiedades osteogénicas y angiogénicas), degradación y control bacterial *in vitro* de una matriz porosa de PDLLA.

CAPITULO 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se muestra la metodología aplicada para el desarrollo de la investigación, así como también los detalles experimentales de los diferentes procedimientos y técnicas empleadas. La Figura 5 muestra la metodología abordada para el desarrollo de la presente tesis doctoral.



Figura 5. Metodología del proyecto de tesis.

4.1. Etapa I. Síntesis sol-gel y caracterización de micropartículas de vidrio con incorporación de Cu y/o Zn

En esta etapa se utilizó el método sol-gel para preparar micropartículas de vidrio bioactivo 58S y NaBG con incorporación de Cu y/o Zn. Se estudió el efecto de estos iones en la bioactividad en fluido corporal simulado (SBF) y citocompatibilidad *in vitro*. Posteriormente se seleccionó los vidrios con mejor comportamiento para ser utilizados en la preparación de los materiales compuestos porosos (scaffolds). Estos vidrios se disminuyeron de tamaño y se caracterizaron de nuevo en su bioactividad y citocompatibilidad. Además, se caracterizó su capacidad antibacterial. La síntesis de los vidrios bioactivos se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros y la caracterización de los materiales fue llevada a cabo con apoyo de otros laboratorios de la FCFM de la Universidad de Chile.

4.1.1. Síntesis de los vidrios bioactivos

En esta etapa se utilizó la síntesis sol-gel para preparar micropartículas de vidrio bioactivo NaBG con incorporación de Cu y/o Zn. También se prepararon micropartículas del vidrio 58S dopadas con los mismos iones metálicos por motivos de comparación entre una matriz ternaria (58S) y otra cuaternaria (NaGB). La Tabla 2 muestra los códigos de las muestras y las composiciones de los vidrios no dopados y los dopados. Los vidrios fueron sintetizados por el proceso sol-gel basado en reacciones de hidrólisis y policondensación de cantidades estequiométricas de tetraetilortosilicato (TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$; Aldrich, 98%), trietilfosfato (TEP, $\text{OP}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$; Aldrich, 99.8%), nitrato de sodio (NaNO_3 ; Riedel-de Häen, 99.5%), nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Merck, 99%) para los vidrios no dopados y para los vidrios dopados con metal se usó nitrato de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; Merck, 99.5%) y/o nitrato de zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Merck, 98.5%). En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo de la fabricación por sol-gel de los vidrios bioactivos. Primero se realizó la hidrólisis del TEOS y el TEP que fue catalizada con una solución de 0.1M de HNO_3 usando la relación molar

$(\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O})/(\text{TEOS}+\text{TEP})=8$. El sol fue obtenido con la hidrólisis del TEOS y seguido por la adición secuencial (de acuerdo a la composición específica de cada vidrio según la Tabla 2) de los otros reactivos dejando intervalos de 45 minutos y manteniendo la mezcla de reacción bajo agitación constante. Cuando se adicionó el último reactivo se dejó agitando por 60 minutos más. Posteriormente se realizaron secados a 60 °C y 130 °C durante tres y dos días respectivamente, para que los soles terminen de gelar y eliminar la mayor cantidad de agua. Los trozos de gel seco se trituraron en un molino analítico y se estabilizó la estructura con un tratamiento térmico a 700 °C por 3 horas. Por último, los vidrios se molieron en un mortero ágata hasta la granulometría deseada (menor a 75 μm para caracterización y menor a 38 μm para preparar los materiales compuestos).

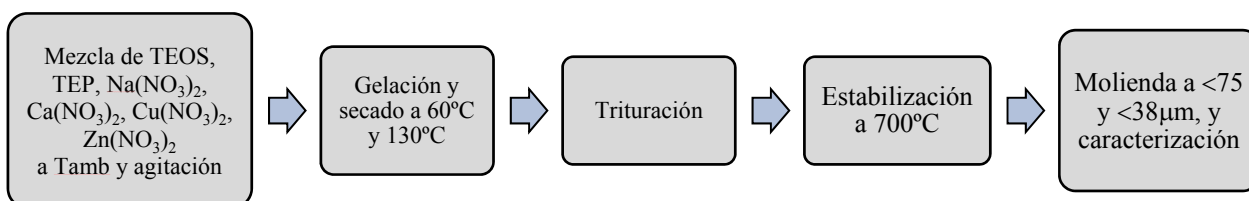


Figura 6. Diagrama del proceso sol-gel para la síntesis de los vidrios bioactivos.

Tabla 2. Composición teórica de los vidrios sintetizados por sol-gel.

Código del vidrio	Composición del vidrio (%mol)					
Vidrios base ternario	SiO₂	CaO	Na₂O	P₂O₅	CuO	ZnO
58S	60	36	**	4	**	**
1Cu-58S	60	35	**	4	1	**
5Cu-58S	60	31	**	4	5	**
10Cu-58S	60	26	**	4	10	**
1Zn-58S	60	35	**	4	**	1
5Zn-58S	60	31	**	4	**	5
10Zn-58S	60	26	**	4	**	10
Vidrios base cuaternario						
NaBG	60	25	11	4	**	**
1Cu-NaBG	60	24	11	4	1	**
5Cu-NaBG	60	20	11	4	5	**
10Cu-NaBG	60	15	11	4	10	**
1Zn-NaBG	60	24	11	4	**	1
5Zn-NaBG	60	20	11	4	**	5
10Zn-NaBG	60	15	11	4	**	10
1Cu1Zn-NaBG	60	23	11	4	1	1

** El vidrio no contiene este óxido en su composición

4.1.2. Caracterización de los vidrios sintetizados

Se caracterizaron los 14 vidrios sintetizados de tamaño de partícula menor a 75 μm (partículas que pasan el tamiz N° 200). Con base en los resultados fueron seleccionados los vidrios con mejor bioactividad y citocompatibilidad para ser usados como segunda fase en la preparación

de los materiales compuestos porosos.

4.1.2.1. Caracterización de las micropartículas

Se evaluó el tamaño de partícula promedio y la distribución de tamaños de los polvos sol-gel por análisis de difracción laser, usando un granulómetro Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, USA). Las propiedades de textura como el área de superficie específica, volumen y tamaño de poro fueron medidos por adsorción de nitrógeno en un sorptómetro Micrometrics ASAP 2010 a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando los métodos BET y BJH. Las muestras fueron pretratadas a $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ en vacío por 2 horas. La estructura y fases presentes en los vidrios fueron determinadas por difracción de rayos X (DRX) usando un difractómetro Bruker modelo D8 Advance con un detector lineal LynxEye, radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5418\text{ \AA}$), sistema de filtro de níquel y rejilla variable. El difractómetro fue operado a 40 kV y 30 mA con un rango 2θ de $20\text{-}50^{\circ}$ usando un barrido acoplado con un tamaño de paso de $0.02^{\circ}/\text{s}$.

4.1.2.2. Formación de apatita y disolución en SBF

La formación de apatita y disolución *in vitro* de las partículas de vidrio fueron evaluadas por inmersión en una solución de fluido corporal simulado (SBF) tal como la desarrollada por Kokubo et al.[135]. Se usó una relación de masa de muestra (partículas de vidrio) a volumen de SBF de 0.01 g/mL y la inmersión se realizó en tubos Falcon® de 50 mL . Durante el ensayo las muestras permanecieron en contacto con el SBF por periodos de 1, 7 y 14 días, a temperatura constante de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego las muestras fueron removidas de los tubos y lavadas con acetona. Finalmente, los polvos secos fueron caracterizados para evaluar la formación de una capa de fosfato de calcio (CaP) tipo apatita sobre su superficie, usando DRX, espectroscopia de infrarrojo con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR, Agilent Technologies modelo Cary 630) en el rango $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ (los resultados son mostrados en el rango de $1300\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ donde se encuentran las señales relevantes para el análisis), microscopia electrónica de barrido (SEM) con espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (XEDS) (FEI modelo Quanta 250). Las muestras usadas para el análisis SEM fueron cubiertas con una capa de oro durante 60 s y con una corriente de 30 mA . Se midieron las concentraciones de iones de calcio (Ca) y fósforo (P) en el SBF después de cada tiempo de inmersión con el fin de relacionarlos con la formación de la capa de apatita. Las mediciones de los iones Ca^{+2} se realizaron por espectroscopia de absorción atómica (AAS) en un espectrofotómetro Perkin Elmer 1100B. El fósforo total fue medido usando colorimetría con una solución de vanadato-molibdato y midiendo la absorbancia a 400 nm . Todos los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (SD) para un $n=3$.

4.1.2.3. Liberación de iones Cu^{+2} and Zn^{+2} y cambios de pH en medio de cultivo celular

La liberación de iones Cu^{+2} and Zn^{+2} fue evaluada por inmersión de los vidrios bioactivos en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12, Gibco® by life technologies). Esta liberación iónica fue evaluada en medio de cultivo celular con el fin de relacionar las concentraciones de los iones metálicos con la citocompatibilidad evaluada en el mismo medio y a la misma relación masa de vidrio a volumen de medio. El procedimiento se basó en la inmersión de las partículas de vidrio en DMEM/F12 durante 1, 3, 7 y 14 días con una relación de 0.01 g/mL , bajo constante agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Zhigheng, model 100B) y temperatura de 37°C . Las concentraciones de los iones metálicos en el medio de cultivo fueron medidas usando AAS. También fue medido el cambio de pH en el SBF generado

por la liberación iónica usando un pH metro (Jenco Electronics Ltda, model 1671). Los resultados se expresaron como la media \pm SD para un n=3.

4.1.2.4. *Citocompatibilidad in vitro*

La citotoxicidad de los vidrios bioactivos fue evaluada con el ensayo del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) (USB Corporation, USA). Este método es basado una medida espectrofotométrica de la actividad mitocondrial en las células vivas, las cuales son capaces de reducir las sales de tetrazolium en derivados de formazán (coloreados) y la lectura de absorbancia es proporcional al número de células viables (viabilidad). El procedimiento empezó con la esterilización de los vidrios bioactivos con autoclave y radiación UV durante 30 minutos. Estos polvos de vidrio se depositaron en los pocillos de una placa de cultivo (96 pocillos) con una relación masa de vidrio a volumen de medio de cultivo de 0.01 g/mL. El cultivo de la línea celular de osteosarcoma humano SaOS-2 se realizó en un medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS), gentamicina (40 mg/ml) y 1 μ l de ketoconazol (5 mg/ml de PBS)/ml de medio, y se adiciona 150 μ l de medio con una densidad celular de 5×10^3 células por pocillo. Después de 24 horas de cultivo en un incubador a 37 °C y atmosfera de 5%CO₂ en 95% de aire, se removió el medio celular anterior de cada pocillo y se lavó con una solución buffer de fosfato (PBS). Luego se adicionaron 100 μ L de solución de MTT (80 μ L de polvo de MTT/ml de DMEM/F12 sin FBS) y se incubaron las placas por tres horas. Después de este periodo de incubación se removió el medio con MTT y se adicionaron 200 μ L de alcohol isopropílico a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. Finalmente se midió la densidad óptica de la solución a 540 nm en un lector de microplacas (Titerket® Multiskan® MCC/340, MKII) y se calculó la viabilidad celular. El ensayo MTT para cada muestra de vidrio bioactivo fue realizado con un n=6 y con tres experimentos independientes para garantizar reproducibilidad de los datos. Las células cultivadas en el medio DMEM/F12 sin vidrio actuaron como un control. La significancia estadística fue determinada usando ANOVA y la prueba de contraste Tukey para comparaciones entre grupos. Se usaron valores de significancia de p<0.05 y p<0.01.

4.1.3. **Caracterización de los vidrios usados en los scaffolds**

En la etapa anterior se seleccionaron los vidrios con mejor bioactividad y citocompatibilidad. A partir de ello, se decidió sintetizar un vidrio co-dopado con Cu y Zn para evaluar si existe efecto sinérgico en las propiedades del vidrio con los dos iones metálicos incorporados al mismo porcentaje. El procedimiento que se siguió para la síntesis fue el mismo descrito en el subcapítulo 3.1.1. adicionando primero la sal de cobre y finalmente la sal de zinc. Todas las micropartículas fueron disminuidas en tamaño con molienda manual usando un mortero de ágata hasta tamaños menores a 38 μ m (partículas que pasan el tamiz N° 400) para mejorar la interacción con las paredes de los poros del scaffold.

4.1.3.1. *Tamaño de partícula, textura y microestructura*

Estas propiedades se evaluaron usando los equipos y siguiendo los mismos procedimientos descritos en el subcapítulo 3.1.2.1. Adicionalmente fueron calculadas las densidades de las partículas de vidrio por picnometría.

4.1.3.2. Formación de apatita y disolución en SBF

La bioactividad y disolución *in vitro* de las partículas de vidrio fueron evaluadas por inmersión en SBF siguiendo los mismos procedimientos usados en el subcapítulo 4.1.2.2. Sin embargo, en este caso los tiempos de inmersión fueron de 1, 3 y 7 días debido a que los vidrios seleccionados para el material compuesto mostraron bioactividad a tiempos tempranos lo que no genera la necesidad de evaluar a tiempos prolongados.

4.1.3.3. Liberación de iones Cu^{+2} and Zn^{+2} y cambios de pH en medio de cultivo celular

La liberación de iones Cu^{+2} and Zn^{+2} fue evaluada siguiendo el mismo procedimiento descrito en el subcapítulo 3.1.2.3.

4.1.3.4. Citocompatibilidad *in vitro*

La citocompatibilidad de los vidrios bioactivos fue evaluada usando el ensayo MTT descrito en 3.1.2.4. En este caso se evaluó la viabilidad celular a 1, 3 y 7 días para conocer el efecto de una mayor liberación iónica.

4.1.3.5. Evaluación antibacterial

La capacidad antibacterial de los vidrios bioactivos se evaluó por un método de contacto directo con una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina ATCC 33591 y el ensayo fue ejecutado por la empresa Corbio-Q, Chile con protocolo desarrollado en esta investigación. El procedimiento inició con la siembra de las bacterias en agar sangre y se incubaron a 37 °C por 24 horas. A partir de este cultivo se realizó un inóculo de 3 mL de agar Müeller-Hinton, el cual se incubó hasta alcanzar una densidad óptica equivalente a $3.5-4.9 \times 10^4$ bacterias/mL. Posteriormente se mezcló 20 mg del material a analizar con 2 mL de medio de cultivo que contiene la cepa bacteriana y se dejó incubar a 4 °C durante 1, 3 y 7 días. Para cada tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 10 μL de la mezcla y se realizó una dilución seriada, las que se depositaron en una placa de Petri con agar Müeller-Hinton y se incubó a 37 °C durante 12 horas. Por último se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) para determinar la viabilidad de las bacterias luego de ser expuestas a los vidrios. Como control se repitió el procedimiento empleando 2 mL de medio con bacterias sin vidrio.

4.2. Etapa II. Preparación y caracterización de materiales compuestos porosos PDLA/vidrio con Cu y/o Zn usando liofilización con lixiviado de NaCl.

En esta etapa se incorporaron 10 y 30% en peso de micropartículas del vidrio con Cu y/o Zn en una matriz de polímero PDLA poroso y se evaluaron las características de la porosidad y propiedades mecánicas.

4.2.1. Fabricación del material compuesto poroso (Scaffold)

Los scaffolds fueron preparados en el Laboratorio de Nanomateriales de la Facultad de Odontología y caracterizados en el Laboratorio de Ingeniería de Polímeros de la FCFM de la Universidad de Chile. El procedimiento seguido para la fabricación de los scaffolds de PDLA/vidrio bioactivo se muestra en la Figura 7. Se realizó una prueba haciendo solamente liofilización para establecer el efecto de los cristales de NaCl sobre la estructura de poro. Como

matriz de los scaffolds se usó un poli(D,L-lactido) (PDLLA) racémico con viscosidad inherente de 2.0 dL/g, $M_w=406.000$ g/mol, amorfo y densidad 1.26 g/cm³, comercialmente disponible como Purasorb® PDL 20 de la compañía Purac Biochem (Gorinchem, Netherlands). El procedimiento comienza con la disolución del polímero en el solvente dimetil carbonato (DMC) a una concentración de 8% peso de polímero/volumen DMC durante 2 horas bajo agitación magnética. Luego se adicionaron las micropartículas de vidrio (10 y 30% en peso), se agitó la mezcla por 30 minutos y luego 15 minutos en ultrasonido para dispersar bien las partículas de vidrio en la solución de polímero. Posteriormente se adicionaron partículas de NaCl (tamaños entre 100 μ m y 400 μ m) en una relación de 9:1 de masa de sal a masa de polímero y se agitó por 30 minutos mas para que se homogenice la mezcla. Antes de congelar, la mezcla fue vaciada en moldes de teflón (generan scaffolds de 150 mm de diámetro y 4.5 mm de espesor). Las muestras estuvieron a -80 °C durante 3 horas y posteriormente fueron liofilizadas durante 24 horas. Después de extraer el solvente DMC en la liofilización, los scaffolds se dejaron en agua desionizada durante dos días (cambiándola dos veces en el día) para lixiviar los cristales de sal de la estructura porosa. Por último, los scaffolds fueron secados a 30 °C con vacío durante 3 días.

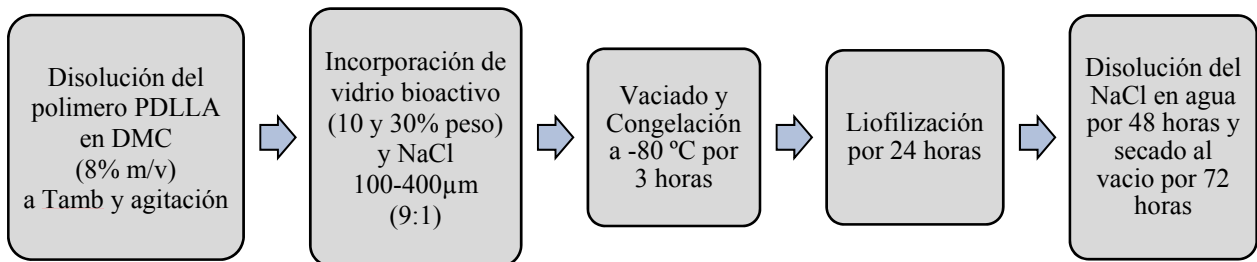


Figura 7. Diagrama del proceso de preparación de los materiales compuestos porosos (scaffolds).

4.2.2. Caracterización de la porosidad de los scaffolds

Los scaffolds fueron cortados en secciones prismáticas de 10 x 10 x 4.5 mm con un hilo caliente para su caracterización.

4.2.2.1. Porosidad teórica de los scaffolds

Se midieron la altura, el ancho y la profundidad en diferentes puntos de las muestras de scaffold (n=9 por cada sistema de scaffold) para calcular el volumen de la espuma y luego se pesaron para calcular la densidad aparente. Para calcular la densidad del material compuesto no poroso se usaron las densidades de los vidrios calculadas por picnometría (ρ_g) y la densidad del PDLLA reportada por el fabricante ($\rho_p=1.26$ g/cm³). El cálculo fue realizado con la regla de mezclas para los materiales compuestos basada en las fracciones de las fases, siendo X_g la fracción en peso del vidrio y X_p la del polímero, como sigue:

$$\rho_0 = \frac{X_g}{\rho_g} + \frac{X_p}{\rho_p}$$

Para calcular la porosidad teórica P de los scaffolds se usó la siguiente ecuación:

$$P = 1 - \frac{\rho}{\rho_0}$$

donde ρ es la densidad aparente del scaffold y ρ_0 es la densidad del material compuesto no poroso.

4.2.2.2. Morfología y tamaño de poro

Para evaluar el tamaño y morfología de poro de los scaffolds se usó el SEM. Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro por 60 s y una corriente de 30 mA antes de observar en el microscopio. El microscopio fue operado con un voltaje de aceleración entre 20-25 kV.

4.2.2.3. Propiedades a compresión

Se evaluaron las propiedades a compresión de los scaffolds en el Institute of Biomaterials MATBIO de la University of Erlangen-Nuremberg, Alemania. Fue usado un equipo Zwick Z050 con una celda de carga de 1 kN a una velocidad del cabezal de 1 mm/min hasta un 60% de deformación. Los datos de carga y extensión fueron procesados para graficar las curvas de esfuerzo (σ) vs. deformación (ϵ) usando las dimensiones iniciales de la muestra de 10 x 10 x 4.5 mm. De la primera parte de la curva (comportamiento preferiblemente elástico y lineal) se calculó el módulo de elasticidad a compresión como la pendiente de la zona elástica. La resistencia a la compresión de los scaffolds se evaluó para un 10% de deformación como punto de comparación debido a que todos los scaffolds no mostraron un límite de fluencia claro. La forma prismática del espécimen y el tratamiento de los datos son acordes a lo descrito en la norma ISO 844:2004 o su equivalente ASTM D1621:2000.[136, 137] Todos los resultados fueron expresados como la media \pm SD de 5 muestras (n=5).

4.3. Etapa III. Evaluación del efecto de la incorporación de las micropartículas de vidrio bioactivo con Cu y/o Zn sobre la bioactividad, degradación y control bacterial *in vitro* de una matriz porosa de PDLA.

Se evaluó el efecto de la incorporación de micropartículas de vidrio bioactivo dopado con Cu y/o Zn sobre la bioactividad, degradación y control bacterial *in vitro* de la matriz polimérica porosa de PDLA. Esta caracterización fue realizada en el Institute of Biomaterials MATBIO de la University of Erlangen-Nuremberg, Alemania.

4.3.1. Formación de apatita en SBF

La formación de apatita *in vitro* de los scaffolds fue evaluada por inmersión en SBF tal como se hizo para los vidrios bioactivos. Sin embargo, en este caso se sumergió una sección de scaffold de 10 x 10 x 4.5 mm en 35 mL de SBF, es decir una relación aproximada de 0.001 g/mL. Para realizar la inmersión y evitar que el scaffold flotara en la solución, fue necesario infiltrar el SBF en los poros usando un montaje como el mostrado en la Figura 8 y realizando vacío durante 10 minutos para lograr sacar el aire atrapado y permitir el ingreso del SBF a los poros. Durante el ensayo las muestras permanecieron en contacto con el SBF por periodos de 1, 7, 14 y 28 días, bajo agitación de 120 rpm y a temperatura constante de 37 °C. Para los periodos de inmersión de 14 y 28 días, el SBF fue cambiado cada 7 días para mantener la concentración de iones en el medio y favorecer las reacciones superficiales. En cada tiempo de ensayo las muestras fueron removidas de los tubos y lavadas con abundante agua destilada. Finalmente, los scaffolds fueron secados a 30 °C con vacío (Vacutherm, VT6060, Thermo Scientific) durante 24 horas. Los scaffolds secos fueron caracterizados para evaluar la formación de una capa de apatita sobre su superficie usando DRX, ATR-FTIR (Nicolet 6700, Thermo Scientific Germany) en el rango

4000-400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , y SEM con XEDS. Las muestras usadas para el análisis SEM fueron cubiertas con una capa de oro.

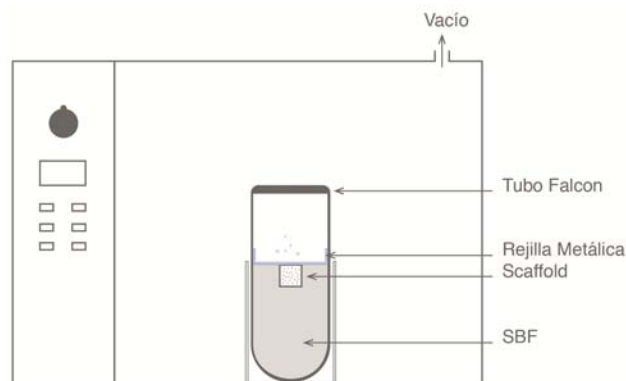


Figura 8. Diagrama esquemático del montaje usado para la inmersión completa de los scaffolds en el SBF para el ensayo de formación de apatita *in vitro*.

4.3.2. Degradación en PBS

Para el estudio de degradación *in vitro* fue usada una solución de tampón fosfato salino (PBS). Se realizó el mismo procedimiento de infiltración de la solución en los poros que el realizado en el subcapítulo 3.3.1., usando en este caso una sección de scaffold de 10 x 10 x 4.5 mm sumergido en 10 mL de PBS. Las muestras fueron mantenidas en inmersión durante 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días en un incubador a 37 °C con agitación tangencial de 120 rpm. A continuación se describen las mediciones realizadas para evaluar el comportamiento de la degradación de los diferentes sistemas de scaffolds.

4.3.2.1. Absorción de agua y cambio de peso

El análisis gravimétrico para determinar la absorción de agua y pérdida de peso durante la degradación empieza con el registro del peso inicial W_i de las muestras de scaffold antes de la inmersión en PBS. A los respectivos periodos de inmersión, las muestras fueron extraídas de la solución y colocadas sobre un paño de papel Kimberly Clark® ligeramente humedecido para quitarle el exceso de agua de la superficie. Posteriormente fue registrado el peso húmedo de las muestras W_w . Luego las muestras fueron colocadas a secar a 30 °C con vacío durante 24 horas y se registró el peso seco W_d . El porcentaje de absorción de agua (WA) fue calculado con la siguiente ecuación:

$$WA = \frac{W_w - W_i}{W_i} * 100$$

Por otro lado, la pérdida en peso (WL) fue calculada como sigue:

$$WL = \frac{W_i - W_d}{W_i} * 100$$

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm SD para muestras en triplicado (n=3).

4.3.2.2. *Cambio de pH*

Se midió el pH en cada tiempo de inmersión para evaluar la variación desde el pH=7.4 del PBS, producto de la degradación del scaffold. Todos los resultados fueron expresados como la media \pm SD para muestras en triplicado (n=3).

4.3.3. **Liberación de iones Cu⁺² y Zn⁺² desde los scaffolds**

La evaluación de la liberación de iones Cu⁺² y Zn⁺² fue realizada en medio de cultivo DMEM, el cual fue el mismo medio usado para el cultivo de las células madres en los ensayos de citocompatibilidad. Cada sección de scaffold fue infiltrada con el medio de cultivo colocándola en un tubo Falcon® y centrifugando a 4000 rpm por 10 minutos. Posteriormente cada sección fue colocada en pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos y sumergida en 1 mL de medio, tal como fue realizado para el ensayo con las células madres. Los tiempos de evaluación para la liberación de iones metálicos fueron 1, 3, 10 y 21 días. Para cada tiempo se extrajo el extracto iónico y se analizó la concentración de Cu y Zn por ICP-OES (Perkin Elmer, Optima 7300V). Los resultados fueron expresados como la media \pm SD para muestras en triplicado (n=3). Con esta evaluación se pretende determinar el perfil de liberación de estos iones en un medio biológico y relacionar la concentración de iones liberados con el comportamiento del material frente a las células y bacterias.

4.3.4. **Citocompatibilidad y propiedades osteogénicas**

4.3.4.1. *Cultivo de las células madres en los scaffolds*

Se usó la línea celular estromal ST-2 aislada de la medula ósea de un ratón BC8 (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivo Celular, Braunschweig). Las células fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies) suplementado con 10%vol. de suero bovino fetal (Sigma–Aldrich), 1%vol. de penicilina/estreptomicina como antibióticos y 1%vol. de GlutaMAX™ (Gibco®, Life Technologies). Para la estimulación osteogénica, el medio fue suplementado con 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma–Aldrich), 10 nM de dexametasona y 10 mmol de β -glicerolfosfato (Sigma–Aldrich).

Previo al cultivo de las células madres en los scaffolds, estos fueron infiltrados con medio de cultivo DMEM (Gibco, Life Technologies) usando una centrifuga a 4000 rpm por 10 minutos. Lo anterior fue realizado para evitar que los scaffolds flotar en el medio y asegurar que la totalidad de los poros tuvieran el medio suficiente para el crecimiento celular. Luego los scaffolds fueron colocados en el fondo de los pocillos de una placa de 48 pocillos (n=4 por cada sistema de scaffold). Se cultivaron 100000 células sobre cada scaffold usando una micropipeta y se adicionó 1 mL de medio de cultivo DMEM para luego dejar incubando a 37 °C y 5% CO₂ durante 10 días. A partir de las mismas muestras con células se realizaron los análisis de citocompatibilidad, propiedades osteogénicas (medición de ALP) y angiogénicas (medición de VEGF). Para evaluar la adhesión y morfología celular se usaron muestras diferentes preparadas especialmente para SEM.

4.3.4.2. *Citocompatibilidad*

La citocompatibilidad fue evaluada por dos métodos que evalúan mecanismos diferentes de toxicidad celular. El primero método consistió en la medición de la actividad mitocondrial

(actividad metabólica) con el ensayo WST-8 (2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio), que es una sal de tetrazolio altamente soluble en agua. El WST-8 es reducido por la actividad de la deshidrogenasa de la célula para dar un formazán de color amarillo, el cual es altamente soluble en el medio de cultivo celular. Esta cantidad de formazán es directamente proporcional al número de células vivas. El procedimiento inicia removiendo el sobrenadante de cada pocillo después de los 10 días de incubación de las células en los scaffolds y lavando la muestra con PBS. Luego se adicionó a cada pocillo 1 mL de una solución al 1% del reactivo WST en medio de cultivo DMEM. Se dejó incubar por 4 h a 37 °C y 5%CO₂ y se traspasó la solución a una placa de 96 pocillos colocando 100 µL en cada pocillo para luego medir la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Autobio PHOmo). La absorbancia es proporcional al número de células viables y los resultados fueron expresados como la media ± SD para un n=12.

El segundo método consistió en la medición de la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH). Este es un ensayo de citotoxicidad de amplio espectro y se basa en la medición de la enzima LDH que está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que han sido afectadas por un agente tóxico. El incremento en la actividad LDH en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas o con daño en la membrana celular. Por otro lado también se puede medir la LDH intracelular que representa el número de células viables. El ensayo se realizó con un Kit comercial (TOX7, Sigma Aldrich) y consta de un grupo de reactivos que contienen lactato, NAD⁺, diaphrose e INT. La enzima LDH cataliza la reducción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato, mientras que la formación de NADH se puede medir mediante una reacción acoplada en la que la sal de tetrazolio INT se reduce hasta un producto de formazán rojo. Para esta investigación el procedimiento inició removiendo el sobrenadante de cada pocillo después de los 10 días de incubación de las células en los scaffolds y lavando la muestra con PBS. Luego se adicionó 1 mL de tampón de lisis (solución preparada con Triton X-100 (1%), Tris (0.2 M), MgCl₂*6H₂O (10 mM), ZnCl₂ (1 mM) y 250 mL de agua desionizada, y luego esta mezcla concentrada fue disuelta al 1% en agua desionizada) y se incubó a 37 °C con 5%CO₂ por 30 minutos. Después de este tiempo el lisado se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm para formar un pellet de células y sacar 140 µL del sobrenadante en cubetas para espectrofotómetro. Luego se adicionaron 60 µL de una solución preparada con cantidades iguales de las soluciones que vienen en el kit LDH (Solución sustrato, solución de marcado y solución cofactor) a cada cubeta y se dejó incubando por 30 min protegido de la luz. La reacción fue detenida adicionando 300 µL de HCl 1 N y cada cubeta fue llenada hasta 1 mL adicionando agua destilada. Finalmente la cantidad e intensidad de color debido al formazán solubilizado se midió espectrofotométricamente a 490 nm y 690 nm usando el lector de microplacas. La absorbancia medida fue proporcional al número de células que mantuvieron integridad en su membrana y los resultados fueron expresados como la media ± SD para un n=4.

Para todos los resultados de citotoxicidad, la significancia estadística fue determinada usando ANOVA y la prueba de contraste Tukey para comparaciones entre grupos con un valor de significancia de p<0.01.

4.3.4.3. Adhesión y morfología celular

La adhesión y morfología celular se estudió usando el SEM, previa preparación de las muestras después del cultivo celular por 10 días. A cada muestra se les removió el medio de

cultivo y se lavaron las células con PBS. Luego se les adicionó 1 mL de la solución de fijación 1 (Glutaraldehído (0.1%), paraformaldehído (2%), sucrosa (5%) y cacodilato de sodio trihidratado (0.2 M)) y se dejó 1 hora. Después de este tiempo se removió la solución de fijación 1 y se adicionó 1 mL de la solución de fijación 2 (glutaraldehído (0.3%), paraformaldehído (3%) y cacodilato de sodio trihidratado (0.2 M) dejando 1 h. Luego se remueve esta solución de fijación y se adicionan una serie de alcohol paso a paso (30, 50, 70, 80, 90, 95 y 2 veces 100%) con un intervalo de 30 minutos entre cada dilución de alcohol. Por último las muestras fueron secadas por punto crítico a 79 bar y 35 °C. Para la observación en el SEM las muestras fueron cubiertas con una capa de cromo usando una corriente de 120 mA por 2 minutos. Posteriormente fueron observadas en un microscopio de emisión de campo Auriga 4750 (Carl Zeiss) con un voltaje de operación de 1 kV para evitar daño en las células.

4.3.4.4. Propiedades osteogénicas

La fosfatasa alcalina (ALP) es un importante marcador para la actividad osteogénica temprana (inicios de la diferenciación de las células madres a osteoblastos). La expresión de ALP fue medida por colorimetría usando *p*-nitrofenil fosfato como sustrato. La enzima ALP expresada por las células hidroliza al sustrato *p*-nitrofenil y un sustrato inorgánico. Bajo condiciones alcalinas el *p*-nitrofenil es convertido a un producto amarillo (*p*-nitrofenol) y su absorbancia fue medida a 405 y 690 nm usando un espectrofotómetro (Analytic Jena, Specord 40). La absorbancia se convierte directamente al nivel de actividad de ALP basado en una curva patrón de proteína, la cual fue obtenida con albumina. Cada ensayo de ALP fue normalizado respecto al contenido de proteína total medido usando el reactivo Bradford (Sigma, Aldrich). El procedimiento inició tomando 250 µL del mismo sobrenadante de la etapa de centrifugado de las células lisadas realizada para medir la LDH. Este volumen fue colocado en una cubeta y se le adicionó 100 µL de una solución de Tris (0.1 M), MgCl₂ (2 mM) y *p*-NPP (9 mM). Luego fue ajustado el pH a 9.8 de las muestras con NaOH 1 M y se incubaron protegiendo de la luz por 22 minutos hasta que el color aparezca. Posteriormente se detiene la reacción con 300 µL de NaOH 1 M y se llenan las cubetas hasta 1 mL con agua destilada. La cantidad de *p*-NPP transformada fue calculada considerando la cantidad de proteína total medida con el ensayo Bradford. Este ensayo consiste en sacar 25 µL del sobrenadante después de lisadas las células y colocarlo en cubetas junto con 975 µL del reactivo Bradford (Sigma, Aldrich). Se deja incubando protegido de la luz por 5 minutos y por último se lee por espectrofotometría a 595 nm. La cantidad de proteína total se calcula tomando como referencia la curva de calibración realizada con un patrón de albumina (Sigma, Aldrich). Los resultados fueron expresados como la media ± SD para un n=4. La significancia estadística fue determinada usando ANOVA y la prueba de contraste Tukey para comparaciones entre grupos con un valor de significancia de p<0.01.

4.3.4.5. Propiedades angiogénicas

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína con fuerte potencial angiogénico que tiene un papel importante en la neovascularización. Para la medición de la secreción de esta proteína en las células madres se utilizó un kit colorimétrico (RayBio®). Este ensayo emplea un anticuerpo específico para cubrir el VEGF humano. El protocolo inicia adicionando 100 µL de la muestra (sobrenadante de la etapa de centrifugado de las células lisadas) en los pocillos (placa de 96 pocillos). Luego se cubre la placa y se incuba por 2.5 horas a temperatura ambiente con agitación. Se retira la solución y se lava 4 veces con solución buffer de lavado. Se adiciona a cada pocillo 100 µL del anticuerpo biotinilado preparado según protocolo

del fabricante y se incuba por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Se descarta la solución y se hace el lavado 4 veces con solución buffer. Luego se adicionan 100 μ L de solución Streptavidina a cada pocillo y se incuba por 45 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se vuelve a descartar la solución, se lava de igual forma y se adicionan 100 μ L del reactivo sustrato TMB a cada pocillo dejando en incubación por 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación. Por último se adicionan 50 μ L de la solución para parar la reacción y se lee a 450 nm inmediatamente. La absorbancia medida es proporcional a la secreción del VEGF, por tanto al potencial angiogénico del material. Para calcular la cantidad de la proteína VEGF se hace el mismo procedimiento seguido para la muestra pero con los estándares y luego se usa la ecuación de la curva ajustada para calcular la cantidad en picogramos (pg) de VEGF en la muestra, de acuerdo a la absorbancia medida. Los resultados fueron expresados como la media \pm SD para un n=4. La significancia estadística fue determinada usando ANOVA y la prueba de contraste Tukey para comparaciones entre grupos con un valor de significancia de $p < 0.01$.

4.3.5. Evaluación antibacterial

La capacidad antibacterial de los scaffolds se evaluó por el mismo método de contacto directo usado para los vidrios bioactivos por la empresa Corbio-Q. Fue usada una cepa bacteriana gram positiva de *S. aureus* resistente a meticilina (ATCC 33591). Los tiempos de evaluación fueron 1, 3 y 7 días, y los resultados fueron expresados como la media \pm SD para muestras en triplicado (n=3).

CAPITULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis y caracterización de vidrios bioactivos

En esta sección se analizan los resultados relacionados a la Etapa I. “Síntesis sol-gel y caracterización de micropartículas de vidrio con incorporación de iones Cu y/o Zn”. Se busca obtener y caracterizar vidrios dopados con Cu y Zn. A partir de ellos, se seleccionaron los vidrios con mayor potencial bioactivo y citocompatible para ser usados como incorporación en los scaffolds poliméricos. Estos vidrios seleccionados fueron disminuidos en tamaño y caracterizados más detalladamente en su bioactividad y citocompatibilidad. Además, se les evaluó su capacidad antibacterial.

5.1.1. Caracterización de textura y microestructura de las partículas sintetizadas

Las partículas sintetizadas fueron molidas y tamizadas a tamaños menores de 75 μm y su morfología irregular es observada en la Figura 9.

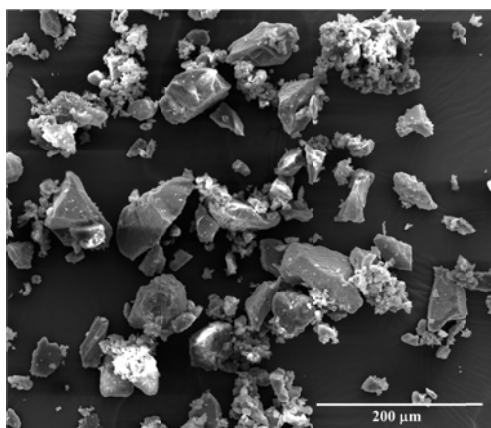


Figura 9. Imagen SEM de las partículas de vidrio sintetizadas (Vidrio NaBG).

La Tabla 3 muestra las composiciones de los vidrios sintetizados calculada teóricamente y medida por espectroscopia (FRX y ICP-OES). Se decidió usar dos técnicas analíticas para medir la composición, debido a que inicialmente el FRX no arrojó valores cercanos al teórico, especialmente para los óxidos SiO_2 , CaO y Na_2O , por lo que se decidió corroborar algunas muestras por una técnica de alta precisión como el ICP-OES. Esta última técnica se basó en la disolución y cuantificación del total del óxido de interés presente en la muestra, por lo que entregó un valor de composición más cercano al diseñado teóricamente. Los resultados mostraron que en general todos los óxidos fueron incorporados en cantidades cercanas a la teórica, especialmente se observó una adecuada incorporación de los dopantes metálicos Cu y Zn.

Tabla 3. Composiciones teórica y medida por espectroscopia para los vidrios sintetizados.

Código del vidrio	Composición en %peso. Teórica y medida ()					
Vidrios base ternario	SiO₂	CaO	Na₂O	P₂O₅	CuO	ZnO
58S ^b	57 (62.1)	39 (35.5)	**	3 (2.4)	**	**
1Cu-58S ^a	57 (68.1)	38 (27.7)	**	3 (3.4)	1 (0.8)	**
5Cu-58S ^a	57 (70.8)	34 (20.8)	**	3 (3.8)	6 (4.6)	**
10Cu-58S ^a	57 (69.7)	28 (17.6)	**	3 (4.7)	11 (9.1)	**
1Zn-58S ^a	57 (70.0)	38 (24.9)	**	3 (4.2)	**	1 (0.9)
5Zn-58S ^a	57 (68.7)	34 (21.9)	**	3 (4.4)	**	6 (4.7)
10Zn-58S ^a	57 (69.2)	28 (17.3)	**	3 (3.9)	**	12 (9.1)
Vidrios base cuaternario						
NaBG ^b	62 (66.0)	29 (25.8)	5 (5.6)	4 (2.6)	**	**
1Cu-NaBG ^a	62 (64.2)	28 (13.0)	5 (19.3)	4 (2.7)	1 (0.8)	**
5Cu-NaBG ^b	62 (63.9)	24 (22.0)	5 (5.4)	4 (2.5)	6 (6.2)	**
10Cu-NaBG ^b	62 (65.1)	18 (16.1)	5 (4.9)	4 (2.7)	12 (11.2)	**
1Zn-NaBG ^a	62 (61.3)	28 (13.1)	5 (21.9)	4 (2.6)	**	1 (1.1)
5Zn-NaBG ^b	62 (64.1)	23 (20.6)	5 (5.4)	4 (2.6)	**	6 (6.4)
10Zn-NaBG ^b	61 (65.2)	17 (14.5)	5 (4.8)	4 (4.4)	**	13 (11.1)
1Cu1Zn-NaBG ^a	62 (63.4)	27 (12.5)	5 (20.0)	4 (2.5)	1 (0.9)	1 (0.7)

** El vidrio no contiene este oxido en su composición
^a Análisis realizado por FRX
^b Análisis realizado por ICP-OES

En la Tabla 4 se muestra la caracterización de tamaños y textura de las partículas de vidrio sintetizadas por sol-gel. El tamaño medio de estas partículas, d_{50} , estuvo entre 30 a 40 μm para todos los vidrios sintetizados. Las propiedades de textura y la microestructura de los vidrios no dopados dependió de su composición específica. El vidrio 58S presentó una área superficial (82 m^2/g) y volumen de poro (0.201 cm^3/g) mas altos que los del vidrio NaBG (15 m^2/g y 0.035 cm^3/g , respectivamente). El valor mas bajo del sistema cuaternario (NaBG) esta relacionado con su contenido de Na_2O , ya que este es usado en los vidrios bioactivos derivados del fundido para bajar el punto de fusión[52, 53], lo cual podría generar un mayor empaquetamiento entre las partículas primarias durante los tratamientos térmicos. Esta mayor densificación del sistema

NaBG fue evidente durante la molienda manual, ya que este vidrio presentó mayor dureza y resistencia para ser disminuido de tamaño que el vidrio 58S.

El efecto del Cu y el Zn sobre las propiedades de textura y la microestructura dependió del tipo de vidrio bioactivo usado para ser dopado (ternario o cuaternario) (Tabla 4). La incorporación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} generó un aumento en el área superficial y el volumen de poro para el vidrio 58S tal como se ha reportado previamente[138, 139]. Sin embargo, estos iones metálicos generaron un efecto contrario en el NaBG disminuyendo su área superficial y el volumen de poro lo que esta acorde con otros estudios que han relacionado la incorporación de ZnO [59, 140] and CuO [13, 76] con el incremento de la densidad, reducción del área superficial y la porosidad de vidrios de silicato de base cuaternaria.

Tabla 4. Propiedades de las partículas de vidrio sintetizadas.

Código del vidrio	Propiedades de las partículas				
	A_s (μm)			S_a (m^2/g)	V_p (cm^3/g)
Vidrios ternarios	d_{10}	d_{50}	d_{90}		
58S	7.0	37.5	80.3	82	0.201
1Cu-58S	3.5	28.1	69.3	130	0.476
5Cu-58S	3.9	30.9	72.8	145	0.464
10Cu-58S	5.6	36.6	82.0	105	0.266
1Zn-58S	4.9	37.8	77.2	123	0.445
5Zn-58S	5.4	37.1	79.6	124	0.355
10Zn-58S	5.6	38.9	81.6	70	0.145
Vidrios cuaternarios					
NaBG	7.8	32.6	64.4	15	0.035
1Cu-NaBG	2.4	33.7	65.3	2	0.003
5Cu-NaBG	2.6	35.8	67.6	2	0.005
10Cu-NaBG	5.4	31.3	69.6	2	0.008
1Zn-NaBG	4.5	34.2	70.8	3	0.009
5Zn-NaBG	4.8	36.0	82.7	3	0.006
10Zn-NaBG	4.0	31.1	73.8	2	0.007

A_s : tamaño promedio de partícula, S_a : área superficial específica, V_p : volumen de poro, Dia.: diámetro de poro

Los difractogramas de rayos X (DRX) de la Figura 10 muestran que ambos vidrios (58S y NaBG) tienen una estructura principalmente amorfa. Sin embargo, el vidrio NaBG mostró un pico ancho alrededor de $2\theta=32^\circ$ el cual corresponde posiblemente a una cristalización parcial de un fosfato parecido a la apatita o silicato de calcio (Ca_2SiO_4) (Figura 10b). Esta cristalización parcial también ha sido observada en otros vidrios cuaternarios después del proceso de calcinación (estabilización del vidrio).[53, 141] Por ejemplo, Lefebvre et al.[141] mostraron que por tratamiento térmico del vidrio 45S5 se puede lograr la cristalización del fosfato silicorhenanita ($\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$) que es isoestructural a la apatita. En el NaBG fue observada la fase calcita (CaCO_3), con su pico principal en $2\theta=29.5^\circ$. Este CaCO_3 ha mostrado capacidad de unión al hueso, lo que no va en detrimento de la bioactividad del vidrio.[142]

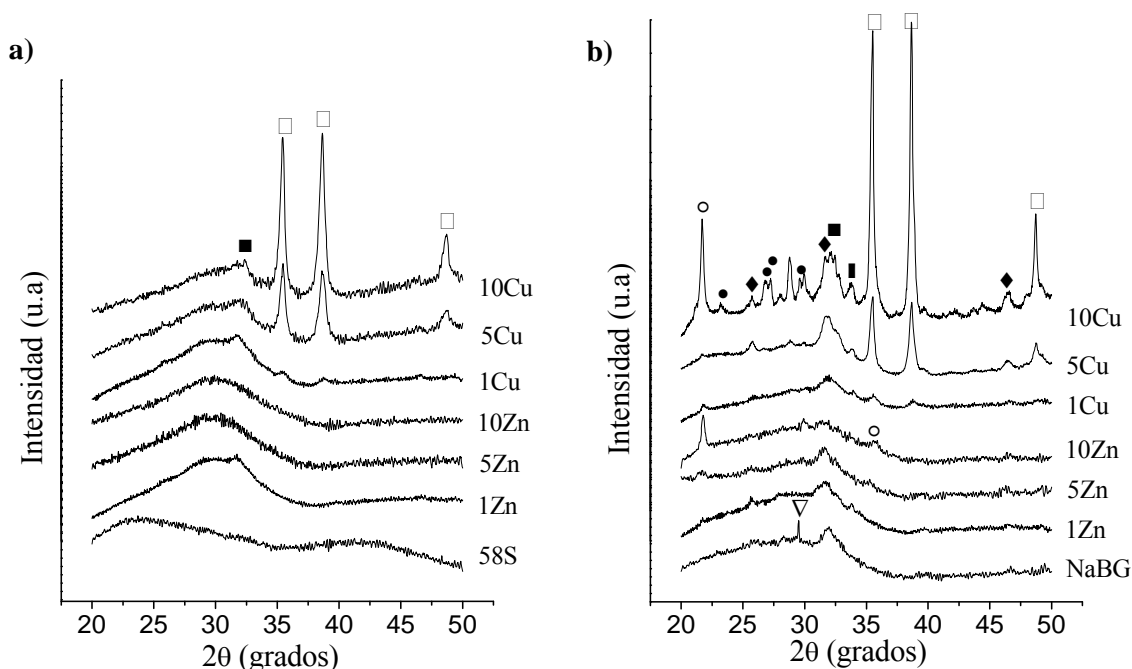


Figura 10. Difractogramas de rayos X de los vidrios 58S (a) y NaBG (b) no dopados y dopados con Cu y Zn. Las fases cristalinas con sus códigos JCPDS fueron etiquetadas de la siguiente forma: (□) CuO (01-089-5899), (■) Ca_2SiO_4 (00-029-0369), (◆) $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (32-1053), (●) $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (00-023-0671), (▨) $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$ (01-073-1726), (▢) CaSiO_3 (01-072-2284), (▽) CaCO_3 (01-085-1108), (°) Cristobalita (SiO_2 , 01-082-0512).

La incorporación de Cu generó óxido de cobre (CuO) en ambos vidrios (58S y NaBG) con sus picos principales en $2\theta=35.6^\circ$ y 38.8° . La presencia de cristales de CuO en estos sistemas depende de las condiciones usadas en el proceso sol-gel y de la cantidad de Cu adicionada, aunque también se ha reportado que los iones de Cu queden homogéneamente disueltos en la red vítrea.[13, 33, 143, 144] La incorporación de Cu en el NaBG promovió la formación de silicorhenanita y Ca_2SiO_4 , y cuando el contenido fue 10%mol de CuO (10Cu-NaBG) se favoreció la formación de cristobalita (SiO_2) y silicatos de calcio ($\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$, $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, CaSiO_3 , Ca_2SiO_4). Esta formación de silicorhenanita y las otras fases cristalinas podría ser explicada por la formación y separación de fases inducidas por repulsiones Coulombicas entre los iones Cu^{+2} y los otros iones modificadores (Ca^{+2} y Na^+), tal como ha sido reportado en estudios previos para los vidrios de silicato.[76, 145] Estas repulsiones Coulombicas son debidas al alto potencial iónico de los iones Cu^{+2} y la coordinación octaédrica (CN=6), lo que convierte a los iones Cu^{+2} en verdaderos modificadores de red produciendo además, inmiscibilidad y separación de fases.[145, 146] Por otro lado, la incorporación de Zn en el vidrio 58S no generó fases cristalinas, mientras que en el vidrio NaBG fue inhibida la cristalización inicial de silicorhenanita y Ca_2SiO_4 . Otros autores han establecido que, contrario a la participación del Cu como modificador de red y promotor de separación de fases cristalinas, el Zn participa como un formador de red vítrea generando tetraedros como los formados por el Si. [147] Estos resultados mostraron que la microestructura final de estos vidrios dependió del ion metálico usado y de la composición del vidrio no dopado. En la Figura 11 se muestra una propuesta sobre el tipo de estructura formada en un vidrio tipo NaBG y el efecto de la incorporación de los iones Cu y Zn. La estructura del NaBG (Figura 11a) es una estructura de tetraedros de Si con los cationes modificadores Ca^{2+} y Na^+ balanceando las cargas negativas de los oxígenos no enlazados de los tetraedros. También se observan las unidades de PO_4^{3-} que preferiblemente se encuentran como unidades aisladas (ortofosfatos) balanceando su carga con los otros cationes. En la estructura del

vidrio dopado con Cu (Figura 11b) se observa que algunos cationes Ca y Na se han enlazado covalentemente a los oxígenos de los tetraedros para formar las fases cristalinas descritas anteriormente. Además, se observa el enlace de algunos iones de Cu para formar CuO. Para el caso de los vidrios dopados con Zn (Figura 11c), este metal ocupó algunos lugares tetraédricos dentro de la red vítrea sin favorecer la formación de fases cristalinas.

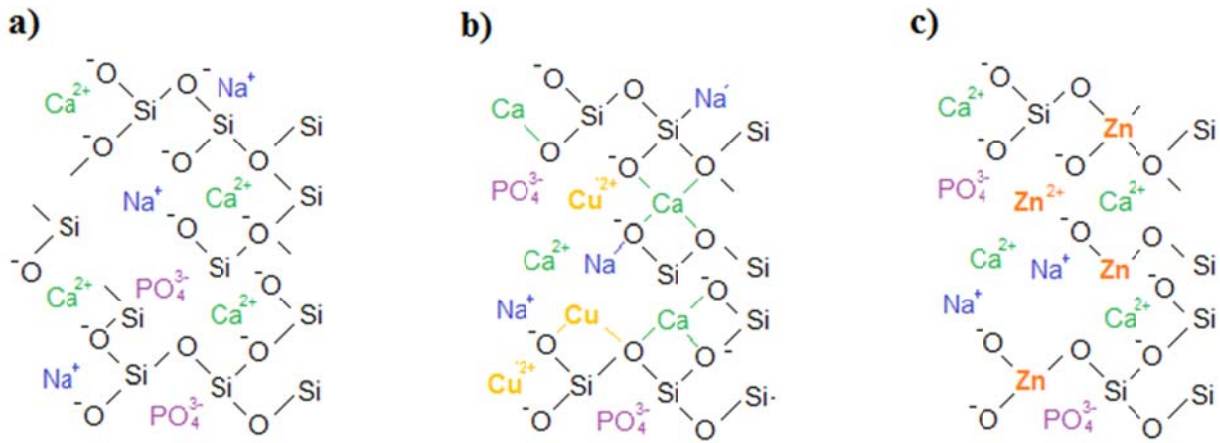


Figura 11. Estructura propuesta para los vidrios bioactivos sintetizados basados en el sistema cuaternario NaBG. a) Estructura de los vidrios NaBG, b) NaBG dopado con Cu y c) NaBG dopado con Zn.

5.1.2. Formación de apatita y disolución en SBF

Los vidrios 58S y NaBG mostraron bioactividad *in vitro* después de la inmersión en SBF lo que fue confirmado por DRX y ATR-FTIR (Figura 12) evaluando la formación de una capa de fosfato de calcio (CaP) después de la inmersión por 1, 7 y 14 días. El vidrio 58S (Figura 12a y 11b) después del primer día de inmersión en SBF desarrolló una fase de CaP cristalina del tipo hidroxiapatita (HA) o hidroxiapatita carbonatada, caracterizada por los picos principales en $2\theta=25.9^\circ$ y 32° (Figura 12a). Conforme fue avanzando el tiempo de inmersión hasta los 14 días, los picos de la HA se volvieron mas intensos y aparecieron otros picos característicos $2\theta=46.7^\circ$ y 49.5° . La bioactividad *in vitro* también fue evidenciada en los espectros ATR-FTIR (Figura 12b) con la aparición de las bandas 560 y 602 cm^{-1} después del primer día de inmersión en SBF, relacionadas con la flexión antisimétrica del enlace P-O de la apatita cristalina (HA).[49, 148] En la Figura 12b también fue observada la banda alrededor de 1060 cm^{-1} para el estiramiento antisimétrico del enlace P-O.[76,143, 144] En el caso del NaBG, el difractograma de la Figura 12c muestra la aparición de los picos característicos de la HA después del primer día de inmersión en SBF, incluso con una mejor cristalización de la HA por la aparición de otro pico característico en $2\theta=39.7^\circ$. Para los 14 días, el pico principal del CaCO₃ a $2\theta=29.5^\circ$ incrementó en intensidad conforme avanzó el tiempo de inmersión, además aparecieron otros picos característicos de esta fase, lo que demuestra una mayor adsorción de grupos carbonatos desde el SBF. La bioactividad del NaBG también fue evaluada por ATR-FTIR (Figura 12d) confirmando los resultados de los DRX debido a la aparición del doblete en 562 y 602 cm^{-1} . Estos picos también aparecieron antes de la inmersión en SBF confirmando la fase isoestructural de la apatita (silicorhenanita) mostrada en la Figura 10b. Estos picos fueron más intensos desde el primer día de inmersión mostrando un aumento de bioactividad hasta los 14 días.

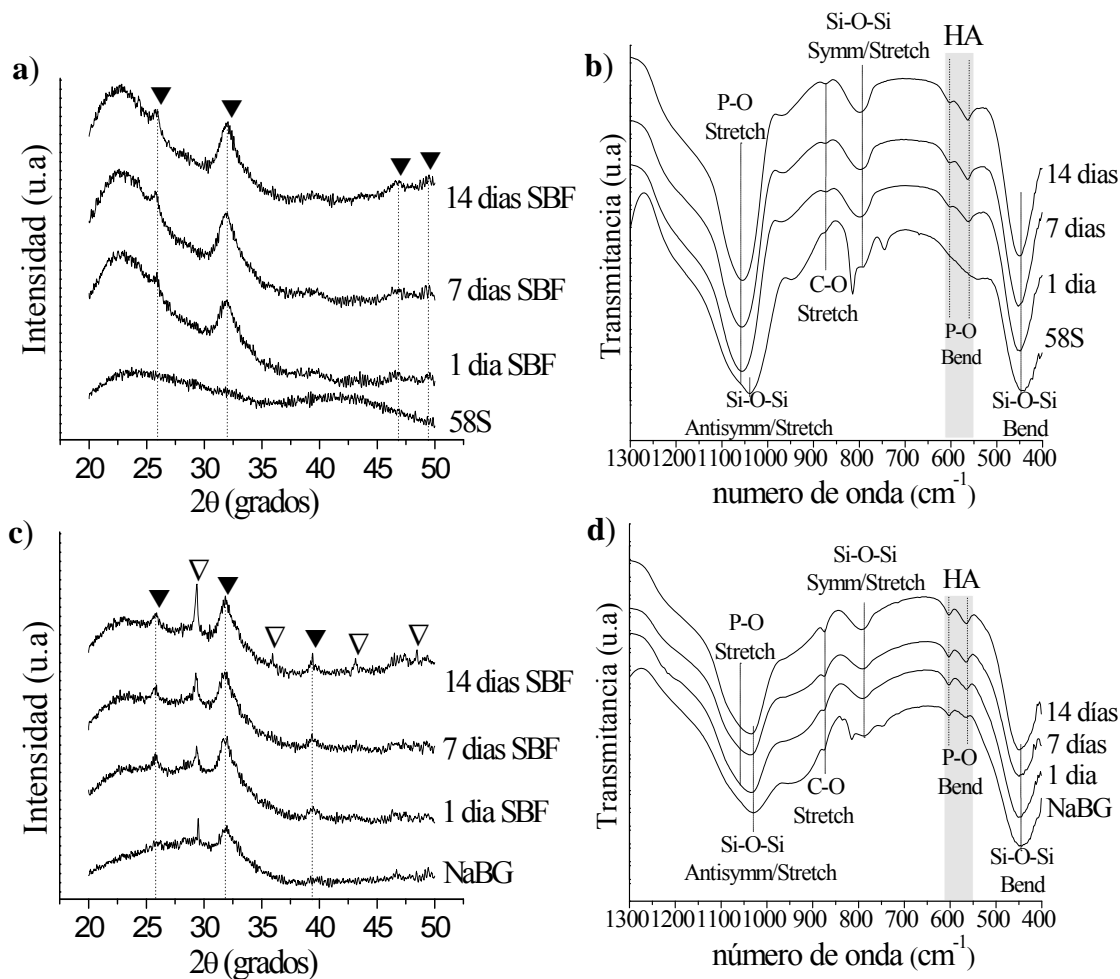


Figura 12. Formación de apatita después de la inmersión en SBF por 1, 7 y 14 días. a) DRX y b) ATR-FTIR del vidrio 58S, c) DRX y d) ATR-FTIR del vidrio NaBG. Las fases cristalinas en el DRX están etiquetadas como sigue: (▼) HA and (▽) CaCO_3 .

La formación de la apatita superficial en los vidrios 58S y NaBG también fue corroborada por SEM y XEDS. La Figura 13a y 13b muestra la formación de partículas esféricas o gránulos en la superficie de los vidrios, lo que es característico de la apatita cristalina.[142, 149, 150] La relación atómica Ca/P de esta capa superficial de apatita estuvo entre 1.5 y 1.8 (valores desde el XEDS) lo que está alrededor de la relación estequiométrica de la HA (1.67).[151] Algunos investigadores han reportado otras relaciones Ca/P parecidas a las obtenidas en esta investigación para apatitas similares con bioactividad y habilidad para unirse al hueso. [143, 152, 153] Estos resultados mostraron que los vidrios 58S y NaBG presentan alta bioactividad *in vitro*, sin mostrar diferencia significativa en la capacidad para formar apatita cristalina.

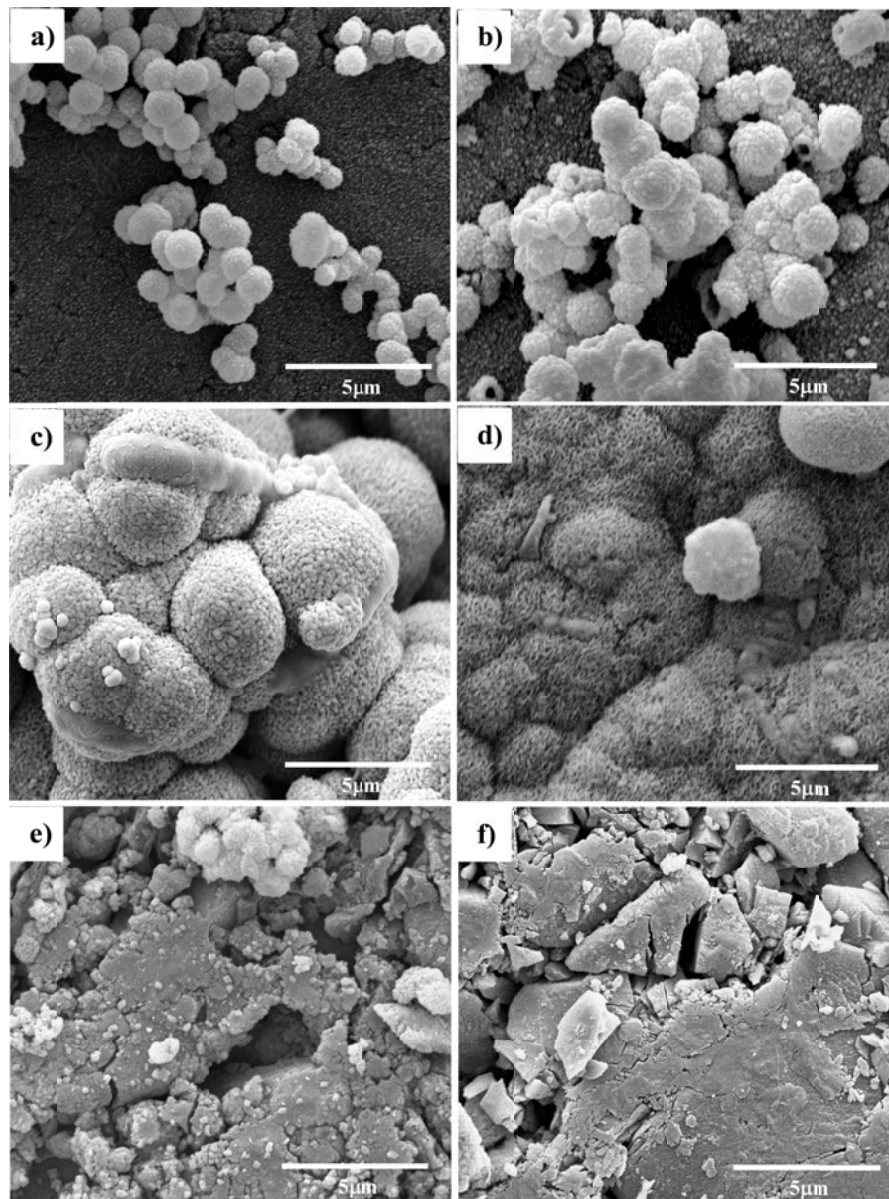


Figura 13. Imágenes SEM de los vidrios no dopados y dopados con Cu y Zn después de 7 días en SBF. a) 58S, b) NaBG, c) 1Cu-58S, d) 1Cu-NaBG, e) 1Zn-58S and 1Zn-NaBG.

Cuando los vidrios están inmersos en SBF sufren disolución y liberan iones.[16, 154] La capa de apatita que se forma sobre la superficie de los vidrios basados en silicato, de acuerdo a la reacciones propuestas por Hench[16], es consecuencia de la difusión de iones Ca^{+2} desde la superficie del vidrio y la posterior migración de iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} sobre una capa de sílice amorfa en la superficie del vidrio. La Figura 14 muestra la concentración de Ca y P en SBF después de la inmersión de los vidrios 58S y NaBG durante 1, 7 y 14 días. La liberación de iones Ca^{+2} fue mayor para los vidrios derivados del 58S que para los vidrios derivados del NaBG (Figura 14a y 14b, respectivamente) debido a que los vidrios 58S tienen áreas superficiales y volúmenes de poro mas altas (Tabla 4), lo que permite una mayor reacción con la solución, disolución del vidrio y liberación de iones, tal como ha sido mostrado en otros estudios.[49, 155] Además, el NaBG desarrolló Ca_2SiO_4 y $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ desde la síntesis estabilizando al Ca presente en la estructura vítrea. En el caso de los iones fosfato PO_4^{-3} (Figura 14c y 14d, respectivamente), ocurrió una adsorción de P desde el vidrio y una reducción de la concentración

del P inicial presente en el SBF. Los vidrios 58S y NaBG adsorben gran cantidad de P desde el SBF a partir del primer día, siendo un poco más alta la adsorción del 58S debido a su mayor área superficial.

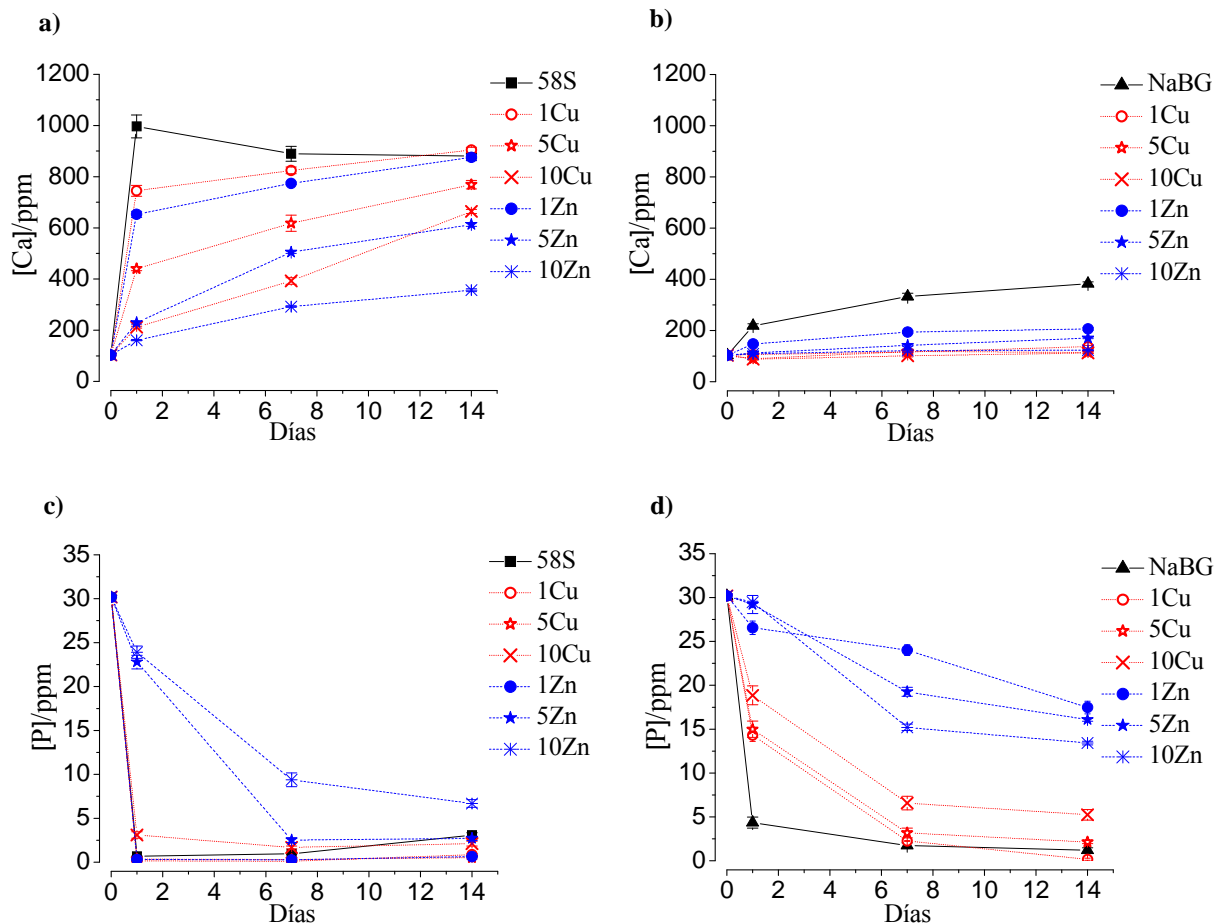


Figura 14. Cambio en la concentración de Ca y P por la inmersión de los vidrios durante 1, 7 y 14 días en SBF. a) liberación de Ca desde los vidrios derivados del 58S, b) liberación de Ca desde los vidrios derivados del NaBG, c) adsorción de P desde los vidrios derivados del 58S y d) adsorción de P desde los vidrios derivados del NaBG.

La incorporación de Cu y Zn en los vidrios 58S y NaBG tuvo efectos diferentes en la formación de apatita y el comportamiento de la disolución, dependiendo del ion metálico y del vidrio usado (58S o NaBG), tal como es mostrado en la Figura 15. Los resultados de DRX después de la inmersión en SBF y la liberación de iones mostraron que la incorporación de Cu y Zn afecta la durabilidad o estabilidad química de los vidrios dopados. Esta conclusión es basada en la formación de nuevas fases cristalinas junto con la generación de una estructura vítrea con mayor interconectividad de red, ambas características teniendo como consecuencia un proceso de disolución mas baja y la inhibición de la conversión desde CaP amorfo a HA por la mas baja difusión de iones Ca^{+2} and PO_4^{-3} . [60, 76, 138, 156, 147] Aunque los difractogramas fueron desarrollados en muestras inmersas a 1, 7 y 14 días, por claridad la Figura 15 muestra solamente los DRX para 7 días de inmersión. Para 1 y 14 días de inmersión, las muestras mostraron la misma tendencia en bioactividad.

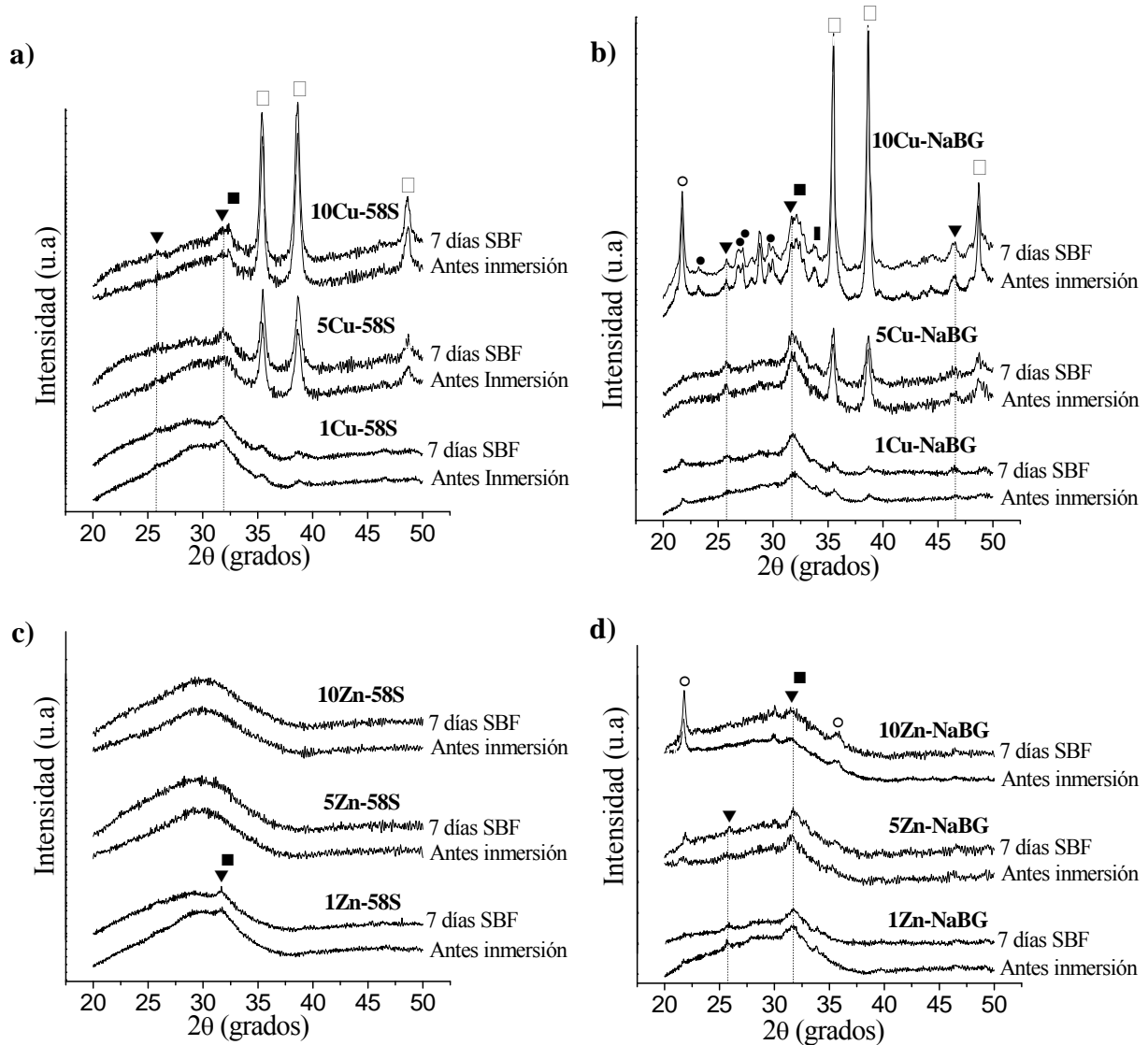


Figura 15. DRX de los vidrios durante el ensayo de bioactividad *in vitro* por inmersión en SBF a 7 días. Vidrios derivados del a) 58S y b) NaBG, dopados con Cu. Vidrios derivados del c) 58S y d) NaBG, dopados con Zn.

La presencia de Cu en el vidrio ternario 58S disminuyó la habilidad para formar apatita en todos los porcentajes de incorporación de Cu (Figura 15a), donde la intensidad de los picos de la HA después de la inmersión en SBF fueron mas bajas que en el 58S no dopado. La competición entre los iones Cu^{+2} y Ca^{+2} en solución para la precipitación de especies de fosfato, podría ser una causa de la más baja bioactividad de los vidrios dopados. [76, 139] Con la incorporación de Cu en el vidrio NaBG (Figura 15b), no se afectó significativamente la formación de apatita cristalina. Además, los silicatos de calcio observados en el 10Cu-NaBG ($\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$, $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, CaSiO_3 , Ca_2SiO_4) sufrieron disolución ya que se observó que sus picos presentaron menor intensidad después de la inmersión en SBF. La disolución de estos silicatos ha sido reportada en otros estudios[52]. Las fases cristobalita y CuO fueron mas estables en SBF y no sufrieron disolución apreciable. Las imágenes SEM de las muestras 1Cu-58S y 1Cu-NaBG a 7 días en SBF (Figura 13c y 13d) permitieron confirmar la formación de apatita con la topografía típica según se ha reportado en otros estudios.[157] La diferencia entre la morfología de la apatita cristalina de

los vidrios dopados con Cu y los vidrios no dopados podría ser explicada por una posible incorporación del Cu en la estructura de la apatita, tal como ha sido reportado previamente. [146] Esta incorporación modifica los parámetros de red y el crecimiento cristalino debido a la diferencia en radios iónicos ($\text{Cu}^{+2}=0.72 \text{ \AA}$ y $\text{Ca}^{+2}=0.99 \text{ \AA}$) y cargas.[156, 158] Sin embargo, parece que la incorporación de Cu en la estructura de la apatita depende de la característica del vidrio, ya que en vidrios boratos dopados con Cu no se ha encontrado evidencia de la incorporación del metal.[156]

La incorporación de Zn en los vidrios 58S y NaBG (Figura 15c y 15d, respectivamente) inhibió la formación de apatitas, mostrando por DRX una estructura principalmente amorfa para todos los tiempos de inmersión. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores.[138, 159, 160] Similar al caso de los vidrios dopados con Cu, esta inhibición también puede ser debida a la sustitución de iones Zn^{+2} por iones Ca^{+2} durante la formación de apatita causando cambios en los cristales por la diferencia en radios atómicos (0.74 \AA para Zn^{+2}) como ha sido demostrado previamente.[161] Sin embargo, a diferencia de los vidrios con Cu, mas adelante serán discutidos otros efectos de la incorporación del Zn en la estabilización estructural que también puede causar la inhibición del crecimiento de apatita. La presencia de 5 y 10%mol de ZnO en el NaBG promovió la formación de otras fases como el CaSiO_2 y la cristobalita. Las imágenes SEM de las muestras 1Zn-58S y 1Zn-NaBG a 7 días en SBF (Figura 13e y 13f) confirmaron los resultados de los DRX, ya que no fue visible una formación significativa de apatita en la superficie de los vidrios dopados con Zn. Por consiguiente, los resultados indicaron que la incorporación de Cu afectó en menor grado la bioactividad *in vitro* de los vidrios que la incorporación de Zn.

La incorporación de Cu y Zn en los vidrios 58S y NaBG disminuyó la liberación de Ca^{+2} comparado con los vidrios no dopados, siendo la liberación de los vidrios dopados con Zn menor que en los vidrios dopados con Cu (Figura 14a y 14b). También fue observado que la incorporación de estos metales disminuyó la alta velocidad de liberación durante el primer día de inmersión, generando una liberación mas controlada durante este periodo.

Las diferencias en la formación de apatita y liberación de iones por efecto de la incorporación de Cu y Zn podrían explicarse por sus diferencias en radio atómico y carga (relación Z/a^2), generando interacciones distintas con los oxígenos no enlazados de los tetraedros de silicato.[57, 159] En particular, la característica anfotérica de los iones Zn^{+2} (coordinaciones 4 y 6) sugiere que este ion puede estar presente en el vidrio con una coordinación tetraédrica como el Si (formador de red) o una coordinación octaédrica como un modificador de red.[145] Cuando los iones Zn^{+2} participan como un formador de red, se aumenta el grado de polimerización o la conectividad de red asociada con la formación de enlaces Zn-O-Zn and Si-O-Zn.[147] Ha sido mostrado que las geometrías de los tetraedros de Zn presentan distancias catión-oxígeno mas largas y ángulos mas pequeños con respecto al tetraedro de Si y al tetraedro interconectado Si-Zn, lo que reduce el volumen entre las unidades de tetraedros produciendo una estructura vítrea mas densa y estable.[140] Cuando los iones Zn^{+2} actúan como modificadores de red reemplazando a los iones Ca^{+2} , la estructura vítrea también se estabiliza ya que el radio iónico del Zn^{+2} es menor que el del Ca^{+2} y los enlaces Zn-O son mas fuertes que los enlaces Na-O y Ca-O.[147] Para el caso de los iones Cu^{+2} , estos presentan coordinación octaédrica y participan solamente como modificadores de red.[146, 162] De acuerdo a Abdrakhmanov et al.[163] el Cu^{+2} esta rodeado por dos oxígenos no enlazados con el fin de lograr electro-neutralidad. Este tipo de interacción con la red tiene enlaces mas débiles que la participación como formador, lo que hace que los iones tengan más movilidad y se generen estructuras vítreas menos densas y estables químicamente que

las generadas por los iones Zn^{+2} , permitiendo mayor disolución del vidrio y formación de apatita. Sin embargo, la competencia entre los iones Cu^{+2} y Ca^{+2} en la solución durante la precipitación de especies de fosfato podría generar una disminución en la formación de apatita tal como fue observado en los vidrios 58S dopados con Cu.[76, 139]

La Figura 16 muestra un esquema de la participación de los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} en la estructura del vidrio y un mecanismo propuesto para el efecto de la incorporación del metal sobre la disolución del vidrio y la formación de apatita, de acuerdo a los hallazgos estructurales encontrados en la literatura para vidrios dopados con Cu o Zn y los mecanismos propuestos por Hench[16] para la disolución del vidrio y formación de apatita.

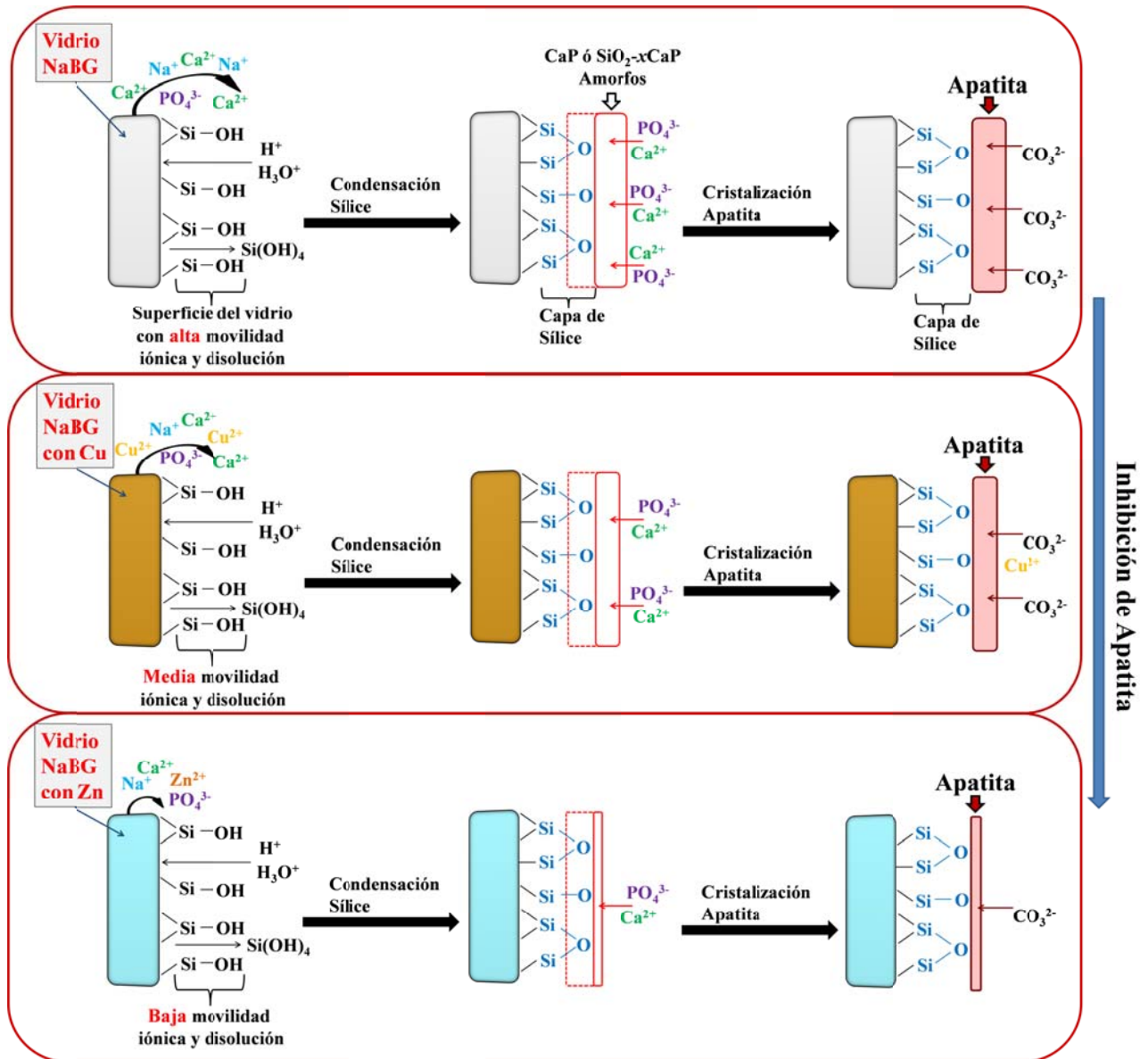


Figura 16. Esquema resumen de la participación de los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} dentro de la estructura del vidrio (Zn preferiblemente formador y Cu modificador del vidrio) y de las principales reacciones superficiales después de SBF, para formar la capa de apatita cristalina con las características propias del tipo de vidrio.

La participación del Cu como modificador de la red vítrea permite que se cree una estructura menos estable y con mayor movilidad iónica que la producida por el Zn con su

participación como formador de red. Además, el Cu también favorece la separación de fases y la formación de fases cristalinas (ej: silicatos de Ca) en el vidrio. La baja movilidad iónica generada por el Zn disminuye la disolución del vidrio, así mismo las reacciones de hidrólisis y condensación que forman la capa de sílice (puntos de nucleación) donde luego precipitarían los iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} para formar una capa amorfa de CaP o $\text{SiO}_2\text{-xCaP}$. Por último, el efecto de la incorporación del Zn se observaría con una muy baja formación o completa inhibición de la apatita, comparada con la generada por los vidrios dopados con Cu.

5.1.3. Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , y cambios de pH en el medio de cultivo

La Figura 17 muestra la liberación de Cu^{+2} y Zn^{+2} desde las partículas al medio de cultivo celular (DMEM/F12). En este caso se usó medio de cultivo y no SBF como en la liberación de los otros iones, con el fin de relacionar la liberación de Cu^{+2} y Zn^{+2} con el ensayo de citocompatibilidad realizado en el mismo medio. La liberación de estos iones metálicos dependió del tipo de vidrio bioactivo y del metal usado, siendo la liberación de iones Cu^{+2} por lo menos 10 veces más alta que la liberación de iones Zn^{+2} para todos los vidrios derivados del 58S y el NaBG. La liberación de Cu^{+2} desde los vidrios derivados del 58S (Figura 17a) fue más rápida que la de los vidrios derivados del NaBG (Figura 17b) durante el primer día de inmersión, debido a la alta área superficial específica de estos vidrios permitiendo un aumento en la disolución. Además, cuando el tiempo transcurrió la velocidad de liberación de iones Cu^{+2} desde los vidrios derivados del 58S fue disminuyendo (hasta los 14 días), mientras que en los vidrios derivados del NaBG (Figura 17b) tuvo un incremento gradual hasta los 14 días.

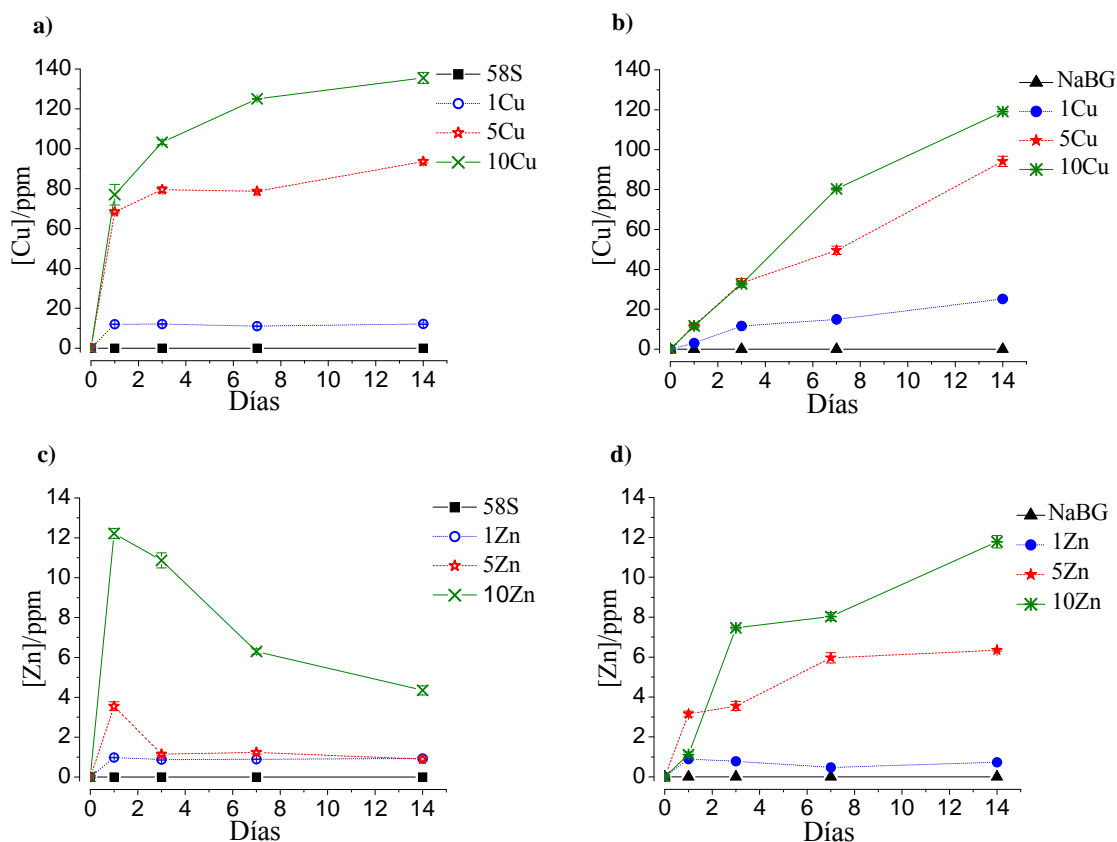


Figura 17. Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los vidrios bioactivos para 1, 3, 7 y 14 días. Liberación de Cu desde los vidrios derivados del a) 58S y b) del NaBG. Liberación de Zn desde los vidrios derivados del c) 58S y d) del NaBG.

La liberación de Zn^{+2} desde los vidrios derivados del 58S (Figura 17c) tuvo un rápido incremento durante el primer día de inmersión aumentando la concentración de iones en el SBF y luego disminuyó para tiempos mayores. Este comportamiento fue marcado en los vidrios 5Zn-58S y 10Zn-58S, mientras que para el vidrio 1Zn-58S la liberación de iones Zn^{+2} fue casi cero durante todo el tiempo de inmersión. Esta disminución después del primer día es debida probablemente a la formación de $Zn(OH)_2$ a partir de los iones Zn^{+2} disueltos, tal como ha sido reportado previamente[57], o a una adsorción del Zn^{+2} por parte del vidrio, generando una disminución de la concentración de este ion en el medio de cultivo. La liberación de Zn^{+2} desde los vidrios derivados del NaBG (Figura 17d) tuvo una cinética diferente a la mostrada por los vidrios 58S dopados con Zn (Figura 17c). La liberación de iones Zn^{+2} en el vidrio 1Zn-NaBG tuvo una rápida liberación inicial y luego tendió a estabilizarse hasta los 14 días, mientras que en las muestras con mas alta cantidad de Zn (5Zn-NaBG y 10Zn-NaBG) se observó un incremento gradual hasta los 14 días. Este comportamiento de la liberación de Zn^{+2} desde los vidrios basados en el NaBG, sugiere que la disminución en concentración de Zn^{+2} observada para los vidrios 58S, sería a causa de una adsorción de iones en el vidrio debido a la alta área superficial y porosidad de estos vidrios.

Las diferencias mostradas entre la liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los vidrios 58S y NaBG confirman lo discutido anteriormente, mostrando que el Zn presenta un mayor enlace a la red vítrea que limita su movilidad y liberación [139], mientras el Cu tiene mayor movilidad por su mas débil interacción con la estructura del vidrio.[164] Liu et al.[156] también encontraron que la liberación de iones Cu^{+2} fue mas alta que la de los iones Zn^{+2} para microfibras del vidrio de borato 13-93B co-dopado con 0.4% en peso de CuO y 1% en peso de ZnO , lo que es consistente con nuestros resultados.

El comportamiento del pH del medio de cultivo es relevante evaluarlo ya que las células son muy sensibles a cambios en el medio fisiológico ($pH=7.4$). En general, los vidrios bioactivos incrementan el pH del medio por intercambio de iones Ca^{+2} y Na^{+2} desde la superficie del vidrio con los H^+ del medio[16]. De acuerdo a la Figura 18, los vidrios derivados del 58S generan un mayor incremento del pH en el medio que los vidrios derivados del NaBG lo que puede ser explicado por la mayor área superficial de los primeros en comparación con los vidrios derivados del NaBG, además estos últimos presentaron cristalización de silicatos, entre otras fases cristalinas, mientras que los vidrios derivados del 58S fueron preferiblemente amorfos lo que aumenta la disolución y liberación de iones que aumentan el pH. Estos resultados mostraron que los vidrios 58S podrían ser más citotóxicos por efecto del pH y mayor liberación de iones que los vidrios NaBG. Por otro lado, los metales Cu y Zn incorporados en los vidrios 58S y NaBG a mas baja concentración (1%mol de CuO y ZnO) produjeron un incremento del pH mayor que el generado por los vidrios no dopados a 14 días. Sin embargo, el pH fue mas bajo con más altas incorporaciones de los metales (5 y 10%mol de CuO o ZnO). Este comportamiento puede ser explicado porque en la composición del vidrio el Ca fue reemplazado por el ion metálico, dejando menos Ca disponible para ser liberado.[76, 143] Además, la incorporación de los iones metálicos promovió la cristalización y la conectividad de red lo que explica la más baja liberación de iones Ca^{+2} y Na^{+2} (Figura 14). Los cambios en pH por los vidrios dopados dependieron del tipo de metal incorporado, siendo la incorporación de Zn la que produjo menor incremento del pH que la de Cu, debido a la mayor estabilización de la red que genera el Zn que disminuyó la liberación iónica.

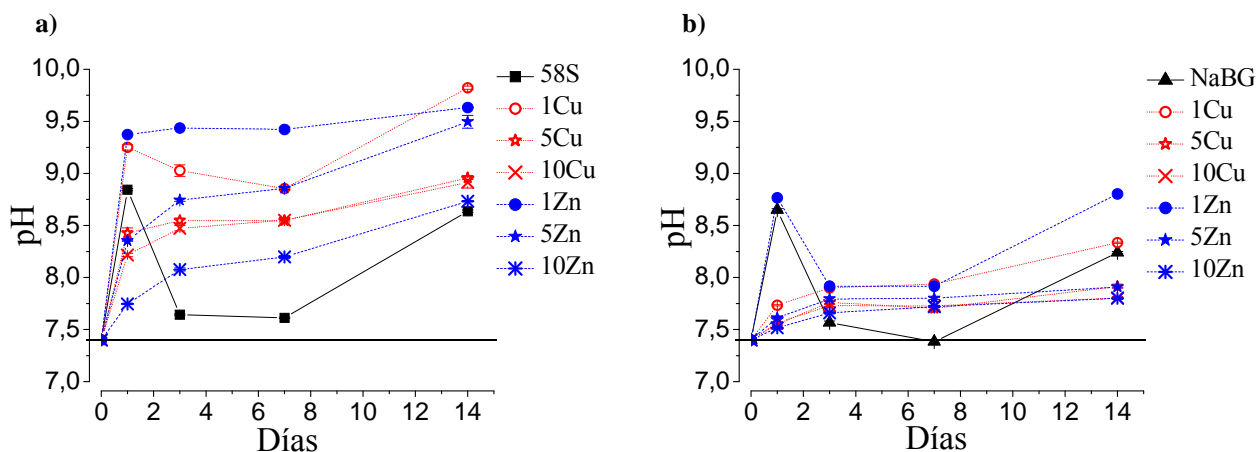


Figura 18. Cambios de pH en el medio DMEM/F12 después de la disolución de los vidrios bioactivos. a) Vidrios derivados del 58S y b) vidrios derivados del NaBG. Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=4).

5.1.4. Evaluación de la citocompatibilidad

En la Figura 19 se muestra la viabilidad de las células SaOS-2 después de la exposición durante 24 horas a los vidrios bioactivos. El vidrio 58S fue mas citotóxico (viabilidad alrededor del 50%) mientras que el vidrio NaBG no mostró diferencia significativa del control. Esto confirma el fuerte efecto de la alta liberación de iones (Ca^{+2}) desde el vidrio 58S generando un pH mas alto y por consiguiente llegando a ser toxico como ha sido reportado previamente para osteoblastos (SaOS-2) y fibroblastos.[123, 138, 165] Según estos autores, el aumento del pH genera una alteración del potencial de la membrana celular lo que causa inhibición en el transporte de iones necesarios para el normal funcionamiento de la célula. Aunque, el vidrio 58S es un material bien caracterizado, los resultados acerca de su citotoxicidad son contradictorios dependiendo de varios parámetros, tales como: tiempo de medición, tipo de células, concentración y pre-tratamientos del vidrio, entre otros. Por ejemplo, Mortazavi et al.[165] también reportó toxicidad a 24 y 48 horas de contacto entre un extracto iónico del vidrio 58S y las células, pero después de 72 horas la viabilidad celular aumentó. Otros estudios han reportado baja o nula toxicidad del vidrio 58S, lo cual puede ser explicado por el uso de concentraciones de vidrio o extractos iónicos mas bajas que las usadas en esta investigación (0.01 g/mL),[155] o por el pre-tratamiento del vidrio por inmersión en medio de cultivo previo al cultivo de las células, con el fin de evitar una alta liberación iónica y el incremento del pH a tiempos tempranos de cultivo.[166] La incorporación de Cu o Zn al vidrio 58S generó aun mas citotoxicidad que la generada por el vidrio 58S no dopado, alcanzando solamente alrededor de un 10% de viabilidad celular para todos los vidrios 58S dopados con Cu, mientras que los vidrios dopados con Zn fueron menos citotóxicos, pero el aumento del porcentaje de Zn aumento la citotoxicidad. Por otro lado, la citocompatibilidad de los vidrios NaBG dopados con Cu y Zn dependió del tipo de ion metálico y de su porcentaje de incorporación. Por ejemplo, el vidrio 1Cu-NaBG no fue citotóxico mientras que los vidrios 5Cu-NaBG y 10Cu-NaBG mostraron una citotoxicidad similar (alrededor de 18% de viabilidad para ambos vidrios) confirmando que a mayor porcentaje de incorporación, mayor Cu liberado con potencial citotóxico. La citotoxicidad de los vidrios dopados con Zn también aumentó con mayor cantidad incorporada del ion metálico. Los vidrios 1Zn-NaBG y 5Zn-NaBG no fueron citotóxicos (no generaron mas de 30% de disminución de la viabilidad celular) mientras que el vidrio 10Zn-NaBG fue citotóxico disminuyendo la viabilidad hasta alrededor del 50%.

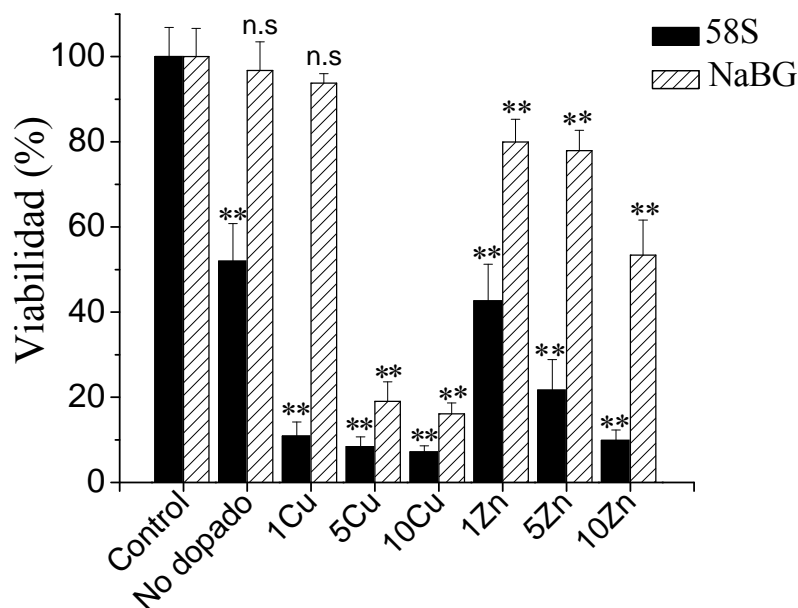


Figura 19. Citocompatibilidad de los vidrios no dopados y los dopados con Cu y Zn. (**) Diferencia significativa estadísticamente entre los grupos experimentales con el control con $p < 0.01$.

Nuestros resultados indicaron que la toxicidad estuvo relacionada con la concentración del ion metálico en el medio, tal como otros estudios han reportado niveles tóxicos para vidrios dopados con Cu[13, 57, 167, 168] y Zn[62, 169–171]. En nuestro caso, los vidrios dopados con Cu (1Cu-58S, 5Cu-58S, 10Cu-58S, 5Cu-NaBG and 10Cu-NaBG) y los vidrios dopados con Zn (1Zn-58S, 5Zn-58S, 10Zn-58S and 10Zn-NaBG) fueron citotóxicos liberando más de 11.7 y 3.5 ppm a 1 día, respectivamente. Las muestras 1Cu-NaBG, 1Zn-NaBG and 5Zn-NaBG no fueron citotóxicas liberando menos de 3.0 ppm a 1 día. Basado en estos resultados se podría estipular un umbral de citotoxicidad alrededor de los 3.0 ppm para ambos iones metálicos. Por encima de este umbral se esperaría más de un 30% en reducción de la viabilidad celular basado en el criterio de citotoxicidad de la norma ISO 10993:5.[172] Debido a que la liberación de los iones Zn^{+2} fue mucho menor a la cantidad liberada de iones Cu^{+2} , no fue posible una determinación directa del efecto del tipo de ion metálico en la citotoxicidad para el mismo grado de incorporación. Sin embargo, la cantidad de iones Cu^{+2} liberados desde el vidrio 1Cu-NaBG fue similar a la cantidad de iones Zn^{+2} liberados desde el vidrio 5Zn-NaBG a 24 horas (alrededor de 3.0 ppm) y ambos vidrios no mostraron citotoxicidad sugiriendo que no hay un efecto significativo en el tipo de ion metálico sino que el efecto predominante en la citotoxicidad es la concentración del ion en la solución. La citotoxicidad generada por los iones Cu^{+2} está relacionada a la producción de especies de oxígeno reactivas (reacción tipo Fenton) lo que genera la desnaturalización oxidativa de proteínas, péptidos, DNA y fosfolípidos.[57, 80] En el caso del efecto de los iones Zn^{+2} , el mecanismo aun no es claro ya que su ion no induce estrés oxidativo, porque aparentemente no tiene el potencial redox para generar especies radicales.[171]

5.1.5. Vidrio co-dopado con Cu y Zn

Debido a que los vidrios 1Cu-NaBG y 1Zn-NaBG no fueron citotóxicos, se preparó un vidrio co-dopado con 1%mol de CuO y 1%mol de ZnO (1Cu1Zn-NaBG) buscando un potencial terapéutico sinérgico de ambos iones. Se evaluaron la bioactividad *in vitro*, la liberación de iones y citocompatibilidad, y los resultados son mostrados en la Figura 20.

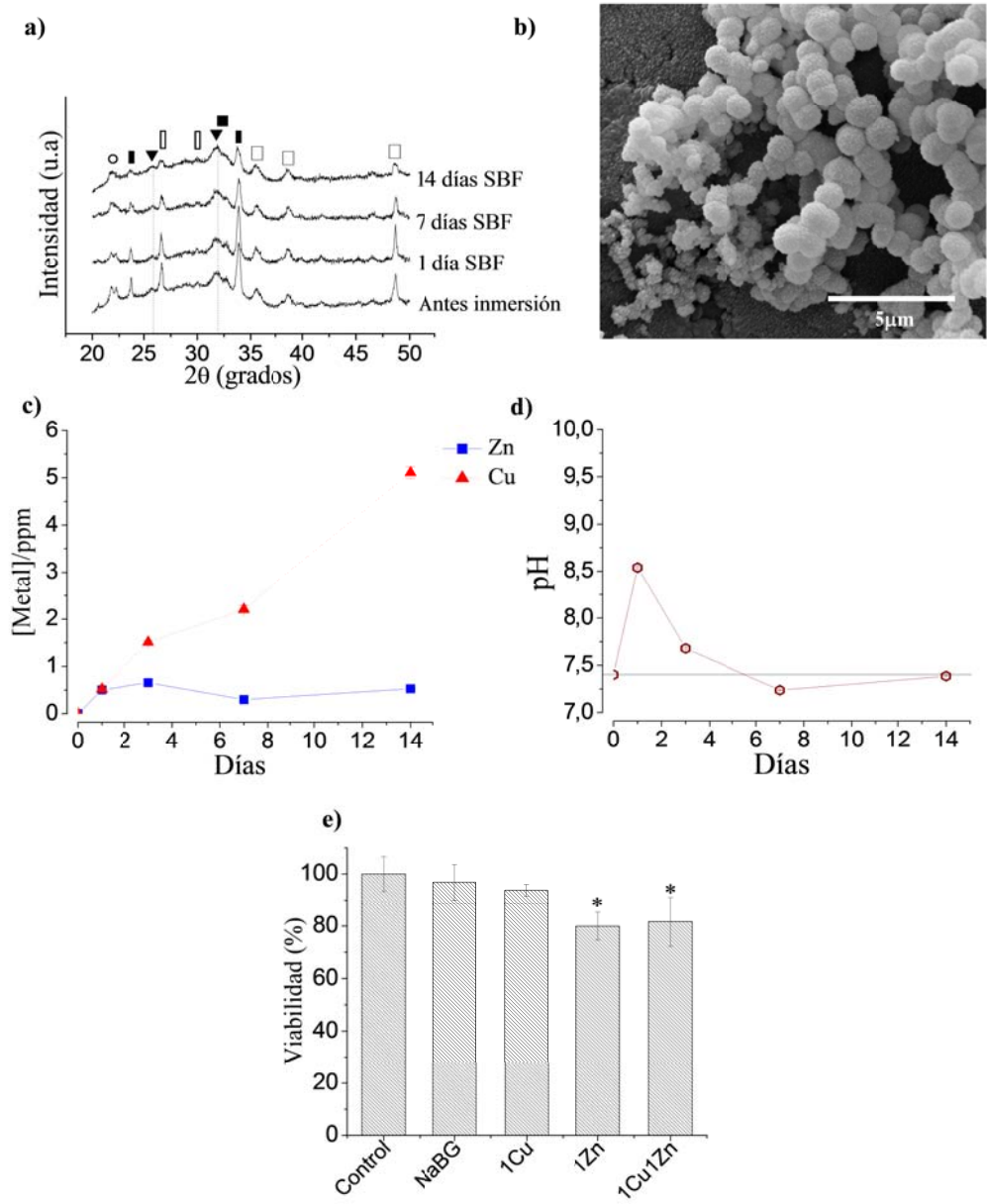


Figura 20. Propiedades del vidrio co-dopado 1Cu1Zn-NaBG. a) DRX y b) SEM para evaluar formación de HA, c) liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , d) cambio de pH en DMEM (Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=4)) y e) citocompatibilidad del 1Cu1Zn-NaBG comparada con los vidrios NaBG, 1Cu-NaBG y 1Zn-NaBG. * Diferencia significativa estadísticamente entre los grupos experimentales y el control ($p < 0.01$). Las fases cristalinas fueron etiquetadas como sigue: (□) CuO, (■) Ca_2SiO_4 , (▼) HA, (▨) $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, (▧) CaSiO_3 , (▽) CaCO_3 , (°) Cristobalita (SiO_2).

El vidrio co-dopado mostró buena bioactividad por la aparición de los pico característicos de la HA después del primer día de inmersión en SBF (Figura 20a). Estos resultados fueron confirmados por la presencia de gránulos de apatita en la superficie del vidrio observados por SEM (Figura 20b). La liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} en medio de cultivo DMEM (Figura 20c) confirmó la relación entre la movilidad del ion metálico y la interacción con la estructura del vidrio, ya que los iones Cu^{+2} se liberaron en mayor cantidad que los iones Zn^{+2} . La liberación de

iones Na^+ y Ca^{+2} (Figura 20d) aumentó el pH durante el primer día de inmersión hasta alrededor de $\text{pH}=8.5$, sin embargo, luego fue balanceado hasta el pH fisiológico (alrededor de $\text{pH}=7.4$). El ensayo de citotoxicidad a 24 h (Figura 20e) mostró que en presencia del vidrio 1Cu1Zn-NaBG se da una alta viabilidad celular para una liberación iónica de 0.52 ppm de Cu^{+2} y 0.51 ppm de Zn^{+2} . Estos valores de liberación son mas bajos que el umbral de citotoxicidad (3.0 ppm) descrito anteriormente, dándole validez a este valor. Los resultados antes mencionados sugieren que el vidrio 1Cu1Zn-NaBG es un material bioactivo y no toxico a las células SaOS-2 de acuerdo al criterio de toxicidad descrito anteriormente, permitiendo la conclusión que puede ser un biomaterial con potencial terapéutico y antibacterial debido a la combinación de los efectos benéficos del Cu y el Zn.

5.1.6. Procesamiento y caracterización de los vidrios usados en los scaffolds

5.1.6.1. Propiedades de las partículas de vidrio

De acuerdo a los resultados descritos en los subcapítulos anteriores, los vidrios que mostraron mayor bioactividad y citocompatibilidad fueron los vidrios basados en el sistema cuaternario NaBG dopados con 1%mol de CuO y ZnO (1Cu-NaBG y 1Zn-NaBG, respectivamente), y el vidrio co-dopado con los dos iones metálicos (1Cu1Zn-NaBG). Por tanto, estos fueron los vidrios seleccionados para fabricar los materiales compuestos porosos con matriz de PDLA. Para garantizar una mejor interacción de las partículas de vidrio con la matriz porosa, se realizó una reducción de tamaño por molienda manual en un mortero de ágata y una clasificación por tamizado a tamaños menores de 38 μm . La Tabla 5 muestra las propiedades de las partículas, donde se observa que los tamaños medios d_{50} están entre 14.4 y 21.6 μm , lo que representó un aumento apreciable en el área superficial específica desde 15 m^2/g (Tabla 4) asta 56 m^2/g (Tabla 5) para el vidrio NaBG, producto de la disminución de tamaños (desde $d_{50}=37.5 \mu\text{m}$ hasta $d_{50}=14.4 \mu\text{m}$). En el caso de los vidrios NaBG dopados con Cu y/o Zn no se observó un aumento apreciable del área superficial con la disminución de tamaño debido posiblemente a la muy baja porosidad de estas partículas (Tabla 5) lo que hace que los cambios de área superficial no sean detectables por la sensibilidad del equipo. Se observó que la incorporación de Cu y/o Zn disminuyó el área superficial y la porosidad del vidrio NaBG tal como fue discutido en los subcapítulos anteriores, así mismo, aumentó la densidad del vidrio.

Tabla 5. Propiedades de los vidrios derivados del NaBG usados en los materiales compuestos.

Código del vidrio	Propiedades de las partículas					
	A_s (μm)			ρ (g/cm^3)	S_a (m^2/g)	V_p (cm^3/g)
	d_{10}	d_{50}	d_{90}			
NaBG	5.1	14.4	30.7	2.01	56	0.201
1Cu-NaBG	7.2	20.8	40.1	2.62	3	0.007
1Zn-NaBG	8.8	23.5	42.3	2.60	2	0.005
1Cu1Zn-NaBG	7.3	21.6	41.7	2.50	3	0.006

A_s : tamaño de particular promedio, S_a : área superficial específica, V_p : volumen de poro, Dia.: diámetro de poro

5.1.6.2. Formación de apatita en SBF

Se evaluó la bioactividad *in vitro* de los vidrios $<38 \mu\text{m}$, pero en este caso se realizó a los tiempos de inmersión de 1, 3 y 7 días. La Figura 21 muestra los DRX después de la inmersión en

SBF, donde todos los vidrios registraron bioactividad por la aparición de los picos de la apatita cristalina ($2\theta=25.9^\circ$ y 32°) después del primer día de inmersión, sin embargo la bioactividad también dependió de la presencia del ion metálico, tal como sucedió con lo descrito para las partículas $<75 \mu\text{m}$. Además, se observó un efecto del menor tamaño de partícula (vidrios $<38 \mu\text{m}$) en la formación y disolución de fases, conforme aumentó el tiempo de inmersión en SBF. Por ejemplo, para el vidrio 1Cu-NaBG (Figura 21b) aparecieron los picos de la HA desde el primer día de inmersión en SBF con una mayor intensidad a 3 y 7 días, que la observada en las partículas grandes. También se observó que la pequeña cristalización de CuO fue menos evidente para mayores tiempos de inmersión, indicando una aparente disolución. El mayor crecimiento de picos característicos de las fases HA y CaCO_3 , y la aparente disolución de fases más estables como el CuO en los vidrios $<38 \mu\text{m}$ comparado con los vidrios $<75 \mu\text{m}$ (Figura 15), puede ser explicado por el menor tamaño de partícula y mayor área superficial de los vidrios $<38 \mu\text{m}$, lo que generó un aumento de reactividad con el medio.[49]

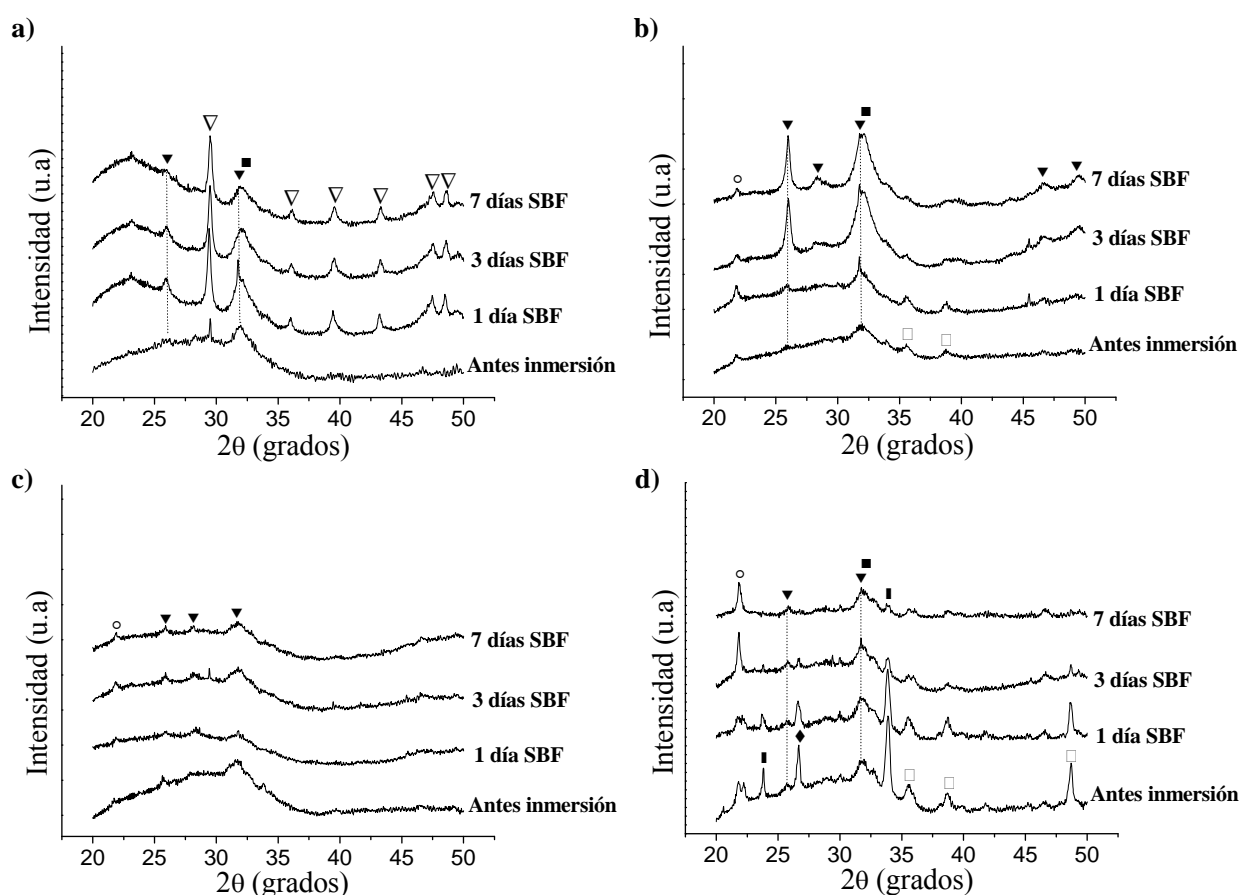


Figura 21. DRX de los vidrios derivados del NaBG ($<38 \mu\text{m}$) después de la inmersión por 1, 3 y 7 días en SBF. a) NaBG, b) 1Cu-NaBG, c) 1Zn-NaBG y d) 1Cu1Zn. Las fases cristalinas fueron etiquetadas como sigue (□) CuO, (■) Ca_2SiO_4 , (▼) HA, (▭) $\text{Na}_2\text{CaSiO}_4$, (▽) CaCO_3 , (°) Cristobalita (SiO_2), (◆) SiP_2O_7 .

La Figura 22 muestra las imágenes SEM de la superficie de los vidrios evidenciando morfologías diferentes en la cristalización de la apatita según el tipo de vidrio, reproduciendo lo observado en las partículas de mayor tamaño.

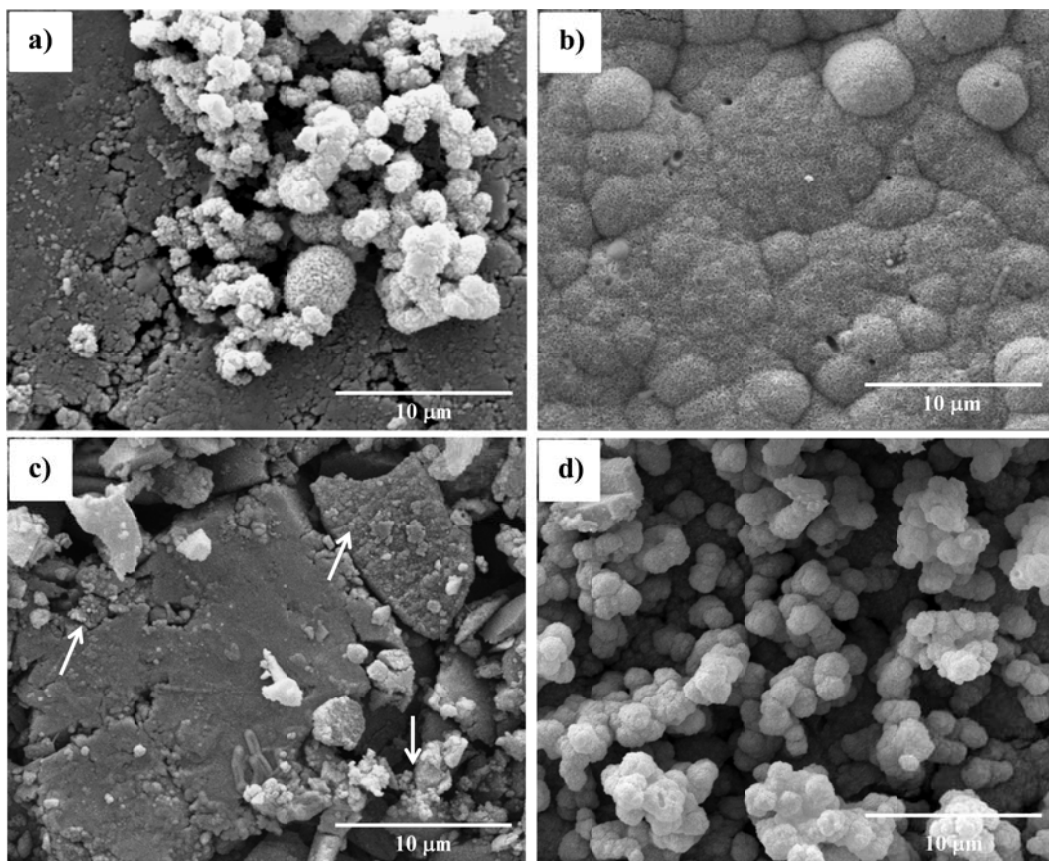


Figura 22. Imágenes SEM de la superficie de los vidrios derivados del NaBG (<38 µm) después de la inmersión por 7 días en SBF. a) NaBG, b) 1Cu-NaBG, c) 1Zn-NaBG (flechas blancas indicando algunas zonas con apatita) y d) 1Cu1Zn-NaBG.

5.1.6.3. *Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , y cambios de pH*

La Figura 23 muestra la liberación de los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los vidrios derivados del NaBG en medio de cultivo DMEM/F12. La liberación tuvo un comportamiento similar al registrado por las partículas de vidrio mas grandes (Figura 17b y 17d). En particular, la liberación de los iones Cu^{+2} desde el vidrio 1Cu-NaBG aumentó casi a una velocidad constante conforme avanzaba el tiempo de inmersión hasta alcanzar alrededor de 30.0 ppm de Cu^{+2} a 14 días, mientras que el vidrio co-dopado 1Cu1Zn-NaBG liberó aproximadamente 7 veces menos cantidad de Cu. Los iones Zn^{+2} desde el vidrio 1Zn-NaBG se liberaron 30 veces menos (0.67 ppm a 14 días) que los iones Cu^{+2} en el 1Cu-NaBG, mientras que el vidrio 1Cu1Zn-NaBG liberó menor cantidad de Zn^{+2} (0.4 ppm).

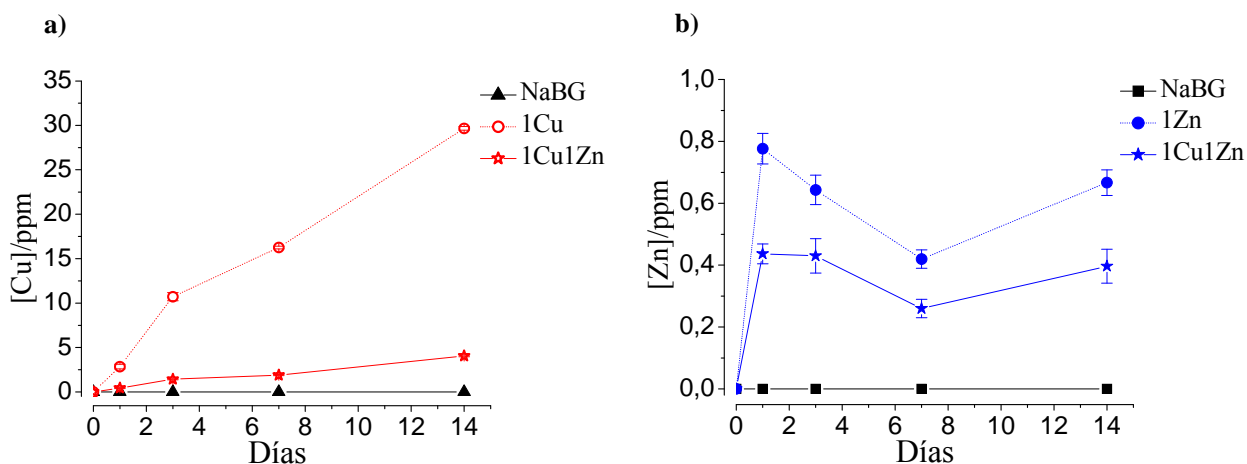


Figura 23. Liberación de iones metálicos desde los vidrios derivados del NaBG (<38 μm) en DMEM durante 1, 3, 7 y 14 días. a) Liberación de Cu^{2+} y b) liberación de Zn^{2+} .

La Figura 24 muestra el cambio de pH del medio DMEM durante 1, 3, 7 y 14 días de inmersión. Similar a la tendencia observada en los vidrios de partículas más grandes, durante el primer día se presentó un incremento del pH alcanzando valores alrededor 8.5, y posteriormente el pH disminuyó y se mantuvo hasta los 14 días alrededor del pH fisiológico 7.4. La incorporación de iones metálicos generó valores de pH un poco más altos, sin embargo se mantuvieron alrededor de 7.4 lo que no genera riesgo tóxico para las células.

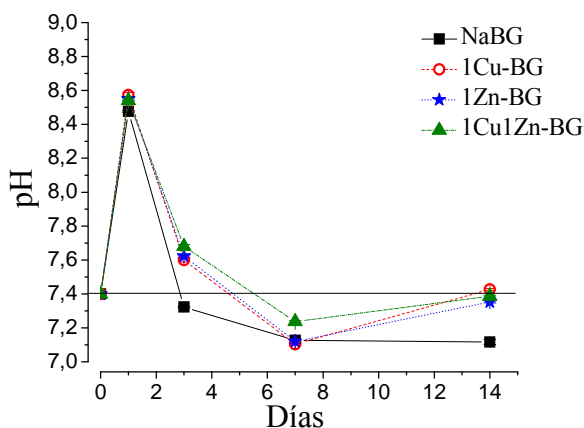


Figura 24. Cambios de pH en el medio DMEM/F12 después de la disolución de los vidrios bioactivos. Línea negra horizontal como referencia del pH fisiológico (pH=7.4).

5.1.6.4. *Citocompatibilidad a células osteoblastos*

La citocompatibilidad de las muestras <38 μm se evaluó con el ensayo de citotoxicidad MTT a 1, 3 y 7 días. La Figura 25 muestra el gráfico de barras con la viabilidad de la células SaOS-2, después de ser expuestas a las partículas de vidrio bioactivo.

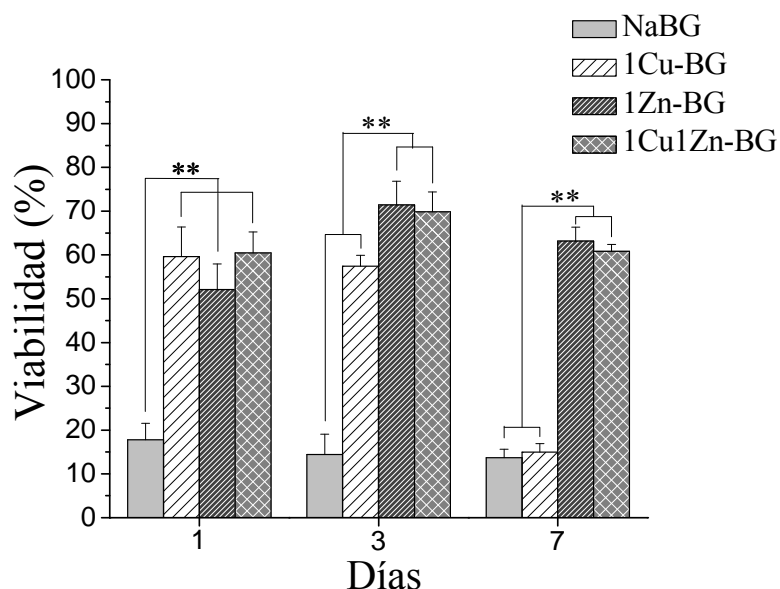


Figura 25. Citocompatibilidad a células SaOS-2 de los vidrios derivados del NaBG (<38 μ m). (**) Diferencia significativa entre los grupos experimentales ($p < 0.01$). Todas las muestras a los diferentes tiempos de exposición con las células tuvieron diferencia significativa ($p < 0.01$) con el control sin células el cual tuvo 100% de viabilidad (barra no mostrada).

El vidrio NaBG mostró citotoxicidad para los 3 tiempos de ensayo por su alta liberación de cationes (Ca^{+2} y Na^{+}) y aumento del pH hasta niveles tóxicos.[123, 138, 165] Se observa que a 1 día las partículas de NaBG <38 μ m presentaron citotoxicidad, mientras que las partículas grandes no registraron efecto toxico al mismo periodo de tiempo, lo que puede atribuirse a la mayor reactividad y liberación de iones desde las partículas pequeñas producto de su mayor área superficial.[49] De los vidrios dopados con iones metálicos, los menos citotóxicos fueron el 1Zn-NaBG y el 1Cu1Zn-NaBG. Lo anterior puede ser explicado debido a que estos vidrios fueron bastante estables en su estructura, con baja disolución y una liberación de iones Cu^{+2} (1Cu1Zn-NaBG) y Zn^{+2} (1Zn-NaBG y 1Cu1Zn-NaBG), menor a 2.0 ppm y 1.0 ppm a 7 días, respectivamente, lo que estaría por debajo del umbral toxico establecido (alrededor de 3.0 ppm). El vidrio 1Cu-NaBG fue considerablemente citotóxico a los 7 días de exposición a las células con una liberación de aproximadamente 16.0 ppm de iones Cu^{+2} , confirmando lo observado en las partículas mas grandes.

5.1.6.5. Evaluación del efecto antibacterial

Dada la alta incidencia de infecciones en implantes y la necesidad de que estos materiales sean resistentes a la colonización de películas bacterianas, se evaluó el efecto bactericida de los vidrios a 1, 3 y 7 días, y los resultados son mostrados en la Figura 26. Todos los vidrios tuvieron un efecto antibacterial significativo estadísticamente respecto al control (bacterias sin exposición a los vidrios) desde el primer día exposición.

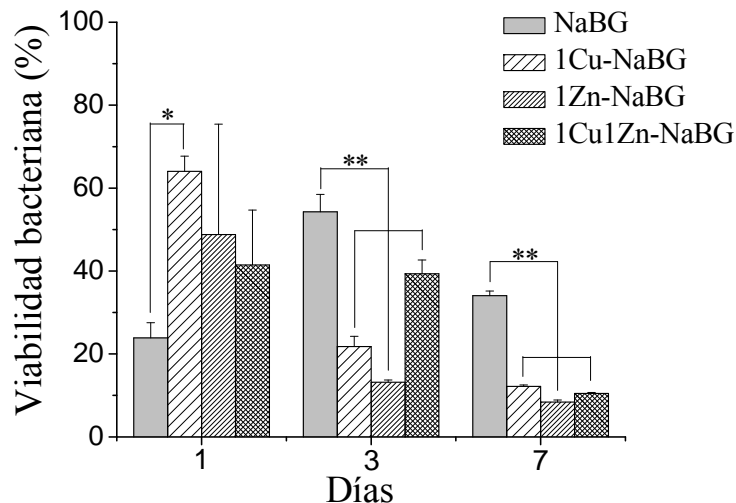


Figura 26. Efecto antibacterial de los vidrios derivados del NaBG a 1, 3 y 7 días de exposición a la bacteria *S. aureus* resistente a la meticilina. Diferencia significativa entre grupos con (*) $p < 0.05$ y (**) con $p < 0.01$.

Para el primer día el vidrio NaBG presentó un mayor efecto antibacterial que el mostrado por los vidrios dopados con iones metálicos (1Cu-NaBG, 1Zn-NaBG, 1Cu1Zn-NaBG), lo que es debido a la mayor disolución que experimenta el vidrio NaBG comparado con los vidrios dopados, generando una mayor liberación de iones Ca^{+2} y altos valores de pH (Figura 14b y Figura 22, respectivamente). Estos son factores tóxicos para las bacterias tal como ha sido reportado en varios estudios.[173–176] Para los días 3 y 7, se evidenció un mayor efecto antibacterial de los vidrios dopados con Cu y/o Zn respecto al vidrio no dopado. A los 7 días la inhibición al crecimiento bacteriano fue de 65.2, 87.8, 91.7 y 89.6% para los vidrios NaBG, 1Cu-NaBG, 1Zn-NaBG y 1Cu1Zn-NaBG, respectivamente. Lo anterior evidencia que los iones metálicos aumentaron el efecto bactericida que generó el NaBG por los factores antes mencionados (pH y liberación de Ca^{+2}). Esto se debe a que los iones como el Zn^{+2} y Cu^{+2} , a pesar de ser elementos traza importantes para el metabolismo, en el caso de un aumento en la concentración empiezan a interactuar con biomoléculas, modificando su función y promoviendo la oxidación que conlleva a un considerable estrés oxidativo, la formación de radicales libres y finalmente a la degradación de las biomoléculas al interior de la bacteria provocando su muerte.[35, 69, 87]

Si comparamos el efecto antibacterial con la citotoxicidad a células osteoblastos SaOS-2, se evidencia que a los 7 días, el vidrio NaBG y 1Cu-NaBG resultaron ser citotóxicos a los osteoblastos al igual que antibacteriales, mientras que los vidrios 1Zn-NaBG y 1Cu1Zn-NaBG no presentaron citotoxicidad a osteoblastos pero si fueron antibacteriales. Esto se debe a la diferencia en la asimilación o mecanismos de resistencia a metales pesados de las bacterias y los osteoblastos.[177]

5.2. Preparación y caracterización de materiales compuestos porosos PDLLA/vidrio bioactivo con Cu y/o Zn

El procedimiento definido para preparar los scaffolds fue la liofilización con lixiviado de cristales de NaCl. Sin embargo, se realizaron pruebas solamente con liofilización para establecer las diferencias en la estructura y tamaños de poro. En particular, la Figura 27 muestra las

imágenes SEM de los scaffolds producidos solo por liofilización de la matriz de PDLLA y de un material compuesto con 30% en peso de vidrio bioactivo NaBG. En las Figura 27a y 27b se observa la superficie superior del scaffold de PDLLA y una sección transversal de la placa producida (aprox. 4.5 mm de espesor), respectivamente. La superficie superior (Figura 27a) mostró grandes poros (alrededor de 100-200 μm) por donde fue liofilizado el solvente DMC, mientras que la sección transversal (Figura 27b) mostró una morfología de poro alargada o tubular interconectada por poros mas pequeños (aprox. 10-50 μm) que es producto de la dirección de transferencia de calor durante el cristalización del DMC, tal como lo han reportado otros autores para scaffolds producidos por este tipo de técnicas (freeze-drying).[104, 122, 124] Por otro lado, el scaffold con 30% de vidrio producido por liofilización (Figura 27c y 27d) mostró superficies más irregulares por la presencia y exposición a la superficie de las partículas de vidrio. Los poros en este caso también fueron alargados pero un poco mas irregulares porque el vidrio impidió el alargamiento uniforme de la matriz durante el enfriamiento y liofilización del solvente. Resultados similares han sido reportados por Maquet et al. en scaffolds de PDLLA/Bioglass® producidos por freeze-drying.[122]

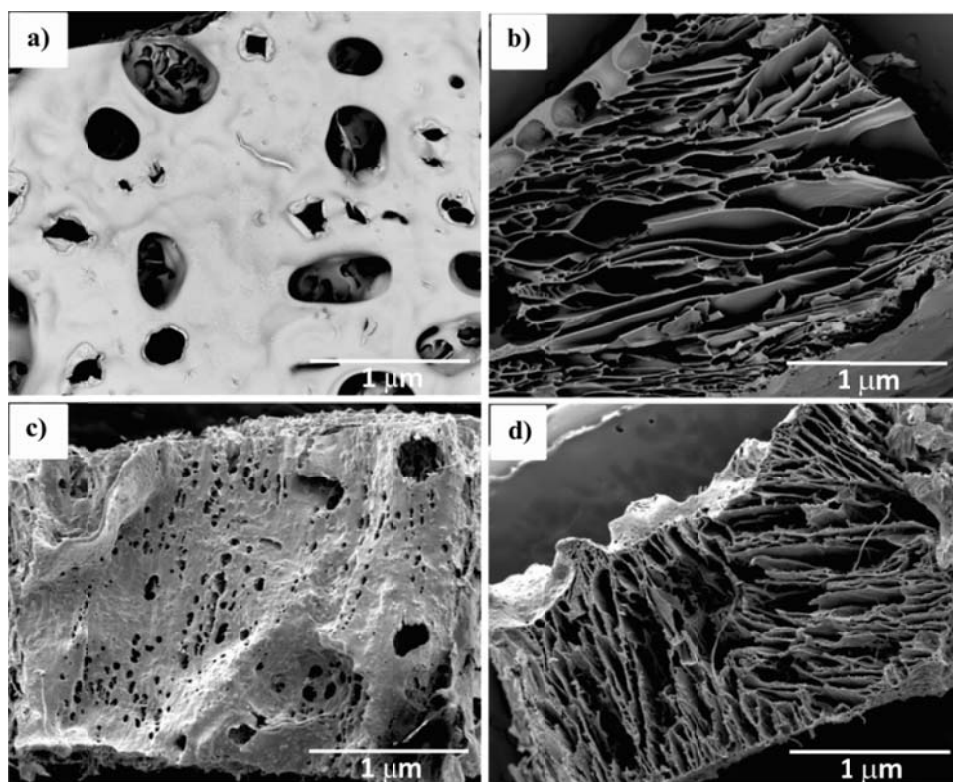


Figura 27. Imágenes SEM de los scaffolds producidos por liofilización. a) Superficie superior y b) sección transversal de la matriz PDLLA. c) superficie superior y d) sección transversal del scaffold con 30% en peso de vidrio bioactivo NaBG.

Los poros generados usando solamente liofilización no fueron considerados adecuados, ya que los poros alargados podrían llevar a deficiencias en las propiedades mecánicas debido a la anisotropía [16], además cuando se realizan placas de scaffold, los poros alargados son verticales lo que limita la proliferación celular y vascularización en dirección horizontal (dirección de crecimiento celular en secciones del cráneo o cara). Por tal razón, los scaffolds fueron preparados por liofilización combinada con lixiviado de porógeno para generar una porosidad mas regular de alta interconectividad.

La apariencia de los scaffolds (discos de 15 cm x 0.45 cm) preparados por liofilización con lixiviado de NaCl es mostrada en la Figura 28. A pesar que los vidrios con cobre presentaban un color gris-azul el material compuesto no mostró una coloración apreciable lo que es favorable desde el punto de vista estético. Se prepararon scaffolds de PDLLA con incorporación de micropartículas de los vidrios en un 10% (PDLLA/10-NaBG, PDLLA/10-1CuBG, PDLLA/10-1ZnBG y PDLLA/10-1Cu1ZnBG) y 30% (PDLLA/30-NaBG, PDLLA/30-1CuBG, PDLLA/30-1ZnBG y PDLLA/30-1Cu1ZnBG) en peso.

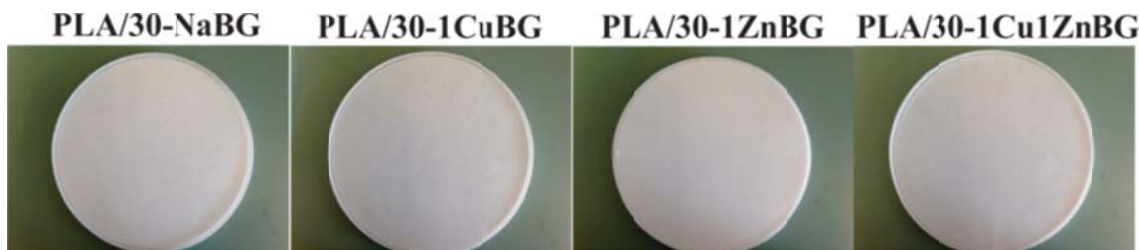


Figura 28. Fotografía de los scaffolds compuestos preparados por liofilización y lixiviado de NaCl. No se observa un cambio de color significativo por efecto de la incorporación de los vidrios con Cu, conservando un tono casi blanco.

5.2.1. Porosidad teórica de los scaffolds

La Tabla 6 muestra la densidad aparente del scaffold (ρ), la densidad del material sólido (ρ_o) y la porosidad teórica (P) calculada para cada uno de los scaffolds preparados. La densidad aparente considera la porosidad de la muestra, ya que se mide el volumen incluyendo los poros (aire).

Tabla 6. Densidades y porosidad total de los scaffolds

Scaffold	ρ (g/cm ³)	ρ_o (g/cm ³)	P (%)
PDLLA	0.083	1.26	93.4
PDLLA/10-NaBG	0.086	1.31	93.5
PDLLA/30-NaBG	0.090	1.42	93.7
PDLLA/10-1CuBG	0.091	1.33	93.2
PDLLA/30-1CuBG	0.102	1.49	93.2
PDLLA/10-1ZnBG	0.095	1.33	92.8
PDLLA/30-1ZnBG	0.106	1.49	92.9
PDLLA/10-1Cu1ZnBG	0.099	1.33	92.5
PDLLA/30-1Cu1ZnBG	0.112	1.48	92.4

ρ =densidad aparente del scaffold; ρ_o = densidad del material sólido; P= porosidad teórica del scaffold.

Los resultados de la Tabla 6 muestran que las densidades aparente (ρ) y del material sólido (ρ_o) aumentaron con la incorporación de los vidrios bioactivos a la matriz de PDLLA, tal como ha sido reportado en otros estudios.[122, 178] La porosidad teórica total estuvo alrededor del 93% para todos los scaffolds preparados, presentando una porosidad un poco más alta el scaffold de la matriz PDLLA y los preparados con el vidrio NaBG, posiblemente porque los vidrios dopados presentan una mayor densidad y restringen la formación de los poros durante la separación de fases en el enfriamiento y la cristalización del solvente. Altas porosidades como las

logradas en estos scaffolds (>92%) han mostrado ser favorables para la regeneración de hueso porque permiten una mayor infiltración celular y vascular.[125, 179]

5.2.2. Morfología y tamaño de poro

La Figura 29 muestra las imágenes SEM de los scaffolds obtenidos por liofilización con lixiviado de cristales de NaCl.

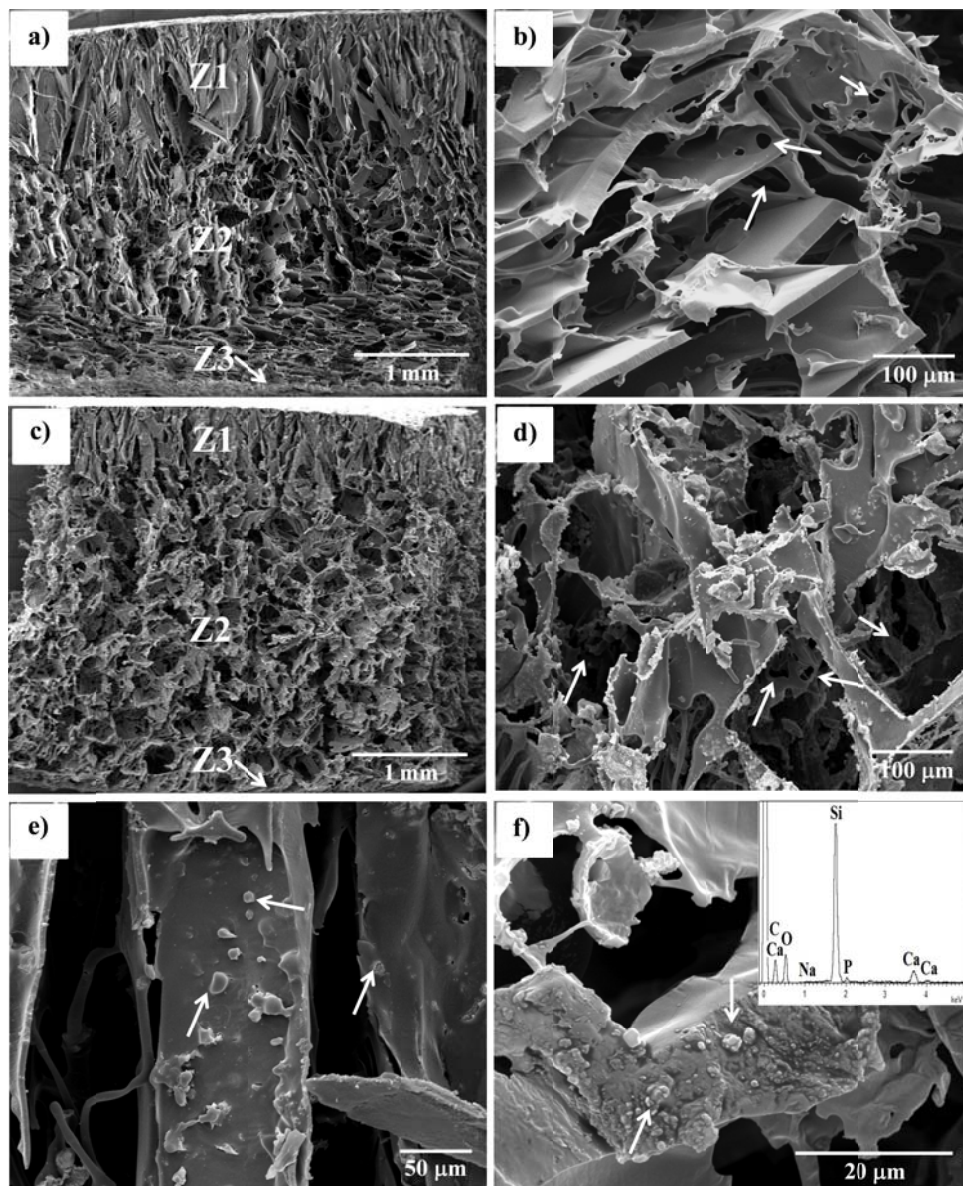


Figura 29. Imágenes SEM de la estructura de poro y la incorporación de las partículas de vidrio en los scaffolds fabricados por liofilización con lixiviado de NaCl. Porosidad estratificada en tres zonas (Z1, Z2 y Z3) en la sección transversal de los scaffolds a) PDLLA y c) PDLLA/30-NaBG. Poros pequeños (10-60 μm, señalizados con flechas blancas) interconectando a los poros de mayor tamaño (100-400 μm) en los scaffold b) PDLLA y d) PDLLA/30-NaBG. e) Partículas de vidrio expuestas en la superficie de los poros y f) partículas embebidas en las paredes del material compuesto PDLLA/30-NaBG (señalizadas con flechas blancas con su análisis composicional por EDS).

En la Figura 29a se evidencia la estructura y morfología de poro del scaffold de PDLA. A lo largo del espesor de la muestra (aprox. 4.5 cm) se observan tres zonas (Z1, Z2 y Z3). La Z1 es la capa superior del disco (aprox. 1.2 cm), compuesta de poros alargados o tubulares propia del método de liofilización, y se debe a la ausencia de cristales de NaCl debido a que estos alcanzaron a decantar antes de congelarse la estructura. La Z2 es la zona de mayor tamaño (aprox. 3.2 cm), de poros mas regulares entre 100-400 μm , producto del espacio que ocupaban las partículas de NaCl antes de ser disueltas. Este rango de porosidades es adecuado para el crecimiento celular y vascular en aplicaciones de regeneración ósea, tal como ha sido reportado en otros estudios.[119, 180, 181] Además, estos poros fueron interconectados por poros entre 10-60 μm (Figura 29b), lo que es muy favorable para el transporte de nutrientes, oxígeno y desechos, vascularización, y una mayor interacción celular.[94, 180, 182] La última zona (Z3) es una capa fina mas densa (aprox. 20-30 μm) producto del mojado y solidificación del polímero sobre el molde de PTFE (Teflón).

La sección transversal del scaffold PDLA/30-NaBG (Figura 29c) también mostró las tres zonas descritas para el scaffold de PDLA, pero en este caso las Z1 y Z2 presentaron diferencias (los materiales compuestos con los otros vidrios presentaron una porosidad similar). Por ejemplo, la Z1 tuvo un espesor un poco menor (aprox. 0.9 cm) que la del scaffold de PDLA (aprox. 1.2 cm), lo cual pudo deberse a que los cristales de NaCl no lograron decantar en la misma proporción debido al obstáculo generado por la presencia de las partículas de vidrio en la solución de polímero. Respecto a la Z2, se observó un espesor un poco mayor (aprox. 3.5 cm) comparado al mostrado por la Z2 del scaffold de PDLA (aprox. 3.2 cm), conservando los poros de 100-400 μm pero con mayor regularidad a causa de una mejor dispersión y acomodamiento de los cristales de NaCl, generada por la presencia de las partículas de vidrio. La Z3 no mostró diferencias significativas por la incorporación de las partículas de vidrio. Por otro lado, la Figura 29d muestra los pequeños poros entre 10-60 μm que interconectan los grandes poros, y se observó una mayor interconectividad que la registrada por el scaffold de PDLA. Además, las paredes de los poros del scaffold compuesto se observaron mas irregulares o distorsionadas por la obstrucción que generan las partículas durante la separación de fases y la cristalización del solvente, tal como ha sido reportado por otros estudios.[121, 124, 183] La estratificación en la porosidad de los scaffolds producidos por liofilización y lixiviado de NaCl (Z1, Z2 y Z3), representa una alternativa potencial para aplicaciones de regeneración craneofacial, ya que estos huesos presentan zonas más densas en las capas externas y en la zona central una estructura de alta porosidad interconectada.

La Figura 29e muestra el material compuesto PDLA/30-NaBG con algunas partículas de vidrio expuestas en la superficie de las paredes de los poros, lo que es benéfico para aumentar la bioactividad de la superficie del scaffold y para una liberación temprana de iones con fines terapéuticos (Cu^{+2} y Zn^{+2}) en el caso de los scaffolds con los vidrios dopados. También se observaron partículas de vidrio más pequeñas (Figura 29d) embebidas dentro de las paredes de los poros, lo que ayudaría a que la bioactividad se conserve a largo plazo conforme se vaya degradando el PDLA, además favorece un posible efecto de reforzamiento en la matriz de polímero. De acuerdo a varias imágenes SEM (no mostradas) fue posible observar que las partículas de vidrio mostraron una dispersión homogénea en la matriz y en todo el volumen del scaffold. Con el fin de ilustrar lo observado por SEM, la Figura 30 muestra un esquema de las paredes de los poros del scaffold con la distribución de las partículas de vidrio, observándose partículas completamente embebidas dentro de las paredes de poro y otras partículas (generalmente mas grandes) con parte de su superficie expuesta.

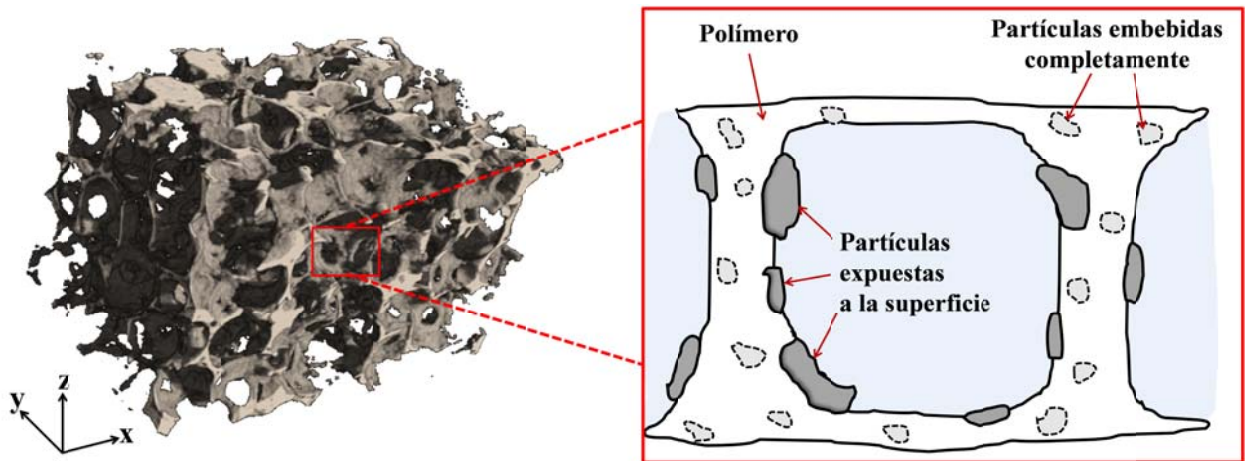


Figura 30. Esquema de una sección de los poros mostrando la distribución de las partículas de vidrio. La imagen 3D de un scaffold fue tomada como referencia de [184] y modificada. Se observan las partículas totalmente embebidas en la matriz en el corte de las paredes de los poros, mientras que otras partículas dejaron expuestas parte de su superficie dentro del volumen de los poros.

5.2.3. Propiedades a compresión

El comportamiento a compresión de los scaffolds con 0, 10 y 30% de vidrio bioactivo es mostrado en la Figura 31. Todas las curvas tuvieron la misma tendencia mostrando tres zonas típicas del ensayo a compresión de una espuma, tal como ha sido reportado en otros estudios.[120, 185] La primera zona está ubicada a bajos esfuerzos y es llamada zona lineal elástica, donde el material sólido (paredes de poro) soporta cargas deformándose en baja proporción y cuando la carga es retirada, la estructura (cadenas poliméricas) vuelve a sus posiciones de equilibrio y recupera sus dimensiones iniciales. En este caso, esta zona lineal elástica se caracterizó por no tener un final bien definido (punto de fluencia o inicio de la deformación plástica), sino una transición atenuada desde el final de la zona de linealidad (5-8% de deformación aprox.) hasta una zona de bajo cambio de esfuerzo. La ausencia de un punto de fluencia bien definido es debido a la alta porosidad de estos scaffolds y a su estructura altamente interconectada. La zona de bajo cambio de esfuerzo con apariencia de plateau corresponde a la segunda zona, caracterizada por el doblamiento de las paredes de los poros y su deformación plástica.[185] Cuando la estructura porosa ha sufrido gran deformación, se llega a un colapso y a un inicio de densificación, la cual inició a alrededor de 40% de deformación. Esta densificación pertenece a la tercera zona y se debe a que las paredes de poro, después de su colapso, llegan a estar en contacto generando un material de menor porosidad. Este material más denso tiene la capacidad de soportar mas carga por lo que la resistencia a la compresión aumentó considerablemente. La incorporación de vidrios bioactivos al scaffold de PDLA hizo que la zona de densificación empezara a menor deformación (acortó la zona 2) y se alcanzara mayores resistencias a compresión, lo que hace mas notorio el efecto de reforzamiento que ejercen las partículas de vidrio.

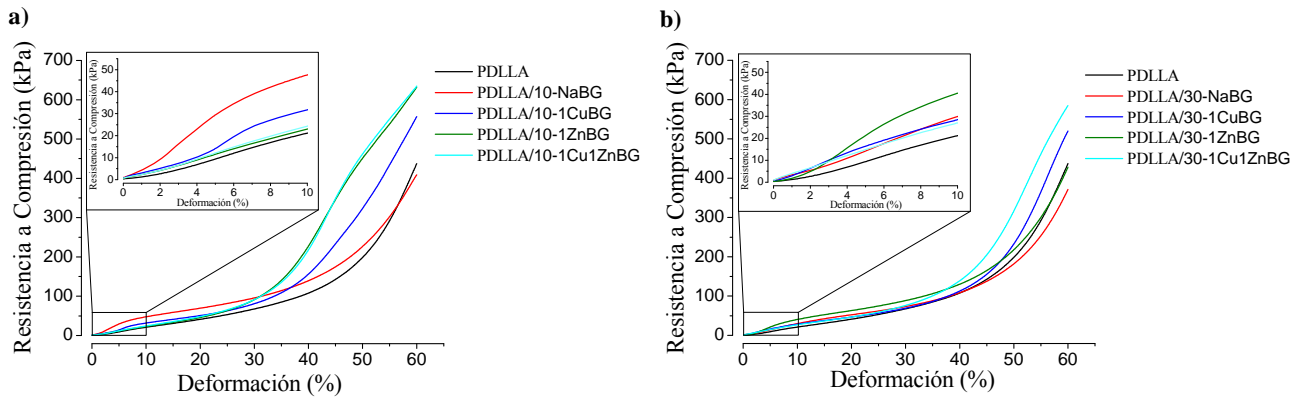


Figura 31. Curva esfuerzo vs. deformación del ensayo a compresión a los scaffolds con a) 10% y b) 30% de vidrio bioactivo.

A partir de estas curvas esfuerzo vs deformación se pueden extraer dos propiedades importantes de los scaffolds, el módulo de elasticidad y la resistencia a la compresión. La Figura 31 muestra las zonas ampliadas hasta un 10% de deformación desde donde fueron calculadas estas dos propiedades. El módulo de elasticidad o módulo de Young se calculó como la pendiente de la curva en la zona elástica o zona principalmente lineal, y esta relacionado con la rigidez del material. En la Tabla 7 se observa que la incorporación de 10% del vidrio NaBG generó un aumento del 130% en el módulo del scaffold de PDLLA. Lo anterior se debió al mayor módulo de las partículas de vidrio y la transferencia de cargas entre el polímero y las partículas, tal como ha sido reportado en otros estudios.[120, 185] Este incremento en módulo debido a la incorporación del NaBG fue menor para los scaffolds con vidrios dopados con Cu y/o Zn, debido posiblemente a las diferencias en las propiedades de las partículas (densidad y porosidad), la distribución de las partículas en la matriz o la interface polímero-vidrio. La mayor incorporación de vidrio (scaffolds con 30% en peso) no aumentó el valor del módulo como debería ser esperado, posiblemente por la aglomeración de partículas y la inclusión de defectos en la interfaz polímero-vidrio por la falta de adherencia entre las fases, tal como se ha descrito en otros estudios.[99, 102, 186] Los módulos de elasticidad obtenidos para estos scaffolds, en general fueron mucho mas bajos que el módulo del hueso trabecular (alrededor de 10^5 kPa)[11] o módulos reportados en otros estudios para materiales similares (alrededor de 10^2 kPa),[102, 120] lo que se puede explicar por una mayor interconectividad y menor consolidación de las paredes de los poros de nuestros scaffolds.

La resistencia a compresión de los scaffolds fue tomada como el esfuerzo soportado por el scaffold después de finalizar la zona elástica (10% de deformación). Los resultados de la Tabla 7, en general mostraron que la resistencia a la compresión no aumentó significativamente con la incorporación de las partículas de vidrio, lo que esta relacionado a la gran influencia que ejerce la alta porosidad e interconectividad, disminuyendo un posible efecto de reforzamiento de las partículas (obstrucción al movimiento de las cadenas poliméricas en la deformación plástica) y permitiendo que el doblez de las paredes de poro tenga mayor influencia durante la deformación. Además, solo una proporción de las partículas de vidrio quedaron completamente embebidas en la matriz, mientras que otras partículas quedaron con superficie expuesta, disminuyendo el área efectiva para transferencia de carga y reforzamiento. La resistencia a la compresión mostrada por estos scaffolds también se encuentra muy por debajo de la registrada para el hueso trabecular

(alrededor de 2000 kPa),[11] y similar o menor a la reportada en otros estudios para sistemas parecidos (40-90 kPa).[102, 120, 131]

Tabla 7. Propiedades a compresión de los scaffolds.

Soporte poroso	Resistencia Compresión a 10% de deformación (kPa)	Módulo de Young (kPa)
PDLLA	30.3 ± 3.3	2.3 ± 0.3
PDLLA/10-NaBG	47.8 ± 6.7	5.3 ± 0.3
PDLLA/30-NaBG	29.1 ± 3.6	3.1 ± 0.3
PDLLA/10-1CuBG	31.9 ± 3.6	4.2 ± 1.1
PDLLA/30-1CuBG	28.9 ± 3.2	3.5 ± 0.4
PDLLA/10-1ZnBG	24.0 ± 2.7	2.8 ± 0.6
PDLLA/30-1ZnBG	40.5 ± 6.5	5.4 ± 1.2
PDLLA/10-1Cu1ZnBG	26.0 ± 2.6	2.8 ± 0.6
PDLLA/30-1Cu1ZnBG	27.0 ± 3.4	2.8 ± 0.5

Los resultados de las propiedades a compresión mostradas por estos scaffolds aun son bajas comparadas con el hueso trabecular que soporta carga. Por lo que en estas condiciones, estos materiales solo podrían usarse en pequeños defectos craneofaciales o ser implantados en defectos más grandes con ayuda de un soporte. El diseño de materiales altamente porosos y con porosidad interconectada para mejorar la regeneración ósea, aun son un reto en cuanto a propiedades mecánicas, especialmente en soportes de matriz polimérica.

5.3. Evaluación de la bioactividad, degradación y control bacterial *in vitro* de los scaffolds

Los scaffolds fabricados fueron caracterizados en su bioactividad, degradación y liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} . La bioactividad se evaluó con los ensayos: formación de apatita en SBF, compatibilidad con células madres, capacidad osteogénica (actividad ALP) y angiogénica (actividad VEGF). La evaluación de la degradación en PBS se realizó midiendo la absorción de agua, el cambio de peso y de pH. La capacidad antibacterial fue evaluada por la medición de la viabilidad bacteriana después del contacto directo del scaffold con las bacterias.

5.3.1. Formación de apatita en SBF

Los scaffolds estuvieron inmersos en SBF durante 1, 7, 14 y 28 días para evaluar la formación de apatita en la superficie del material. La evaluación se realizó usando las técnicas DRX, ATR-FTIR y SEM. La Figura 32 muestra los DRX para los scaffolds PDLLA/10-NaBG y PDLLA/30-NaBG con 1, 7, 14 y 28 días de inmersión en SBF. No fueron observadas fases relacionadas al PDLLA debido a su carácter amorfo. Estos scaffolds presentaron los picos principales del NaCl ($2\theta=31.7^\circ$ y 45.5°) desde antes de la inmersión en SBF, lo que muestra la presencia de residuos de los cristales usados como porógeno, tal como ha sido reportado en otros estudios.[94] Sin embargo, esta sal remanente tuvo una aparente disolución conforme aumentó el tiempo de inmersión. El CaCO_3 fue otra fase presente en los scaffolds (proveniente de la carbonatación del vidrio) que también sufrió disolución. En la Figura 32a se muestran los DRX del scaffold PDLLA/10-NaBG, donde se evidencian los picos principales de la apatita después de 7 días de inmersión en SBF ($2\theta=25.9^\circ$ y 32°). Lo anterior, muestra una disminución de la

bioactividad del vidrio al estar embebido en el PDLLA, debido a que el NaBG independiente mostró formación de apatita desde el primer día de inmersión en SBF (Figura 21a). Esta menor formación de apatita se debe a que el polímero cubrió la superficie de las partículas de vidrio y generó una barrera física que evita la rápida reacción del vidrio con el medio. Esta barrera física se potencia por el carácter hidrofóbico del PDLLA, debido a los grupos metilo, lo que disminuye la mojabilidad y la difusión del SBF entre las cadenas del polímero.[99] Sin embargo, parte de las partículas de vidrio tienen expuesta superficie al SBF, favoreciendo una rápida reacción para formar apatita. Esta rápida reacción también podría favorecer la degradación del vidrio, generando poros e interfaces por donde puede ingresar el SBF y mojar las partículas de vidrio más embebidas. Para tiempos de inmersión más largos (14 y 28 días), el scaffold PDLLA/10-NaBG presentó los picos característicos de la apatita con mayor claridad e intensidad, incluso se observaron otros picos de la apatita ubicados a $2\theta=46.7^\circ$ y 49.5° . El aumento en la incorporación de vidrio de la muestra PDLLA/30-NaBG (Figura 32b) aumentó la formación de apatita en el scaffold, mostrada por la mayor intensidad de sus picos característicos comparados con los del scaffold PDLLA/10-NaBG. Otros estudios también han mostrado que la formación de apatita en SBF aumentó con la mayor incorporación de vidrio bioactivo en el polímero PDLLA.[124]

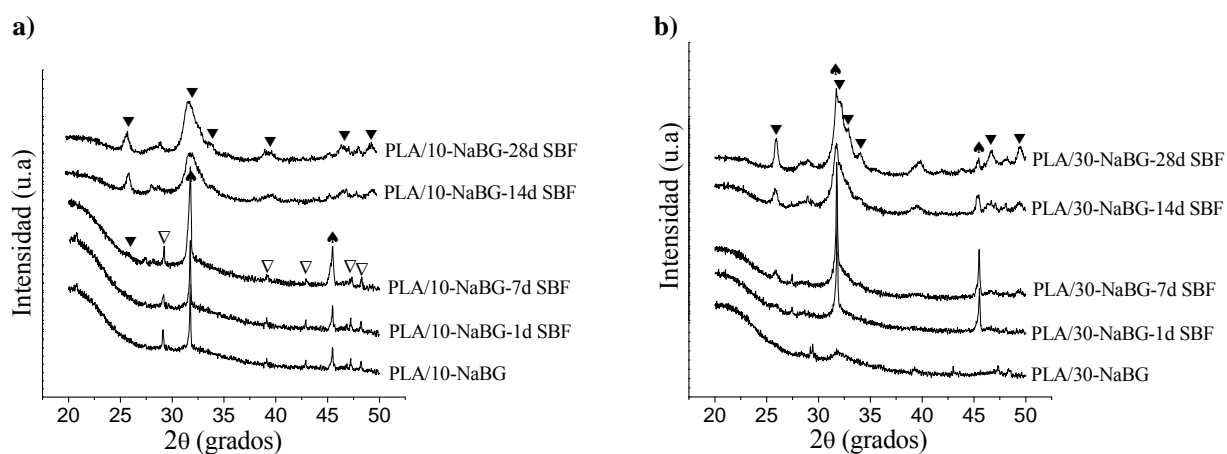


Figura 32. Evaluación por DRX de la formación de la capa de apatita en la superficie de los scaffolds con NaBG después de la inmersión en SBF por 1, 7, 14 y 28 días. Scaffolds a) PDLLA/10-NaBG y b) PDLLA/30-NaBG. Las fases cristalinas están etiquetadas: (▼) apatita, (▽) CaCO_3 y (▲) Halita (NaCl).

La Figura 33 muestra los DRX de los scaffolds con 10 y 30% en peso de los vidrios dopados con Cu y/o Zn después de la inmersión en SBF durante 7 y 28 días. Solo se mostraron los resultados a estos tiempos para mayor claridad en la visualización, además con estos tiempos fue suficiente para evaluar cualitativamente la formación de apatita. Para los scaffolds con vidrios dopados también se observó la tendencia que la formación de apatita aumentó con un mayor tiempo de inmersión en SBF y con mayor incorporación de vidrio bioactivo. El scaffold de PDLLA inmerso por 7 días (Figura 33a) no desarrolló apatita en su superficie por la ausencia de sus picos principales a $2\theta=25.9^\circ$ y 32° , mientras que a 28 días se observó un pequeño pico alrededor de $2\theta=32^\circ$ que podría indicar alguna formación de CaP, sugiriendo la difusión de iones desde el SBF para formar algunos precipitados en la superficie del polímero (biomineralización).[133] El remanente del porógeno NaCl estuvo presente en algunos scaffolds, sin mostrar una tendencia clara de su disolución, lo que también podría sugerir que su aparición dependió de la muestra específica usada para el ensayo. La fase CaCO_3 también estuvo presente,

principalmente en los scaffolds con Zn, mientras que en los otros scaffolds se observó una disolución de esta fase. La Figura 33a y 33b muestra los DRX para los scaffolds con 10% de vidrio con inmersión de 7 y 28 días en SBF, respectivamente.

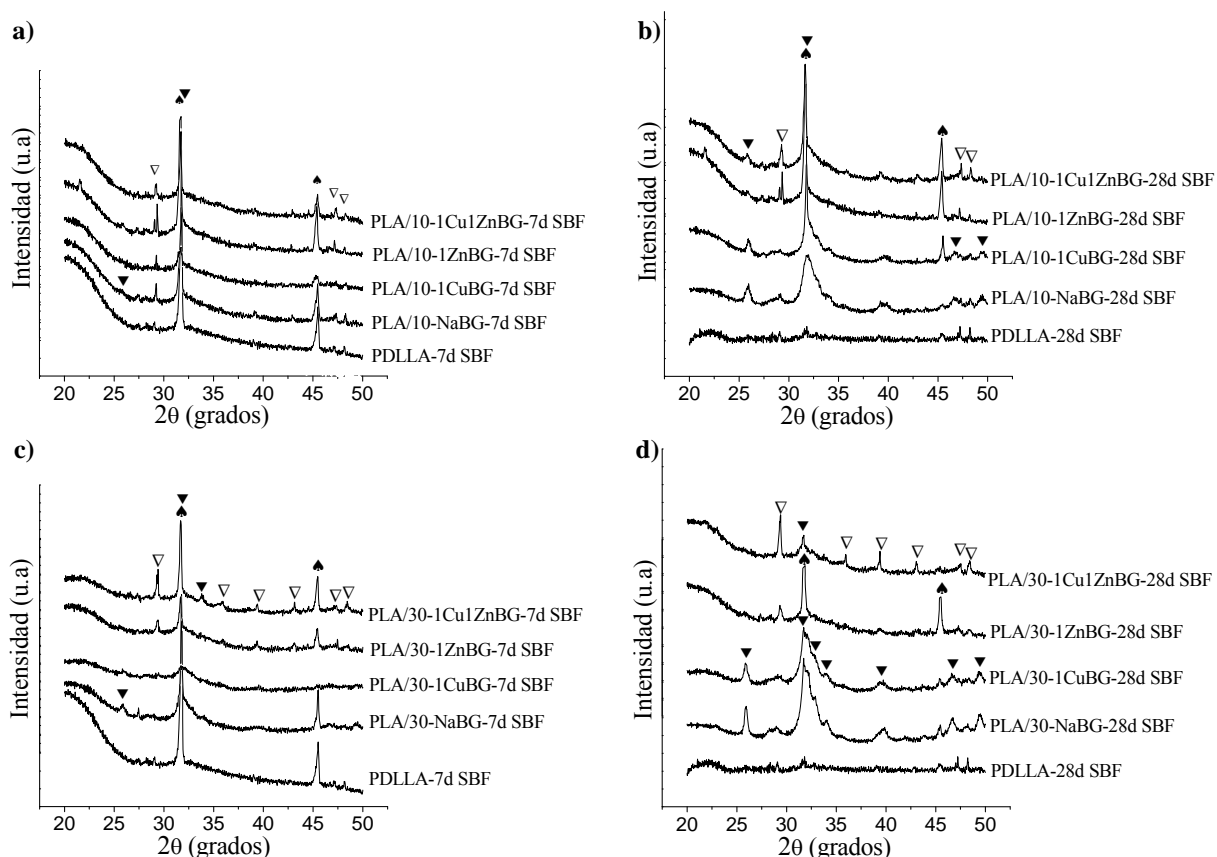


Figura 33. DRX de los scaffolds compuestos para evaluar la formación de apatita después de la inmersión en SBF por 7 y 28 días. Scaffolds con 10% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Scaffolds con 30% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Las fases cristalinas están etiquetadas como: (▼) apatita, (▽) CaCO_3 y (▲) NaCl .

El scaffold PDLLA/10-NaBG mostró una pequeña formación de apatita a 7 días de inmersión, mientras que los scaffolds PDLLA/10-1CuBG, PDLLA/10-1ZnBG y PDLLA/10-1Cu1ZnBG no presentaron una clara evidencia de apatita. Para 28 días en SBF (Figura 33b), estos scaffolds con vidrios dopados desarrollaron los picos de la apatita cristalina. Sin embargo, el scaffold PDLLA/10-1ZnBG mostró una fuerte inhibición a la formación de apatita. Los scaffolds con mayor cantidad de vidrio (30% en peso) mostraron un aumento en bioactividad (Figura 33c y 33d), especialmente los scaffolds PDLLA/30-NaBG y PDLLA/30-1CuBG, ya que la presencia de Zn en los scaffolds PDLLA/30-1ZnBG y PDLLA/30-1Cu1ZnBG inhibió en cierto grado la formación de apatita. Con el aumento en el tiempo de inmersión hasta 28 días (Figura 33d) fue notable el aumento de la formación de apatita, donde incluso aparecieron otros picos de la apatita de menor intensidad a $2\theta=32.9^\circ$, 34.1° y 39.8° en los scaffolds PDLLA/30-NaBG y PDLLA/30-1CuBG.

Para confirmar los resultados obtenidos con el DRX, la Figura 34 muestra los espectros ATR-FTIR de los scaffolds después de la inmersión en SBF por 7 y 28 días. Todos los espectros de los scaffolds mostraron las bandas características del PDLLA. A 1747 cm^{-1} se observó la banda del modo de estiramiento de los grupos carboxilos del grupo éster ($\text{C}=\text{O}$). En 1452 cm^{-1} están presentes los modos de deformación asimétrica del CH_3 . La banda en 1383 cm^{-1} representa la deformación simétrica $\delta_s \text{CH}_3$. Las bandas a 1045 , 1080 , 1129 , 1181 y 1267 cm^{-1} se refieren al modo de estiramiento del grupo éster $-\text{CO}-\text{O}-$. A 750 y 865 cm^{-1} se encuentran las bandas del enlace CH . [99, 187] La banda del vidrio NaBG a 1045 cm^{-1} correspondiente al enlace $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$, fue traslapada por las bandas del grupo éster del PDLLA. Para el scaffold de PDLLA no fueron observadas las bandas a 560 y 602 cm^{-1} correspondientes a la flexión antisimétrica del enlace $\text{P}-\text{O}$ de la apatita cristalina, [188, 189] sino una pequeña señal en esta misma zona que podría confirmar lo descrito por DRX sobre la posible presencia de algún precipitado de CaP en la superficie del PDLLA generado por la migración de iones desde el SBF.

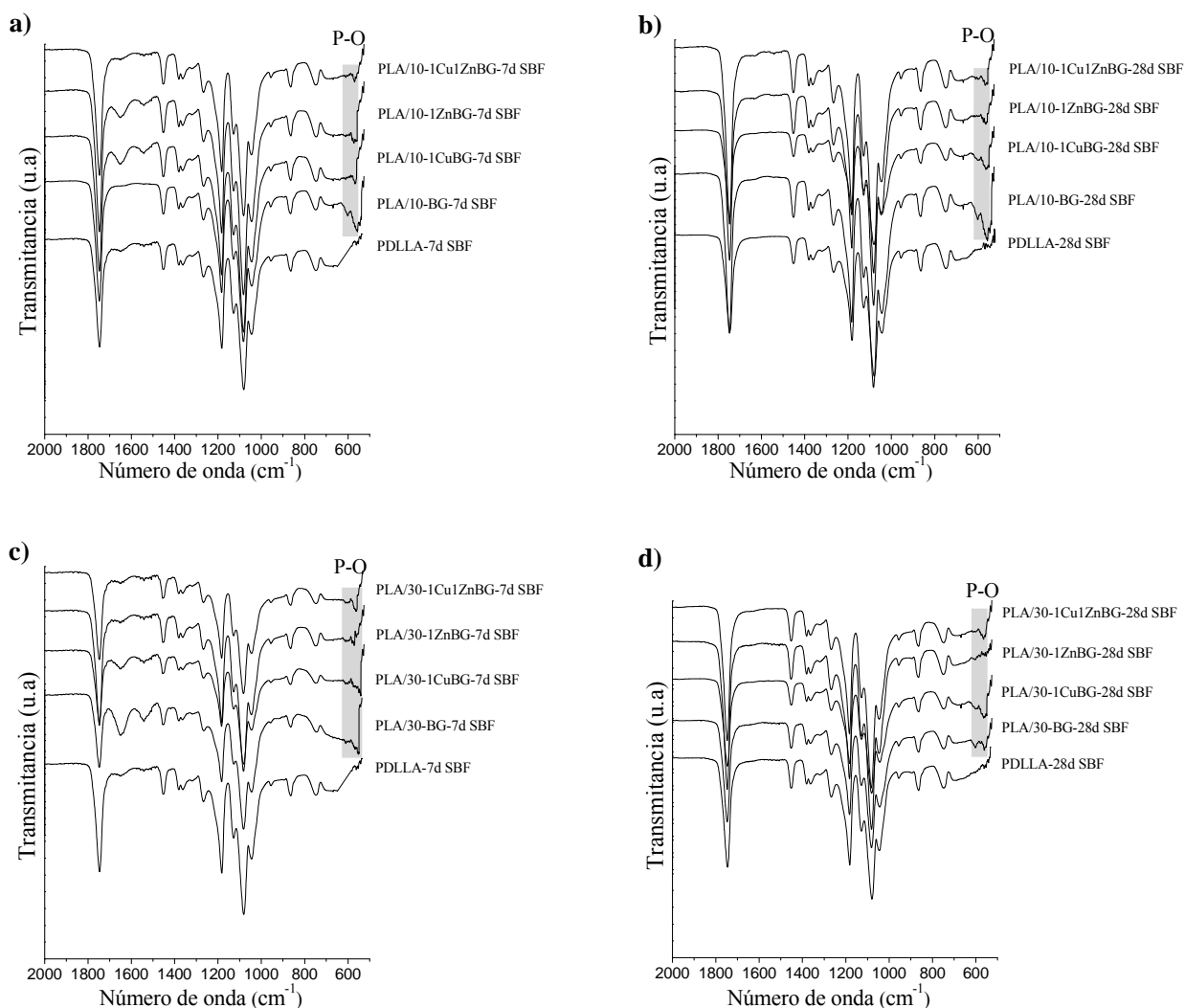


Figura 34. Espectros ATR-FTIR de los scaffolds compuestos para evaluar la formación de apatita después de la inmersión en SBF por 7 y 28 días. Scaffolds con 10% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF. Scaffolds con 30% de vidrio bioactivo después de a) 7 días y b) 28 días de inmersión en SBF.

Los espectros de los scaffolds con 10% en peso de vidrio (Figura 34a y 34b) confirmaron los resultados de formación de apatita descritos por DRX. A 7 días de inmersión, el scaffold

PDLLA/10-NaBG mostró las dos bandas características de la apatita cristalina (560 cm^{-1} y 602 cm^{-1}) reflejando la buena bioactividad de este compuesto.[49, 148] Los scaffolds con los vidrios dopados mostraron la banda a 560 cm^{-1} , mientras que la banda a 602 cm^{-1} fue de muy baja intensidad o casi ausente, lo que confirma la baja bioactividad de estos scaffolds observada por DRX (Figura 33a). Para 28 días de inmersión en SBF (Figura 34b), los scaffolds lograron desarrollar las dos bandas de la apatita a excepción del scaffold PDLLA/10-1ZnBG, confirmando la inhibición que genera la presencia del Zn. La presencia de 30% en peso de vidrio (Figura 34c) aumentó la bioactividad del material compuesto, y a su vez, la formación de apatita fue favorecida por el mayor tiempo de inmersión (Figura 34d).

La evaluación del efecto de los vidrios bioactivos en la formación de apatita también fue realizada usando SEM para los scaffolds PDLLA, PDLLA/30-NaBG, PDLLA/30-1CuBG, PDLLA/30-1ZnBG y PDLLA/30-1Cu1ZnBG después de 28 días en SBF (Figura 35).

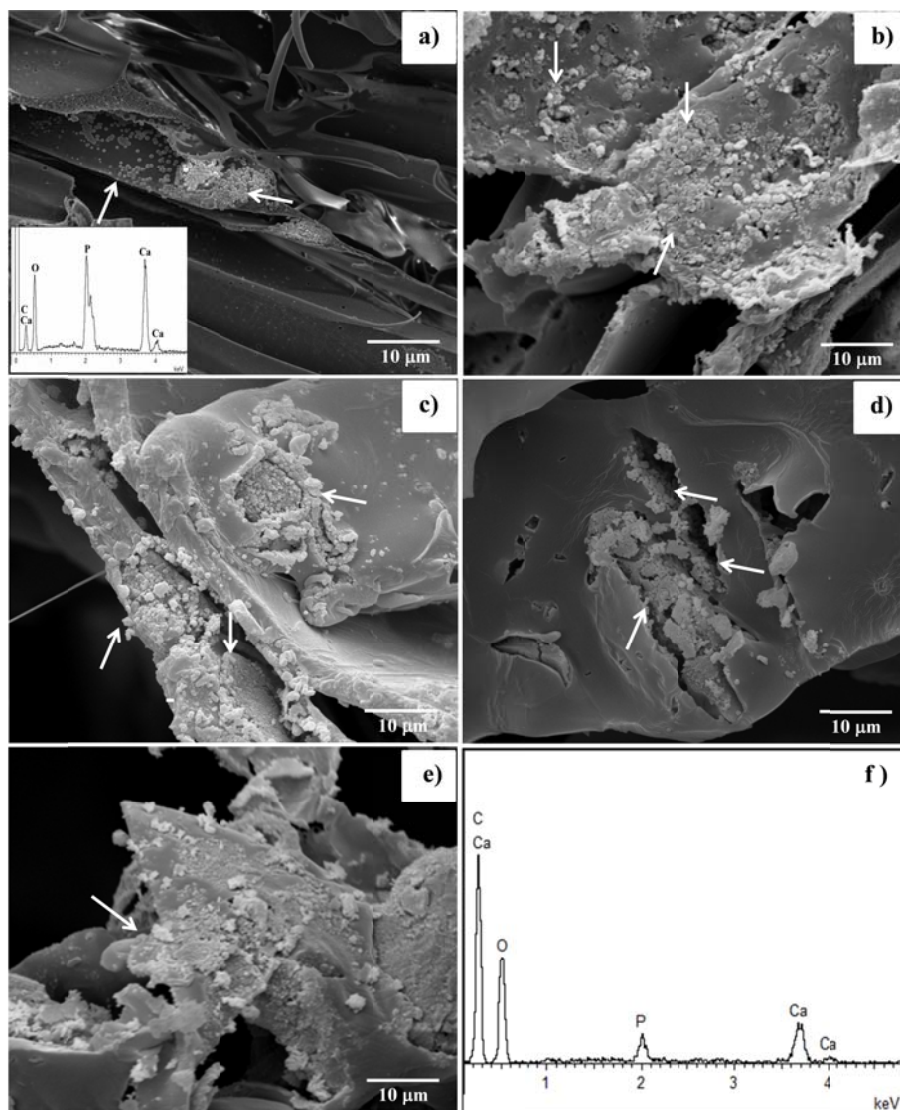


Figura 35. Imágenes SEM de la superficie de los scaffolds después de inmersión en SBF por 28 días. a) PDLLA, b) PDLLA/30-NaBG, c) PDLLA/30-1CuBG, d) PDLLA/30-1ZnBG, e) PDLLA/30-1Cu1ZnBG. f) Espectro XEDS representativo de las zonas donde se formó apatita.

En la Figura 35a se observa el scaffold de PDLLA después de 28 días en SBF con una superficie principalmente lisa, tal como la mostrada para el scaffold antes de la inmersión en SBF (Figura 29a y 29b). Sin embargo, fueron observados en algunas zonas de la superficie, pequeños precipitados parecidos a gránulos de apatita, cuya composición por EDS (Figura 35a) arrojó principalmente Ca y P. Lo anterior confirmó los resultados de DRX y FTIR, acerca de la capacidad de lograr una biomineralización por la precipitación de los iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} provenientes del SBF. Zhang et al.[133] logró la formación de gránulos de apatita, como los mostrados en este estudio, por inmersión de un scaffold de PLLA en SBF durante 28 días. Por otro lado, el scaffold PLA/30-NaBG (Figura 35b) mostró una notable reactividad en la superficie de los poros producto de la disolución del vidrio. Acompañando esta degradación, se observaron los gránulos característicos de la apatita, confirmando la alta bioactividad mostrada por DRX y FTIR. Los scaffolds con partículas de vidrio dopado con Cu y/o Zn presentaron menor grado de reactividad y degradación superficial que el scaffold PLA/30-NaBG. No obstante, todos estos scaffolds compuestos presentaron reactividad especialmente en las zonas cercanas a las partículas de vidrio. Por ejemplo, la Figura 35c muestra la superficie del scaffold PDLLA/30-1CuBG con formación de los gránulos de apatita entorno a las partículas de vidrio. El scaffold PDLLA/30-1ZnBG (Figura 35d) también mostró reactividad, pero no todas las partículas expuestas registraron una apreciable formación de apatita. Finalmente, el scaffold PDLLA/30-1Cu1ZnBG (Figura 35e) presentó formación de apatita en gran parte de la superficie de los poros.

Las zonas con apatita fueron caracterizadas por EDS mostrando un enriquecimiento en P y Ca, y una desaparición de la señal del Si propio del vidrio (Figura 35f). Las relaciones atómicas Ca/P estuvieron alrededor de 1.6 para el scaffold con NaBG y alrededor de 2.0 para los scaffolds con los vidrios dopados con Cu y/o Zn. Lo anterior indicó que hay una diferencia en la estequiometría de las apatitas formadas, causada por los cambios en disolución, liberación y adsorción de iones, que generan los iones metálicos en la estructura del vidrio.

Los resultados de la evaluación de la bioactividad por DRX, FTIR y SEM/EDS, indicaron que el vidrio NaBG y los vidrios dopados con Cu y/o Zn promovieron la formación de apatita cristalina en el scaffold de PDLLA durante la inmersión en SBF. La Figura 36 muestra un esquema de las etapas propuestas para la formación de apatita en los materiales compuestos porosos. Se observa que la bioactividad del material compuesto depende fuertemente de la reactividad inicial de las partículas de vidrio acompañada con la liberación de iones. A tiempos tempranos las partículas con superficie expuesta deberían liberar mayor cantidad de iones por su contacto directo con el SBF. Desde la solución ingresan los iones H^+ y H_3O^+ para formar los silanoles (Si-OH). Después del aumento de pH se da la hidrólisis de la sílice (liberación de Si(OH)_4), luego la condensación y repolimerización de la sílice. Esta capa de sílice actuaría como puntos de nucleación para la formación de una capa de CaP amorfo por la precipitación en la superficie de los iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} . La disolución del vidrio podría generar aberturas o separaciones en las interfaces polímero-partícula por donde ingresaría más fácilmente el SBF para reaccionar con las partículas de vidrio completamente embebidas. Por último, se da la cristalización de la apatita y el ingreso de los carbonatos u otros iones desde la solución que pueden ingresar a la estructura de la apatita (ej: iones metálicos). El grado de bioactividad y formación de apatita para los scaffolds dependerá del tipo de vidrio bioactivo incorporado tal como es mostrado en el esquema de la Figura 16.

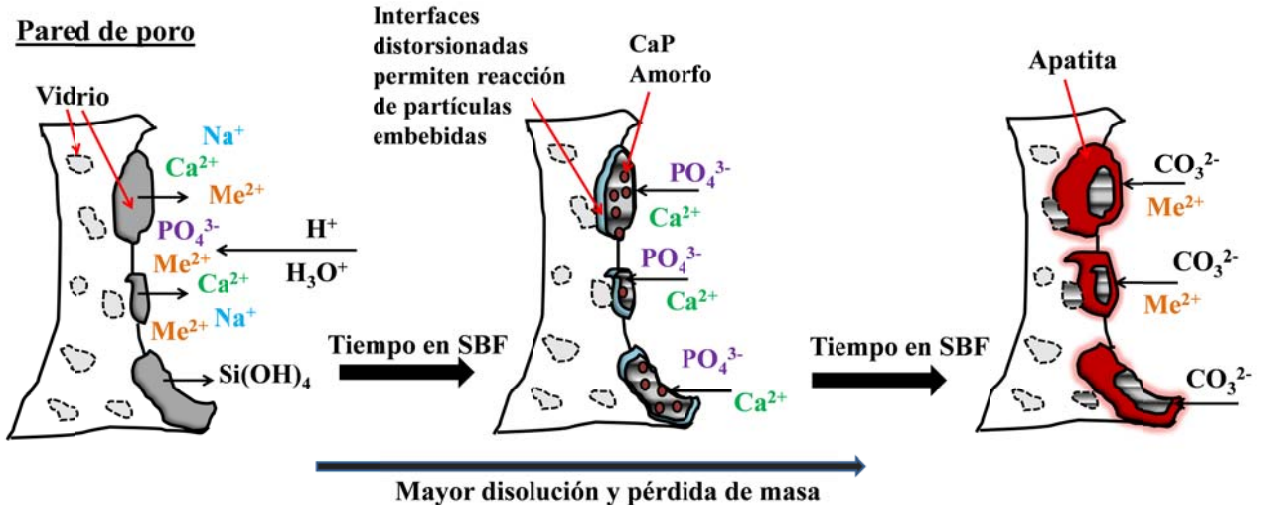


Figura 36. Esquema de las etapas de reacción propuestas para los scaffolds compuestos durante la formación de apatita en SBF. La bioactividad es promovida por las partículas de vidrio de alta reactividad.

El grado de reactividad y formación de apatita dependieron del tipo de vidrio bioactivo incorporado en el PDLLA. Por ejemplo, los scaffolds con 30% en vidrio de mayor a menor bioactividad siguieron el siguiente orden: PDLLA/30-NaBG, PDLLA/ 30-1CuBG, PDLLA/30-1Cu1ZnBG, PDLLA/1ZnBG. En la literatura no hay estudios que muestren la bioactividad de materiales compuestos de matriz de PDLLA con partículas de vidrio dopado con iones metálicos, por lo que estos resultados representan un gran aporte en este campo.

5.3.2. Degradación en PBS

La degradación de los scaffolds fue evaluada por inmersión de las muestras en una solución acuosa de fosfato salino (PBS) y se midió la absorción de PBS (agua), pérdida de peso y cambio de pH después de 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. Para evaluar la degradación se decidió usar PBS y no SBF, debido a que este último, además de los fosfatos, tiene otras sales de Ca y carbonatos que podrían facilitar la formación de apatita, lo que podría intervenir en las mediciones de degradación del material (ej: pérdida de peso).

5.3.2.1. *Absorción, pérdida de peso y cambio de pH*

En la Figura 37 se observa la absorción de PBS que mostraron los scaffolds hasta 120 días de inmersión en PBS. Como se puede observar todos los scaffolds absorbieron gran cantidad de PBS desde el primer día (entre 630-750% en peso, comparado al peso inicial seco del scaffold), lo que fue coherente con su alto volumen de porosidad (aprox. 93%), teniendo en cuenta el volumen disponible en los poros para ser llenado por PBS usando la infiltración al vacío de la Figura 8. Lo anterior también confirmó que la porosidad tiene alto grado de interconectividad para permitir que el PBS llene los poros.

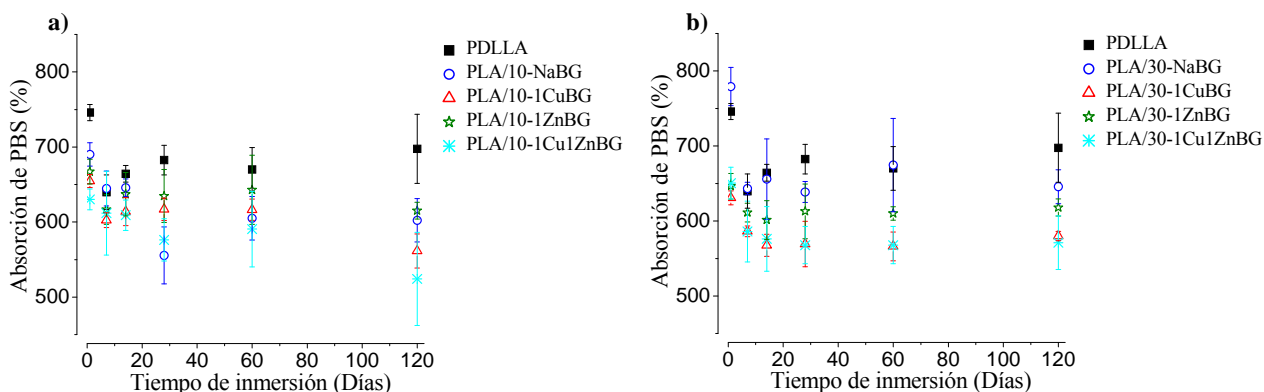


Figura 37. Absorción de PBS registrada por los scaffolds durante, 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio.

En la Figura 37a se observa la absorción de PBS del scaffold de PDLLA y los scaffolds con 10% en peso de vidrio, donde la tendencia fue la absorción de gran cantidad de agua en el primer día de inmersión (forzada por la infiltración en vacío) y una absorción un poco menor para tiempos mayores. Esto debido posiblemente a la distorsión de la estructura de poro (plastificación y deformación del polímero) y a la degradación del material, que disminuyen la capacidad de retención de agua de los scaffolds, tal como fue reportado en otro estudio.[102] Los scaffolds que presentaron mayor absorción de agua en el primer día de inmersión fueron el de PDLLA y el PDLLA/10-NaBG, lo que puede deberse al mayor porcentaje de porosidad de estos scaffolds comparado con la porosidad de los scaffolds con vidrios dopados (Tabla 6), además el vidrio NaBG es un vidrio con alta área superficial lo que podría aumentar la retención de agua, comparado con la baja área superficial de los vidrios dopados Cu y Zn. Maquet et al.[121] reportaron que la absorción del scaffold de PDLLA fue mas baja que la de los scaffolds con Bioglass® y en nuestro caso el PDLLA tuvo una absorción similar a los scaffolds con NaBG y mayor que los scaffolds con vidrios dopados, lo que se explica porque en nuestro estudio se forzó la entrada del PBS en los poros usando vacío, mientras que Maquet et al. solamente colocaron la muestra de scaffold sobre el PBS. Por tanto, la absorción inicial de nuestro estudio dependió de la porosidad total y su interconectividad lo que estaría acorde con el estudio de Blaker et al.[102] quien realizó la misma infiltración en vacío y tuvo absorciones similares entre el scaffold de PDLLA y los compuestos con Bioglass®. A 120 días Maquet et al. encontraron que la absorción de todos los scaffolds fue muy similar (alrededor de 600%), lo que podría indicar que el PBS logró llenar casi todos los poros del scaffold, siendo coherente con nuestros resultados logrados desde el primer día con la infiltración forzada de PBS.

En los scaffolds con vidrios dopados con Cu y/o Zn, no hubo una diferencia apreciable entre sus absorciones de PBS hasta los 60 días, posiblemente porque estos scaffolds presentaron una porosidad similar y las partículas de vidrio dopadas son parecidas en su densidad y área superficial, por lo que no debería generarse diferencias significativas en adsorción y retención de agua. A 120 días de inmersión, la absorción de agua del scaffold de PDLLA fue mayor, posiblemente porque el scaffold de solo polímero sufre baja degradación y distorsión de su porosidad, a comparación de los scaffolds con vidrios. Lo anterior nos muestra que a tiempos tempranos la alta porosidad y la presencia de vidrios de alta porosidad como el NaBG podrían estar favoreciendo las mayores retenciones de agua, pero a mayores tiempo de inmersión, la degradación del vidrio tiene un efecto importante distorsionando la estructura porosa del scaffold y disminuyendo su capacidad de retención de agua. Para soportar esta afirmación, la Figura 38

muestra una pared de poro del scaffold de PDLLA y otra del scaffold PDLLA/10-NaBG después de 60 días en PBS, evidenciándose que la presencia de las partículas de vidrio tiene un efecto marcado en la distorsión del poro.

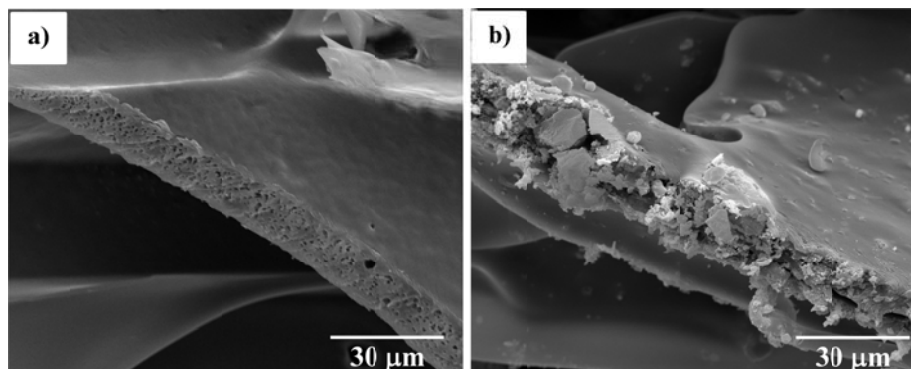


Figura 38. Imágenes SEM de la pared de poro de los scaffolds a) PDLLA y b) PDLLA/10-NaBG, después de 60 días en PBS.

Los scaffolds con 30% en peso de vidrio (Figura 37b) mostraron la misma tendencia en absorción de agua que los scaffold con 10% de vidrio. Esta tendencia fue una mayor absorción de PBS para el primer día de inmersión y una pequeña disminución para tiempos mayores. El scaffold PDLLA/30-NaBG también fue el que registró mayor absorción de PBS para el primer día y disminuyó para tiempos mayores (hasta 120 días) por la degradación del vidrio y distorsión de la estructura porosa. El scaffold PDLLA/30-NaBG registró una mayor absorción para el primer día de inmersión que el scaffold PDLLA/10-NaBG, lo que mostraría el efecto del contenido de vidrio sobre una mayor afinidad para la retención de agua. Los scaffolds con vidrios dopados presentaron menor absorción que el scaffold con NaBG.

Los resultados descritos mostraron que la absorción de agua de los scaffolds dependió de la porosidad, y del tipo de vidrio incorporado al material. Sin embargo, fue un reto conocer la absorción de agua generada solamente por el material (paredes de poro de PDLLA o material compuesto), debido a la alta porosidad de los scaffolds. Blaker et al.[102] molieron el scaffold para evitar el efecto de la porosidad, pero concluyeron que podrían existir varios errores en la medición de absorción por efecto de la molienda y el agua remanente por capilaridad. De acuerdo a lo mencionado, nuestro estudio permitió corroborar el nivel de porosidad e interconectividad del scaffold, así mismo la distorsión de los poros a mayores tiempos de inmersión que cambiaron la retención de agua. También permitió observar algunas diferencias según el tipo de vidrio incorporado. Una estrategia para conocer la absorción real por el material sería hacer el estudio con secciones densas del material, pero en nuestro caso dejaría de ser acorde con el material que sería implantado (scaffold).

La absorción y retención de agua en la porosidad del scaffold permite que se den reacciones entre la superficie del material y el medio. Para el caso de los materiales compuestos, tanto el PDLLA como el vidrio bioactivo tienen capacidad de interactuar con el PBS e iniciar su proceso de degradación y pérdida de peso por su característica biodegradable. El PDLLA, se degrada por la hidrólisis de los grupos éster, generándose oligómeros de ácido láctico e iniciando una erosión superficial.[94] Por otra parte, el vidrio bioactivo de silicato se degrada por el intercambio iónico con el medio, generándose una disolución de la red de sílice (salen grupos $\text{Si}(\text{OH})_4$) con lo que empieza la degradación y pérdida de masa del vidrio.[16] La velocidad y

tiempo para la degradación total de los materiales compuestos va a depender, entre otros factores, de las características químicas y estructurales de cada fase.[94] La Figura 39 muestra el cambio de peso experimentado por los scaffolds después de la inmersión en PBS hasta 120 días.

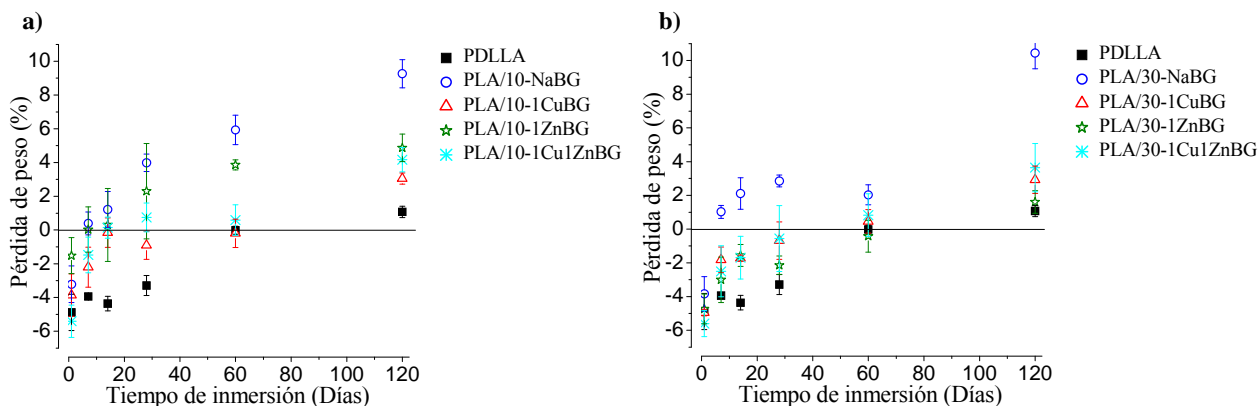


Figura 39. Pérdida de peso de los scaffolds inmersos en PBS por 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio.

En la Figura 39a se observa la pérdida de peso del scaffold de PDLLA y los scaffolds con 10% en peso de vidrio. Todos los scaffolds después de los primeros días de inmersión tuvieron un porcentaje negativo de pérdida de peso, indicando que después de la inmersión y el secado, las muestras quedaron con mayor peso que el inicial. Lo anterior se debe a que el agua podría haber quedado atrapada en los poros pequeños del scaffold (capilaridad)[102] o ser absorbida en el polímero (interactuando entre las cadenas poliméricas), siendo más difícil su extracción con el secado realizado (30 °C durante 24 horas). Se realizó un secado mas intenso durante 3 días y no se obtuvo diferencia significativa en la extracción del agua. Sin embargo, para todos los scaffolds se observó la tendencia que el porcentaje de pérdida de peso fue cada vez mas positivo conforme aumentó el tiempo de inmersión, indicando que el material estaba dejando de retener agua y/o estaba perdiendo masa por degradación. Por ejemplo, el scaffold de PDLLA empezó con un cambio de peso de -4.9%, a lo 60 días llegó a un cambio de peso de 0% y para los 120 días la pérdida en peso fue de 1.1%, lo que indica que la estructura porosa se fue distorsionando (efecto plastificante del agua) hasta los 60 días permitiendo extraer mas agua con el secado, y a los 120 días se dio una pequeña pérdida de peso por degradación superficial. Otros estudios han reportado pérdidas de peso entre 1% y 2% para tiempos menores a 70 días y es asociada a la generación de oligómeros y una posterior erosión superficial.[102, 122]

Respecto a los scaffolds con vidrio, el PDLLA/10-NaBG empezó con una pérdida de peso negativa después del primer día de inmersión, pero a los 7 días ya había alcanzado una pérdida de peso positiva hasta llegar a un valor de 9.3% a los 120 días. Esto indicó que el scaffold perdió masa principalmente por la disolución del vidrio NaBG, ya que como fue mencionado anteriormente, la degradación del polímero a 120 días solo aporta el 1.1% de pérdida en peso. Otro factor que podría influir es que la mayor absorción y retención de agua generada por el NaBG, junto con la distorsión de la interface partícula de vidrio-polímero (después de la degradación del vidrio), haría que se aumente la hidrólisis y degradación del polímero, y por tanto la pérdida de peso. Koort et al.[190] también encontraron que la incorporación de partículas de vidrio bioactivo en el PDLLA generó mayor degradación del compuesto e interfaces distorsionadas alrededor de las partículas, lo que podría favorecer la hidrólisis del polímero por una mayor superficie disponible para la reacción con el medio. Los scaffolds con 10% de los vidrios dopados con Cu y/o Zn también perdieron mas peso que el scaffold de PDLLA para todos

los tiempos de inmersión, debido a la presencia del vidrio. Sin embargo, la pérdida de peso de los scaffolds con vidrio dopado fue menor a la del scaffold PDLLA/10-NaBG, debido a la menor degradación de los vidrios dopados. Para soportar este análisis, las imágenes SEM de la Figura 40 muestran la comparación de los scaffolds PDLLA/10-NaBG y PDLLA/10-1CuBG después de 60 días en PBS, mostrando que las partículas de vidrio NaBG están más degradadas que las partículas de vidrio 1CuBG, lo que genera interfaces con grandes aberturas y distorsionadas permitiendo la fácil difusión del agua para hidrolizar el polímero y disolver las partículas de vidrio embebidas generando una mayor pérdida de peso. En la revisión de la literatura no fue encontrada una comparación de la degradación de scaffolds por efecto de la disolución de vidrios no dopados y dopados con iones metálicos, por lo que este estudio representa un avance en el conocimiento de estos sistemas.

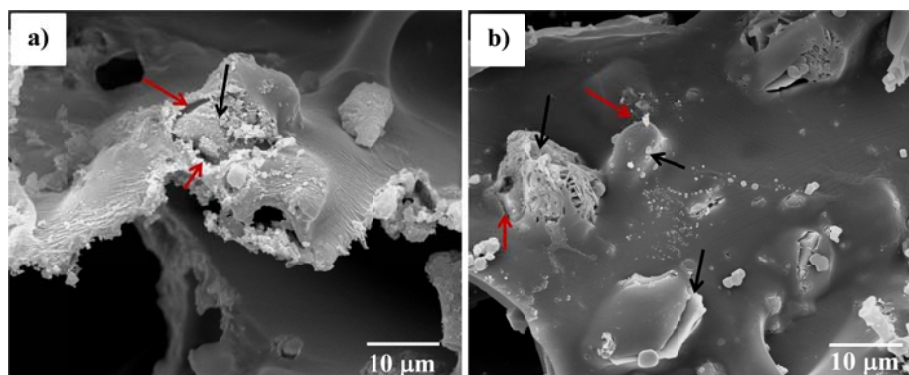


Figura 40. Imágenes SEM de las diferencias en degradación a 60 días en PBS de los vidrios a) NaBG y b) el vidrio dopado 1CuBG embebidos en el scaffold de PDLLA. Las flechas negras indican los vidrios bioactivos y las flechas rojas las interfaces polímero-vidrio.

Para los scaffolds con 30% en peso de vidrio (Figura 39b) se observó la misma tendencia que en los scaffolds con 10% de vidrio. Las pérdidas de peso empezaron con un valor negativo, indicando agua remanente después del secado, y luego una pérdida de peso hacia valores positivos con el aumento en el tiempo de inmersión. El scaffold PDLLA/30-NaBG reportó la mayor pérdida de peso de todos los scaffolds evaluados a los 120 días (10.4%). Por otro lado, los scaffolds con 30% de vidrio dopado registraron una pérdida de peso de 3.5% debido a la menor capacidad de disolución de estos vidrios. Tener baja pérdida de peso hasta los 120 días es benéfico para el sostenimiento de la estructura porosa y las propiedades mecánicas durante el periodo en que las células ocupan los poros internos del scaffold, generan matriz extracelular y se da la mineralización (4 a 16 semanas, aproximadamente).[102, 152, 191]

La degradación experimentada por el material en el PBS esta asociada con la liberación de subproductos que pueden cambiar el pH local del medio. En este caso, el PDLLA degrada en oligómeros con grupos de ácido carboxílico (ácido láctico)[99] que generan una disminución del pH fisiológico (7.4). Por otro lado, los vidrios bioactivos degradan liberando iones como el Ca^{+2} y Na^{+} , los cuales generan un aumento de pH.[16] Las modificaciones de pH tienen un efecto significativo en la viabilidad celular, por tanto es importante evaluar su comportamiento durante la degradación del material. La Figura 41 muestra el cambio del pH en el PBS después de la inmersión de los scaffolds por 1, 7, 14, 28, 60 y 120 días. La línea en los gráficos a $\text{pH}=7.4$ es de referencia para indicar el pH fisiológico.

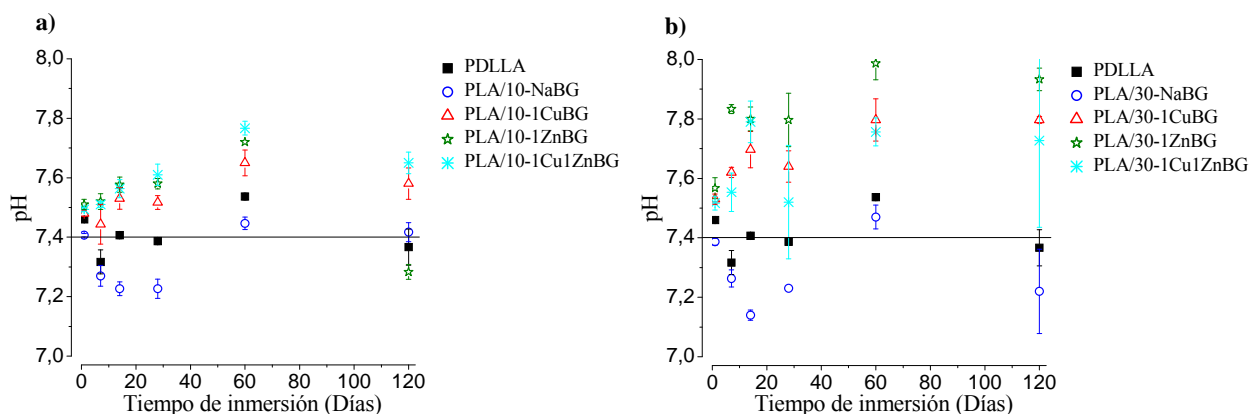


Figura 41. Cambio de pH en el PBS por efecto de la liberación de iones desde los scaffolds. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio bioactivo.

La Figura 41a muestra el cambio de pH del PBS después de la inmersión del scaffold de PDLLA y los scaffolds con 10% en peso de vidrio. El scaffold de PDLLA generó una disminución del pH hasta 7.3 a los 7 días de inmersión, pero a tiempos mayores se mantuvo entre 7.4 y 7.5, lo que es una variación aceptable alrededor del pH fisiológico. Lo anterior indicó que entre 1 y 7 días el PDLLA sufrió una pequeña liberación de ácido láctico a nivel superficial, la cual no avanzó a nivel volumétrico y el pH fue estabilizado por el medio.[94] Estos resultados son soportados por Maquet et al.[121], quienes encontraron una disminución en el peso molecular del polímero durante las primeras dos semanas de inmersión de los scaffold, debido a una pequeña liberación superficial de productos de degradación ácidos. Respecto a los scaffolds con 10% de vidrio, el PDLLA/10-NaBG generó una disminución del pH hasta casi 7.2 durante los 7, 14 y 28 días. Como fue descrito en el análisis de la pérdida de peso, esto podría ser debido a la degradación del vidrio NaBG que genera interfaces distorsionadas dejando expuesta más superficie de polímero con posibilidad de perder oligómeros ácidos por la hidrólisis, y por tanto causar una disminución del pH mayor que si estuviera el polímero solo. Para 60 y 120 días el pH aumentó entre 7.4-7.5 por efecto de la disolución y liberación iónica desde el vidrio NaBG generando un efecto de tampón o balance de pH que es benéfico para evitar toxicidad en las células por alcalosis (exceso de base) o acidosis (exceso de acidez). Por otro lado, los scaffolds con 10% de vidrios dopados, aumentaron el pH del PBS hasta los 60 días a valores cercanos a 7.8, mostrando que la degradación y liberación de iones desde los vidrios dopados es la que más influye en el pH del medio a tiempos tempranos, mientras que a 120 días disminuyó el pH debido a la degradación del polímero que empieza a ser relevante, según resultados de pérdida de peso y disminución de peso molecular reportados.[121] Para el caso de los scaffolds con 30% de vidrio (Figura 41b), se presentó las mismas tendencias mostradas para los scaffolds con 10% de vidrio pero con efectos más marcados sobre el pH producto de la mayor cantidad de vidrio. Los scaffolds con Zn, a pesar de tener vidrios de menor disolución generalmente provocaron un mayor aumento de pH que los scaffolds con Cu, lo que podría estar relacionado con la formación de productos alcalinos como el $Zn(OH)_2$. Cabe resaltar que los valores máximos de pH generados por los scaffolds con vidrios bioactivos no superaron el $pH=7.8$, el cual no es un valor muy alto y en condiciones dinámicas del cuerpo podría ser fácilmente balanceado hasta un pH más cercano a 7.4 para evitar toxicidad. Además, según otros estudios,[102] para tiempos mayores a 120 días (fuera del alcance de esta tesis) es esperado que el polímero se degrade en mayor proporción y lograría balancear el pH.

De acuerdo a los resultados de degradación de los scaffolds, se evidenció un efecto del tipo de vidrio y de su porcentaje de incorporación sobre la absorción de agua, pérdida de peso y cambio de pH. Resultados relevantes fueron que un vidrio de alta área superficial y porosidad como el NaBG podría aumentar la degradación del material compuesto porque tiene alta disolución y permite una mayor hidrólisis del polímero. Para lograr mayor conocimiento sobre los mecanismos durante la degradación y el efecto del tipo de vidrio, serían necesarios más análisis como: evaluación del cambio de peso molecular del polímero, cuantificación de la pérdida de peso por cada fase, análisis de microscopia profundos para evaluar cambios de morfologías en las fases, interfaces polímero-vidrio, entre otros. Por último, es de resaltar que hasta los 120 días de inmersión en PBS no se presentó una pérdida en peso considerable en ninguno de los materiales compuestos porosos que pudiese implicar una pérdida de soporte para el crecimiento celular. Lo anterior se complementa con el bajo cambio dimensional que sufrieron los scaffolds durante la inmersión, tal como es mostrado en las fotografías de la Figura 42.

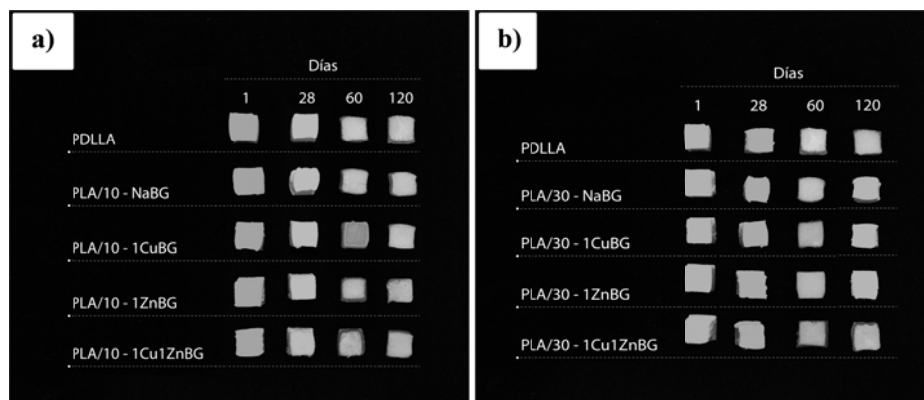


Figura 42. Fotografía de los scaffolds después de la inmersión en PBS por 1, 28, 60 y 120 días.

5.3.3. Liberación de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} desde los scaffolds en medio de cultivo celular

La liberación de los iones metálicos Cu^{+2} y Zn^{+2} debe mantenerse a concentraciones seguras para las células, por tanto su liberación desde los scaffolds en medio de cultivo celular (DMEM) fue medida hasta 21 días (Figura 43). Para efectos de comparación entre la liberación de iones desde los scaffolds y la mostrada por los vidrios independientes, se usaron los scaffolds con 30% de vidrio debido a la equivalencia en la cantidad de vidrio usada por volumen de medio. La liberación de los iones desde los scaffolds fue menor que la mostrada por los vidrios independientes, debido a que el PDLLA es una barrera física para el contacto directo del medio con las partículas de vidrio, restringiendo la liberación de iones. Por ejemplo, la liberación de los iones Cu^{+2} disminuyó casi en un 70% para el scaffold PDLLA/30-1CuBG y en un 30% para el scaffold PDLLA/30-1Cu1ZnBG. Esta disminución en la liberación iónica no fue significativa en los scaffolds con Zn, registrándose pequeñas diferencias (menor a 10% de reducción) entre la liberación de iones Zn^{+2} desde el scaffold y la liberación desde los vidrios independientes 1ZnBG y 1Cu1ZnBG. Aunque, no fue encontrada una explicación clara para este comportamiento, es de notar que a mayor capacidad de liberación iónica del scaffold (material con vidrio dopado con Cu) se registró un efecto barrera mayor, mientras que para capacidades de liberación bajas (material con vidrio dopado con Zn), el efecto barrera del polímero fue débilmente observado posiblemente por un efecto de los diferentes gradientes de concentración de los iones en las interfaces polímero-vidrio. A pesar de ello, las tendencias en la liberación de iones desde los vidrios independientes se siguen cumpliendo cuando están embebidos en la matriz polimérica, por ejemplo: 1) los iones Cu^{+2} se liberan hasta 30 veces mas (depende del tiempo de inmersión)

que los iones Zn^{+2} , 2) existe mayor liberación de iones metálicos cuando están solos en el vidrio que cuando están en el vidrio co-dopado, 3) la liberación de iones Zn^{+2} tiene una cinética diferente a la de los iones Cu^{+2} , registrándose una disminución en la concentración del Zn^{+2} después de un día.

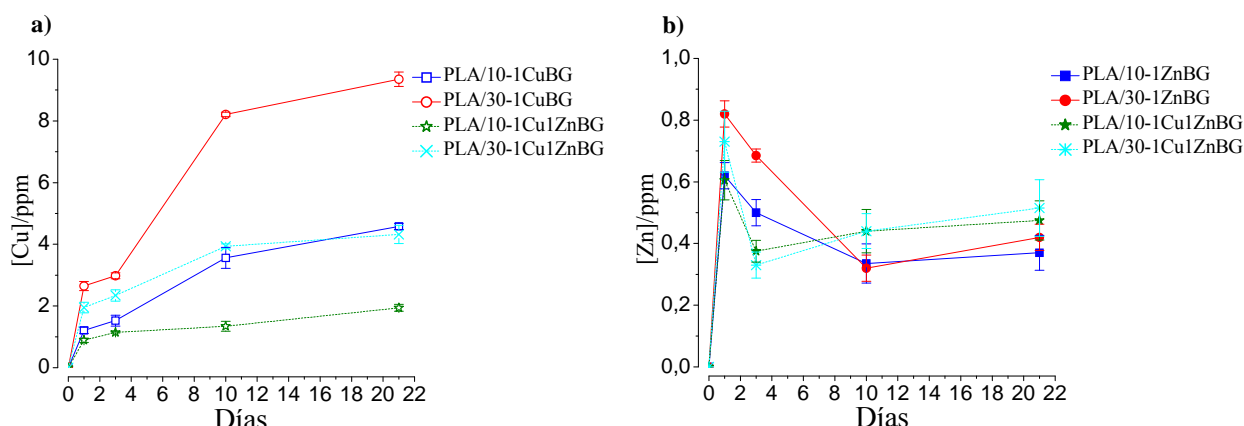


Figura 43. Liberación de iones metálicos desde los scaffolds en medio de cultivo DMEM durante 1, 3, 10 y 21 días. Scaffolds con a) 10% y b) 30% en peso de vidrio bioactivo.

La Figura 43 muestra que la liberación de los iones Cu^{+2} (Figura 43a) desde los scaffolds dependió de la cantidad de vidrio incorporado en el scaffold y de la presencia del Zn en el vidrio co-dopado. Por ejemplo, el scaffold PDLLA/30-1CuBG fue el material que liberó más iones Cu^{+2} con una velocidad casi constante conforme aumentó el tiempo de inmersión, mientras que el scaffold PDLLA/10-1CuBG liberó aproximadamente la mitad de iones Cu^{+2} debido a una menor disponibilidad del metal en el vidrio. La liberación del scaffold PDLLA/10-1Cu1ZnBG también fue menor a la liberación del scaffold PDLLA/30-1Cu1ZnBG, mostrando el efecto del mayor contenido de vidrio. Respecto a la influencia del Zn, en los scaffolds PDLLA/1Cu1ZnBG disminuyó a la mitad la liberación de iones Cu^{+2} , comparado con los scaffolds PDLLA/1CuBG, debido a la estabilización que genera el Zn en la red del vidrio co-dopado.[189] Para la liberación de los iones Zn^{+2} , la cinética fue similar a la mostrada por los vidrios independientes, observándose un incremento hasta el primer día y luego una disminución en la concentración producto de la adsorción de los iones Zn^{+2} o la formación de $Zn(OH)_2$. A tiempos cortos el scaffold PDLLA/1Cu1ZnBG registró una liberación de Zn^{+2} ligeramente menor que la liberación del scaffold PDLLA/1ZnBG y a tiempos mas largos las diferencias no fueron significativas, al igual que con el aumento en el contenido de vidrio.

5.3.4. Citocompatibilidad con células madres

La citocompatibilidad de los scaffolds se evaluó con células madres (ST-2), debido a la mayor relevancia que tiene usar células progenitoras, las cuales están presentes cuando hay un defecto óseo y son las primeras que intervienen en el proceso de regeneración para luego diferenciarse a osteoblastos. Es decir que con el uso de estas células se aproxima más a las condiciones reales de la regeneración ósea y es posible evaluar el potencial osteogénico (estimulación para la transformación de célula madre a célula ósea) y angiogénico del biomaterial.

5.3.4.1. *Citocompatibilidad por ensayos de WST-8 y LDH*

La Figura 44 muestra los resultados de los ensayos de citotoxicidad (WST-8 y LDH) realizados después de cultivar las células madres sobre las muestras de scaffold (se deja que infiltre una suspensión de células en los poros del scaffold) y dejarlas incubando durante 10 días. El objetivo de usar estos dos ensayos de citotoxicidad fue evaluar la citocompatibilidad por dos mecanismos diferentes: el WST-8 es un ensayo que mide la actividad mitocondrial de las células (metabolismo) que están vivas después de cierto tiempo de exposición al scaffold y el ensayo de actividad LDH evalúa la integridad de la membrana celular, que puede ser dañada o permeada por un agente toxico, liberando la enzima LDH desde el interior de la célula. Para conocer la cantidad de células muertas o vivas, es posible cuantificar la enzima LDH liberada por las células muertas o la que continúa dentro de las células vivas. En el caso de este estudio se evaluó la cantidad de LDH presente al interior de las células vivas. Ambos ensayos de citotoxicidad son colorimétricos, es decir que se mide la absorbancia o densidad óptica (D.O) de un producto coloreado que es proporcional a la viabilidad celular.

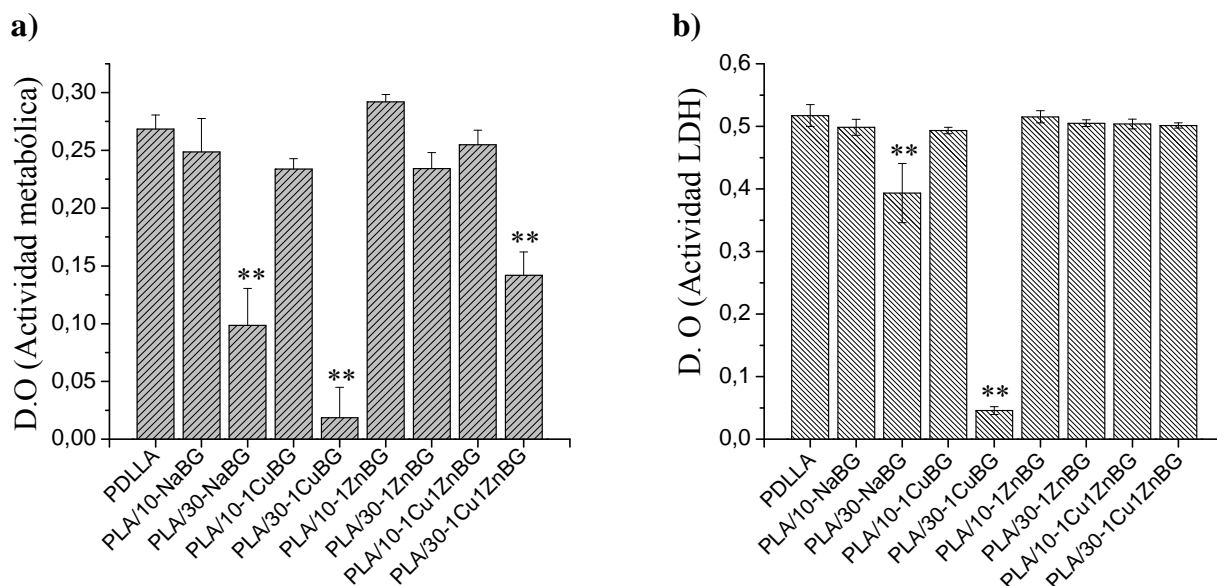


Figura 44. Citocompatibilidad de los scaffolds a células madres ST-2 evaluada por los ensayos a) WST-8 y b) LDH.

Los resultados del ensayo WST-8 son mostrados en la Figura 44a. El PDLLA fue usado como referencia para evaluar el efecto de los vidrios bioactivos porque presentó alta actividad metabólica (viabilidad celular) y ha sido aprobado por la FDA para aplicaciones medicas por su alta citocompatibilidad.[99] Los scaffolds con 10% en peso de vidrio bioactivo mostraron alta actividad metabólica sin diferencia estadística significativa entre ellos. Es de notar que los scaffolds con 10% de los vidrios dopados presentaron liberaciones de iones Cu^{+2} y Zn^{+2} menores a 3.5 ppm a 10 días (Figura 43), dándole validez al umbral de toxicidad descrito para las partículas de vidrio independiente (3.0 ppm). Por otro lado, los scaffolds con 30% de vidrio, excepto el PDLLA/30-1ZnBG, presentaron diversos grados de citotoxicidad manifestada por la reducción de la actividad metabólica de la célula. En el caso del scaffold PDLLA/30-NaBG la actividad metabólica celular disminuyó en un 64% respecto a la del PDLLA, lo que se atribuye a la alta liberación de iones Ca^{+2} y Na^{+} que generaron un aumento de pH, lo que ha sido mostrado que puede causar apoptosis o necrosis celular (toxicidad) por la alteración del potencial de la membrana celular e inhibición en el transporte de iones necesarios para el normal funcionamiento de la célula.[123] El scaffold de PDLLA/30-1CuBG disminuyó la actividad metabólica en un

93%, lo que se explica por el aporte que hizo los iones Cu^{+2} para aumentar la toxicidad (8.2 ppm de Cu^{+2} , superior al umbral establecido). El scaffold PDLLA/30-1Cu1ZnBG mostró una disminución de la actividad metabólica de un 47%. Para este scaffold la liberación de Cu^{+2} a 10 días fue de 4 ppm, lo que explicaría este nivel de toxicidad a pesar que la liberación de iones Zn^{+2} haya sido baja (0.4 ppm). La no toxicidad del PDLLA/30-1ZnBG se debe a la baja liberación iónica, que en el caso de los iones Zn^{+2} fue de 0.3 ppm.

Por otro lado, la Figura 44b muestra la citocompatibilidad evaluada por la medición de LDH dentro de las células vivas después de ser lisadas (despegadas del scaffold). Para este caso los únicos scaffolds que mostraron toxicidad con diferencia significativa respecto al scaffold de PDLLA fueron el PDLLA/30-NaBG y PDLLA/30-1CuBG, con una reducción en la actividad LDH intracelular de un 24% y 91%, respectivamente. Las diferencias entre los resultados obtenidos por WST-8 y actividad LDH se deben a que estos ensayos evalúan diferentes mecanismos de toxicidad. Por ejemplo, para el scaffold PDLLA/30-NaBG la actividad metabólica (ensayo WST-8) disminuyó en un 67% respecto a la del PDLLA, mientras que la actividad LDH intracelular (células sin daño en la membrana) se redujo en un 24%, lo que indica que la liberación iónica de este scaffold logró alterar marcadamente las reacciones bioquímicas y procesos físico-químicos (actividad metabólica) de las células sin llegar a dañar en gran magnitud su membrana, el cual representaría un daño mas severo para la célula e implicaría su muerte inminente. Por otro lado, el scaffold PDLLA/30-1CuBG mantuvo una toxicidad significativa también para el ensayo de LDH, indicando que los iones Cu^{+2} en una concentración toxica también afectaron notablemente la membrana celular. La alta toxicidad de los iones Cu^{+2} se debe al fuerte potencial redox de este ion, el cual genera radicales libres que desnaturalizan las biomoléculas de la membrana celular provocando cambio estructural y permeación anormal.[57, 80, 87] La cantidad de iones Cu^{+2} liberados por el PDLLA/30-1Cu1ZnBG (4.0 ppm) logró disminuir la actividad metabólica pero no afecto significativamente la membrana celular, lo que sugiere que a esa concentración probablemente no se generaron radicales libres con el potencial de generar un daño significativo en la membrana celular, por el contrario los iones Cu^{+2} fueron transportados por biomoléculas (metaloproteínas) hasta el interior de las células donde las mitocondrias lograron ser afectadas en su funcionamiento por ser moléculas mas pequeñas y sensibles que la membrana celular. Este tipo de toxicidad es llamada apoptosis o muerte inducida, la cual es una muerte lenta caracterizada por el cambio estructural de la mitocondria, especialmente de su membrana, inhibiendo el metabolismo o respiración celular.[192]

Los resultados de los ensayos de citocompatibilidad (WST-8 y LDH) mostraron que en general los scaffold con vidrios dopados con Cu y/o Zn (10 y 30% en peso) presentaron una buena citocompatibilidad a excepción del scaffold PDLLA/30-1CuBG.

5.3.4.2. *Adhesión y morfología celular*

Para profundizar en el estudio sobre la citocompatibilidad de los scaffolds con las células madres, se realizaron imágenes SEM de la superficie de los scaffolds para observar la interacción de las células con el material. La Figura 45 muestra la superficie con células de los scaffolds PDLLA, PDLLA/10-NaBG, PDLLA/10-1CuBG, PDLLA/10-1ZnBG y PDLLA/10-1Cu1ZnBG, los cuales mostraron buena citocompatibilidad por los ensayos WST-8 y LDH. En la Figura 45a se observa la pared de un poro del scaffold PDLLA sin células, con su característica superficie lisa, algunos poros muy pequeños y líneas de deformación, mientras que la presencia de células en este mismo scaffold se observa en la Figura 45b. En este caso, las células tuvieron una morfología aplanada formando capas en la superficie del scaffold (célula destacada con flecha

blanca). También se observó una superficie más lisa que no tiene la apariencia del polímero, sino de un depósito que podrían ser las proteínas de adhesión y matriz extracelular que excretan las células. Las imágenes de la Figura 45c-45f, muestran la interacción de las células con los scaffolds con 10% de vidrio bioactivo, en las que se observan las células con morfología aplanada, gran extensión y adhesión a la superficie del material, lo que demuestra la buena citocompatibilidad de estos scaffolds. Por medio del análisis SEM, no se notaron diferencias significativas en la apariencia o adhesión de las células por efecto de los iones metálicos. Es de resaltar es que en el scaffold PDLLA/10-NaBG (Figura 45c, imagen pequeña) se observaron las células y la matriz extracelular cubriendo los gránulos de apatita (señalados con flechas naranjas) mostrando una buena interacción y afinidad con esta fase activa. También se observó en la Figura 45d (imagen ampliada), una célula (señalizada con flecha blanca) interactuando con una partícula de vidrio (señalizada con flecha naranja) del scaffold PDLLA/10-1CuBG. La interacción de las células con el material se da a través proyecciones en forma de filamento formadas de proteínas (filopodia) que le permiten a la célula adherirse al biomaterial.[62]

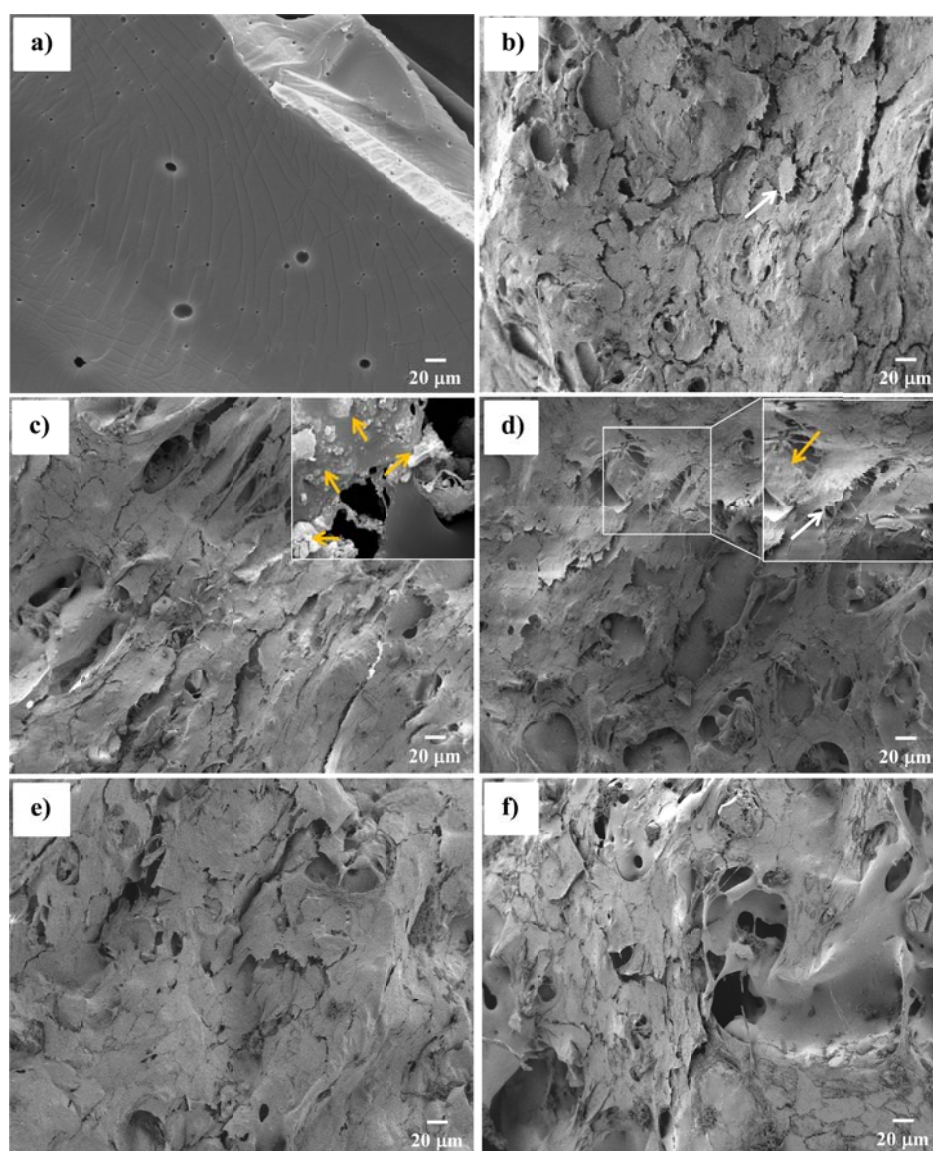


Figura 45. Imágenes SEM del scaffold a) PDLLA sin células y la interacción de las células madres ST-2 con los scaffolds b) PDLLA, c) PDLLA/10-NaBG, d) PDLLA/10-1CuBG, e) PDLLA/10-1ZnBG y f) PDLLA/10-1Cu1ZnBG.

La Figura 46 muestra las imágenes de la superficie de los scaffolds PDLLA, PDLLA/10-1CuBG y PDLLA/30-1CuBG después de 10 días de incubación de las células madres. Se tomaron estos scaffolds específicos para evaluar el efecto de incorporar un vidrio bioactivo, y a su vez aumentar el porcentaje de incorporación hasta lograr cierta toxicidad en las células, que fue lo sucedió para el scaffold PDLLA/30-1CuBG de acuerdo a los ensayos de WST-8 y LDH.

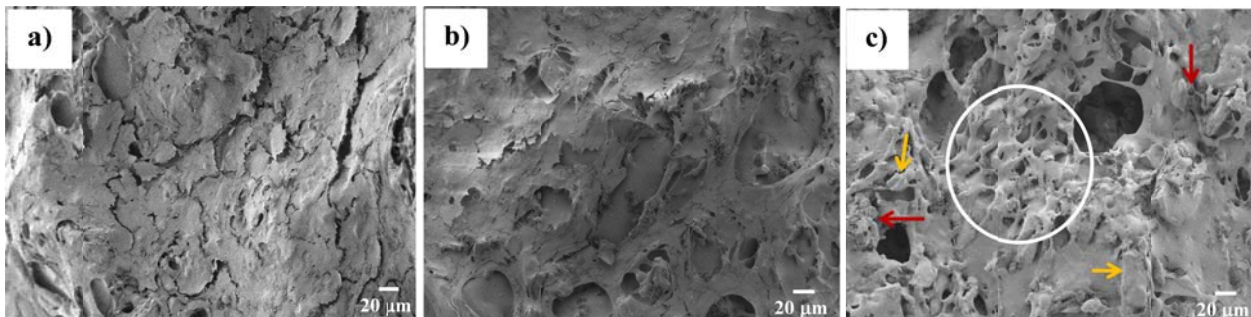


Figura 46. Imágenes SEM de la interacción de las células madres ST-2 con el scaffold sin vidrio, con 10% y 30% de vidrio. a) PDLLA, b) PDLLA/10-1CuBG y c) PDLLA/30-1CuBG, respectivamente.

La Figura 46a muestra la buena citocompatibilidad de los scaffolds PDLLA y PDLLA/10-1CuBG, tal como fue descrito anteriormente. Sin embargo, el polímero con mayor cantidad de vidrio, PDLLA/30-1CuBG (Figura 46c), mostró gran cantidad de células con una forma más redondeada y apilada (zona dentro del círculo blanco), además se observaron pequeñas zonas (señalizadas con flechas rojas) con apariencia de residuos (debris) o también podrían ser células inmaduras que no crecieron y empezaron un proceso de muerte. Esta apariencia diferente de las células sobre este scaffold indicó que las células no crecieron normalmente y que algunas están degeneradas, posiblemente por efecto de un agente tóxico como fue la alta concentración de iones Cu^{+2} liberados (8.2 ppm) desde este scaffold, confirmando así, los resultados de citotoxicidad por WST-8 y LDH. Por lo tanto, se puede confirmar que el scaffold PDLLA/30-1CuBG es el único material que generó riesgo de toxicidad a las células y que los otros scaffolds presentaron una buena citocompatibilidad.

5.3.5. Propiedades osteogénicas y angiogénicas

Uno de los objetivos finales de incorporar los vidrios dopados con Cu y/o Zn en el scaffold de PDLLA, es proporcionarle a esta matriz propiedades terapéuticas que estimulen la regeneración de hueso. Dos de las propiedades más importantes necesarias en la regeneración de un defecto óseo son la capacidad osteogénica y angiogénica. Como fue descrito anteriormente, un agente osteogénico tiene la capacidad para inducir o estimular la diferenciación de células madres hacia células óseas y su posterior, crecimiento y proliferación, mientras que un agente angiogénico estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

5.3.5.1. *Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP)*

En la Figura 47 se muestran los resultados de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) para 10 días de incubación de las células madres en los scaffolds. El scaffold de PDLLA en este caso actuara como un control para evaluar el efecto de la incorporación de vidrios bioactivos en la expresión de la enzima ALP, la cual es un biomarcador que indica el inicio de la diferenciación de las células madres hasta convertirse en osteoblastos maduros como un indicador de la capacidad osteogénica del material.[193]

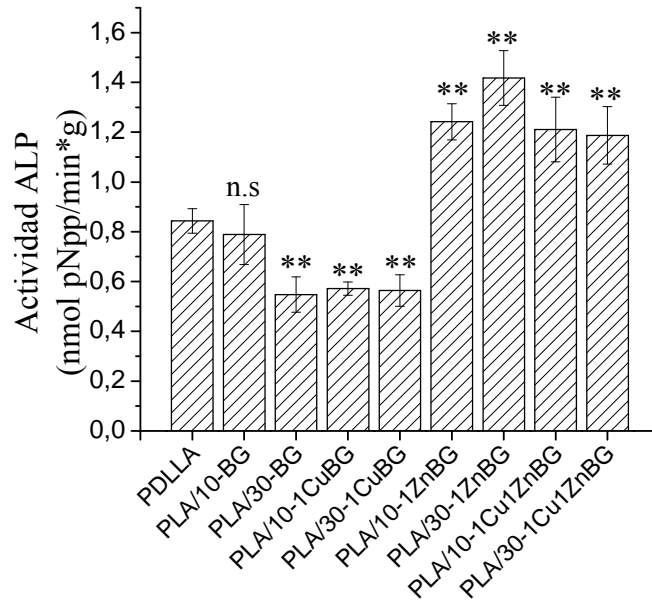


Figura 47. Actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) de las células madres en contacto con los scaffolds. (**) Diferencia significativa entre los scaffolds con vidrio bioactivo y el scaffold de PDLLA usando un $p < 0.01$.

De acuerdo a los resultados de la Figura 47 el scaffold PDLLA/10-NaBG no tuvo diferencia estadística significativa con el scaffold de PDLLA, lo que indica que la incorporación de 10% en peso de NaBG no generó un estímulo apreciable para la expresión de ALP. Estudios han mostrado que la incorporación de Bioglass® en PDLLA aumenta la expresión de ALP,[99] lo que sería contrario a nuestros resultados. Esto podría deberse a varios factores, entre ellos, a que el vidrio NaBG por su mayor área superficial podría tener mayor disolución y liberación iónica que el Bioglass®, lo que contrarrestaría un efecto positivo en la expresión de ALP. También podrían influir diferencias en las células, condiciones y tiempo de cultivo usadas, lo que dificulta hacer una comparación directa de los resultados. Por ejemplo, se ha reportado que antes de 14 días la expresión de ALP de células madres podría ser baja, dificultando establecer diferencias marcadas.[99, 194] Por otro lado, los scaffolds PDLLA/30-NaBG, PDLLA/10-1CuBG y PDLLA/30-1CuBG, tuvieron una actividad ALP menor a la del scaffold de PDLLA, lo cual podría deberse a concentraciones iónicas altas que afectaron el inicio de la diferenciación y la expresión de ALP. Por el contrario, los scaffolds con Zn mostraron mayor expresión de ALP, siendo el valor mas alto registrado para las células cultivadas en el scaffold PDLLA/30-1ZnBG. En los scaffolds con el vidrio co-dopado (1Cu1ZnBG), la presencia del Cu no afectó negativamente las propiedades osteogénicas proporcionadas por el Zn. Otros estudios han reportado las propiedades osteogénicas del Zn relacionadas con el aumento del metabolismo óseo, la síntesis de matriz extracelular (colágeno), y la expresión de ALP.[7, 17, 56, 62, 195] Sin tener bien claro los mecanismos que ocurren, se ha mostrado que las metaloproteínas que tienen Zn juegan un papel importante en estos procesos osteogénicos con una dependencia de la concentración de Zn.[56] Por otro lado, nuestros resultados son acordes con varios estudios que afirman que no es claro si el Cu juega un papel positivo en la osteogénesis, por lo menos en el caso de la expresión de ALP se ha mostrado que el Cu no afecta o interviene negativamente en su expresión.[7, 195, 196] Incluso se ha mostrado que el Cu inhibe el efecto anabólico que ejerce el Zn en el hueso.[195] Solo algunos estudios han mostrado evidencias que el Cu podría incrementar la expresión de ALP y otros marcadores osteogénicos.[13, 78] Lo anterior indica que

son necesarios más estudios *in vitro* e *in vivo* específicos sobre el papel de estos dos iones metálicos en la estimulación osteogénica, sin embargo, nuestros resultados son coherentes con la mayor cantidad de evidencia en la literatura que muestra que el Zn tiene mayor potencial osteogénico que el Cu.

5.3.5.2. Secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Es conocido que la angiogénesis es mediada por una variedad de factores de crecimiento en un complejo proceso multietapas, en el cual el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) ha sido identificado como uno de los estimuladores claves. El VEGF activa las células endoteliales en el tejido circundante regulando su proliferación, migración, y finalmente la formación de estructuras tubulares o vasos sanguíneos.[13] Los resultados de la secreción del VEGF mostrados en la Figura 48, indican que los scaffolds con los vidrios NaBG y 1ZnBG no promovieron la secreción del VEGF, es decir que no inducen el crecimiento de vascularización para ayudar a una rápida regeneración ósea. Por otro lado, las células cultivadas en los scaffolds PDLLA/10-1CuBG y PDLLA/10-1Cu1ZnBG tuvieron una secreción de VEGF mayor que la registrada por el scaffold de PDLLA, lo que indica que el Cu podría tener potencial angiogénico, tal como se ha reportado anteriormente en otros estudios.[13, 80]

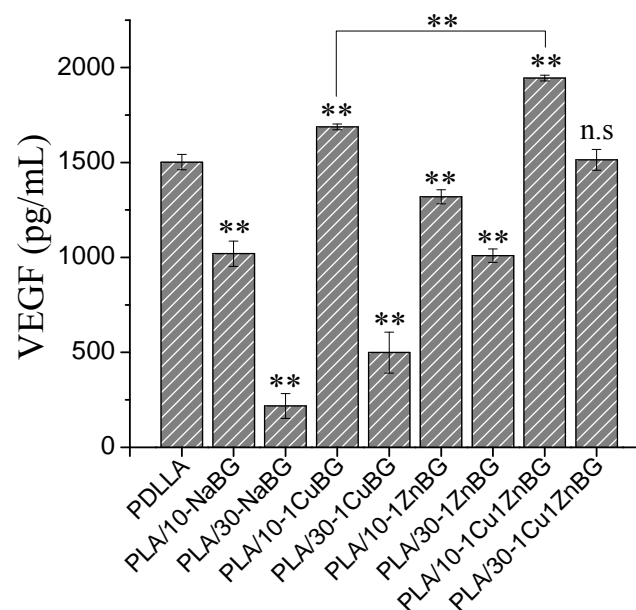


Figura 48. Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por las células madres en contacto con los scaffolds. (**) Diferencia significativa entre los scaffolds con vidrio bioactivo y el scaffold de PDLLA usando un $p < 0.01$.

El mecanismo que se ha demostrado es que los iones Cu^{+2} genera un ambiente de hipoxia (ausencia de oxígeno) que estimula la expresión de VEGF y otros genes que inducen la neovascularización.[13] Sin embargo, el scaffold PDLLA/30-1CuBG generó una secreción de VEGF muy baja, lo que podría ser explicado por el efecto citotóxico que tuvo este scaffold debido a la alta liberación de iones Cu^{+2} . Otro aspecto importante es que si se analiza la secreción de VEGF provocada por los scaffolds PDLLA/10-1CuBG y PDLLA/10-1Cu1ZnBG, se puede notar que el scaffold con el vidrio co-dopado expresó mas VEGF con una diferencia estadística significativa, lo que podría estar relacionado a la concentración de iones Cu^{+2} liberados. En

particular, se puede indicar que con una liberación de Cu^{+2} igual o menor a 1.3 ppm (liberación desde el scaffold PDLLA/10-1Cu1ZnBG) se puede favorecer la estimulación de la angiogénesis.

Los resultados de la expresión de VEGF permiten sugerir que la incorporación de vidrios con Cu en los scaffolds de PDLLA proporciona mayor potencial angiogénico que la incorporación de vidrios con Zn, sin embargo, son necesarios mas ensayos *in vitro* e *in vivo* para dar mayor evidencia a este comportamiento de los scaffolds preparados.

Como resultado importante de la capacidad osteogénica y angiogénica de los scaffolds tenemos que el scaffold PDLLA/10-1Cu1ZnBG tiene una combinación sinérgica de los iones metálicos Cu y Zn, ya que presenta la mejor combinación de expresión de ALP y VEGF convirtiéndose en un buen candidato para ser usado en regeneración ósea.

5.3.6. Capacidad antibacterial

Los scaffolds preparados además de tener buen comportamiento con las células para promover la regeneración ósea, deben evitar las infecciones centradas en el implante causadas por películas bacterianas. En este sentido, los scaffolds fueron inmersos en una suspensión de la bacteria *S. aureus* resistente a la meticilina, la cual es una de las más comunes en infecciones de implantes.[28] La Figura 49 muestra la viabilidad bacteriana (relativa al control de bacterias sin scaffold) después del contacto con los scaffolds por 1, 3 y 7 días. Además del scaffold de PDLLA, solamente fueron evaluados los scaffolds con 10% de vidrio bioactivo porque en general, fueron los que presentaron mejor comportamiento celular.

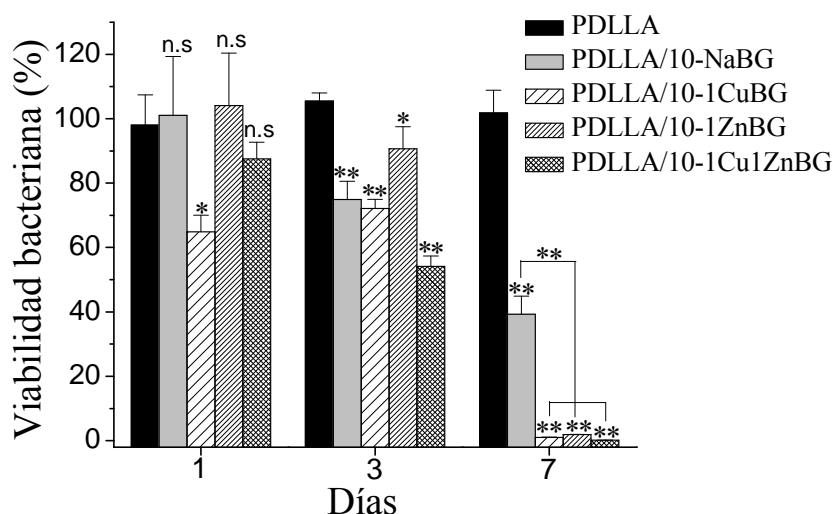


Figura 49. Viabilidad bacteriana después del ensayo de contacto directo de los scaffolds con la bacteria *S. aureus* resistente a la meticilina (ATCC33591).

Los resultados mostraron que el scaffold de PDLLA no tiene ningún efecto antibacterial durante los tres tiempos de exposición a las bacterias, tal como ha sido reportado en la literatura.[197] La incorporación de 10% en partículas del vidrio bioactivo le proporcionó capacidad antibacterial al scaffold de PDLLA, principalmente después de tres días de exposición a las bacterias. Para el primer día de exposición solamente el scaffold PDLLA/10-1CuBG presentó un efecto antibacterial significativo estadísticamente respecto al scaffold de PDLLA, debido a la más alta liberación del ion metálico (Cu^{+2}). Para siete días de contacto, el scaffold con

el vidrio no dopado PDLLA/10-NaBG alcanzó un efecto antibacterial alrededor del 60%, mientras que los scaffolds con vidrios dopados con Cu y/o Zn lograron un efecto antibacterial mayor a 98% sin diferencia estadística significativa entre ellos. En concordancia con estos resultados, Nies[87] reportó que el Zn y el Cu tienen efecto antibacterial similar, principalmente en una bacteria *E. coli*. Además, y Beherei et al.[71] reportaron que la incorporación de vidrios bioactivos con Cu y Zn aumentaba la capacidad antibacterial de una matriz de quitosano, aproximadamente con la misma magnitud para los dos iones metálicos, siendo coherente con nuestros resultados. El orden de menor a mayor efectividad antibacterial de todos los scaffolds preparados en nuestro estudio fue: PDLLA (0%), PDLLA/10-NaBG (60.7%), PDLLA/10-1ZnBG (98.1%), PDLLA/10-1CuBG (98.9%) y PDLLA/10-1Cu1ZnBG (99.8%).

Los iones metálicos son elementos traza importantes para el metabolismo de las células, por ello fueron obtenidos buenos resultados en los ensayos de citocompatibilidad, actividad ALP y VEGF. Sin embargo, en el caso de las bacterias sus estructuras y funciones celulares son mas simples que las mostradas por una célula humana, además las bacterias poseen una menor cantidad de proteínas transportadoras de Cu y Zn debido a su menor requerimiento de estos metales para su metabolismo. Lo anterior permitió que la concentración de los iones metálicos generada por los scaffolds evaluados, alcanzará un nivel toxico para las bacterias generando una interacción y degradación de sus biomoléculas lo que conllevó a la reducción de la viabilidad bacteriana.[35, 69, 87] Es de resaltar que el scaffold con el vidrio co-dopado (PDLLA/10-1Cu1ZnBG) generó una reducción bacteriana un orden de magnitud mayor a la mostrada por los scaffolds PDLLA/10-1CuBG y PDLLA/10-1ZnBG, observándose un efecto sinérgico del Cu y Zn respecto a la capacidad antibacterial, al igual que fue observado en el comportamiento con las células madres.

CAPITULO 6. CONCLUSIONES Y TRABAJOS FUTUROS

6.1. Conclusiones

Se logró preparar vidrios ternarios (58S) y cuaternarios (NaBG) dopados con 1, 5 y 10%mol de CuO y/o ZnO usando el método sol-gel. La incorporación de iones metálicos tuvo un efecto significativo sobre la microestructura, bioactividad, citocompatibilidad y actividad antibacterial de los vidrios, permitiendo una modulación de estas propiedades según el tipo de metal y su concentración. Los iones metálicos disminuyeron la disolución del vidrio e inhibieron la formación de apatita, siendo los vidrios dopados con Zn los que mostraron una mayor inhibición que los dopados con Cu. Por otro lado, el Cu y el Zn le aumentaron la capacidad antibacterial a los vidrios bioactivos. La incorporación de los metales al 1%mol, incluyendo el vidrio co-dopado con Cu y Zn, permitió una buena formación de apatita, citocompatibilidad y capacidad antibacterial.

Fue posible producir materiales porosos (scaffolds) de PDLLA con incorporación de micropartículas de vidrio dopadas con 1%mol de CuO y/o ZnO. Se obtuvieron altas porosidades adecuadas para la regeneración de tejido óseo (poros entre 100-400 μm e interconectados). Esta estructura porosa tuvo mayor influencia en las propiedades mecánicas disminuyendo la capacidad de soportar carga de los scaffolds, mientras que la incorporación de las micropartículas de vidrio mejoró el módulo de Young pero no la resistencia a la compresión. A mayor porcentaje de vidrio las propiedades mecánicas fueron afectadas.

La incorporación de partículas de vidrio logró modular la degradación de los scaffolds modificando la absorción de agua, pérdida de peso y cambio de pH del medio. Las diferentes cinéticas mostradas en la liberación de los iones Cu^{+2} y Zn^{+2} , mostró relación con las propiedades biológicas del vidrio. La incorporación de vidrios dopados con Cu y Zn le otorgó potenciales capacidades terapéuticas a los scaffolds de PDLLA, específicamente los scaffolds con vidrios con Cu presentaron mayor potencial angiogénico (expresión de VEGF) y los scaffolds con vidrios con Zn mayor potencial osteogénico (expresión de ALP). Sin embargo, altos niveles de liberación de iones metálicos puede generar citotoxicidad como fue el caso del scaffold PDLLA/30-1CuBG, mientras que los demás scaffolds evaluados presentaron alta viabilidad, y adecuada morfología y adhesión de las células madres. El scaffold con el vidrio co-dopado con Cu y Zn mostró un efecto sinérgico de los iones metálicos mostrando una potencial capacidad osteogénica y angiogénica. Con la incorporación de los vidrios dopados se le otorgó capacidad antibacterial mayor al 98% al scaffold de PDLLA, lo que es muy relevante para evitar infecciones.

Nuestros resultados mostraron que la incorporación de vidrios dopados con Cu y/o Zn en scaffolds de PDLLA, permitió obtener materiales bioactivos con propiedades terapéuticas (osteogénicas y angiogénicas) y capacidad antibacterial que los convierten en potenciales biomateriales multifuncionales para regenerar tejido óseo.

6.2. Trabajos futuros

Considerando el alcance de esta tesis doctoral, es posible establecer las siguientes líneas de trabajo futuro que permitan aprovechar los resultados y análisis desarrollados:

- Optimizar la composición de los vidrios sol-gel dopados con Cu y Zn con el fin de obtener mayor bioactividad y mejorar la respuesta terapéutica (osteogénica y angiogénica). Basado en los resultados de esta tesis, se podría evaluar porcentajes de óxido metálico menores a 1%mol.
- Probar otros efectos biológicos de estos iones metálicos como la capacidad antiinflamatoria y sintetizar vidrios con otros iones de alto interés biológico como el estroncio y el cobalto. Hacer estudios más profundos sobre el efecto real del ion metálico sobre las funciones celulares.
- Sintetizar nanopartículas de vidrio dopado y evaluar el efecto del tamaño de partícula en la liberación de iones y efecto biológico.
- Mejorar las propiedades mecánicas de los scaffolds realizando un estudio sobre las variables para producir el scaffold con porógeno y/o liofilización. También es posible usar otras técnicas de gran interés como el prototipado rápido.
- Evaluar el efecto del tamaño de partícula y su interacción con la matriz polimérica sobre las propiedades del scaffold compuesto.
- Hacer mayores pruebas *in vitro* y evaluar los scaffolds *in vivo* para aportar mayor evidencia a los potenciales terapéuticos descritos en este trabajo.
- Evaluar otros sistemas poliméricos como vehículo de liberación para los productos iónicos de los vidrios, según el tipo de defecto óseo a reparar. Por ejemplo, sistemas de hidrogeles inyectables.

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Cómo parte del desarrollo de la presente tesis doctoral se generaron los siguientes resultados agrupados en dos ítems:

I. Formación de Capacidades

- Se contribuyó a la formación y perfeccionamiento de las habilidades necesarias para proponer y conducir investigación aplicada con un alto nivel científico.
- Se contribuyó al establecimiento de una nueva línea de investigación en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile relacionada con el área de los biomateriales, específicamente materiales compuestos para aplicaciones de regeneración de hueso.

II. Producción Científica

Publicaciones en revistas internacionales con indexación ISI:

- **Julian Bejarano**, Pablo Caviedes, Humberto Palza, “Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity study of Cu and Zn doped silicate bioactive glasses”. En prensa en *Biomedical Materials*.
- Humberto Palza , Blanca Escobar, **Julian Bejarano**, Denisse Bravo, Mario Diaz-Dosque, Javier Perez, “Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol-gel method”. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 33, 3795-3801 (2013).

En preparación:

- Humberto Palza, Natalia Galarce, **Julian Bejarano**, Macarena Beltran, Pablo Caviedes. “Effect of copper nanoparticles incorporated into polymer matrices on the *in vitro* cell viability”.
- **Julian Bejarano**, Pablo Caviedes, Humberto Palza, “Comparative effect of copper and zinc ions on the in vitro bioactivity and antibacterial behavior of a sol-gel derived bioactive glass”.
- **Julian Bejarano**, Humberto Palza, Cristian Covarrubias, Aldo Boccaccini, “Evaluation of the incorporation of Cu and Zn doped bioactive glasses on the osteostimulation and antibacterial capacity of PDLLA scaffolds”

Presentación de trabajos en eventos:

- **Joint Meeting of DGG-ACerS GOMD** del 25 al 30 de Mayo en la ciudad de Aachen Alemania, donde se presentó el trabajo titulado “Development of Antimicrobial Bioactive Glasses with Copper and Zinc Ions by Sol-gel Process”.
- **25th European Conference on Biomaterials**” del 31 de Agosto al 3 de Septiembre en Liverpool, Reino Unido, donde se presentó el trabajo titulado “Synthesis and *in vitro* Bioactivity of Cu and Zn doped sol-gel-silicate bioactive glasses”.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] KINI, U. & NANDEESH, B.N. 2012. Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, & Wall H (eds) Radionucl. Hybrid Bone Imaging. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, p 1046
- [2] STEVENS, M.M. 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 11(5):18–25.
- [3] ENTERPRISES, P. 2014. Craniomaxillofacial Surgery : Essential Biomaterials. Stryker :17.
- [4] KARFELD-SULZER, L.S. & WEBER, F.E. 2012. Biomaterial development for oral and maxillofacial bone regeneration. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 38(5):264.
- [5] Bone and Joint Decade's Musculoskeletal Portal. <http://bjdonline.org/>. Accessed 24 Oct 2013
- [6] ARCOS, D. & VALLET-REGÍ, M. 2010. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. *Acta biomaterialia* 6(8):2874–88.
- [7] HOPPE, A., GÜLDAL, N.S. & BOCCACCINI, A.R. 2011. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials* 32(11):2757–74.
- [8] GAO, C., DENG, Y., FENG, P., MAO, Z., LI, P., YANG, B., DENG, J., CAO, Y., SHUAI, C. & PENG, S. 2014. Current progress in bioactive ceramic scaffolds for bone repair and regeneration. *International journal of molecular sciences* 15(3):4714–32.
- [9] CHEN, Q., ZHU, C. & THOUAS, G. A. 2012. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials* 1(1):2.
- [10] CAMPOCCIA, D., MONTANARO, L. & ARCIOLA, C.R. 2013. A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 34(33):8018–8029.
- [11] FU, Q., SAIZ, E., RAHAMAN, M.N. & TOMSIA, A.P. 2011. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 31(7):1245–1256.
- [12] CHENARD, K.E., TEVEN, C.M., HE, T.-C. & REID, R.R. 2012. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012:601549.
- [13] WU, C., ZHOU, Y., XU, M., HAN, P., CHEN, L., CHANG, J. & XIAO, Y. 2013. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials* 34(2):422–33.
- [14] BAINO, F. 2011. Biomaterials and implants for orbital floor repair. *Acta biomaterialia* 7(9):3248–66.
- [15] HENCH, L.L., SPLINTER, R.J., ALLEN, W.C. & GREENLEE, T.K. 1971. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials. *Journal of biomedical materials research symposium* 5(6):117–141.
- [16] JONES, J.R. 2013. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta biomaterialia* 9(1):4457–86.
- [17] HOPPE, A., MOURIÑO, V. & BOCCACCINI, A.R. 2013. Therapeutic inorganic ions in bioactive glasses to enhance bone formation and beyond. *Biomaterials Science* 1(3):254.
- [18] RHO, J.-Y., KUHN-SPEARING, L. & ZIOUPOS, P. 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* 20(2):92–102.
- [19] GENESER, F. 1986. *Textbook of Histology*. Muuksgcarrel: Kopenhagen

- [20] SANTOS, M.I. & REIS, R.L. 2010. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromolecular bioscience* 10(1):12–27.
- [21] VINATIER, C., MRUGALA, D., JORGENSEN, C., GUICHEUX, J. & NOËL, D. 2009. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in biotechnology* 27(5):307–14.
- [22] FURTH, M.E., ATALA, A. & VAN DYKE, M.E. 2007. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28(34):5068–73.
- [23] ENGBRETSEN, L. ET AL. 2010. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. :1072–1081.
- [24] GIANNOUDIS, P. V, EINHORN, T. A, SCHMIDMAIER, G. & MARSH, D. 2008. The diamond concept--open questions. *Injury* 39 Suppl 2:S5–8.
- [25] CORREIA, S.I., PEREIRA, H., SILVA-CORREIA, J., VAN DIJK, C.N., ESPREGUEIRA-MENDES, J., OLIVEIRA, J.M. & REIS, R.L. 2014. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 11(92):20130784.
- [26] DVIR, T., TIMKO, B.P., KOHANE, D.S. & LANGER, R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature nanotechnology* 6(1):13–22.
- [27] AVASHIA, Y.J., SASTRY, A., FAN, K.L., MIR, H.S. & THALLER, S.R. 2012. Materials used for reconstruction after orbital floor fracture. *The Journal of craniofacial surgery* 23(7 Suppl 1):1991–7.
- [28] GRISTINA, A. 1987. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Clinical orthopaedics and related research* 237(4822):4–12.
- [29] GOMES, D., PEREIRA, M. & BETTENCOURT, A.F. 2013. Osteomyelitis: an overview of antimicrobial therapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 49
- [30] GÓMEZ-BARRENA, E., ESTEBAN, J., MEDEL, F., MOLINA-MANSO, D., ORTIZ-PÉREZ, A., CORDERO-AMPUERO, J. & PUÉRTOLAS, J. A. 2012. Bacterial adherence to separated modular components in joint prosthesis: a clinical study. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* 30(10):1634–9.
- [31] LASA, I., DEL POZO, J.L., PANADÉS, J.R. & LEIVA, J. 2012. Biofilms bacterianos e infección. *ANALES-Universidad Publica de Navarra*
- [32] COSTERTON, J.W. 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284(5418):1318–1322.
- [33] PALZA, H., ESCOBAR, B., BEJARANO, J., BRAVO, D., DIAZ-DOSQUE, M. & PEREZ, J. 2013. Designing antimicrobial bioactive glass materials with embedded metal ions synthesized by the sol-gel method. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 33(7):3795–801.
- [34] PALZA, H., GUTIÉRREZ, S., DELGADO, K., SALAZAR, O., FUENZALIDA, V., AVILA, J.I., FIGUEROA, G. & QUIJADA, R. 2010. Toward Tailor-Made Biocide Materials Based on Poly(propylene)/Copper Nanoparticles. *Macromolecular rapid communications* 31(6):563–7.
- [35] TRIPATHI, A., SARAVANAN, S., PATTNAIK, S., MOORTHY, A., PARTRIDGE, N.C. & SELVAMURUGAN, N. 2012. Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering. *International journal of biological macromolecules* 50(1):294–9.
- [36] AHOLA, N., MÄNNISTÖ, N., VEIRANTO, M., KARP, M., RICH, J., EFIMOV, A., SEPPÄLÄ, J. & KELLOMÄKI, M. 2013. An in vitro study of composites of phosphate and ciprofloxacin intended for local treatment of osteomyelitis. *Biomatter, Landes Bioscience* 3:2, e2316(June):1–13.

- [37] ZHAO, L., YAN, X., ZHOU, X., ZHOU, L., WANG, H., TANG, J. & YU, C. 2008. Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release. *Microporous and Mesoporous Materials* 109(1-3):210–215.
- [38] KOLK, A., HANDSCHEL, J., DRESCHER, W., ROTHAMEL, D., KLOSS, F., BLESSMANN, M., HEILAND, M., WOLFF, K.-D. & SMEETS, R. 2012. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 40(8):706–18.
- [39] NEUMANN, A. & KEVENHOERSTER, K. 2009. Biomaterials for craniofacial reconstruction. *GMS Current Topics in Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery* 8:1–17.
- [40] BAINO, F., PERERO, S., FERRARIS, S., MIOLA, M., BALAGNA, C., VERNÉ, E., VITALE-BROVARONE, C., COGGIOLA, A., DOLCINO, D. & FERRARIS, M. 2013. Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: Overview and future prospects. *Acta biomaterialia*
- [41] WHEELER, D.L., MONTFORT, M.J. & MCLOUGHLIN, S.W. 2001. Differential healing response of bone adjacent to porous implants coated with hydroxyapatite and 45S5 bioactive glass. *Journal of biomedical materials research* 55(4):603–12.
- [42] AITASALO, K., KINNUNEN, I., PALMGREN, J. & VARPULA, M. 2001. Repair of orbital floor fractures with bioactive glass implants. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 59(12):1390–5; discussion 1395–6.
- [43] PELTOLA, M., KINNUNEN, I. & AITASALO, K. 2008. Reconstruction of orbital wall defects with bioactive glass plates. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 66(4):639–46.
- [44] SWORDS, G. 2006. US 7066962B2-Composite surgical implant made from macroporous synthetic resin and Bioglass particles.
- [45] HENCH, L.L. 2006. The story of Bioglass. *Journal of materials science Materials in medicine* 17(11):967–78.
- [46] BONFIELD, W., WANG, M. & HENCH, L.L. 1998. Bioactive composite material for repair of hard and soft tissues.
- [47] RAHAMAN, M.N., DAY, D.E., BAL, B.S., FU, Q., JUNG, S.B., BONEWALD, L.F. & TOMSIA, A.P. 2011. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta biomaterialia* 7(6):2355–73.
- [48] LI, R., CLARK, A E. & HENCH, L.L. 1991. An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. *Journal of applied biomaterials : an official journal of the Society for Biomaterials* 2(4):231–9.
- [49] SEPULVEDA, P., JONES, J.R. & HENCH, L.L. 2002. In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of biomedical materials research* 61(2):301–11.
- [50] LACZKA, M., CHOLEWA-KOWALSKA, K., LACZKA-OSYCZKA, A, TWORZYDLO, M. & TURZYNA, B. 2000. Gel-derived materials of a CaO-P(2)O(5)-SiO(2) system modified by boron, sodium, magnesium, aluminum, and fluorine compounds. *Journal of biomedical materials research* 52(4):601–12.
- [51] CARTA, D., PICKUP, D.M., KNOWLES, J.C., SMITH, M.E. & NEWPORT, R.J. 2005. Sol-gel synthesis of the P2O5-CaO-Na2O-SiO2 system as a novel bioresorbable glass. *Journal of Materials Chemistry* 15(21):2134.
- [52] SIQUEIRA, R.L., PEITL, O. & ZANOTTO, E.D. 2011. Gel-derived SiO2-CaO-Na2O-P2O5 bioactive powders: Synthesis and in vitro bioactivity. *Materials Science and Engineering: C* 31(5):983–991.

- [53] CHEN, Q.-Z., LI, Y., JIN, L.-Y., QUINN, J.M.W. & KOMESAROFF, P. A. 2010. A new sol-gel process for producing Na₂O-containing bioactive glass ceramics. *Acta biomaterialia* 6(10):4143–53.
- [54] NAGATA, M. & LÖNNERDAL, B. 2011. Role of zinc in cellular zinc trafficking and mineralization in a murine osteoblast-like cell line. *The Journal of nutritional biochemistry* 22(2):172–8.
- [55] CHEN, D., WAITE, L.C. & PIERCE, W.M. 1999. In vitro effects of zinc on markers of bone formation. *Biological trace element research* 68(3):225–34.
- [56] LAKHKAR, N.J., LEE, I.-H., KIM, H.-W., SALIH, V., WALL, I.B. & KNOWLES, J.C. 2012. Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: Role and controlled delivery from phosphate-based glasses. *Advanced drug delivery reviews* 65(4):405–20.
- [57] VARMETTE, E. A., NOWALK, J.R., FLICK, L.M. & HALL, M.M. 2009. Abrogation of the inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophages by Zn- and Cu-doped bioactive sol-gel glasses. *Journal of biomedical materials research Part A* 90(2):317–25.
- [58] OKI, A., PARVEEN, B., HOSSAIN, S., ADENIJI, S. & DONAHUE, H. 2004. Preparation and in vitro bioactivity of zinc containing sol-gel-derived bioglass materials. *Journal of biomedical materials research Part A* 69(2):216–221.
- [59] AINA, V., MALAVASI, G., FIORIO PLA, A., MUNARON, L. & MORTERRA, C. 2009. Zinc-containing bioactive glasses: surface reactivity and behaviour towards endothelial cells. *Acta biomaterialia* 5(4):1211–22.
- [60] HAIMI, S., GORIANC, G., MOIMAS, L., LINDROOS, B., HUHTALA, H., RÄTY, S., KUOKKANEN, H., SÁNDOR, G.K., SCHMID, C., MIETTINEN, S. & SUURONEN, R. 2009. Characterization of zinc-releasing three-dimensional bioactive glass scaffolds and their effect on human adipose stem cell proliferation and osteogenic differentiation. *Acta biomaterialia* 5(8):3122–31.
- [61] SRIVASTAVA, A.K. & PYARE, R. 2012. Characterization of ZnO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - Ceramics. *Journal of Materials Science Research* 1(2):207–220.
- [62] BALAMURUGAN, A., BALOSSIER, G., KANNAN, S., MICHEL, J., REBELO, A.H.S. & FERREIRA, J.M.F. 2007. Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO-P₂O₅-SiO₂-ZnO bioglass. *Acta biomaterialia* 3(2):255–62.
- [63] DU, R.L., CHANG, J., NI, S.Y., ZHAI, W.Y. & WANG, J.Y. 2006. Characterization and in vitro bioactivity of zinc-containing bioactive glass and glass-ceramics. *Journal of biomaterials applications* 20(4):341–60.
- [64] LUSVARDI, G., MALAVASI, G., MENABUE, L., MENZIANI, M.C., PEDONE, A., SEGRE, U., AINA, V., PERARDI, A., MORTERRA, C., BOCCAFOSCHI, F., GATTI, S., BOSETTI, M. & CANNAS, M. 2008. Properties of zinc releasing surfaces for clinical applications. *Journal of biomaterials applications* 22(6):505–26.
- [65] EROL, M., ÖZYUGURAN, A. & ÇELEBICAN, Ö. 2010. Synthesis, Characterization, and In Vitro Bioactivity of Sol-Gel-Derived Zn, Mg, and Zn-Mg Co-Doped Bioactive Glasses. *Chemical Engineering & Technology* 33(7):1066–1074.
- [66] FINNEY, L., VOGT, S., FUKAI, T. & GLESNE, D. 2009. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36(1):88–94.
- [67] GÉRARD, C., BORDELEAU, L.-J., BARRALET, J. & DOILLON, C.J. 2010. The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper. *Biomaterials* 31(5):824–31.
- [68] HU, G.F. 1998. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *Journal of cellular biochemistry* 69(3):326–35.
- [69] GRASS, G., RENSING, C. & SOLIOZ, M. 2011. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and environmental microbiology* 77(5):1541–7.

- [70] BARRALET, J., GBURECK, U., HABIBOVIC, P., VORNDRAN, E., GERARD, C. & DOILLON, C.J. 2009. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue engineering Part A* 15(7):1601–9.
- [71] BEHEREI, H.H., MOHAMED, K.R. & MAHMOUD, A.I. 2009. Preparation , Bioactivity and Antibacterial Effect of Bioactive Glass / Chitosan Biocomposites. *ICBME 2008, Proc.* 23. pp 1199–1203
- [72] KIM, T.N., FENG, Q.L., KIM, J.O., WU, J., WANG, H., CHEN, G.C. & CUI, F.Z. 1998. Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. *Journal of materials science Materials in medicine* 9(3):129–34.
- [73] CATTALINI, J.P., HARO, L.A., GORUSTOVICH, A.A., BOCCACCINI, A.R., SILVIA, E. & MOURIÑO, V.L. 2011. Novel Cu 2 + Releasing Composite Films for Bone Tissue Engineering. 2nd Work. *Artif. Organs, Biomater. Tissue Eng. Mar del Plata-Argentina*, pp 5–8
- [74] EROL, M., ÖZYU, A., MARA, M. & KÜÇÜKBAYRAK, S. 2013. In Vitro Evaluation of Sr and Cu Doped Bioactive Glasses. *Advanced Science Letters* 19(11):3333–3337.
- [75] EROL, M.M., MOURIÑO, V., NEWBY, P., CHATZISTAVROU, X., ROETHER, J. A, HUPA, L. & BOCCACCINI, A.R. 2012. Copper-releasing, boron-containing bioactive glass-based scaffolds coated with alginate for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia* 8(2):792–801.
- [76] SRIVASTAVA, A.K. & PYARE, R. 2012. Characterization of CuO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass - ceramics. *International Journal of Scientific & Technology Research* 1(2):28–41.
- [77] NEEL, E. A A., AHMED, I., PRATTEN, J., NAZHAT, S.N. & KNOWLES, J.C. 2005. Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres. *Biomaterials* 26(15):2247–54.
- [78] EWALD, A., KÄPPEL, C., VORNDRAN, E., MOSEKE, C., GELINSKY, M. & GBURECK, U. 2012. The effect of Cu(II)-loaded brushite scaffolds on growth and activity of osteoblastic cells. *Journal of biomedical materials research Part A* 100(9):2392–400.
- [79] GREENSPAN, D., WEST, J.K., LEE, S. & MEYERS, JAMES L. 2004. US6756060-Anti-inflammatory and Antimicrobial Uses for Bioactive Glass Compositions.
- [80] MILKOVIC, L., HOPPE, A., DETSCH, R., BOCCACCINI, A.R. & ZARKOVIC, N. 2014. Effects of Cu-doped 45S5 bioactive glass on the lipid peroxidation-associated growth of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of biomedical materials research Part A* 102(10):3556–3561.
- [81] ATMACA, S. 1998. The Effect of Zinc On Microbial Growth. *Turkish Journal of Medical Sciences* 28:595–597.
- [82] ZHOU, G., LI, Y., XIAO, W., ZHANG, L., ZUO, Y., XUE, J. & JANSEN, J. A. 2008. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohydroxyapatite/zinc oxide complex. *Journal of biomedical materials research Part A* 85(4):929–37.
- [83] M. YOUSEF, J. & N. DANIAL, E. 2012. In Vitro Antibacterial Activity and Minimum Inhibitory Concentration of Zinc Oxide and Nano-particle Zinc oxide Against Pathogenic Strains. *International Journal of Health Science* 2(4):38–42.
- [84] PHAN, T.-N., BUCKNER, T., SHENG, J., BALDECK, J.D. & MARQUIS, R.E. 2004. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms. *Oral microbiology and immunology* 19(1):31–8.
- [85] STANIĆ, V., DIMITRIJEVIĆ, S., ANTIĆ-STANKOVIĆ, J., MITRIĆ, M., JOKIĆ, B., PLEČAŠ, I.B. & RAIČEVIĆ, S. 2010. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Applied Surface Science* 256(20):6083–6089.

- [86] MATTHEWS, L., KANWAR, R.K., ZHOU, S., PUNJ, V. & KANWAR, J.R. 2010. Applications of Nanomedicine in Antibacterial Medical Therapeutics and Diagnostics. *The Open Tropical Medicine Journal* 3:1–9.
- [87] NIES, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied microbiology and biotechnology* 51(6):730–50.
- [88] MATSUMOTO, N., SATO, K., YOSHIDA, K., HASHIMOTO, K. & TODA, Y. 2009. Preparation and characterization of beta-tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions. *Acta biomaterialia* 5(8):3157–64.
- [89] LI, Y., HO, J. & OOI, C.P. 2010. Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* 30(8):1137–1144.
- [90] MALACHOVÁ, K., PRAUS, P., RYBKOVÁ, Z. & KOZÁK, O. 2011. Antibacterial and antifungal activities of silver, copper and zinc montmorillonites. *Applied Clay Science* 53(4):642–645.
- [91] MURPHY, S., BOYD, D., MOANE, S. & BENNETT, M. 2009. The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts. *Journal of materials science Materials in medicine* 20(11):2207–14.
- [92] KAALI, P., STRÖMBERG, E., AUNE, R.E., CZÉL, G. & KARLSSON, S. 2011. The influence of Ag⁺, Zn²⁺ and Cu²⁺ exchanged zeolite on antimicrobial and long term in vitro stability of medical grade polyether polyurethane. 5(12):1028–1040.
- [93] BOYD, D., LI, H., TANNER, D. A., TOWLER, M.R. & WALL, J.G. 2006. The antibacterial effects of zinc ion migration from zinc-based glass polyalkenoate cements. *Journal of materials science Materials in medicine* 17(6):489–94.
- [94] REZWAN, K., CHEN, Q.Z., BLAKER, J.J. & BOCCACCINI, A.R. 2006. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(18):3413–31.
- [95] DHANDAYUTHAPANI, B., YOSHIDA, Y., MAEKAWA, T. & KUMAR, D.S. 2011. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review. *International Journal of Polymer Science* 2011(ii):1–19.
- [96] KROEZE, R.J., HELDER, M.N., GOVAERT, L.E. & SMIT, T.H. 2009. Biodegradable Polymers in Bone Tissue Engineering. *Materials* 2(3):833–856.
- [97] AKKOUCH, A., ZHANG, Z. & ROUABHIA, M. 2011. A novel collagen/hydroxyapatite/poly(lactide-co-ε-caprolactone) biodegradable and bioactive 3D porous scaffold for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research Part A* 96(4):693–704.
- [98] JEON, O., BOUHADIR, K.H., MANSOUR, J.M. & ALSBERG, E. 2009. Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials* 30(14):2724–34.
- [99] LEAL, A.I., CARIDADE, S.G., MA, J., YU, N., GOMES, M.E., REIS, R.L., JANSEN, J. A., WALBOOMERS, X.F. & MANO, J.F. 2013. Asymmetric PDLA membranes containing Bioglass® for guided tissue regeneration: characterization and in vitro biological behavior. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 29(4):427–36.
- [100] EL-KADY, A.M., ALI, A.F. & FARAG, M.M. 2010. Development, characterization, and in vitro bioactivity studies of sol–gel bioactive glass/poly(l-lactide) nanocomposite scaffolds. *Materials Science and Engineering: C* 30(1):120–131.
- [101] CHEUNG, H.-Y., LAU, K.-T., LU, T.-P. & HUI, D. 2007. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering* 38(3):291–300.

- [102] BLAKER, J.J., NAZHAT, S.N., MAQUET, V. & BOCCACCINI, A.R. 2011. Long-term in vitro degradation of PDLLA/bioglass bone scaffolds in acellular simulated body fluid. *Acta biomaterialia* 7(2):829–40.
- [103] CEMBRANOS, J.L.L. 2004. Osteosíntesis maxilofacial con materiales reabsorbibles. *Maxilofacial osteosynthesis with resorbable material. Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial* 26:369–383.
- [104] CHEN, Q., ROETHER, J.A. & BOCCACCINI, A.R. 2008. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. *Top. Tissue Eng.* p Chapter 6
- [105] POURSAMAR, S.A., AZAMI, M. & MOZAFARI, M. 2011. Controllable synthesis and characterization of porous polyvinyl alcohol/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds via an in situ colloidal technique. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 84(2):310–6.
- [106] REA, S.M., BROOKS, R. A, BEST, S.M., KOKUBO, T. & BONFIELD, W. 2004. Proliferation and differentiation of osteoblast-like cells on apatite-wollastonite/polyethylene composites. *Biomaterials* 25(18):4503–12.
- [107] BLEACH, N.C., NAZHAT, S.N., TANNER, K.E., KELLOMÄKI, M. & TÖRMÄLÄ, P. 2002. Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate--polylactide composites. *Biomaterials* 23(7):1579–85.
- [108] LU, H.H., TANG, A., OH, S.C., SPALAZZI, J.P. & DIONISIO, K. 2005. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 26(32):6323–34.
- [109] MISRA, S.K., ANSARI, T., MOHN, D., VALAPPIL, S.P., BRUNNER, T.J., STARK, W.J., ROY, I., KNOWLES, J.C., SIBBONS, P.D., JONES, E.V., BOCCACCINI, A.R. & SALIH, V. 2010. Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7(44):453–65.
- [110] LEI, B., SHIN, K.-H., NOH, D.-Y., KOH, Y.-H., CHOI, W.-Y. & KIM, H.-E. 2012. Bioactive glass microspheres as reinforcement for improving the mechanical properties and biological performance of poly(ϵ -caprolactone) polymer for bone tissue regeneration. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 100(4):967–75.
- [111] BOCCACCINI, A.R., EROL, M., STARK, W.J., MOHN, D., HONG, Z. & MANO, J.F. 2010. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology* 70(13):1764–1776.
- [112] LUZ, G.M. & MANO, J.F. 2012. Chitosan/bioactive glass nanoparticles composites for biomedical applications. *Biomedical Materials* 7(5):054104.
- [113] LU, H.H., EL-AMIN, S.F., SCOTT, K.D. & LAURENCIN, C.T. 2003. Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer–bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64A(3):465–474.
- [114] DE OLIVEIRA, A.A.R., DE CARVALHO, S.M., LEITE, M.D.F., ORÉFICE, R.L. & PEREIRA, M.D.M. 2012. Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 100(5):1387–96.
- [115] VALENZUELA, F., COVARRUBIAS, C., MARTÍNEZ, C., SMITH, P., DÍAZ-DOSQUE, M. & YAZDANI-PEDRAM, M. 2012. Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 100(6):1672–82.
- [116] LI, H. & CHANG, J. 2004. Preparation and characterization of bioactive and biodegradable wollastonite/poly(D,L-lactic acid) composite scaffolds. *Journal of materials science Materials in medicine* 15(10):1089–95.

- [117] DENG, C., WENG, J., LU, X., ZHOU, S.B., WAN, J.X., QU, S.X., FENG, B. & LI, X.H. 2008. Preparation and in vitro bioactivity of poly(D,L-lactide) composite containing hydroxyapatite nanocrystals. *Materials Science and Engineering: C* 28(8):1304–1310.
- [118] BOCCACCINI, A.R., BLAKER, J., MAQUET, V., CHUNG, W., JEROME, R. & NAZHAT, S. 2006. Poly (D,L-lactide) (PDLLA) foams with TiO₂ nanoparticles and PDLLA/TiO₂-Bioglass (R) foam composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science* 41:3999–4008.
- [119] CHEN, Q., ZHU, C. & THOUAS, G. A. 2012. Progress and challenges in biomaterials used for bone tissue engineering: bioactive glasses and elastomeric composites. *Progress in Biomaterials* 1(1):2.
- [120] BLAKER, J.J., MAQUET, V., JÉRÔME, R., BOCCACCINI, A R. & NAZHAT, S.N. 2005. Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass composite foams as scaffolds for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia* 1(6):643–52.
- [121] MAQUET, V., BOCCACCINI, A R., PRAVATA, L., NOTINGHER, I. & JÉRÔME, R. 2003. Preparation, characterization, and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams. *Journal of biomedical materials research Part A* 66(2):335–46.
- [122] MAQUET, V., BOCCACCINI, A.R., PRAVATA, L., NOTINGHER, I. & JEROME, R. 2004. Porous poly (α-hydroxyacid)/Bioglass composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation. *Biomaterials* 25:4185–4194.
- [123] GOUGH, J.E., JONES, J.R. & HENCH, L.L. 2004. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. *Biomaterials* 25(11):2039–2046.
- [124] BLAKER, J.J., GOUGH, J.E., MAQUET, V., NOTINGHER, I. & BOCCACCINI, A R. 2003. In vitro evaluation of novel bioactive composites based on Bioglass-filled polylactide foams for bone tissue engineering scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A* 67(4):1401–11.
- [125] GERHARDT, L.-C., WIDDOWS, K.L., EROL, M.M., BURCH, C.W., SANZ-HERRERA, J. A., OCHOA, I., STÄMPFLI, R., ROQAN, I.S., GABE, S., ANSARI, T. & BOCCACCINI, A.R. 2011. The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds. *Biomaterials* 32(17):4096–108.
- [126] TSIGKOU, O., HENCH, L.L., BOCCACCINI, A.R., POLAK, J.M. & STEVENS, M.M. 2007. Enhanced differentiation and mineralization of human fetal osteoblasts on PDLLA containing Bioglass(R) composite films in the absence of osteogenic supplements. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80(4):837–851.
- [127] REN, J., BLACKWOOD, K. A., DOUSTGANI, A., POH, P.P., STECK, R., STEVENS, M.M. & WOODRUFF, M. A. 2013. Melt-electrospun polycaprolactone-strontium substituted bioactive glass scaffolds for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research Part A* 61(0):1–41.
- [128] VULPOI, A., SIMON, V., YLANEN, H. & SIMON, S. 2012. Development and in vitro assessment of bioactive glass/polymer nanostructured composites with silver. *Journal of Composite Materials* 0:1–8.
- [129] ARMENTANO, I., DOTTORI, M., FORTUNATI, E., MATTIOLI, S. & KENNY, J.M. 2010. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability* 95(11):2126–2146.
- [130] ZHANG, L.F., SUN, R., XU, L., DU, J., XIONG, Z.C., CHEN, H.C. & XIONG, C.D. 2008. Hydrophilic poly (ethylene glycol) coating on PDLLA/BCP bone scaffold for drug delivery and cell culture. *Materials Science and Engineering: C* 28(1):141–149.

- [131] TAN, Q., LI, S., REN, J. & CHEN, C. 2011. Fabrication of porous scaffolds with a controllable microstructure and mechanical properties by porogen fusion technique. *International journal of molecular sciences* 12(2):890–904.
- [132] WU, L. & DING, J. 2004. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 25:5821–5830.
- [133] ZHANG, R. & MA, P.X. 2004. Biomimetic polymer/apatite composite scaffolds for mineralized tissue engineering. *Macromolecular bioscience* 4(2):100–11.
- [134] MA, J., WANG, H., HE, B. & CHEN, J. 2001. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. *Biomaterials* 22:331–336.
- [135] KOKUBO, T. & TAKADAMA, H. 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials* 27(15):2907–15.
- [136] 2004. ISO 844-Rigid Cellular Plastics-Determination of Compression Properties.
- [137] 2000. ASTM D1621-Standard Test Method for Compressive Properties Of Rigid Cellular Plastics. :1–4.
- [138] BINI, M., GRANDI, S., CAPSONI, D., MUSTARELLI, P., SAINO, E. & VISAI, L. 2009. SiO₂-P₂O₅-CaO Glasses and Glass-Ceramics with and without ZnO: Relationships among Composition, Microstructure, and Bioactivity. *The Journal of Physical Chemistry C* 113:8821–8828.
- [139] AINA, V., CERRATO, G., MARTRA, G., MALAVASI, G., LUSVARDI, G. & MENABUE, L. 2013. Towards the controlled release of metal nanoparticles from biomaterials: Physico-chemical, morphological and bioactivity features of Cu-containing sol-gel glasses. *Applied Surface Science* 283:240–248.
- [140] LUSVARDI, G., MALAVASI, G., MENABUE, L. & MENZIANI, M.C. 2002. Synthesis , Characterization , and Molecular Dynamics Simulation of Na₂O-CaO-SiO₂-ZnO Glasses. *The Journal of Physical Chemistry B* 106:9753–9760.
- [141] LEFEBVRE, L., CHEVALIER, J., GREMILLARD, L., ZENATI, R., THOLLET, G., BERNACHE-ASSOLANT, D. & GOVIN, A. 2007. Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments. *Acta Materialia* 55(10):3305–3313.
- [142] GOH, Y.-F., ALSHEMARY, A.Z., AKRAM, M., ABDUL KADIR, M.R. & HUSSAIN, R. 2013. In vitro study of nano-sized zinc doped bioactive glass. *Materials Chemistry and Physics* 137(3):1031–1038.
- [143] GOH, Y.-F., ALSHEMARY, A.Z., AKRAM, M., ABDUL KADIR, M.R. & HUSSAIN, R. 2014. Bioactive Glass: An In-vitro Comparative Study of Doping with Nanoscale Copper and Silver Particles. *International Journal of Applied Glass Science* 5(3):255–266.
- [144] KHALIL, E.M. A., ELBATAL, F.H., HAMDY, Y.M., ZIDAN, H.M., AZIZ, M.S. & ABDELGHANY, A. M. 2010. Infrared absorption spectra of transition metals-doped soda lime silica glasses. *Physica B: Condensed Matter* 405(5):1294–1300.
- [145] HUDON, P. & BAKER, D.R. 2002. The nature of phase separation in binary oxide melts and glasses. I. Silicate systems. *Journal of Non-Crystalline Solids* 303(3):299–345.
- [146] HOPPE, A., MESZAROS, R., STÄHLI, C., ROMEIS, S., SCHMIDT, J., PEUKERT, W., MARELLI, B., NAZHAT, S.N., WONDRACZEK, L., LAO, J., JALLOT, E. & BOCCACCINI, A.R. 2013. In vitro reactivity of Cu doped 45S5 Bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B* 1(41):5659.
- [147] AZEVEDO, M.M., JELL, G., O'DONNELL, M.D., LAW, R. V., HILL, R.G. & STEVENS, M.M. 2010. Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration. *Journal of Materials Chemistry* 20(40):8854.

- [148] RENNO, A.C.M., BOSSINI, P.S., CROVACE, M.C., RODRIGUES, A.C.M., ZANOTTO, E.D. & PARIZOTTO, N.A. 2013. Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. *BioMed research international* ID 141427:7.
- [149] SIQUEIRA, R.L. & ZANOTTO, E.D. 2013. The influence of phosphorus precursors on the synthesis and bioactivity of SiO₂-CaO-P₂O₅ sol-gel glasses and glass-ceramics. *Journal of materials science Materials in medicine* 24(2):365–79.
- [150] CHEN, Q.Z., THOMPSON, I.D. & BOCCACCINI, A.R. 2006. 45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27(11):2414–25.
- [151] WANG, P., LI, C., GONG, H., JIANG, X., WANG, H. & LI, K. 2010. Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process. *Powder Technology* 203(2):315–321.
- [152] BI, L., JUNG, S., DAY, D., NEIDIG, K., DUSEVICH, V., EICK, D. & BONEWALD, L. 2012. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A* 100(12):3267–3275.
- [153] EL-KADY, A.M. & ALI, A.F. 2012. Fabrication and characterization of ZnO modified bioactive glass nanoparticles. *Ceramics International* 38(2):1195–1204.
- [154] HABIBOVIC, P. & BARRALET, J.E. 2011. Bioinorganics and biomaterials: bone repair. *Acta biomaterialia* 7(8):3013–26.
- [155] BIELBY, R.C., CHRISTODOULOU, I.S., PRYCE, R.S., RADFORD, W.J.P., HENCH, L.L. & POLAK, J.M. 2004. Time- and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue engineering* 10(7-8):1018–26.
- [156] LIU, X., RAHAMAN, M.N. & DAY, D.E. 2014. In Vitro Degradation and Conversion of Melt-Derived Microfibrous Borate (13-93B3) Bioactive Glass Doped with Metal Ions. *Journal of the American Ceramic Society* 97(11):3501–3509.
- [157] SIQUEIRA, R.L. & ZANOTTO, E.D. 2011. Facile route to obtain a highly bioactive SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ crystalline powder. *Materials Science and Engineering: C* 31(8):1791–1799.
- [158] LIU, G., TALLEY, J.W., NA, C., LARSON, S.L. & WOLFE, L.G. 2010. Copper doping improves hydroxyapatite sorption for arsenate in simulated groundwaters. *Environmental science & technology* 44(4):1366–72.
- [159] WERS, E., BUNETEL, L., OUDADESSE, H., LEFEUVRE, B., MOSTAFA, A. & PELLEN, P. 2013. Effect of Copper and Zinc on the Bioactivity and Cells Viability of Bioactive Glasses. *Bioceram. Dev. Appl.* p S1:013
- [160] BIGI, A., FORESTI, E., GANDOLFI, M., GAZZANO, M., ROVERI, N., GAN, M., DIPARTIMENTO, N.R. & BOLOGNA, U. 1995. Inhibiting Effect of Zinc on Hydroxylapatite Crystallization. *Journal of Inorganic Biochemistry* 58(1995):49–58.
- [161] REN, F., XIN, R., GE, X. & LENG, Y. 2009. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. *Acta biomaterialia* 5(8):3141–9.
- [162] SCHREIBER, H.D., KOCHANOWSKI, B.K., SCHREIBER, C.W., MORGAN, A.B., COOLBAUGH, M.T. & DUNLAP, T.G. 1994. Compositional dependence of redox equilibria in sodium silicate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 177:340–346.
- [163] ABDRAKHMANOV, R. & IVANOVA, T. 1978. The influence of quadrupole effects on Cu(II) ESR spectra in glasses. *Journal of Molecular Structure* 46:229–244.
- [164] ZHANG, Z., DONG, H., GORMAN, B.P., MUELLER, D.W. & REIDY, R.F. 2004. Behavior of copper ions in silica xerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids* 341:157–161.

- [165] MORTAZAVI, V., NAHRKHALAJI, M.M., FATHI, M.H., MOUSAVI, S.B. & ESFAHANI, B.N. 2010. Antibacterial effects of sol-gel-derived bioactive glass nanoparticle on aerobic bacteria. *Journal of biomedical materials research Part A* 94(1):160–168.
- [166] SILVER, I.A., DEAS, J. & ERECIN, M. 2001. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro : effects of 45S5 Bioglass (R), and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 22:175–185.
- [167] SINGH, R.P., KUMAR, S., NADA, R. & PRASAD, R. 2006. Evaluation of copper toxicity in isolated human peripheral blood mononuclear cells and it's attenuation by zinc: ex vivo. *Molecular and cellular biochemistry* 282(1-2):13–21.
- [168] CAO, B., ZHENG, Y., XI, T., ZHANG, C., SONG, W., BURUGAPALLI, K., YANG, H. & MA, Y. 2012. Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomedical microdevices* 14(4):709–20.
- [169] LODEMANN, U., EINSPANIER, R., SCHARFEN, F., MARTENS, H. & BONDZIO, A. 2013. Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 27(2):834–43.
- [170] ZHANG, X.Q., YIN, L.H., TANG, M. & PU, Y.P. 2011. ZnO, TiO₂, SiO₂, and Al₂O₃ Nanoparticles-induced Toxic Effects on Human Fetal Lung Fibroblasts. *Biomedical and Environmental Sciences* 24(6):661–669.
- [171] AINA, V., PERARDI, A., BERGANDI, L., MALAVASI, G., MENABUE, L., MORTERRA, C. & GHIGO, D. 2007. Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts. *Chemico-biological interactions* 167(3):207–18.
- [172] ISO STANDARD 10993-5. 2009. Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods.
- [173] HU, S., CHANG, J., LIU, M. & NING, C. 2009. Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass. *Journal of materials science Materials in medicine* 20(1):281–6.
- [174] ZHANG, D., LEPPÄRANTA, O., MUNUKKA, E., YLÄNEN, H., VILJANEN, M.K., EEROLA, E., HUPA, M. & HUPA, L. 2009. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93(2):475–483.
- [175] MARTINS, C.H.G., CARVALHO, T.C., SOUZA, M.G.M., RAVAGNANI, C., PEITL, O., ZANOTTO, E.D., PANZERI, H. & CASEMIRO, L.A. 2011. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate® against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *Journal of materials science Materials in medicine* 22(6):1439–46.
- [176] MUNUKKA, E., LEPPÄRANTA, O., KORKEAMÄKI, M., VAAHTIO, M., PELTOLA, T., ZHANG, D., HUPA, L., YLÄNEN, H., SALONEN, J.I., VILJANEN, M.K. & EEROLA, E. 2008. Bactericidal effects of bioactive glasses on clinically important aerobic bacteria. *Journal of materials science Materials in medicine* 19(1):27–32.
- [177] BORKOW, G. & GABBAY, J. 2005. Copper as a Biocidal Tool. *Current medicinal chemistry* 12:2163–2175.
- [178] ASHBY, M., SHERCLIFF, H. & CEBON, D. 2007. *Materials: Engineering, Science, Processing and Design*. Elsevier Ltd.
- [179] VERRIER, S., BLAKER, J.J., MAQUET, V., HENCH, L.L. & BOCCACCINI, A.R. 2004. PDLA/Bioglass s composites for soft-tissue and hard-tissue engineering: an in vitro cell biology assessment. *Biomaterials* 25:3013–3021.
- [180] HOUMARD, M., QIANG, F., SAIZ, E. & TOMSIA, A.P. 2013. Sol-gel method to fabricate CaP scaffolds by robocasting for tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 23(4):921–930.

- [181] HENNO, S., LAMBOTTE, J.C., GLEZ, D., GUIGAND, M., LANCIEN, G. & CATHELIN, G. 2003. Characterisation and quantification of angiogenesis in β -tricalcium phosphate implants by immunohistochemistry and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 24(19):3173–3181.
- [182] SUNDELACRUZ, S. & KAPLAN, D.L. 2009. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Seminars in cell & developmental biology* 20(6):646–55.
- [183] ZHANG, R. & MA, P.X. 1999. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology. *Journal of biomedical materials research* 44(4):446–55.
- [184] SMITH, D. & PIVONKA, P. Design and optimization of 3D scaffolds for orthopaedic devices and applications. The University of Western Australia School of Computer Science and Software Engineering Engineering Computational Biology :http://biomed.csse.uwa.edu.au/research3_4.php.
- [185] TORRES, F., NAZHAT, S., SHEIKHMDFADZULLAH, S., MAQUET, V. & BOCCACCINI, A. 2007. Mechanical properties and bioactivity of porous PLGA/TiO₂ nanoparticle-filled composites for tissue engineering scaffolds. *Composites Science and Technology* 67(6):1139–1147.
- [186] CHARLES-HARRIS, M., DEL VALLE, S., HENTGES, E., BLEUET, P., LACROIX, D. & PLANELL, J. A. 2007. Mechanical and structural characterisation of completely degradable polylactic acid/calcium phosphate glass scaffolds. *Biomaterials* 28(30):4429–38.
- [187] LÁCTICO, L.Á. & MOTTA, A.C. 2007. Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (L-co-D,L Ácido Láctico). *Polimeros* 17(2):123–129.
- [188] COLEMAN, N.J., BELLANTONE, M., NICHOLSON, J.W. & MENDHAM, A.P. 2007. Textural and structural properties of bioactive glasses in the system CaO–SiO₂. *Ceramics-Silikaty* 51(1):1–8.
- [189] SRIVASTAVA, A.K. & PYARE, R. 2012. Characterization of CuO substituted 45S5 Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. *International Journal of Scientific and Technology Research* 1(2):28–41.
- [190] KOORT, J.K., MAKINEN, T.J., SUOKAS, E., VEIRANTO, M., JALAVA, J., TORMALA, P. & ARO, H.T. 2008. Sustained release of ciprofloxacin from an osteoconductive poly(DL)-lactide implant. *Acta orthopaedica* 79(2):295–301.
- [191] KIKUCHI, M., KOYAMA, Y., YAMADA, T., IMAMURA, Y., OKADA, T., SHIRAHAMA, N., AKITA, K., TAKAKUDA, K. & TANAKA, J. 2004. Development of guided bone regeneration membrane composed of beta-tricalcium phosphate and poly (L-lactide-co-glycolide-co-epsilon-caprolactone) composites. *Biomaterials* 25(28):5979–86.
- [192] PIAO, M.J., KANG, K.A., LEE, I.K., KIM, H.S., KIM, S., CHOI, J.Y., CHOI, J. & HYUN, J.W. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology letters* 201(1):92–100.
- [193] LEAL, A.I. 2011. Tesis de Magister: “Asymmetric PDLLA Membranes Containing Bioglass® for Guided Tissue Regeneration.” Universidade do Minho
- [194] OTSUKA, E., YAMAGUCHI, A., HIROSE, S. & HAGIWARA, H. 1999. Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid. *The American journal of physiology* 277(1 Pt 1):C132–8.
- [195] LAI, Y.L. & YAMAGUCHI, M. 2005. Effects of copper on bone component in the femoral tissues of rats: anabolic effect of zinc is weakened by copper. *Biological & pharmaceutical bulletin* 28(12):2296–301.

- [196] RODRIGUEZ, J.P., RIOS, S. & GONZALES, M. 2002. Modulation of the Proliferation and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Copper. *Journal of cellular biochemistry* 100(85):92–100.
- [197] MCMILLAN, D.J., LUTTON, C., ROSENZWEIG, N., SRIPRAKASH, K., GOSS, B., STEMBERGER, M., SCHUETZ, M. & STECK, R. 2011. Prevention of *Staphylococcus aureus* biofilm formation on metallic surgical implants via controlled release of gentamicin. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 4:535–542.