



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**SÍNTESIS DE BIOVIDRIOS DOPADOS CON COBALTO POR  
SOL-GEL Y SUS EFECTOS EN BIOACTIVIDAD Y MIGRACIÓN  
AL INCORPORARLOS EN PDLLA.**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA  
INGENIERÍA MENCIÓN QUÍMICA.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO

**ANTOINE GERARD LEÓN SERVANTI RIVERA**

PROFESOR GUÍA  
HUMBERTO PALZA CORDERO

MIEMBROS DE LA COMISIÓN  
VICENTE TORRES GÓMEZ  
ÁLVARO OLIVERA NAPPA  
CRISTIAN COVARRUBIAS GALLARDO

SANTIAGO DE CHILE  
2017

## **RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO**

**DE:** Ingeniero civil químico y magister en ciencias de la ingeniería mención química.

**POR:** Antoine Gerard León Servanti Rivera

**FECHA:** 28/11/2017

**PROFESOR GUÍA:** Humberto Palza Cordero

### **Síntesis de biovidrios dopados con cobalto por sol-gel y sus efectos en bioactividad y migración al incorporarlos en PDLLA**

Uno de los mayores desafíos para la ingeniería de tejidos óseos es el desarrollo de estructuras que puedan promover la formación de hueso y estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). El biovidrio es un material prometedor en el área de regeneración ósea y corresponde a un vidrio cerámico que puede ser dopado con distintos elementos, permitiendo otorgarle nuevas funcionalidades. En particular se destacan los iones metálicos terapéuticos, tales como el cobalto, debido a su capacidad de mejorar la angiogénesis. Esta tesis pretende desarrollar vidrios dopados con cobalto mediante el método sol-gel y estudiar los efectos que tiene la incorporación de este ión en las propiedades finales del material.

Se sintetizaron mediante 2 métodos sol-gel distintos vidrios bioactivos ternarios ( $60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$  %mol) dopados con 1, 2 y 4%mol de  $\text{CoO}$ , buscando obtener micro y nanopartículas (método 1 y 2 respectivamente). El área específica, la nanotopografía y el rol del cobalto en la estructura, ya sea como óxido intermediario o modificador de red, de los materiales obtenidos dependen del método de síntesis. Todos presentaron una disminución de la bioactividad al incorporar cobalto, pero las micropartículas presentaron mejores propiedades de liberación de cobalto. Así también, las micropartículas presentaron mejores resultados de viabilidad celular en comparación con las nanopartículas, asociado a las mayores áreas superficiales y mayor liberación de calcio de estas últimas. Por otro lado, todos los materiales presentaron una capacidad alcalinizadora que afectó negativamente tanto a las células SaOS-2 como Ea.HY, durante los ensayos de citocompatibilidad y migración. Se prepararon mediante fundido compósitos de PDLLA con un 10% en peso de vidrios sintetizados por el método 1. Después de 28 días de inmersión en SBF no se observó la formación de apatita mediante SEM o DRX, pero el análisis EDS indica una razón Ca/P relacionada a esta fase mineral. Además, la incorporación de vidrio en una matriz polimérica permitió regular la liberación de iones, mitigando los efectos alcalinizadores. Los compósitos con biovidrios dopados con cobalto presentaron mayores migraciones que el compósito con vidrio ternario, pero faltan estudios de los factores angiogénicos para determinar el efecto terapéutico del cobalto.

Los efectos del dopaje con cobalto y la incorporación de estos vidrios en matrices poliméricas descritos en este trabajo proporcionan información importante a la hora de decidir el uso de estos materiales en ingeniería de tejidos y regeneración ósea.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi profesor guía Humberto Palza, quien me dio la oportunidad y los medios para realizar este trabajo. Siempre me alentó a avanzar un poco más, me apoyó incondicionalmente en las decisiones tomadas y mostró confianza hasta en momentos donde yo ya la había perdido. A todos los integrantes del Laboratorio de Ingeniería de Polímeros, en especial a Juan Benavides por su ayuda y apoyo durante todos estos años. A mi profesor co-guía Vicente Torres, quien abrió las puertas de su laboratorio y me hizo sentir como en casa. A Julián Bejarano por toda la ayuda al realizar este trabajo.

A mi padre Pierre quien me enseñó la importancia y el poder del conocimiento. Sin su ayuda jamás hubiese estudiado y sin su paciencia no podría haber realizado este trabajo. A mi madre Isabel, quien siempre supo aconsejarme y me otorgó calma en momentos de desesperación. A mis hermanas Françoise y Muriel por soportarme y siempre entregarme cariño. A mi familia en general por alentarme a terminar esto. A mi tía Pili, Pili chica, I-ván y Lligue que ya son mi segunda familia. A mis dos Cármenes, por sus muestras de amor infinitas.

Gracias a mis amigos de la vida Medina, Goga y Super por el estar siempre, quienes de cierta manera compartieron conmigo la carga de esta tesis. Junto a ellos, a mis amigos de Rawr team (Felits, Reed, Claudin y Whats) y los Chope (Lajar, Pablo, Wkk, Shesho, Dona y Woxito) con los que compartí casi todos los días durante estos 3 años y transformaron todo este proceso en una tragicomedia. A Edgars y Javi, que a pesar de estar a miles de kilómetros de distancia siempre se han preocupado por mí. A Ronald, que con su mirada crítica me hace ver el mundo de otra manera.

A la Anji, sin ella jamás hubiese empezado a escribir la tesis. A mis compañeros de piso Felipe, Marmota y Claudio, con los que compartiendo aliviaron mi mente. A Constanza Romero y su familia, quienes me apoyaron y dieron ánimo durante el año más agobiante de este trabajo. A mis compañeros de colegio, con quienes me descargué contra esta tesis, a mis amigos de ingeniería, quienes evitaron en gran medida hablar de ella. A mis compañeros de Ing. Química, en especial a Pancho y su asna, Frodo y Caro. A M4E y su gente, por ser en algún momento como mi 5ta casa. A todos los del FDG por los tirones de oreja para que terminara y a los jueguitos de computadora, que es lo mejor que me pasó.

# TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo 1 Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 Motivación.....	1
<b>Capítulo 2 Estado del arte</b> .....	<b>2</b>
2.1 Hueso.....	2
2.2 Biomateriales para regeneración ósea.....	4
2.2.1 Biocerámicos.....	6
2.2.2 Polímeros.....	13
2.2.3 Compósitos.....	15
2.3 Angiogénesis.....	16
<b>Capítulo 3 Propuesta y objetivos de la investigación</b> .....	<b>18</b>
3.1 Hipótesis .....	18
3.2 Objetivos generales .....	18
3.3 Objetivos específicos .....	18
<b>Capítulo 4 metodología</b> .....	<b>19</b>
4.1 Síntesis y caracterización biovidrios .....	19
4.1.1 Síntesis .....	19
4.1.2 Caracterización .....	20
4.2 Preparación compósitos y caracterización .....	21
4.3 Ensayos Biológicos .....	21
4.3.1 Citocompatibilidad in-vitro .....	21
4.3.2 Ensayos de migración .....	22
<b>Capítulo 5 Resultados y discusión</b> .....	<b>24</b>
5.1 Caracterización de vidrios bioactivos por síntesis 1 .....	24
5.1.1 Caracterización de microestructura y textura de las partículas sintetizadas. ....	24
5.1.2 Bioactividad: Formación de apatita y liberación de iones.....	27
5.1.3 Liberación de Co y cambio de pH .....	34
5.2 Caracterización de vidrios bioactivos por síntesis 2.....	38
5.2.1 Caracterización de microestructura y textura de las partículas sintetizadas. ....	38
5.2.2 Bioactividad: Formación de apatita y liberación de iones.....	43

5.2.3 Liberación de Co y cambio de pH .....	48
5.3 Caracterización de materiales compuestos PDLLA/Biovidrios 1 .....	51
5.4 Ensayos biológicos .....	56
5.4.1 Citocompatibilidad .....	56
5.4.2 Migración .....	59
<b>Capítulo 6 Conclusiones .....</b>	<b>66</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COMPOSICIONES TEÓRICAS Y MEDIDAS POR ESPECTROSCOPÍA ICP-OES DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 .....	25
TABLA 2. ÁREAS SUPERFICIALES DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 .....	26
TABLA 3. RAZÓN CA/P DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 SUMERGIDOS 7 DÍAS EN SBF. ..	33
TABLA 4. COMPOSICIONES TEÓRICAS Y MEDIDAS POR FLUORESCENCIA DE RAYOS X DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 2 .....	41
TABLA 5. ÁREAS SUPERFICIALES DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 2 .....	41
TABLA 6. RAZÓN CA/P DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 2 SUMERGIDOS DURANTE 7 DÍAS EN SBF .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. LA MICROESTRUCTURA DE UN HUESO TÍPICO. TOMADO DE [8] Y MODIFICADO .....	3
FIGURA 2. MECANISMO DE LA FORMACIÓN DE APATITA EN LA SUPERFICIE DE VIDRIOS BASADOS EN CAO-SiO <sub>2</sub> . [20] .....	8
FIGURA 3. ESQUEMA DE LAS DISTINTAS CAPAS PRESENTES EN EL SISTEMA MATERIAL-HUESO [21]. .....	9
FIGURA 4. LÍMITES COMPOSICIONALES PARA EL BIOVIDRIO SEGÚN BIOACTIVIDAD. TODAS LAS COMPOSICIONES CONTIENEN UN 6% DE P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> [22]. .....	10
FIGURA 5. A) LIBERACIÓN DE COBALTO EN SCAFFOLDS SINTERIZADOS DE BIOVIDRIO DOPADO CON COBALTO EN 0%, 2% Y 5% EN PESO. B) SECRECIÓN DE VEGF EN CÉLULAS ESTROMALES DE MÉDULA ÓSEA (BMSC) DESPUÉS DE 7 DÍAS. TOMADO DE [38] Y MODIFICADO .....	13
FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ÁCIDO POLI LÁCTICO (PLA) Y DEL ÁCIDO POLI GLICÓLICO .....	14
FIGURA 7. ESQUEMA DE ENSAYO DE HERIDA REALIZADO CON CÉLULAS EA.HY Y POSICIÓN DEL DISCO DE COMPÓSITO EN EL POCILLO. LOS NÚMEROS DE LA IMAGEN DE LA DERECHA CORRESPONDEN A LAS ZONAS FOTOGRAFIADAS. ....	23
FIGURA 8. MICROPARTÍCULAS TERNARIAS SINTETIZADAS POR EL MÉTODO 1 QUE CORRESPONDEN A A) MBG58s, B) MBGCo1, C) MBGCo2, D) MBGCo4 .....	24
FIGURA 9. DIFRACTOGRAMAS DE LOS VIDRIOS TERNARIOS Y DOPADOS CON COBALTO SINTETIZADOS MEDIANTE EL MÉTODO 1. LA FASE CRISTALINA MARCADA COMO (■) CORRESPONDE A SILICATO DE CALCIO Ca <sub>2</sub> SiO <sub>4</sub> (00-029-0369). ....	27
FIGURA 10. DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X DE LOS VIDRIOS A) MBG58s, B) MBGCo1, C) MBGCo2 Y D) MBGCo4 DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN SBF DURANTE 6 HORAS, 1, 3 Y 7 Y 14 DÍAS. LAS FASES CRISTALINAS CORRESPONDEN A HIDROXIAPATITA (•) Y CALCITA (o). ....	28

FIGURA 11. IMÁGENES SEM DE LAS MUESTRAS INMERSAS DURANTE 7 DÍAS EN SBF. LOS VIDRIOS CORRESPONDIENTES SON A) MBG58s, B) MBGCo1, C) MBGCo2 Y D) MBGCo4. ....	30
FIGURA 12. ESTRUCTURAS HUECAS DE HIDROXIAPATITA PRESENTES EN LA SUPERFICIE EL MATERIAL MBGCo4. ....	31
FIGURA 13. FOTO SEM DE LOS MATERIALES INMERSOS EN SBF DURANTE 7 DÍAS. A LA IZQUIERDA SE PRESENTAN LOS CRISTALES FORMADOS SOBRE EL MATERIAL MBG58s, MIENTRAS QUE A LA DERECHA LOS FORMADOS SOBRE EL MATERIAL MBGCo4. ....	32
FIGURA 14. ANÁLISIS COMPOSICIONAL POR EDS PARA A) MBG58s Y B) MBGCo4 AMBOS ANTES DEL ENSAYO, C) MBG58s Y D) MCo4 AMBOS DESPUÉS DE 7 DÍAS SUMERGIDOS EN SBF. ....	33
FIGURA 15. LIBERACIÓN DE $Co^{2+}$ DESDE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 HACIA EL SBF PARA 6 HORAS, 1, 3, 7 Y 14 DÍAS DE INMERSIÓN. ....	35
FIGURA 16. CAMBIO DE PH EN EL MEDIO SBF PRODUCTO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS VIDRIOS DURANTE EL ENSAYO DE BIOACTIVIDAD, DONDE EL BLANCO CORRESPONDE AL MEDIO SIN VIDRIOS. ....	36
FIGURA 17. PRESENCIA DE MICROPARTÍCULAS EN LOS MATERIALES SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 2. ....	38
FIGURA 18. IMAGEN TEM DEL VIDRIO TERNARIO SINTETIZADO MEDIANTE EL MÉTODO 2. ....	39
FIGURA 19. NANOPARTÍCULAS TERNARIAS SINTETIZADAS POR EL MÉTODO 2 QUE CORRESPONDEN A A) NBG58s, B) NBGCo1, C) NBGCo2, D) NBGCo4. ....	39
FIGURA 20. COMPARACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE LOS VIDRIOS DOPADOS CON 4% MOL DE COBALTO DONDE A) NBGCo4 Y B) MBGCo4. ....	40
FIGURA 21. DIFRACTOGRAMAS DE LOS VIDRIOS TERNARIOS Y DOPADOS CON COBALTO SINTETIZADOS MEDIANTE EL MÉTODO 2. LA FASE CRISTALINA MARCADA COMO (■) CORRESPONDE A SILICATO DE CALCIO $Ca_2SiO_4$ (00-029-0369). ....	42
FIGURA 22. DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X DE LOS VIDRIOS A) NBG58s Y B) NBGCo1 DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN SBF DURANTE 6 HORAS, 1, 3 7 Y 14 DÍAS. LAS FASES CRISTALINAS CORRESPONDEN A HIDROXIAPATITA (●) Y CALCITA (○). ....	43
FIGURA 23. DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X DE LOS VIDRIOS A) NBGCo2 Y B) NBGCo4 DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN SBF DURANTE 6 HORAS, 1, 3 7 Y 14 DÍAS. LAS FASES CRISTALINAS CORRESPONDEN A HIDROXIAPATITA (●) Y CALCITA (○). ....	44
FIGURA 24. IMAGEN SEM DE LOS CRISTALES FORMADOS SOBRE EL VIDRIO NBG58s DESPUÉS DE 7 DÍAS DE INMERSIÓN EN SBF. ....	45
FIGURA 25. IMÁGENES SEM DE LAS MUESTRAS INMERSAS DURANTE 7 DÍAS EN SBF. LOS VIDRIOS CORRESPONDIENTES SON A) NBG58s, B) NBGCo1, C) NBGCo4. ....	46
FIGURA 26. ANÁLISIS COMPOSICIONAL POR EDS PARA A) NBG58s, B) NBGCo1, C) NBGCo2 Y D) NBGCo4. ....	47
FIGURA 27. LIBERACIÓN DE $Co^{2+}$ DESDE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 HACIA EL SBF PARA 6 HORAS, 1, 3, 7 Y 14 DÍAS DE INMERSIÓN. ....	48
FIGURA 28. CAMBIO DE PH EN EL MEDIO SBF PRODUCTO DE LA DISOLUCIÓN DE LOS VIDRIOS DURANTE EL ENSAYO DE BIOACTIVIDAD, DONDE EL BLANCO CORRESPONDE AL MEDIO SIN VIDRIOS. ....	50
FIGURA 29. DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X DEL POLÍMERO PDLLA UTILIZADO EN LOS COMPÓSITOS, INMERSO DURANTE 0, 14 Y 28 DÍAS EN SBF. ....	51
FIGURA 30. CAMBIO DE PH EN EL MEDIO SBF DURANTE EL ENSAYO DE BIOACTIVIDAD, DONDE EL BLANCO CORRESPONDE AL MEDIO SIN MATERIALES A ESTUDIAR. ....	52
FIGURA 31. DIFRACTOGRAMAS DE RAYOS X DE LOS COMPÓSITOS DESPUÉS DE SU INMERSIÓN EN SBF DURANTE 28 DÍAS. ....	53
FIGURA 32. IMÁGENES SEM DE LAS MUESTRAS A) PDLLA/MBG58s Y B) PDLLA/MBGCo4, INMERSAS DURANTE 28 DÍAS. ....	54
FIGURA 33. ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN DE LA SUPERFICIE DEL COMPÓSITO PDLLA/MBG58s MEDIANTE EDS. ....	55
FIGURA 35. ENSAYO DE MTT PARA EVALUAR LA CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 1 EN CÉLULAS SAOS-2. ....	56
FIGURA 36. CITOCOMPATIBILIDAD DE LOS VIDRIOS SINTETIZADOS POR EL MÉTODO 2. ....	57
FIGURA 37. ENSAYO DE MIGRACIÓN CON CÉLULAS EXPUESTAS A LAS PARTÍCULAS DE VIDRIO. ....	59
FIGURA 38. ENSAYOS DE HERIDA APLICANDO DIRECTAMENTE POLVOS DE NBGCo4 MOSTRANDO LA ALTA VARIABILIDAD DE LOS ENSAYOS. ....	60

FIGURA 39. ENSAYO DE HERIDA APLICANDO DIRECTAMENTE POLVOS DE NBG58S MOSTRANDO LA ALTA VARIABILIDAD DE LOS ENSAYOS. ....	60
FIGURA 40. ENSAYO DE MIGRACIÓN CON CÉLULAS EXPUESTAS A LOS PRODUCTOS DE DISOLUCIÓN DE LOS MICROVIDRIOS, DISUELTOS DURANTE 24 HORAS. ....	61
FIGURA 41. VARIACIONES EN EL CIERRE DE HERIDA PARA LAS CÉLULAS EXPUESTAS A LOS PRODUCTOS DE DISOLUCIÓN DEL VIDRIO MBGCo4. ....	62
FIGURA 42. ENSAYO DE MIGRACIÓN CON CÉLULAS EXPUESTAS A LOS COMPÓSITOS DE PDLLA Y MICROVIDRIOS. ....	63
FIGURA 43. ENSAYO DE MIGRACIÓN UTILIZANDO A) Y B) PDLLA/MBG58S, ANTES Y DESPUÉS DE 16 HORAS DE EXPOSICIÓN Y C) Y D) PDLLA/MBGCo4, ANTES Y DESPUÉS DEL MISMO INTERVALO. ....	64

# CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Motivación

Mundialmente el número de traumatismos relacionados con las estructuras óseas sobrepasa las decenas de millones de casos anualmente. Se estima que para el año 2050 habrá cerca de 700 mil fracturas de cadera solo en Latinoamérica lo que se traduce en costos de 13 billones de dólares, los cuales corresponden a costos de hospitalización, medicamentos, tratamientos, licencias, etc.[1]. Para las distintas patologías óseas hay un rango de entre 3 semanas y 6 meses de recuperación, por lo que resulta atractivo buscar un medio que permita reducir los tiempos de recuperación, mejorar la calidad con la que se regeneran los tejidos óseos y la calidad de vida de los pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos y es acá donde la ingeniería de tejidos y/o la medicina regenerativa pueden tener un rendimiento excepcional. Entre 1980 y 2000 comienza el estudio de biomateriales de segunda generación, enfocados en desarrollar materiales que interactúen con el ambiente biológico de manera óptima, mejorando la respuesta biológica por parte del organismo, las uniones del tejido con la superficie del material y la degradación progresiva del material a medida que el tejido se regenera, destacándose los cerámicos por sus similitudes con la fase mineral del hueso, permitiendo una fácil unión sin la mediación de tejido conectivo fibroso. Muchos cerámicos bioactivos presentan propiedades de biocompatibilidad y osteoconductividad, entre los cuales destacan los biovidrios por la rápida inducción en el crecimiento de hueso en sistemas biológicos en comparación con cerámicos como la hidroxiapatita y por la capacidad de incorporar distintos metales en su estructura para luego ser liberados e interactuar con sistemas biológicos, pero debido a sus pobres propiedades mecánicas este material se ve limitado a aplicaciones de baja carga[2]. Por esto resulta atractivo realizar compósitos utilizando polímeros biocompatibles, como el PDLLA, con el fin de obtener un material de alta procesabilidad y cuyas propiedades mecánicas pueden ser moduladas acorde a la aplicación deseada. Hoy en día, estos materiales carecen de la habilidad de regenerar defectos de mayor tamaño, donde es necesaria la formación de vasos sanguíneos en el tejido regenerado para que este se provea de nutrientes y no muera[3]. Si bien este proceso se puede estimular mediante factores de crecimiento suministrados de manera exógena, el uso de iones metálicos como el cobalto es más atractivo, dado que este elemento demuestra un potencial angiogénico y es capaz de mantenerse estable durante la síntesis y procesamiento del material[4].



## CAPÍTULO 2 ESTADO DEL ARTE

### 2.1 Hueso

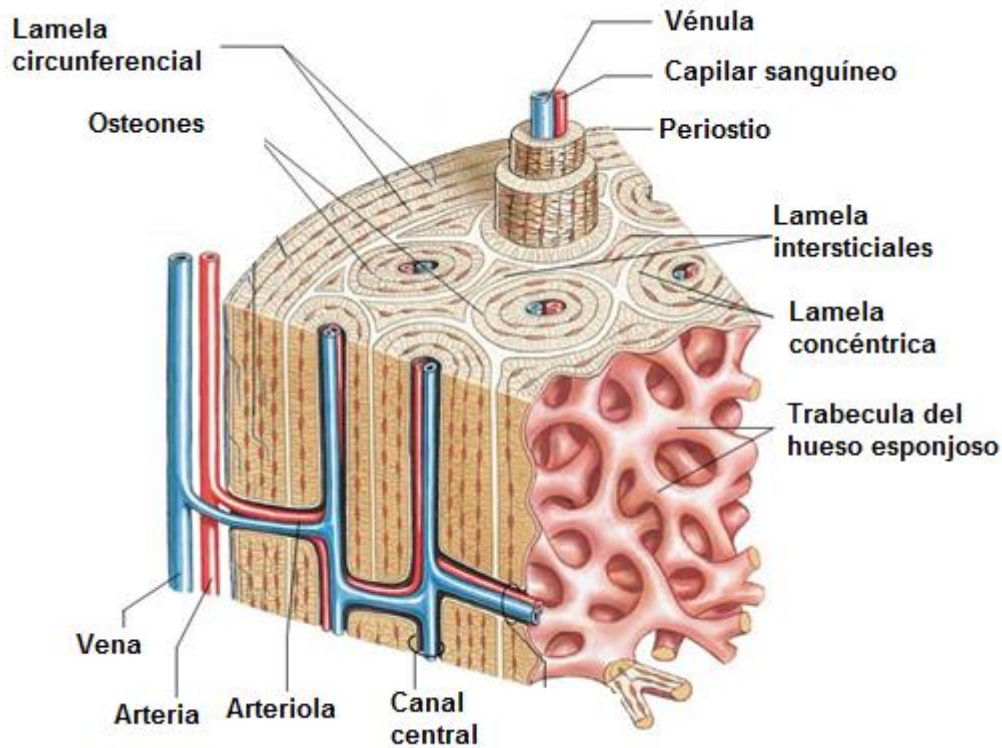
El hueso es un tejido conectivo metabólicamente activo que provee soporte estructural y mecánico para los músculos, protección de estructuras vitales, reserva de minerales y factores de crecimiento, regulación de la homeostasis mineral y acido-base y sitio para la hematopoyesis (formación, desarrollo y duración de células y derivados celulares que circulan por la sangre)[5]. El hueso como un órgano tiene junto a su compleja composición celular una arquitectura orgánica-inorgánica altamente especializada, que puede ser clasificada como tejido micro o nanocompósito. Es una matriz mineralizada que consiste en:

- 1) Una fase orgánica, conformada principalmente por colágeno (35% en peso seco) responsable de la rigidez transversal (*Shear modulus*), viscoelasticidad y resistencia.
- 2) Una fase mineral compuesta por apatita carbonatada (65% del peso seco) que actúa como un refuerzo estructural, provee rigidez (*stiffness*) y capacidad homeostática mineral.
- 3) Una fase de proteínas no colagenosa que forman un microambiente estimulador para las funciones celulares[6].

Dos tipos de tejidos óseos pueden ser encontrados en todos los huesos: hueso compacto o cortical y hueso esponjoso o trabecular. El hueso cortical se encuentra principalmente en el eje central de los huesos largos (Diáfisis) y está compuesto de numerosas unidades cilíndricas solapadas llamadas osteones o sistema de Havers. El canal haversiano central, que contiene vasos sanguíneos y nervios, está rodeado de fibrillas de colágeno densamente empaquetadas de manera concéntrica, denominadas lamelas, entre estas se encuentran los osteocitos. Los canales de Volkmann son los responsables de dar paso a los vasos sanguíneos desde o hacia los canales haversianos. Esta densa organización resulta en un material de alta resistencia a la flexión y torsión, lo que provee al hueso cortical de una resistencia y capacidad de carga alta.

Por otro lado, el hueso trabecular se encuentra al final de los huesos largos (Epífisis) como también en huesos planos o dentro de las vértebras, lugares donde las fuerzas son aplicadas en varios ángulos. Está compuesto de una red de tejido esponjoso permitiendo la reducción

del peso esquelético sin comprometer la resistencia de este. Esta organización particular tiene como consecuencia una alta área superficial[7]. La Figura 1 presenta un esquema de cómo se organizan los elementos mencionados anteriormente.



**Figura 1.** La microestructura de un hueso típico. Tomado de [8] y modificado.

La matriz ósea comprende cerca del 90% del volumen del hueso y el otro 10% lo componen las distintas células que coexisten en este órgano. Se pueden encontrar dos líneas celulares: células osteoprogenitoras que derivan de células madres mesenquimales y que son capaces de diferenciarse a osteoblastos u osteocitos; y osteoclastos, que tienen un origen hematopoyético[5].

Los osteoblastos son capaces de sintetizar matriz ósea mediante el proceso de biomineralización y en su pared celular, se encuentran numerosos receptores hormonales, prostaglandinas, factores de crecimiento, etc. Los osteoclastos son células grandes, multinucleadas, que derivan de precursores de la línea granulocito-macrófago de la médula ósea. Son los encargados de la resorción ósea. Numerosos factores hormonales y citoquinas participan en el proceso de diferenciación, reclutamiento, activación e inhibición de los osteoclastos. Los osteocitos son las células más numerosas, que originadas a partir de

los osteoblastos quedan en lagunas dentro de la matriz ósea calcificada. Poseen largas conexiones citoplasmáticas, permitiendo la comunicación entre ellas y los osteoblastos. Modulan composición del fluido óseo y responden al estrés mecánico, actuando como mecanorreceptores. Juegan un papel importante en la regulación de la formación y resorción ósea especialmente la orientada a la reparación de daño modelado óseo[9].

Estas células son capaces de orquestar la biomineralización del hueso, proceso que involucra la extracción y entrada selectiva de elementos del ambiente que son incorporados en estructuras funcionales bajo un estricto control biológico, gracias a la producción y liberación de materiales orgánicos que interactúan con componentes inorgánicos. De esta manera, se utilizan proteínas u otras biomacromoléculas como plantilla para controlar de manera directa o indirecta la mineralización, que usualmente, sigue estrategias *bottom-up* que permiten organizar las estructuras y defectos de tal manera que estos biomateriales híbridos presenten propiedades mecánicas, de superficie y químicas únicas y específicas en comparación con las partes individuales (parte orgánica e inorgánica). Hasta el momento se conocen algunos aspectos claves de este proceso, como la interacción en la interfase orgánica-inorgánica, los estados de hidratación de los minerales en las distintas etapas de mineralización, las propiedades de las soluciones acuosas en donde ocurre el proceso y que este ocurre en condiciones ambientales o cercanas a estas[10].

## **2.2 Biomateriales para regeneración ósea**

La misión de encontrar un modo de sustituir material óseo dañado o perdido ha perdurado a lo largo de la historia humana, en un inicio dado por el uso de prótesis que cumplían solo con requerimientos mecánicos, pasando por injertos óseos y hoy en día materiales compuestos. Los injertos óseos han sido ampliamente utilizados desde el siglo 19 hasta hoy, pudiendo ser estos *autólogos* (hueso proveniente del mismo usuario), *aloinjerto* (material proveniente de la misma especie) o *xenoinjerto* (material cuyo origen es distinto al humano)[6]. Una de las limitaciones del material autólogo es el riesgo de ser resorbido por el organismo, la escasa disponibilidad en comparación con los materiales sintéticos y el doloroso y complicado procedimiento por el que debe pasar el paciente para obtenerlo[11]. Por otro lado, los aloinjertos y xenoinjertos se ven limitados por la fuerte respuesta inmune que provocan en el paciente[12] y los riesgos de transmisión de infecciones virales o bacteriales. Ante esto surge el desarrollo de biomateriales sintéticos que no solo tienen una mayor disponibilidad sino que pueden ser diseñados para presentar una bioactividad acorde a

las necesidades. Para la regeneración ósea los materiales deben ser *osteoinductivos* (capaces de promover la diferenciación de células progenitoras a osteoblastos), *osteoconductor* (dar soporte al crecimiento de hueso y guiar la regeneración de este) y *osteointegrativo* (que el material se integre al hueso cercano)[13]. Al sumar el uso de factores de crecimiento junto a los elementos mencionados anteriormente se obtiene el concepto de "modelo de diamante" que establece los 4 factores que contribuyen a la regeneración ósea y que deben ser considerados a la hora de diseñar y utilizar material para reparar tejido. Entre los materiales destinados a esto podemos encontrar cerámicos o vidrios (cerámicos basados en calcio, biovidrios, hidroxiapatita), polímeros (colágeno, ácido poliláctico o poliglicólico) o una combinación de estos, con el fin de alcanzar el máximo efecto osteogénico[14].

Hoy en día, estos biomateriales se diseñan tomando en cuenta conceptos de la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos que aplican los principios del trasplante de células (Cell Transplantation), de la ciencia de materiales y la bioingeniería para construir sustitutos biológicos que puedan restaurar y mantener la función normal de tejidos enfermos o dañados[12]. Las estrategias utilizadas por esta disciplina caen en dos grandes categorías: la primera corresponde al uso de estructuras tridimensionales, que llamaremos *scaffolds*, libres de células, que actúan como plantillas para la adhesión, proliferación y migración celular, dependiendo de la capacidad natural que tiene el cuerpo para regenerar y guiar el crecimiento de nuevo tejido[15], mientras que la segunda consiste en utilizar matrices con células embebidas.

Los *scaffolds* deben cumplir con los siguientes criterios al momento de considerar su uso en la ingeniería de tejidos[2]:

- biocompatible: el material no genere efectos tóxicos o perjudiciales para el sistema biológico, y los productos de su degradación deben ser no citotóxicos.
- biodegradable: el material debe ser resorbido al mismo paso en que se repara el tejido soportado.
- porosidad interconectada: debe tener una combinación de macro y micro poros que permitan el crecimiento interno de tejido, la vascularización y la entrega de nutrientes requerido por el sistema.

- propiedades mecánicas: el material debe mantener su integridad estructural durante las primeras etapas de la formación de tejido.

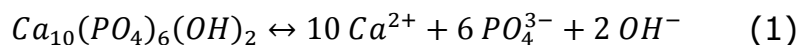
Junto a estos requerimientos se espera que el *scaffold* tenga propiedades de superficie que permitan la adhesión, proliferación y migración celular y al mismo tiempo que sea *bioactivo*, es decir, que el material genere una respuesta beneficiosa por parte del cuerpo al interactuar con este.

### **2.2.1 Biocerámicos**

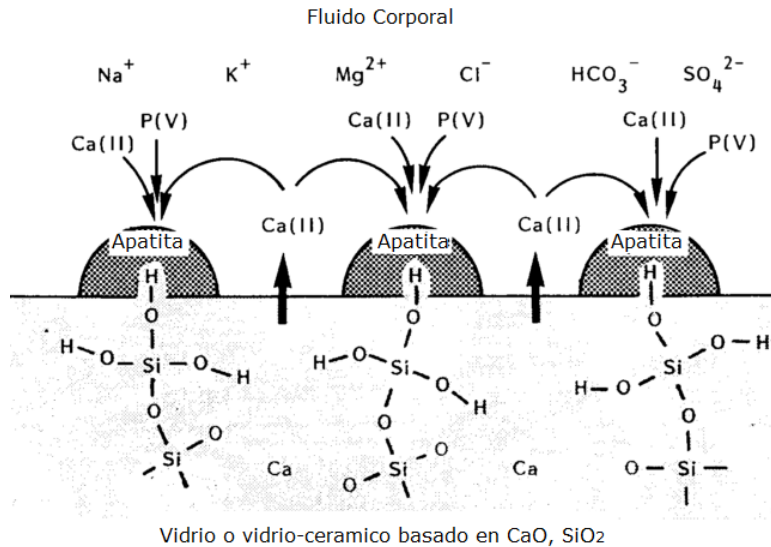
Biocerámicos es el término general usado para englobar los vidrios, los vidrios-cerámicos y los cerámicos usados como materiales para implantes, que comparten la característica de ser bioactivos, es decir, que estimulan una respuesta beneficiosa del cuerpo, particularmente la unión del material al tejido[3]. Además de ser bioactivos, muchos de estos materiales son biocompatibles, resultado directo de su composición química que contiene iones comúnmente encontrados en el ambiente fisiológico, tales como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o  $\text{Na}^+$ [16]. Algunos de los materiales que destacan en este grupo, desarrollados durante las últimas 4 décadas, son la hidroxiapatita sintética ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), cerámicos a base de fosfato de calcio como el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), vidrios-cerámicos compuestos por oxifluorapatita cristalina ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}_x\text{F}_y$ ) y wollastonita ( $\text{CaO}, \text{SiO}_2$ ) en matriz de vidrio a base de sílice ( $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ ) y por último los biovidrios (Bioglass), material cuya composición se encuentra en un sistema ternario de  $\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$  o cuaternario de  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ [17]. Los cerámicos y vidrios presentan una baja resistencia a la fractura y a la flexión mientras que presentan una mayor resistencia a la compresión y poseen una tribología que, comparada con los polímeros o metales, otorga una baja tasa de desgaste resultado de sus durezas. Es por esto que se utilizan comúnmente en superficies articuladas[18].

Todos estos materiales tienen una característica en común: la formación de una capa de apatita en la superficie del material al estar en contacto con los fluidos fisiológicos. Corresponde a una capa rica en calcio y fósforo, capaz de formar fuertes uniones químicas con otras apatitas presentes en el cuerpo, tales como las presentes en los huesos, o con otros tejidos blandos.

Esta capa es producto de una serie de reacciones pero la reacción general para la formación de hidroxiapatita a partir de los iones constituyentes presentes en la solución acuosa que corresponde a la Ecuación 1 [19]. En el caso de materiales como la hidroxi u oxifluorapatita, que no poseen silicio dentro de sus componentes, al ser sumergidos en fluido corporal se cargan negativamente debido a los iones  $\text{OH}^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  presentes en su superficie, atrayendo y combinándose selectivamente con los iones positivamente cargados de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en el fluido, para formar fosfato de calcio rico en Ca. A medida que los iones de calcio se acumulan en la superficie, la carga neta positiva atrae iones fosfatos cargados negativamente presentes en el fluido, formando fosfato de calcio amorfo con una razón Ca/P baja. Esta fase es metaestable, por lo que eventualmente se transforma en su versión estable, similar a la apatita encontrada en los huesos[17].

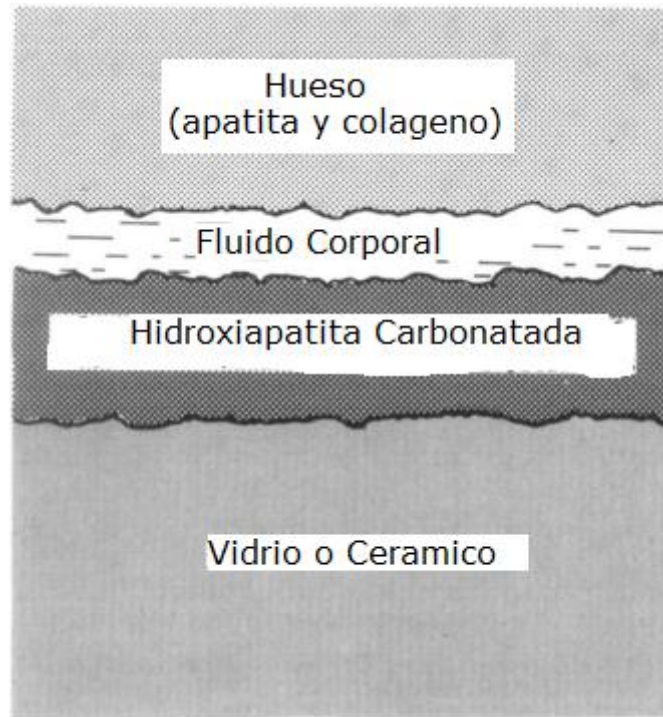


Para vidrios y vidrios-cerámicos basados en sistemas  $\text{CaO-SiO}_2$  el mecanismo es distinto. El vidrio libera  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Na}^+$  vía intercambio iónico con los iones  $\text{H}_3\text{O}^+$  presentes en el fluido corporal, formando grupos Si-OH en su superficie, simultáneamente, moléculas de agua pueden reaccionar con los enlaces Si-O-Si para formar grupos Si-OH adicionales [17]. Los iones calcio liberados aumentan el producto de actividad iónica de la apatita que se encuentra en el fluido, producto del equilibrio de la Ecuación 1. La sílica hidratada en la superficie provee un sitio favorable para la nucleación de la apatita, por lo que se forman núcleos de apatita en la superficie, los cuales crecen espontáneamente a medida que consumen los iones calcio y fosfato presentes en el fluido[20], proceso ilustrado y resumido en la Figura 2.



**Figura 2.** Mecanismo de la formación de apatita en la superficie de vidrios basados en CaO-SiO<sub>2</sub>. [20]

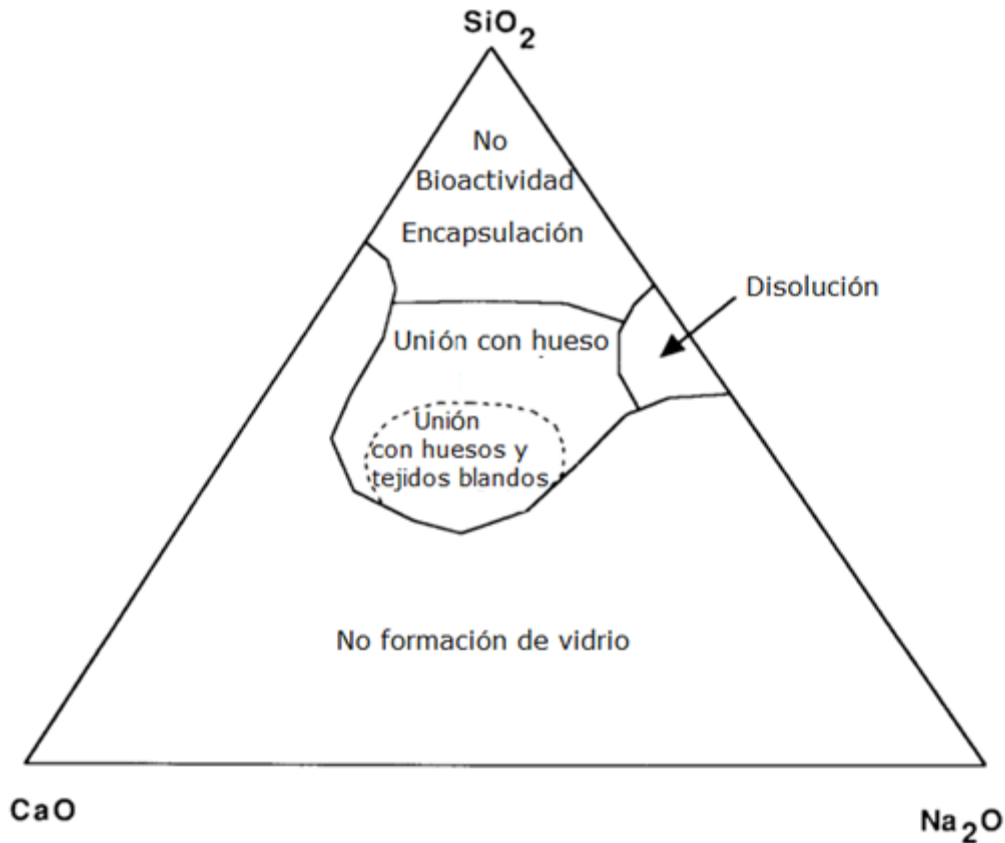
La capa rica en calcio y fósforo resultado de ambos mecanismos es la responsable de la unión del vidrio y del hueso. Esta capa consiste en hidroxiapatita carbonatada (HCA), con una composición y características estructurales de su superficie similares a las del hueso, dando un medio adecuado para la proliferación de osteoblastos (células encargadas de sintetizar la matriz ósea) por sobre los fibroblastos [21], responsables de generar el tejido conectivo fibroso como respuesta del sistema inmune. Una vez que la capa rica en calcio y fósforo se encuentra con el hueso, son los osteoblastos presentes en la superficie de este los encargados de realizar la osteointegración del material. En la Figura 3 se presenta un esquema de las distintas capas que interactúan durante el proceso de osteointegración del material.



**Figura 3.** Esquema de las distintas capas presentes en el sistema material-hueso[21].

Dentro de los materiales capaces de formar esta capa se encuentran los biovidrios, cuyas composiciones pueden variar dependiendo de las características deseadas. Sin embargo, estos vidrios tienen límites composicionales muy estrechos para mantener su habilidad de formar enlaces entre materia viva y no viva. La Figura 4 corresponde al diagrama ternario composicional para los biovidrios cuaternarios con un porcentaje en peso de 6% de  $P_2O_5$ . Los biovidrios con un porcentaje en peso de  $SiO_2$  mayor al 60% se vuelven biológicamente inertes, mientras que entre un 42 y 52% el material es capaz de unirse tanto al hueso como a otros tejidos conectivos blandos y posee propiedades osteogénicas, debido a estos materiales son capaces de liberar concentraciones de sílice hidratado soluble los cuales activan las células óseas para producir factores de crecimiento. La sílica hidratada presente en la capa formada en la superficie del biovidrio puede adsorber o desorber estos factores de crecimiento, acelerando el crecimiento del hueso[22].





**Figura 4.** Límites composicionales para el biovidrio según bioactividad. Todas las composiciones contienen un 6% de  $P_2O_5$ [22].

A pesar de estos límites, este material puede ser dopado mediante la incorporación de otros iones durante su síntesis, no solo manteniendo o mejorando sus particulares características, sino también, otorgando nuevas funcionalidades biológicas. Una vez integrados estos nuevos iones al material, pueden ser liberados en el medio e interactuar con otros iones que pueden alterar las funciones celulares (generalmente promoviendo la expresión de genes), el metabolismo celular u otras funciones biológicas al unirse a macromoléculas como enzimas y ácidos nucleicos, activar canales iónicos o segundos mensajeros. Aun así, estos iones metálicos tienen un potencial toxicológico que debe ser tomado en cuenta al momento de la liberación, ya que en condiciones normales, el cuerpo se encarga de mantener a niveles muy bajos la concentración de iones metálicos, y de ser necesario, enviarlos de manera selectiva a los sitios de acción. La incorporación de estos substratos como los biovidrios es una estrategia eficiente para controlar la tasa de liberación de iones, ya que estos se unen a la matriz mediante enlace iónico permitiendo una liberación controlada, aunque

una de las metas que todavía se deben alcanzar respecto al uso de iones metálicos como agentes terapéuticos es lograr la liberación constante de la cantidad terapéutica necesaria durante un periodo de tiempo[4].

Otra característica que se puede modular en estos cerámicos corresponde al tamaño de partícula, ya sea en el rango micro o nanométrico. Si bien el estudio de micropartículas es extenso, es durante la última década que se desarrolla la investigación a escala de nanopartículas, las cuales tienen ventajas en comparación con las anteriores. En el área de regeneración ósea destaca las altas áreas específicas que poseen, lo que las hace más competentes como vehículos de liberación de componentes terapéuticos, principalmente debido a que presentan mayores velocidades de respuesta ante estímulos del ambiente. Se ha demostrado que la nanotopografía intrínseca de estos materiales permite modular la organización del citoesqueleto y propiedades mecánicas de células[23] o las capacidades osteogénicas de estas[24]. Así también, a escala nanométrica se facilita el uso de estas partículas como bloques de construcción para sistemas coloidales para ser utilizados como geles inyectables para regeneración ósea. Estos sistemas suelen tener una mejor estabilidad y mayores facilidades para ser inyectados o moldeados que sus contrapartes compuestas por micropartículas. Sin embargo, también estas nanopartículas tienen la desventaja de que: faltan técnicas de preparación costo efectivas, las cuales suelen traer problemas al momento de escalarlas a un nivel industrial, una estabilidad reducida en ambientes *in vitro* e *in vivo* dadas las altas áreas específicas que maximizan las interacciones con medios fisiológicos, la tendencia de las nanopartículas a formar agregados de escala micrométrica que mitigan los potenciales beneficios de trabajar en la escala nano y finalmente estas partículas resultan inapropiadas para varias aplicaciones en regeneración ósea que requieren de partículas en escala micrométrica para la creación de macroporos o entrega de células[25].

En el caso de los biovidrios, hay estudios que indican que las nanopartículas menores a 174 nm resultan menos citotóxicas que las micropartículas o nanopartículas de mayores tamaños ya que al ingresar en la célula pueden ser manipuladas sin problemas mientras que las partículas de mayor tamaño causan daños a medida que pasa el tiempo[26]. Otros estudios reportan un mayor daño a las células por parte de las nanopartículas producto de sus mayores áreas superficiales y tasas de liberación de iones[27]. Por otra parte, el uso de nanopartículas está asociado a mayores tasas de formación de hueso[28] y en mejores propiedades mecánicas al ser utilizadas en compositos[29], [30].

### **2.2.1.1 Iones metálicos para efectos terapéuticos**

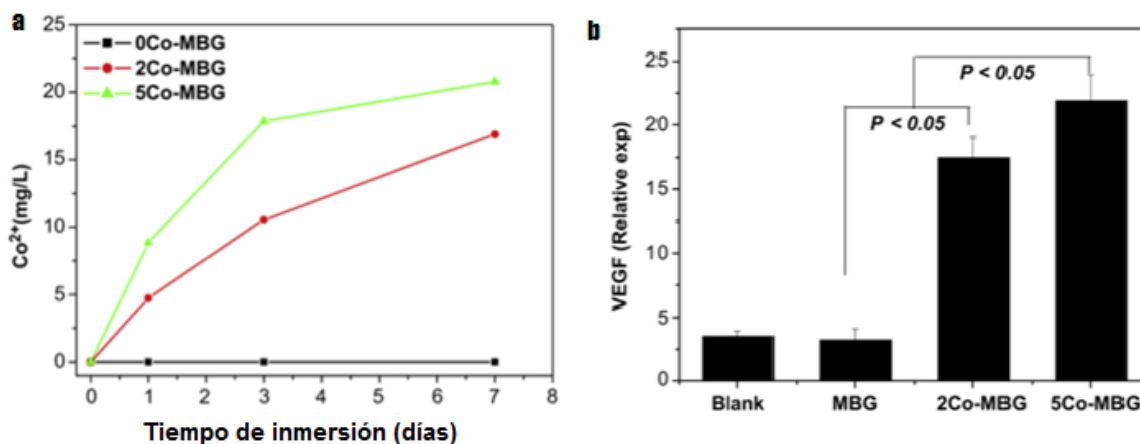
Desde el punto de vista de la ingeniería de tejidos, la selección del método de síntesis y las propiedades finales del material son de mayor relevancia. Desde la perspectiva farmacológica, la síntesis del material o scaffold debe ser compatible con la incorporación de drogas, considerando la estabilidad y la liberación sostenida de estas. Muchas veces las técnicas implementadas por la primera disciplina no permiten resultados satisfactorios, dada las propiedades intrínsecas de las moléculas orgánicas de ser inestables y descomponerse, especialmente en presencia de altas temperaturas, presiones o solventes. Bajo este escenario se vuelve atractivo el uso de iones metálicos para fines terapéuticos, considerando que estos no tienen estas desventajas de inestabilidad y descomposición, pero aun así, logran interactuar con otros iones que alteran las funciones celulares, el metabolismo celular u otras funciones biológicas, al unirse con macromoléculas y/o activando canales iónicos o vías de señalización secundarias.

La administración de estos iones, el porcentaje de carga en matrices y como se libera en el medio son aspectos de gran importancia debido al potencial citotóxico de estos pasadas ciertas concentraciones. Es por esto que una estrategia bastante común es la unión de iones en sustratos apropiados, como zeolitas, hidroxapatitas o vidrios bioactivos, mejorando la estabilidad de los iones y permitiendo la liberación sostenida de estos por mayores tiempos

Los efectos y aplicaciones de los iones metálicos son conocidos, entre los que destacan el cobre y plata por sus efectos antimicrobianos[31] o el magnesio y el zinc por la estimulación del crecimiento de nuevo tejido óseo[32]. Para este estudio, se resaltan el cobalto, ión metálico capaz de activar la proteína HIF-1 $\alpha$  (factor alfa 1 inducible por hipoxia) en células madres lo que permite la expresión de genes y factores de crecimiento como el endotelial vascular (VEFG) responsables del proceso de vascularización[33]. El cobalto actúa a un nivel molecular, inhibiendo la degradación de HIF-1 $\alpha$  al unirse al dominio de degradación dependiente de oxígeno presente en esta proteína, lo que no permite la interacción de esta con proteínas que conllevan a su posterior degradación[34]. Para una apropiada regeneración de tejido es necesario que los vasos sanguíneos entren a este, de no hacerlo, el nuevo tejido formado morirá producto de la falta de nutrientes[3]. Se han realizado estudios que demuestran la sinergia entre el VEFG y los productos de la disolución de biovidrio en el proceso

de vascularización, producto de la estimulación mejorada de la mitosis de células endoteliales[35].

Por otra parte, la incorporación de óxidos de cobalto en el biovidrio produce un retardo en la formación de la capa de hidroxiapatita al ser inmerso en fluido corporal, ya que los iones de cobalto disueltos inhiben la cristalización del fosfato cálcico amorfo a hidroxiapatita carbonatada.[36], lo cual puede resultar atractivo para aplicaciones en tejidos blandos, como la regeneración de cartílagos. Debido a su razón carga/tamaño, el cobalto es capaz de ser incorporado a la red amorfa como una especie disuelta  $[\text{CoO}_4]^{2-}$  o actuar como un modificador de red de alto número de coordinación. El rol del cobalto en la red determinará la conectividad de la red y las propiedades del biovidrio, tales como las tasas de liberación de iones y la formación de hidroxiapatita carbonatada, se verán afectadas[37]. Aun así Wu et al.[38] sintetizó biovidrios dopados con cobalto, que presentó una liberación controlada de cobalto (Figura 5 a) y que promovió la secreción de VEGF en células estromales (Figura 5 b).



**Figura 5. a)** Liberación de cobalto en scaffolds sinterizados de biovidrio dopado con cobalto en 0%, 2% y 5% en peso. **b)** Secreción de VEGF en células estromales de médula ósea (BMSC) después de 7 días. Tomado de [38] y modificado.

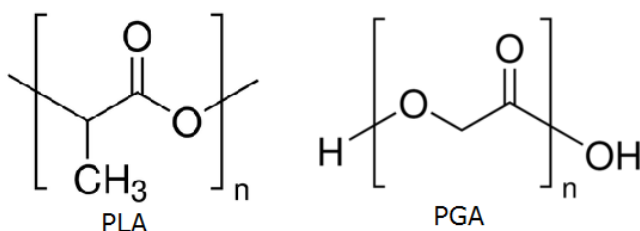
## 2.2.2 Polímeros

La mayoría de las células mamíferas son del tipo anclaje-dependientes (anchorage-dependant), muriendo al no tener un sustrato adecuado al cual adherirse[12], es por esto que es importante que el biomaterial replique las funciones mecánicas y biológicas de la matriz extracelular nativa del cuerpo, entregando un medio en donde las células pueden formar un tejido con la estructura y función apropiada. Tanto polímeros biodegradables naturales como sintéticos han sido utilizados para la producción de scaffolds, pero son estos últimos los que

llaman la atención debido a que permiten un mayor control de sus propiedades fisicoquímicas.[2]

Otras ventajas de los polímeros sintéticos biodegradables son la facilidad con la que son sintetizados, con una calidad y cantidad reproducible, la habilidad de tener propiedades mecánicas a la medida para distintas aplicaciones, excelente procesabilidad en comparación con otros materiales como metales y cerámicos, entre otras.

Entre estos polímeros se encuentran los polihidroxicanoatos, tales como ácido poli glicólico (Polyglycolic acid o PGA) o el ácido poli láctico (Polylactic acid o PLA), la policaprolactona (Polycaprolactone o PCL) y el polihidroxi butirato (Polyhydroxybutyrate o PHB)[39]. Al ser termoplásticos, se pueden procesar a modo de obtener estructuras tridimensionales con microestructuras, formas y dimensiones deseadas. Como se puede observar en la Figura 6, la unión de los monómeros es mediante enlaces éster, los cuales son degradados por hidrólisis no enzimática y los productos no tóxicos de esta reacción son eliminados del cuerpo en forma de dióxido de carbono y agua.



**Figura 6.** Estructura química del ácido poli láctico (PLA) y del ácido poli glicólico.

La velocidad de degradación de estos polímeros puede ser controlada mediante la alteración de la cristalinidad, el peso molecular inicial del polímero y la razón en la que se encuentran los monómeros al ser copolimerizados, alcanzando tiempos de degradación que varían de las varias semanas hasta varios meses[12].

El PDLLA, un poliéster alifático racémico y amorfo, se encuentra en el mismo grupo que los polímeros mencionados anteriormente y al ser termoplástico, se puede procesar para obtener estructuras tridimensionales con microestructuras, formas y dimensiones deseadas, pero tienen generalmente una falta intrínseca de actividad biológica y los productos de la degradación pueden causar efectos adversos o alterar localmente el microambiente (*in vivo*). Es por esto que se ha estudiado la preparación de compósitos, materiales que consisten en dos fases químicamente distintas separadas por interfaces y cuyo diseño conlleva a la combinación de las mejores características de cada

componente del material[40]. Para que el material sea bioactivo alguno o todos los componentes del material deben serlo[16], por lo que resulta atractivo adicionar partículas bioactivas a los polímeros con el fin de aumentar la bioactividad. Se ha reportado que la incorporación de biocerámicos como el biovidrio a matrices poliméricas de PDLLA o PLLA aumentan las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad de compuesto[41], [42].

### **2.2.3 Compósitos**

Cuando un polímero y una fase inorgánica son combinadas, es posible ajustar las propiedades del compuesto obtenido de acuerdo a lo requerido. Para obtener un compuesto exitoso, es necesario controlar la interface entre el polímero y la fase inorgánica de manera adecuada, con el fin de que el material combine las propiedades favorables de cada fase minimizando los aspectos negativos de estas. Adicionalmente, utilizando compósitos, es posible imitar la estructura natural del hueso u otros órganos complejos del cuerpo humano. Bajo este acercamiento, es posible balancear las propiedades físicas, mecánicas y biológicas de cada fase individual y manufacturar estructuras de diversas complejidades. La adición de nanopartículas inorgánicas puede inducir una rugosidad a una escala nanométrica en la superficie del material, lo que ha demostrado estimular la adhesión, proliferación y maduración de distintos tipos celulares[43]. Finalmente, la combinación de una fase polimérica y una inorgánica se puede utilizar para controlar la tasa de degradación que es de suma importancia para el diseño de scaffolds con degradación controlada[44].

La inclusión de biocerámicos en matrices poliméricas corresponde a una práctica exitosa al mejorar las propiedades de regeneración ósea, gracias a que facilita las propiedades bioactivas del material compuesto. Los cerámicos más usados son los fosfatos cálcicos, hidroxiapatitas y vidrios bioactivos, mientras que suelen utilizarse matrices biodegradables tales como PLA, PGLA, PDLLA, colágeno, policaprolactona, entre otros. La incorporación suele ir de la mano con cambios en las propiedades mecánicas y disminución de la hidrofobicidad del material final en plásticos como el PGLA [45], disminución de la degradación y formación de hidroxiapatita en copolímeros PDLLA/PGLA[46]–[48] o en policaprolactona[49] al utilizar biovidrios como relleno, aunque estos cambios dependerán de la cantidad de cerámico incorporado en la matriz, la porosidad del material final o la composición de los cerámicos utilizados[46],[50],[51]. Siguiendo esta misma línea, Misra et al.[29] estudia los efectos de la

incorporación de biovidrios en polihidroxibutirato dependiendo del tamaño de partículas, donde las nanopartículas tuvieron mejor rendimiento frente a las micropartículas del mismo cerámico en propiedades mecánicas, formación de hidroxiapatita y adsorción de proteínas. Tamjid et al.[52] estudió la incorporación de partículas de biovidrio con distintos tamaños, demostrando que una buena dispersión de estas en la matriz y su distribución en la superficie mejoran la formación de la capa de apatita, mientras que la aglomeración de partículas disminuye esta capacidad bioactiva. Así también, señala que las partículas submicrométricas se encuentran dispersas en la superficie de los films de compósitos con PCL a diferencia de las partículas con tamaños superiores a 1 micrón. Esto se traduce en una mejora en la nanotopografía del material, un aumento en la exposición de partículas al medio SBF y por lo tanto en mayor bioactividad.

Los estudios de compósitos PDLLA/Biovidrios son variados. Muchos apuntan a la preparación de scaffolds porosos para usos en regeneración de tejidos óseos, demostrando una capacidad bioactiva de los compósitos con distintos porcentajes de relleno[42], [53], [54] o como esta incorporación afecta las propiedades mecánicas y de degradación del polímero[47], [48]. Recientemente, los estudios se enfocan en evaluar el potencial de este compósito utilizando células, demostrando presentar buena compatibilidad con un amplio rango de células y capacidad osteogénica[55]–[57]. No hay estudios relacionados con la incorporación de vidrios dopados con cobalto y este polímero. Lo más cercano corresponde a los estudios de Quinlan et al.[58] quien preparó scaffolds utilizando compósitos de vidrios dopados con cobalto y colágeno, donde obtuvo mejoras en el módulo de compresión del material, expresión de VEGF y formación de estructuras tubulares en células endoteliales.

## **2.3 Angiogénesis**

Uno de los mayores desafíos para la ingeniería de tejidos óseos es el desarrollo de estructuras que puedan promover la formación de hueso y estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Dentro del organismo, la baja presión de oxígeno (hipoxia) juega un rol vital en el desarrollo y regeneración de tejido esquelético. La hipoxia activa una serie de procesos celulares, incluyendo el reclutamiento de células madre, angiogénesis y diferenciación celular. Bajo condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es sintetizada en el citoplasma pero degradada inmediatamente vía proteasomas. Sin embargo, en condiciones de hipoxia, la degradación de HIF-1 $\alpha$  se ve inhibida, y este factor de transcripción estabilizado es translocado al núcleo, donde dimeriza en HIF-1 $\beta$ . Este dímero recién formado es capaz de unirse a elementos

sensibles a la hipoxia (HRE por sus siglas en inglés) presentes en genes objetivos y recluta proteínas coactivadoras/inhibitorias logrando la transcripción de estos.

La activación de una respuesta hipóxica es esencial para la formación de huesos largos y la reparación de fracturas. Bajo hipoxia los osteoblastos ven incrementada la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), un factor de crecimiento que tiene un rol central en la respuesta angiogénica y reparación de las redes vasculares. Recientemente se ha reportado que la hipoxia estimula la producción de estos factores en células mesenquimales y osteoblastos implantados en estructuras tridimensionales. Actualmente uno de los mayores problemas en la ingeniería de tejidos óseos es la falta de una microvascularización consistente. Imitar condiciones de hipoxia mediante la estabilización de HIF-1 $\alpha$  ha sido sugerido como una vía eficiente de regular la expresión un gran número de genes pro y antiangiogénicos[37]. Yu et al.[59] demostró que el cobalto puede ser utilizado como un medio para precondicionar células mesenquimales (MSC) a un estado de hipoxia, que al compararlas con las mismas células en normoxia, presentan una mayor expresión de HIF-1 $\alpha$  y una mejora en la migración *in-vitro*. La migración en células endoteliales es un componente esencial de la angiogénesis, que requiere de una regulación precisa de los estados contráctiles y no-contráctiles de estas. En este fenómeno se ven involucrados mayoritariamente 3 mecanismos distintos, siendo estos la mecanotaxis, que corresponde a la migración producto de fuerzas mecánicas, haptotaxis, donde motilidad de las células se produce debido a un gradiente de adhesión celular o de ligandos inmovilizados tales como integrinas presentes en la matriz extracelular y finalmente la quimiotaxis, una migración direccional hacia un gradiente de quimioatrayentes solubles, donde principalmente destaca VEGF[60].



## **CAPÍTULO 3 PROPUESTA Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

El desarrollo de la ingeniería de tejidos nos permite desarrollar sustitutos sintéticos para tejidos dañados y estudiar su comportamiento, a modo de obtener un material que cumpla con los requerimientos acordes al uso de este, considerando propiedades físicas, mecánicas y biológicas. El biovidrio ha sido ampliamente investigado como material para regeneración ósea, no solo por sus propiedades intrínsecas, sino también por su capacidad de incorporar otros elementos en su estructura. Un elemento de interés es el cobalto, que presenta antecedentes de ser un elemento proangiogénico en cantidades adecuadas, la cual se puede regular al incorporar este vidrio dopado en una matriz polimérica. Para este estudio se recurrió al PDLLA, un polímero biodegradable con buena biocompatibilidad. Es por esto que se plantean las siguientes hipótesis y objetivos de investigación:

### **3.1 Hipótesis**

- 1) El cobalto, al estar incorporado en la estructura del biovidrio, otorga nuevas funcionalidades biológicas al biocerámico, como angiogénesis.
- 2) La incorporación del material descrito anteriormente a una matriz polimérica permite la regulación de la liberación de iones al medio expuesto y por lo tanto una mejor respuesta biológica.

### **3.2 Objetivos generales**

Sintetizar biovidrios ternarios mediante 2 métodos, estudiar su bioactividad, citocompatibilidad, potencial proangiogénico y estudiar el efecto de su dopaje con cobalto y su incorporación en una matriz polimérica biodegradable.

### **3.3 Objetivos específicos**

- i) Sintetizar micropartículas de biovidrios ternarios ( $60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO-}4\text{P}_2\text{O}_5$ ) mediante 2 métodos sol-gel distintos y evaluar los efectos de la incorporación de cobalto (1, 2 y 4% mol de  $\text{CoO}$  sustituyendo al  $\text{CaO}$ ) en la capacidad de formación de apatita y citocompatibilidad.
- ii) Implementar una metodología basada en migración celular para evaluar el potencial angiogénico del material.
- iii) Desarrollar un material compuesto de micropartículas (10% en peso) y PDLLA mediante mezclado en fundido para luego

evaluar los efectos de la incorporación de micropartículas dopadas con cobalto en una matriz polimérica en su capacidad de formación de apatita y angiogénesis.

## **CAPÍTULO 4 METODOLOGÍA**

### **4.1 Síntesis y caracterización biovidrios**

Se sintetizaron micropartículas de biovidrios mediante el método sol-gel utilizando dos rutas distintas, con el fin de obtener materiales con distintas propiedades estructurales. En ambos se buscaba sintetizar biovidrio ternario (58s) dopado con cobalto, los cuales fueron caracterizados y posteriormente se estudió su bioactividad mediante inmersión en fluido corporal simulado (SBF por sus siglas en inglés). Los vidrios fueron sintetizados en el Laboratorio de Polímeros y la caracterización se llevó a cabo en distintos laboratorios de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

#### **4.1.1 Síntesis**

Para los dos métodos de síntesis se utilizaron los mismos precursores iniciales, los que se utilizan en una serie de reacciones de hidrólisis y policondensación para obtener un gel y posteriormente un polvo. Se utilizó, en cantidades estequiométricas acorde a la composición deseada en el material, tetraortosilicato (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 calcio tetrahidratado ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, 99%) y nitrato de cobalto hexahidratado ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; Aldrich, 98%).

##### **4.1.1.1 Síntesis 1**

Se preparó una solución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) con una concentración 0,1[M] en la cual se vertió TEOS y TEP bajo agitación constante y en una relación molar  $(\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}) / (\text{TEOS} + \text{TEP}) = 8$ . Tras esto se agregaron los nitratos en intervalos de 45 minutos y dejando en agitación 45 minutos más tras agregar el último obteniendo una solución completamente líquida. Se realizó un secado a 60°C durante 3 días y un secado a 130°C durante 2 días, con el fin de obtener un gel y envejecerlo respectivamente. El gel obtenido se trituró en un molino y los polvos obtenidos recibieron un tratamiento térmico a 700 °C por 2,5

horas. El material final fue tamizado con el fin de obtener partículas menores a 37 micrómetros.

#### **4.1.1.2 Síntesis 2**

Se preparó una solución de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) con una concentración 0,33[M] en la cual se vertió TEOS y TEP bajo agitación constante y en la misma relación estequiométrica anterior. Se agregaron los nitratos en intervalos de 45 minutos y dejando en agitación 45 minutos más tras agregar el último. Para finalizar la síntesis se agrega por goteo una solución de amoníaco 2[M] bajo agitación constante hasta obtener un gel. Se realizó un secado durante 1 día a 60°C y un secado a 130°C durante 2 días obteniendo un polvo el cual se pasó por un mortero a modo de homogenizar el material, el cual recibió un tratamiento térmico a 700°C por 2,5 horas.

#### **4.1.2 Caracterización**

Inicialmente se procedió a caracterizar los 8 vidrios sintetizados. A partir de ahora los vidrios sintetizados por el método 1 se identifican con una "m" como prefijo a su código de identificación mientras que los vidrios sintetizados por el método 2 se identifican con una "n".

##### **4.1.2.1 Caracterización partículas**

La estructura y posibles fases presentes en el vidrio fueron determinadas por difracción de rayos X (DRX), las propiedades de superficie (Área superficial) se midió por adsorción de nitrógeno usando el método BET. La composición se verificó mediante espectroscopia (FRX y ICP-OES)

##### **4.1.2.2 Bioactividad**

Para evaluar la formación de apatita en las micropartículas de vidrio se utilizó el método desarrollado por Kokubo[61] en la cual las muestras se sumergen durante cierto periodo en un fluido corporal simulado (simulated body fluid o SBF por sus siglas en inglés) a 37°C. Las muestras correspondieron a discos de 0,3[g] de micropartículas comprimidas (sometidas a 4[ton] durante 2 min) o discos de compuesto de 13 [mm] de diámetro, las cuales fueron sumergidas en 30[ml] de SBF durante 6 horas, 1, 3, 7, 14 o 28 días. Tras ser extraídas del medio se midió el valor de pH a la solución y se almacenó para posterior cuantificación de la liberación de iones. Las muestras fueron lavadas con agua desionizada y secadas a temperatura ambiente, para posteriormente analizar las fases presentes mediante DRX y microscopía en busca de apatita.

#### **4.1.2.3 SEM y EDS**

Tanto los materiales como las muestras después del ensayo de bioactividad fueron observados mediante microscopio electrónico de barrido (SEM por sus siglas en inglés) con detector EDS con el fin de observar la morfología y determinar la composición de las partículas sintetizadas y de la apatita formada después de los ensayos. Para poder realizar el procedimiento las distintas muestras fueron cubiertas de oro durante 60[s] con una corriente de 30[mA]. Mediante EDS se buscó determinar las concentraciones de calcio y fósforo en las muestras sumergidas en SBF con el fin de relacionarlo con la formación de apatita.

#### **4.1.2.4 Liberación de iones**

La solución restante de cada muestra después del ensayo de bioactividad fue enviada a espectroscopía por ICP-OES para determinar la cantidad de cobalto liberado para los distintos tiempos.

### **4.2 Preparación compósitos y caracterización**

Los compósitos se prepararon mediante mezclado en fundido utilizando un brabender del Laboratorio de Polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Se utilizaron como matriz polimérica PDLLA y las micropartículas sintetizadas por el método 1, en una relación peso/peso de 10%. Se prepararon placas de 1 [mm] de espesor para cada material y con una cortadora laser se prepararon discos con distintos diámetros para realizar ensayos in-vitro y bioactividad.

### **4.3 Ensayos Biológicos**

Para evaluar los efectos biológicos de las partículas se utilizaron dos líneas celulares para distintos ensayos: osteosarcoma humano SaOS-2 para realizar citocompatibilidad y células endoteliales humanas Ea.HY para ensayos de migración y expresión de factores/proteínas (?).

#### **4.3.1 Citocompatibilidad in-vitro**

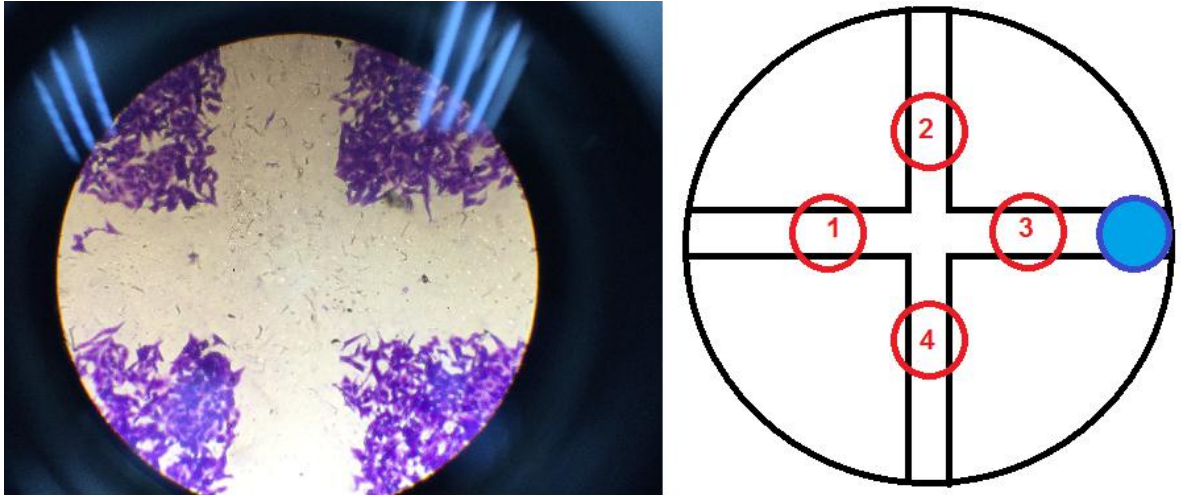
Se utilizó el ensayo de MTT para evaluar la citotoxicidad de las partículas. Este es un ensayo colorimétrico para contabilizar la actividad mitocondrial de las células, las cuales al estar vivas reducen el tetrazolium en formazán, el cual puede ser cuantificado por absorbancia

y cuya cantidad es proporcional al número de células vivas. Se cultivaron en placas de 96 pocillos un aproximado de 5.000 células SaOS-2 por pocillo. Una vez adheridas a la placa, se agregó el material a evaluar, previamente esterilizado, a los pocillos en una relación constante de masa de vidrio por volumen de medio de cultivo (0,01 [g/ml]). Se realizó ensayos para evaluar citotoxicidad a 1, 3 y 7 días. Una vez finalizado el ensayo, se retiraron los medios de cada pocillo y se lavaron con una solución buffer de fosfato (PBS). Se prepara una solución que contiene 80 [ul] de MTT por cada 1 [ml] de medio de cultivo sin suero bovino (DMEM-F12) y esta se colocan 100[ul] de esta solución en cada pocillo y se incuban las placas a 37°C durante 3 horas. Luego de la incubación, se retira el medio con MTT y se adicionan 200 [ul] de alcohol isopropílico a cada pocillo para disolver los cristales de formazán recién formados. Una vez disueltos, el contenido se traspasa a una placa nueva y se realiza la medición de densidad óptica en un lector de microplacas a 540 [nm] y se calcula la viabilidad utilizando como control células cultivadas en medio sin ningún material a evaluar.

#### **4.3.2 Ensayos de migración**

Se cultivó en placas de 24 pocillos células Ea.HY con medio de cultivo DMEM HG con 10% suero fetal bovino (FBS) hasta alcanzar una monocapa. Con una punta de micropipeta se realiza un corte en forma de cruz a lo largo de todo el pocillo, se lava con una solución de PBS y se coloca el material a evaluar junto con el medio de cultivo DMEM HG con 1% FBS y bajo microscopio, junto con una cámara, se registran los cortes realizados en cada pocillo para cuantificar posteriormente el cambio producto de la migración al ser expuestas las células a materiales o soluciones. Una vez transcurridas 16 horas, se lavan los pocillos con PBS, se fijan las células con cristal violeta y se vuelve a registrar con microscopio y cámara los cortes. Utilizando el software ImageJ se cuantifican los cambios en el ancho de los cortes realizados para calcular un porcentaje de cierre de cada herida en 4 zonas distintas para luego promediar los valores.

Al estudiar los compósitos en los ensayos de migración se utilizaron discos de 6 mm y se colocaron a la orilla de los pocillos con células en confluencia, cercana a una de las zonas que se fotografían, tal como se puede observar en la Figura 7.



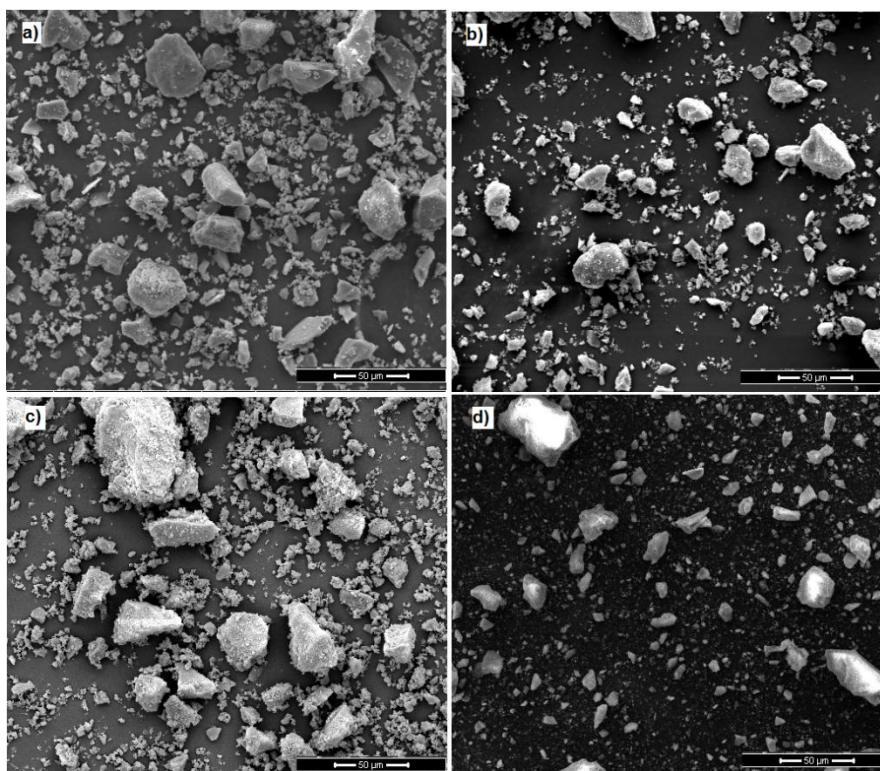
**Figura 7.** Esquema de ensayo de herida realizado con células Ea.HY y posición del disco de compósito en el pocillo. Los números de la imagen de la derecha corresponden a las zonas fotografiadas.

## CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de vidrios bioactivos por síntesis 1

#### 5.1.1 Caracterización de microestructura y textura de las partículas sintetizadas.

Los materiales sintetizados fueron observados mediante microscopía electrónica de barrido. Tal como se presenta en la Figura 8, las partículas comparten una morfología irregular y tamaños de partículas similares, lo que es consecuente con el método de síntesis en donde las partículas son reducidas mediante un proceso de molienda y posteriormente un tamizado utilizando una malla Tyler #400, con un diámetro de partícula máximo de 37  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8.** Micropartículas ternarias sintetizadas por el método 1 que corresponden a **a)** mBG58s, **b)** mBGCo1, **c)** mBGCo2, **d)** mBGCo4

Para el estudio de la composición de las partículas se utilizó espectroscopia ICP-OES que corresponde a una técnica más precisa al momento de determinar los elementos que componen estos materiales. Como se observa en la Tabla 1, el porcentaje en peso para los óxidos de Si y P son mayores a lo esperado mientras que para los otros óxidos son menores. La menor cantidad de calcio disponible en la red podría repercutir en el rol del cobalto durante la formación del material, ya que

este cumple su rol de modificador de red al reemplazar los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que entraría a la red como óxido intermediario.

**Tabla 1.** Composiciones teóricas y medidas por espectroscopía ICP-OES de los vidrios sintetizados por el método 1.

<b>Código Vidrio</b>	<b>Composición teórica en %peso de los biovidrios. En paréntesis los valores experimentales</b>				
	<b>Método síntesis 1</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>CoO</b>
mBG58s		59,41	7,32	33,27	--
		(66,21)	(10,37)	(23,4)	--
mBGCo1		58,37	7,19	31,78	2,67
		(64,26)	(10,46)	(23,34)	(2,03)
mBGCo2		57,35	7,05	30,33	5,25
		(65,81)	(10,33)	(19,7)	(4,16)
mBGCo4		55,43	6,83	27,59	10,15
		(62,11)	(10,2)	(20,2)	(7,49)

El proceso de síntesis de estos vidrios explica la diferencia entre el valor teórico y el experimental, dado que se lleva a cabo la adición subsecuente de alcoholóxidos y nitratos al medio ácido, partiendo con el TEOS seguido por el TEP, nitrato de calcio y nitrato de cobalto. De esta manera se da prioridad a la hidrólisis y policondensación del TEOS y el TEP a modo de formar la red vítrea compuesta de silicio, oxígeno y fósforo. Posteriormente se agrega el calcio, que corresponde a un modificador de la red e interrumpe en la red covalente formada inicialmente, estableciendo interacciones iónicas con los átomos de oxígeno[62]. Al agregar cobalto, este elemento puede comportarse como un modificador de red o un formador de red al establecer enlaces covalentes como el silicio o el fósforo[37], [63]. Al dar más tiempo a la formación de la red (hidrólisis y condensación), la cantidad de átomos de oxígeno disponibles para interactuar con los iones de calcio y cobalto disminuyen, pero el cobalto aun es capaz de entrar a la red mediante enlace covalente, esto explica la gran diferencia en las mediciones de calcio pero no así en la medición del cobalto.

Como se puede observar en la Tabla 2 todos los vidrios presentan áreas superficiales similares medidas mediante BET, lo que es



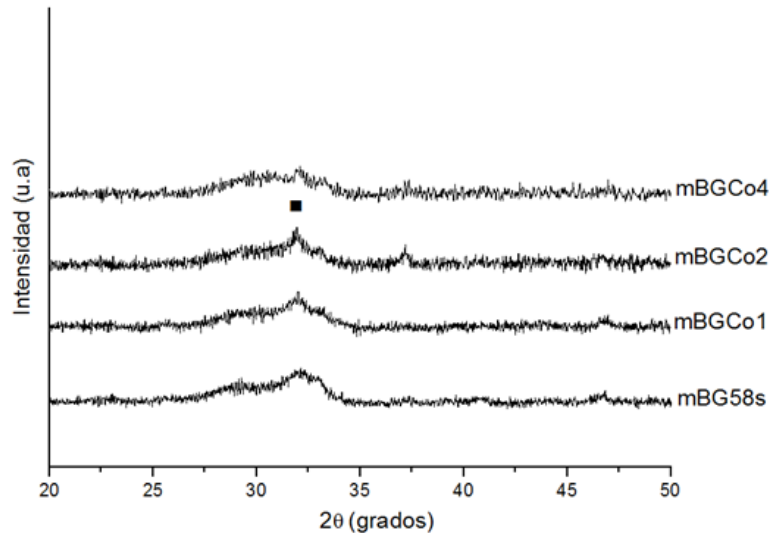
consecuente al método con el que se preparaban, ya que todos los materiales pasan por el mismo método de síntesis, reducción mecánica y tamizado, obteniéndose partículas con propiedades de superficie y tamaños de partículas similares.

**Tabla 2.** Áreas superficiales de los vidrios sintetizados por el método 1.

<b>Código del vidrio</b>	<b>Área superficial [m<sup>2</sup>/g]</b>
mBG58s	163,5
mBGCo1	150,7
mBGCo2	141,4
mBGCo4	151,0

A diferencia de los vidrios sintetizados por fundido que presentan áreas superficiales menores a 1 m<sup>2</sup>/g, los vidrios sintetizados por sol-gel (SSG) de composición ternaria (SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) se caracterizan por presentar mayores áreas superficiales (100 a 250 m<sup>2</sup>/g) y mesoporos, con volúmenes de poro en el rango de 0,2-0,4 g/cm<sup>3</sup>. Cabe destacar que estos vidrios no se encuentran dentro de la familia de los biovidrios mesoporosos (MBG), que para sus síntesis utilizan agentes surfactantes a modo de plantillas obteniendo un material con mesoporos ordenados, con mayores volúmenes de poros y áreas superficiales (200-500 m<sup>2</sup>/g)[64]. Shih et al.[65] sintetizó SSG y MBG utilizando un protocolo similar al propuesto en este trabajo y obtuvo áreas superficiales de 102 y 328 m<sup>2</sup>/g respectivamente, utilizando para el tamizado una malla #325, con una abertura de 44 [um], por lo que las partículas eran de mayor tamaño, lo que explica esta disminución de área específica en los SSG de Shih en comparación con los de este trabajo.

Los materiales fueron sometidos a difracción de rayos X para corroborar la estructura de los polvos y se puede observar en la Figura 9 que todos los vidrios corresponden a un material amorfo, solo presentando una cristalización parcial del silicato de calcio (2θ=32°, Ca<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>). Esta fase cristalina no interrumpe la reactividad de los materiales ya que de por si es un precursor del fosfato de calcio al combinarse con iones fosfato en el medio, dando origen a una apatita amorfa con una razón atómica Ca/P baja, que en etapas posteriores se transforma en cristales similares a los del hueso[17].

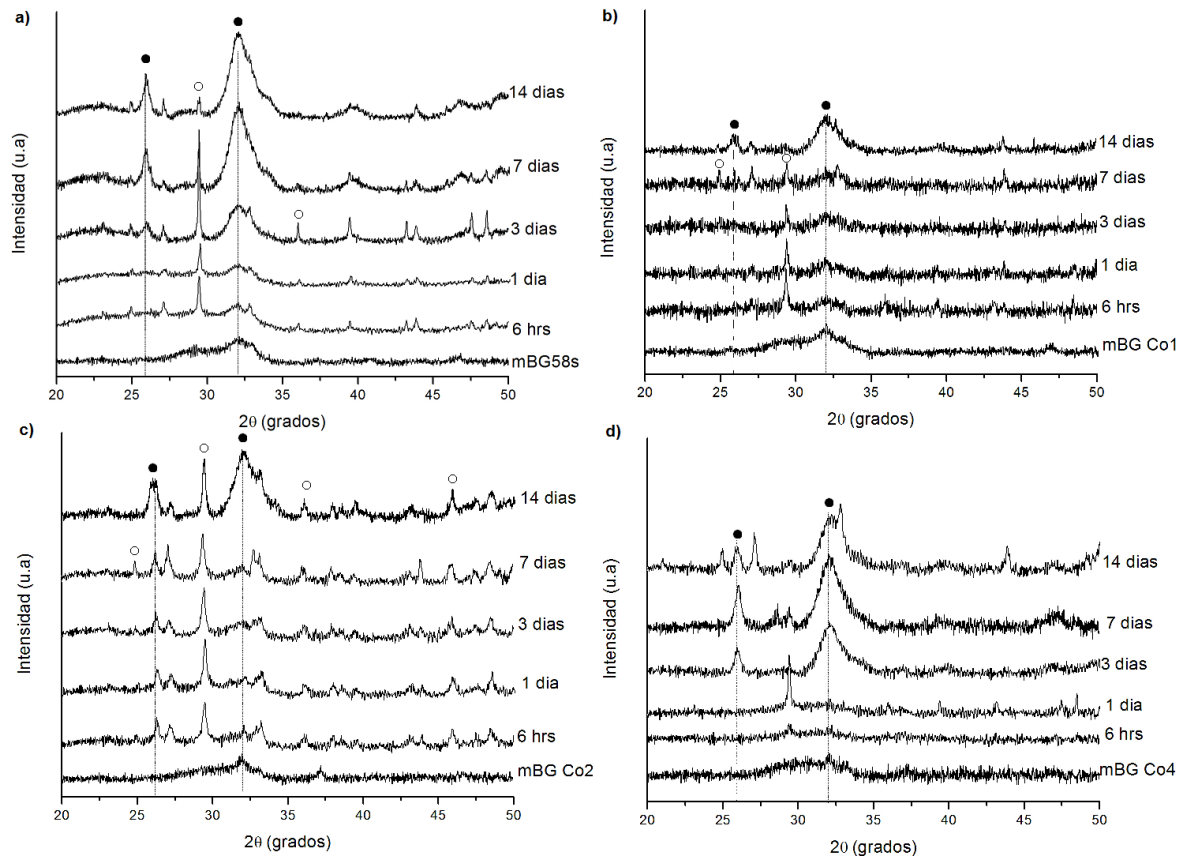


**Figura 9.** Diffractogramas de los vidrios ternarios y dopados con cobalto sintetizados mediante el método 1. La fase cristalina marcada como (■) corresponde a silicato de calcio  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (00-029-0369).

Esta fase aparece producto del tratamiento térmico que reciben los vidrios, lo que permite eliminar residuos no deseados de la síntesis, estabilizar la estructura, modular la propiedades mecánicas o bioactividad del material[64]. Vyas et al.[63] sintetizó vidrios cuaternarios dopados con cobalto por fundido, en las mismas proporciones que este trabajo y observó solo una cristalización parcial de una fase de silicato de calcio y sodio ( $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ ) concluyendo que el cobalto se encuentra disuelto en la matriz vítrea, probablemente relacionado al bajo contenido de este elemento en la composición del material, y no formando una fase cristalina.

### **5.1.2 Bioactividad: Formación de apatita y liberación de iones**

Los vidrios fueron sumergidos durante 1, 3, 7 y 14 días a una solución de SBF para determinar sus propiedades bioactivas, para luego ser caracterizados por SEM y DRX.



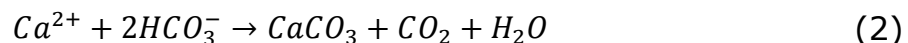
**Figura 10.** Difractogramas de rayos X de los vidrios **a)** mBG58s, **b)** mBGCo1, **c)** mBGCo2 y **d)** mBGCo4 después de su inmersión en SBF durante 6 horas, 1, 3 7 y 14 días. Las fases cristalinas corresponden a hidroxiapatita (●) y calcita (○).

En la Figura 10 se puede observar en los difractogramas como todos los materiales mostraron la capacidad de formación de una capa de apatita, aunque a pesar de las similitudes en microestructura y textura, los vidrios dopados con cobalto presentaron una disminución en la intensidad de los picos relacionados con la hidroxiapatita (●), cuyos picos característicos principales corresponden a  $2\theta=25.9^\circ$  (002) y  $31.5^\circ$  (112). Los vidrios mBG58s y mBGCo4 presentan estos picos a partir del día 3, mientras que los vidrios mBGCo1 y mBGCo2 presentan un retardo en la formación de esta fase cristalina, midiéndose la aparición en el día 14 de inmersión. En general, se observa que a medida que aumenta el tiempo de inmersión en SBF hay un incremento en la intensidad de los picos característicos de la hidroxiapatita. En los vidrios dopados, a mayor cantidad de cobalto se observa la aparición de estos picos en menores tiempos, principalmente al comparar los resultados de los materiales al estar expuestos 3 días al SBF. De cualquier manera, estudios anteriores demuestran que materiales que presentan la

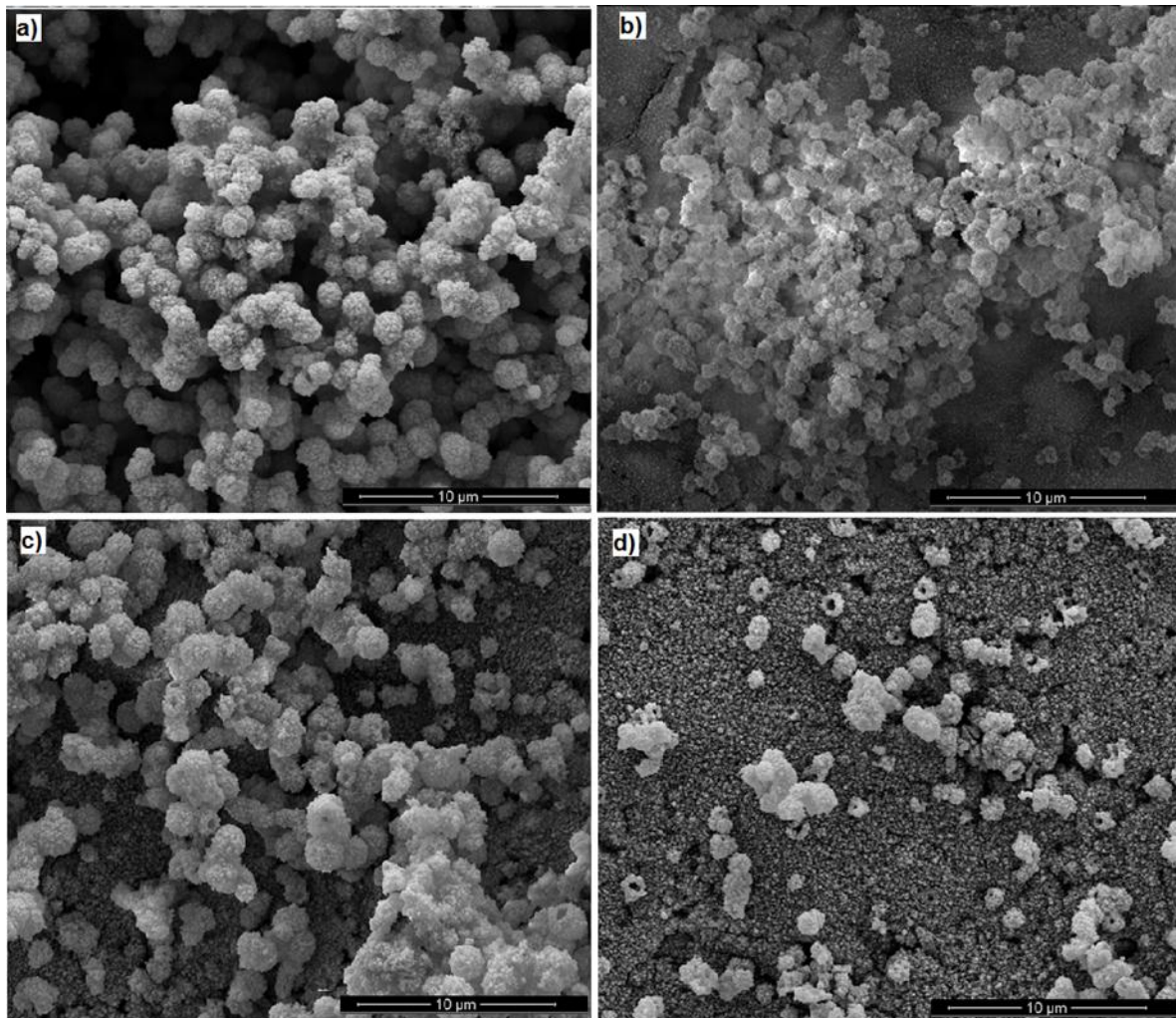
formación de apatita con relaciones cercanas a la hidroxiapatita de los huesos son capaces de realizar uniones químicas fuertes[66]–[69], mientras que el tiempo a la cual aparecen las capas bioactivas determinará si el material tendrá mejor desempeño cuando se buscan uniones con tejidos blandos o duros, en donde se busca retardar la aparición de la capa de hidroxiapatita para tejidos blandos[37].

Azevedo et al.[37] describió la disminución en la nucleación de apatita al incorporar cobalto en la composición de los biovidrios, producto de las interacciones que tienen los iones  $\text{Co}^{2+}$  con los iones fosfato del medio. Esto no se condice con estos resultados expuestos, pues sería de esperar que el vidrio mBGCo4 presentase la menor bioactividad de los 4 materiales, al liberar más cobalto hacia el medio. Es difícil atribuir esta disminución de la bioactividad por parte de los vidrios mBGCo1 y mBGCo2 a las menores áreas superficiales que presentan en comparación con el vidrio mBGCo4 ya que estos valores se encuentran en el mismo orden de magnitud. Así también, todos los materiales presentan las mismas características de superficie y cristalinidad, las cuales están asociadas a la reactividad de los materiales. Aun así, se concluye que la incorporación de cobalto en el vidrio ternario produce una disminución de la bioactividad pero no se observa que esta disminución sea proporcional a la cantidad de cobalto incorporado.

Así también se observa un pico en  $2\theta = 29^\circ$  el cual corresponde a calcita ( $\text{CaCO}_3$ ). Esto ocurre en vidrios con un alta área específica ( $\sim 140 \text{ m}^2/\text{g}$ ) que al ser sumergidos en SBF liberan una gran cantidad de iones calcio al medio, el cual normalmente se encuentra bajo el punto de saturación para la nucleación de calcita. Una vez alcanzado este punto, comienza la co-nucleación de una capa de carbonato de calcio amorfo como precursor a la calcita junto a la ya mencionada capa de apatita amorfa[70]–[72]. Esta formación de calcita, que sigue la reacción descrita por la Ecuación 2, no altera las propiedades de bioactividad del material y a pesar de que no suele reportarse en estudios *in vitro* este fenómeno ocurre en evaluaciones *in vivo*, principalmente favorecido por las mayores concentraciones de  $\text{HCO}_3^-$  en la sangre en comparación con el SBF[73].



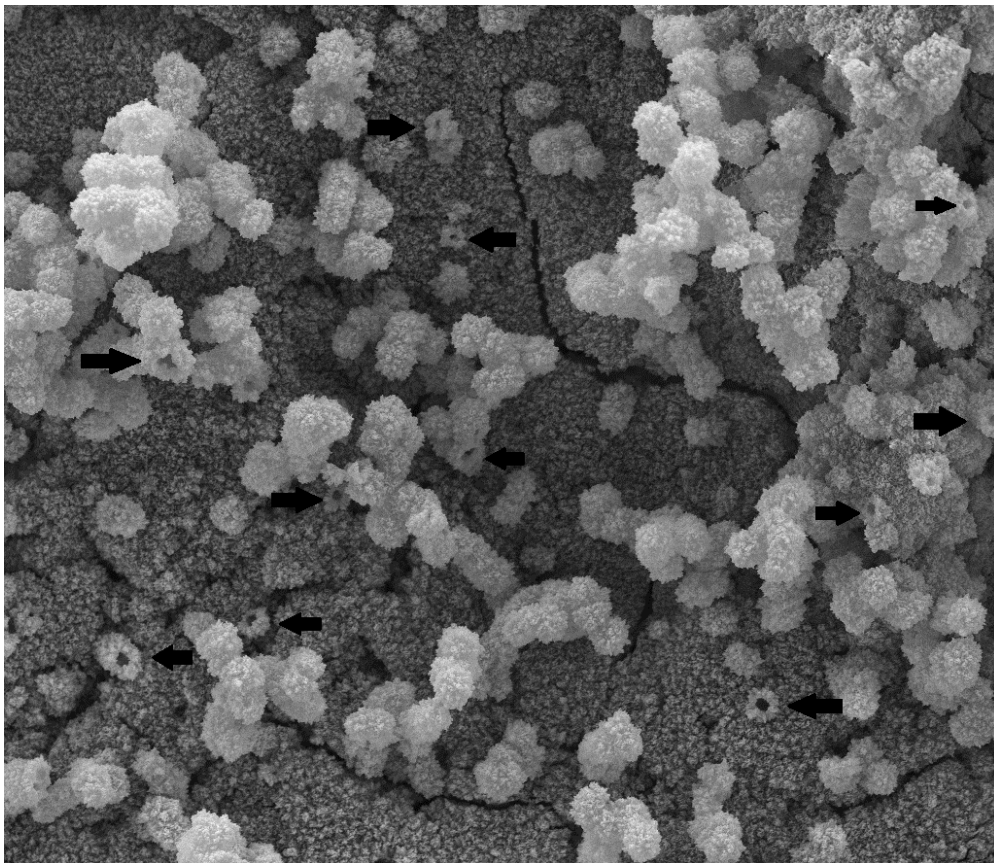
Las muestras inmersas durante 7 días en SBF durante ensayo de bioactividad fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido para corroborar la formación de hidroxiapatita. A continuación se presentan algunas de las imágenes en la Figura 11 en donde todas las muestras presentaron la presencia de una fase cristalina, con cristales que no superaron los 2 [um] de diámetro y cuya frecuencia disminuye a medida que aumenta la cantidad de cobalto incorporada en el vidrio. Esto no se observó en los resultados de rayos X anteriores, donde los difractogramas de la Figura 10 indicaban que los vidrios mBGCo1 y mBGCo2 presentaban una menor bioactividad en comparación con el vidrio mBGCo4.



**Figura 11.** Imágenes SEM de las muestras inmersas durante 7 días en SBF. Los vidrios correspondientes son **a)** mBG58s, **b)** mBGCo1, **c)** mBGCo2 y **d)** mBGCo4.

Esta disminución de cristales formados puede explicarse por las interacciones de los iones cobalto con el fosfato del medio o rol del cobalto como modificador de red reemplazando al calcio. Al tener menor radio iónico que el calcio produce un aumento en la densidad de la red, disminuyendo la reactividad del material. Aumentar la cantidad de este ión como modificador de red se traduce en una red más estable, que es menos propensa a hidrolizarse y degradarse en medio fisiológico[64], implicando una menor liberación de iones y un retardo en la formación de la capa de hidroxiapatita carbonatada. Este fenómeno es comúnmente observado en vidrios bioactivos dopados con otros metales que forman óxidos intermediarios u modificadores de red, tales como zinc, estroncio o magnesio[32], [74]–[76].

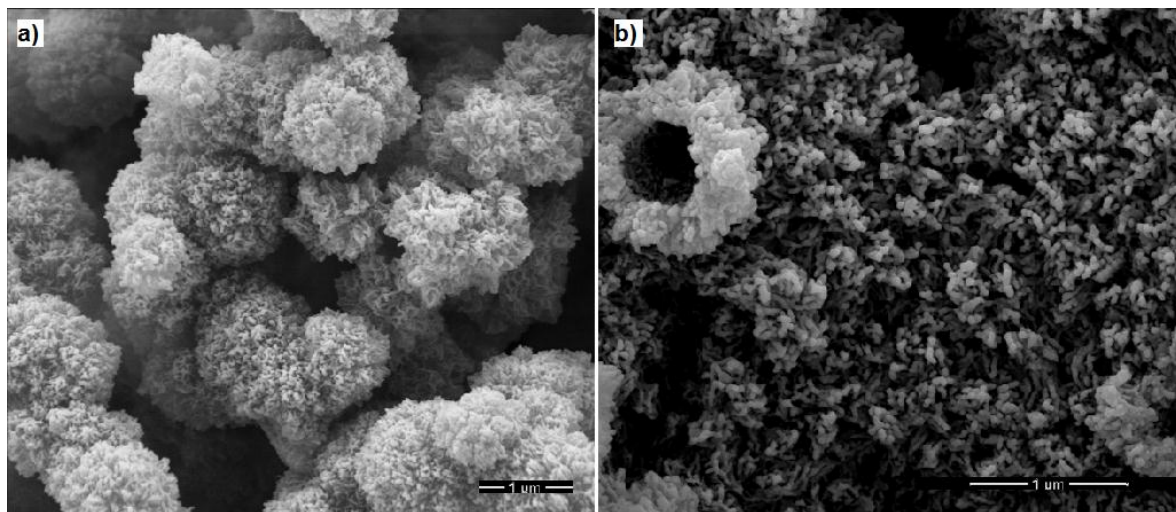
Se puede observar en la Figura 11 que a mayor dopaje con cobalto se vuelven más notorias y frecuentes unas estructuras de forma esférica y huecas. En la Figura 12 se puede ver que estas formaciones aparecen con regularidad en la superficie del material mBGCo4.



**Figura 12.** Estructuras huecas de hidroxiapatita presentes en la superficie el material mBGCo4.



En la Figura 13 se presenta un acercamiento a los cristales formados en los vidrios mBG58s y mBGCo4, en donde el primero presentó cristales bien conformados, todos muy cercanos unos de los otros, mientras que en el vidrio con cobalto se ve en detalle esta estructura hueca y con esferulitas en el fondo.

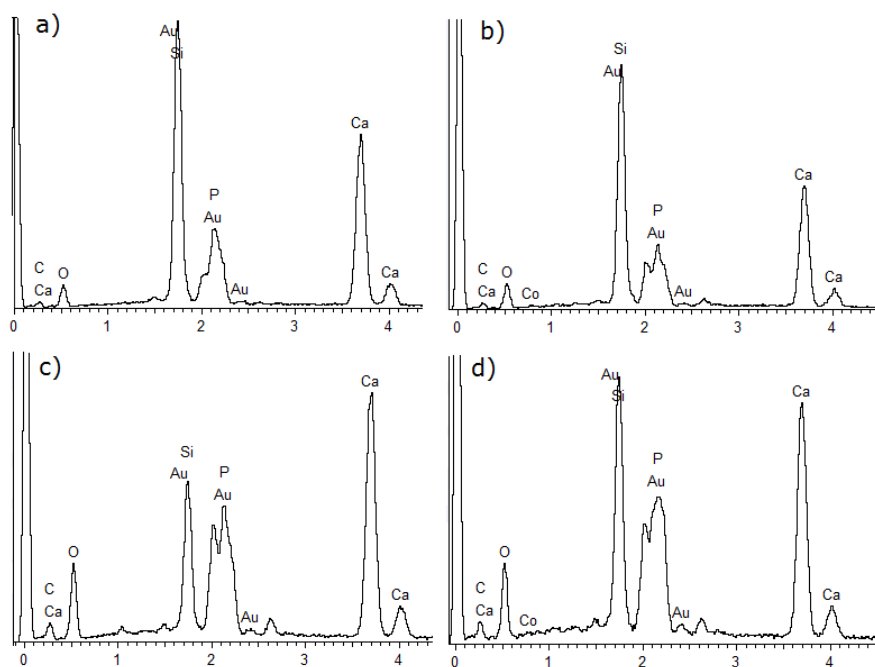


**Figura 13.** Foto SEM de los materiales inmersos en SBF durante 7 días. A la izquierda se presentan los cristales formados sobre el material mBG58s, mientras que a la derecha los formados sobre el material mBGCo4.

Parece ser que estas estructuras huecas corresponden a formaciones tempranas de los cristales de apatita que no alcanzan a crecer a modo de finalizar en una forma esférica. Hasta la fecha los estudios encontrados respecto a la formación de cristales de apatita o estructuras de fosfato de calcio amorfo dan cuenta de las formas que toman estos de manera individual, a escala nanométrica, y no la forma que adoptan los conglomerados. El estudio que describe de mejor manera la formación de cristales de apatita establece la formación de esferulitas de fosfato de calcio amorfo (ACP por sus siglas en inglés) a partir de la saturación de iones en el medio y posteriormente una disolución de estas desde el centro de la esferulita hacia afuera, a medida que por fuera comienza la nucleación de cristales de apatita. La disección de estas estructuras reveló que estos cristales en su centro presentaban material granular de baja densidad o simplemente se encontraban vacíos. Por otra parte describen que a tiempos tempranos ambas estructuras tienden a formar aglomerados en forma de anillo[77]. Es probable que al mantenerse la condición de supersaturación, los cristales aglomerados en forma de anillo crezcan hasta formar una nueva microestructura en forma de esfera. Se puede ver como esta estructura hueca de la Figura 13 b) parece estar compuesta por pequeños gránulos irregulares, mientras que las

estructuras de la Figura 13 a) están formadas por pequeños cristales en forma de aguja, característico de la HCA. Se concluye que estas estructuras huecas corresponden a aglomerados de apatita amorfa, que con el tiempo deberían cristalizar de manera gradual en hidroxiapatita carbonatada al incorporar iones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  o  $\text{CO}_3^{2-}$  [64].

Mediante EDS se pudo determinar la composición de la superficie del material antes y después de la exposición al SBF. Se presentan en la Figura 14 una comparación de estos resultados para los vidrios mBG58s y mBGCo4 antes y después de la inmersión en SBF durante 7 días.



**Figura 14.** Análisis composicional por EDS para a) mBG58s y b) mBGCo4 ambos antes del ensayo, c) mBG58s y d) mCo4 ambos después de 7 días sumergidos en SBF.

Para el vidrio ternario se midió una razón Ca/P similar a la de la composición teórica (4,32) mientras que para los vidrios dopado este valor fue decreciendo a mayor cantidad de cobalto, midiéndose para el vidrio con 4%mol de cobalto una razón de 2,83. Después de 7 días de inmersión en SBF la razón Ca/P en la superficie de los vidrios disminuyó, los datos se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Razón Ca/P de los vidrios sintetizados por el método 1 sumergidos 7 días en SBF.

<b>Código del vidrio</b>	<b>Razón Ca/P</b>
mBG58s	1,85
mBGCo1	1,92

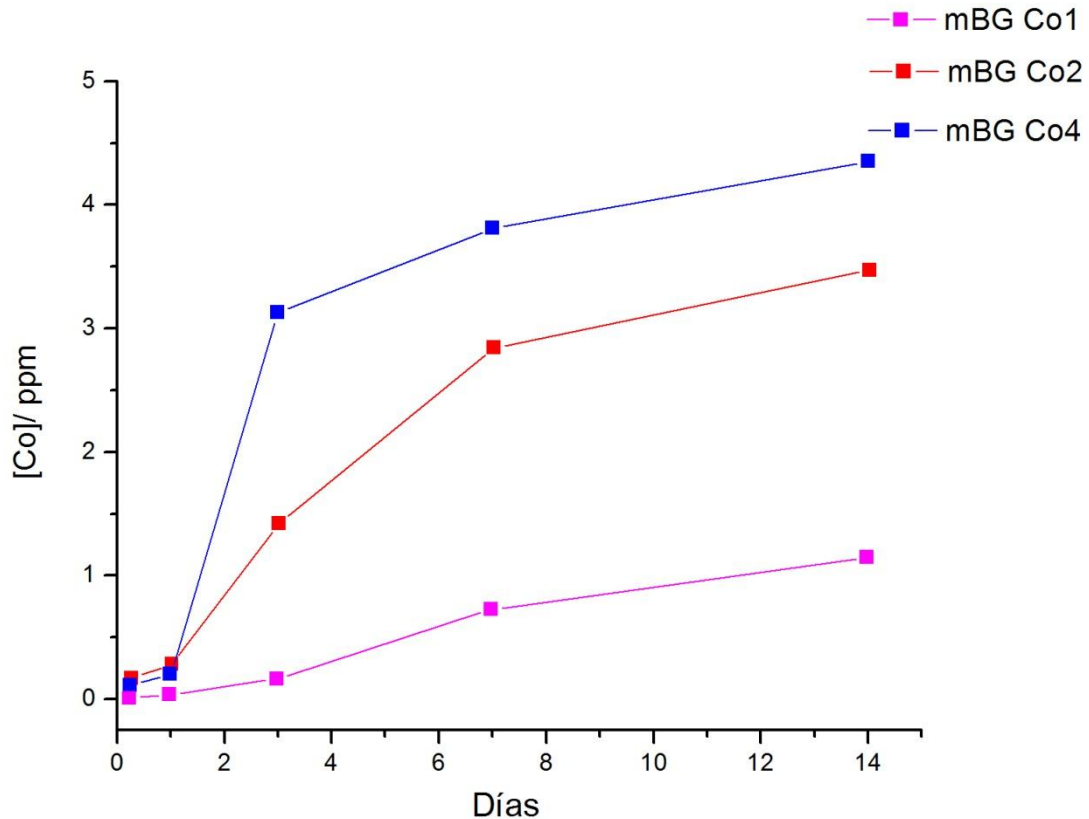


mBGCo2	1,84
mBGCo4	1,81

Cabe recordar que para el fosfato de calcio amorfo esta razón es cercana a la unidad, aumentando con el tiempo y transformándose en cristales de hidroxiapatita con una razón igual a 1,67 [78], mientras que la hidroxiapatita que se encuentra en los huesos se encuentra en el rango 1,57-1,62 [20]. La mayor razón Ca/P medida en los materiales estudiados en comparación con la razón 1,67 se debe a la presencia de cristales de calcita en la superficie, que también se observaron en los difractogramas de la Figura 10, que al estar compuestos de calcio elevan la cantidad de este elemento en la superficie analizada. Para los vidrios dopados con cobalto se encontró que pequeñas cantidades de cobalto fueron incorporadas en los cristales formados, pero esto no compromete la capacidad osteogénica de la capa formada [79].

### **5.1.3 Liberación de Co y cambio de pH**

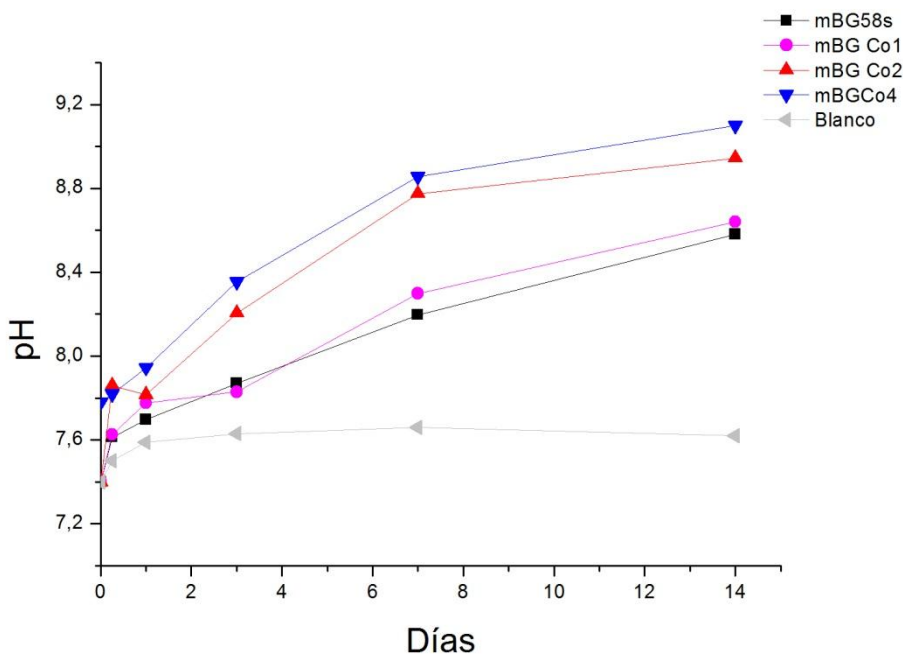
A cada muestra sometida al ensayo de bioactividad en SBF se midió pH y liberación de iones de Co si correspondía. En la Figura 15 se puede observar que para los vidrios dopados hay un aumento en la concentración de cobalto liberado hacia el medio a medida que aumentan los días de inmersión y la cantidad de cobalto incorporado en el material, y que a medida que pasan los días, las concentraciones tienden a converger a un valor máximo, el cual no es alcanzado a estos tiempos. No hay un valor claro para el cual el cobalto comienza a ser citotóxico pero hay antecedentes de que células estromales de médula ósea capaces de crecer y diferenciarse sin problemas en medios con hasta concentraciones de 20 ppm de  $\text{Co}^{2+}$  aunque se observó una disminución en la viabilidad[38]. Otros estudios determinan que ya a una concentración de 10 ppm hay un efecto citotóxico en osteoblastos, disminuyendo el número de células del cultivo en un 40%[36]. Se estima que el rango en el cual el cobalto es biológicamente activo es de 10-14 ppm[4] mientras que el rango en el cual el cobalto actúa sobre HIF corresponde a 3-15 ppm[37], [58]. Steinbrech et al.[80] estudió la expresión de VEGF en células de osteoblastos de ratas, reportando una máxima expresión de esta proteína al usar medios con una concentración de cobalto igual a 0,01 ppm, mientras que a 0,3 ppm, la expresión de VEGF era similar a las células en normoxia. En base a esto se espera que estos vidrios presenten propiedades proangiogénicas.



**Figura 15.** Liberación de  $\text{Co}^{2+}$  desde los vidrios sintetizados por el método 1 hacia el SBF para 6 horas, 1, 3, 7 y 14 días de inmersión

Los valores medidos en este experimento se encuentran por debajo de las tasas de liberación reportadas por otros autores, tanto para vidrios preparados por el método sol-gel o por fundido. La principal diferencia radica en el uso del material, ya que como se mencionó anteriormente, se realizaron discos comprimidos a partir de los polvos, los cuales durante todos los días de inmersión mantuvieron su integridad, sin signos de disolución o degradación significativa, por lo que se cree que solo se encontraron expuestos al medio los vidrios de la superficie del disco. Otros estudios se llevaron a cabo mediante el uso de estructuras tridimensionales sinterizadas usando como moldes esponjas de poliuretano [36], [38] o polvos[37], todos en menores relaciones masa de vidrio/volumen de medio, obteniendo mayores concentraciones pero en el mismo orden de magnitud. Esto puede resultar atractivo para aplicaciones en las cuales se quiera mantener estas menores concentraciones durante mayores tiempos pero para aplicaciones en regeneración ósea se necesita un material altamente poroso.

En la Figura 16 se puede observar las mediciones de pH para los medios de SBF expuestos a los materiales estudiados. Los valores de "Blanco" corresponden a los valores para el SBF sin material, el cual debería mantenerse en su valor inicial (7.45) pero mostró un aumento a lo largo del ensayo.



**Figura 16.** Cambio de pH en el medio SBF producto de la disolución de los vidrios durante el ensayo de bioactividad, donde el blanco corresponde al medio sin vidrios.

Para los materiales se observa el aumento del pH a medida que aumenta el tiempo de inmersión. Esto ocurre principalmente por el intercambio iónico entre los cationes del vidrio ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ ) y  $\text{H}^+$  disueltos en el medio acuoso, lo que da inicio a la serie de reacciones que forman la capa de apatita[81]. En base a esto es de esperar que los vidrios con mayor reactividad presenten un mayor cambio de pH en comparación con los vidrios de estructuras más estables y menos reactivas, tendencia que se repite en la mayoría de los vidrios bioactivos[82]. Azevedo et al.[37] detalla que en vidrios que no presentan sus cargas balanceadas, la entrada del cobalto en la estructura como óxido intermediario se traduce en la formación de enlaces Co-O-Si que son más débiles que los enlaces Si-O-Si formados comúnmente en estos vidrios. La mayor incorporación de cobalto en la estructura produce un aumento en la cantidad de estos enlaces débiles por lo que aumenta la reactividad y la disolución del vidrio. De esta manera el mayor aumento de pH y mayor tasa de liberación a medida que aumenta la cantidad de cobalto son congruentes. Esto refuta lo

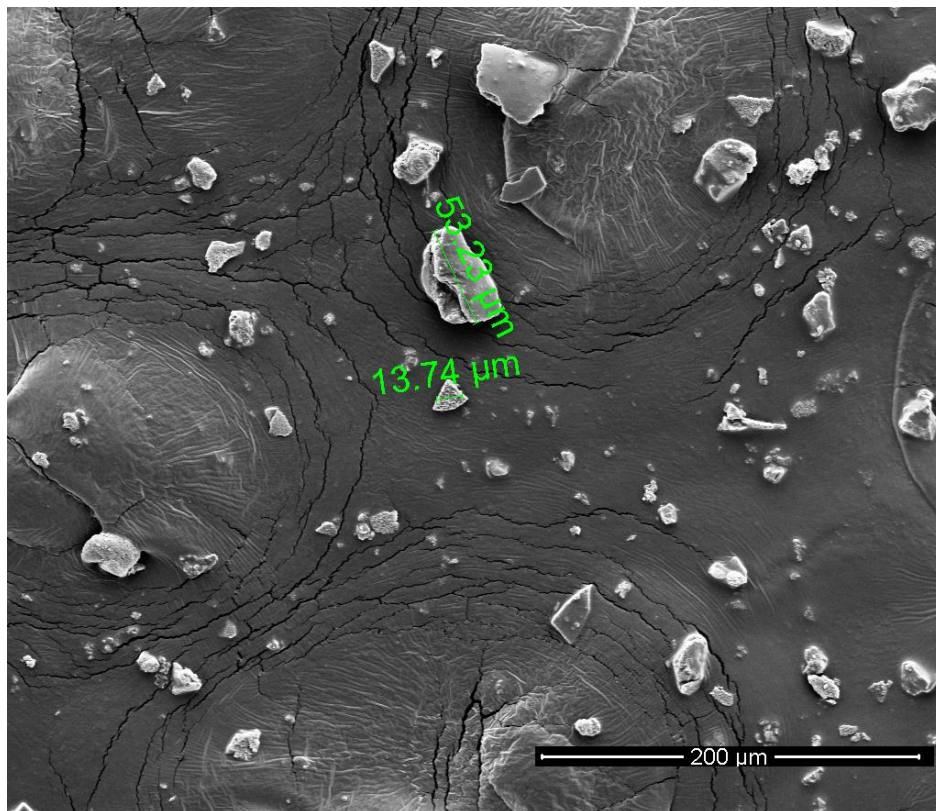
planteado anteriormente, que estos vidrios se volvían menos reactivos al incorporar cobalto en base a lo observado en los ensayos de bioactividad. Finalmente esta disminución de la bioactividad se debe a las interacciones de los iones cobaltos disueltos en el medio con los iones fosfato, inhibiendo la nucleación de apatita. Paralelamente la red es capaz de degradarse producto de la presencia de estos enlaces débiles, liberando iones  $\text{PO}_4^{3-}$  que se encontraban en la red[83]. Estos iones fomentan la nucleación de apatita, por lo que el material sigue presentando capacidades bioactivas.

Otro punto a destacar es como los valores medidos superan el pH del medio fisiológico (7,4) lo cual tiene efectos negativos para los sistemas biológicos, usualmente disminuyendo la viabilidad de las células.

## 5.2 Caracterización de vidrios bioactivos por síntesis 2

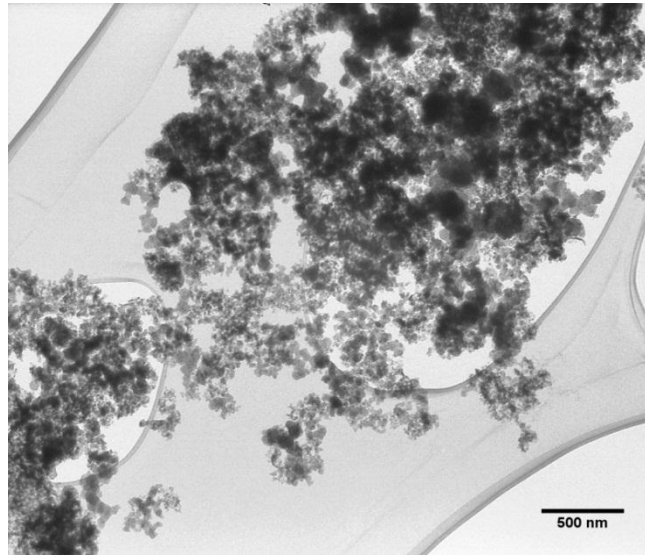
### 5.2.1 Caracterización de microestructura y textura de las partículas sintetizadas.

A diferencia de los vidrios sintetizados por el método 1, las partículas sintetizadas por el método 2 presentaron una amplia distribución de tamaños de partículas, presentando tanto micro como nanopartículas. En la Figura 17 se puede observar la presencia de micropartículas de mayor envergadura. Esta preparación no tiene un paso de tamizado que permita extraer las partículas de mayor tamaño, ya que la implementación de este procedimiento tenía por objetivo lograr la síntesis de nanopartículas desde una aproximación *bottom-up*, que suele ser una estrategia rápida, precisa, energéticamente eficiente y por lo tanto interesante desde el punto de vista investigativo[84] y no se esperaba obtener partículas de tamaños micrométricos.



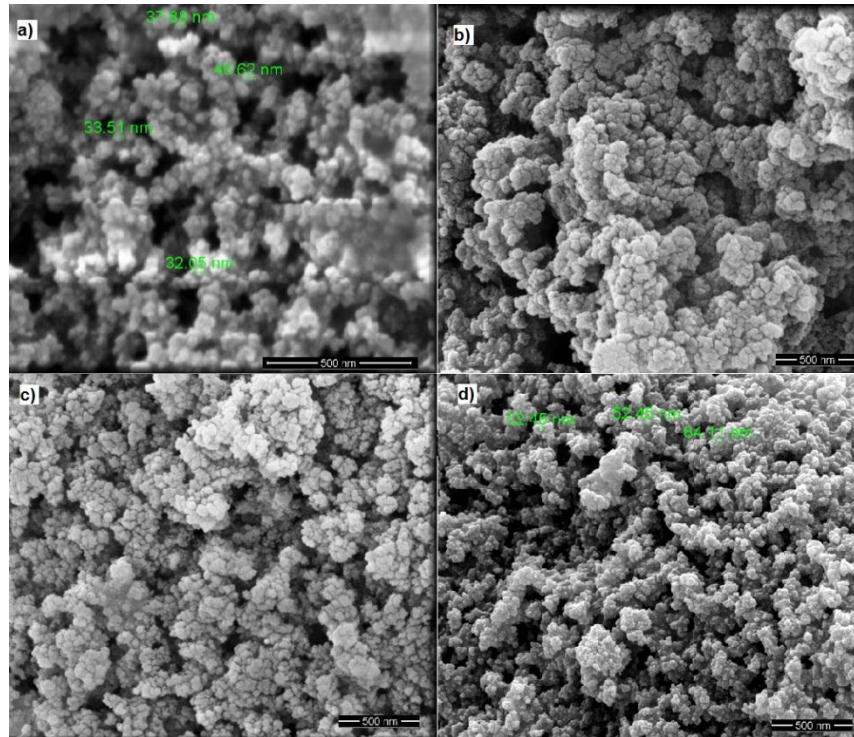
**Figura 17.** Presencia de micropartículas en los materiales sintetizados por el método 2.

La Figura 18 corresponde a una foto TEM, donde se pueden apreciar partículas aglomeradas a escala nanométrica, estructuras similares se han reportado como nanopartículas en trabajos anteriores[49], [85], [86] a pesar de que a una escala micrométrica se pueden observar partículas de mayor envergadura bien constituidas.



**Figura 18.** Imagen TEM del vidrio ternario sintetizado mediante el método 2.

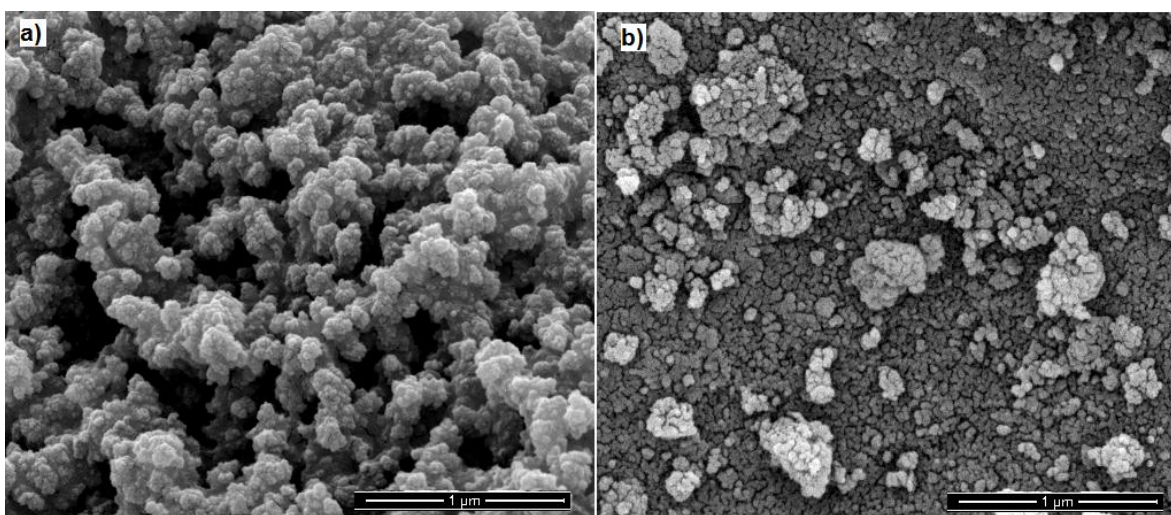
En la Figura 19 se presentan el vidrio ternario y dopado al 1, 2 y 4% mol con cobalto, imágenes obtenidas mediante SEM. Se observa que todos los materiales sintetizados por este método poseen una nanoestructura similar, con aglomerados de partículas que poseen un diámetro entre 30 y 50 [nm].



**Figura 19.** Nanopartículas ternarias sintetizadas por el método 2 que corresponden a **a)** nBG58s, **b)** nBGCo1, **c)** nBGCo2, **d)** nBGCo4



La Figura 20 se realiza una comparación de los materiales, que corresponden a los vidrios con el mismo porcentaje de cobalto incorporado pero sintetizados por los 2 métodos estudiados en este trabajo. El primero, que corresponde a la síntesis *bottom-up*, presenta una nanotopografía más irregular que el segundo, preparado mediante la estrategia *top-down*, lo que se traduciría en un aumento en el área superficial.



**Figura 20.** Comparación de las superficies de los vidrios dopados con 4%mol de cobalto donde **a)** nBGCo4 y **b)** mBGCo4

Al igual que para los vidrios sintetizados por el método 1, se analizó la composición final de los vidrios en comparación con la teórica, los cuales se presentan en la Tabla 4, donde presentaron diferencias en sus valores, pero que a diferencia de la síntesis anterior no sigue una tendencia clara en cuanto a cuales son los óxidos favorecidos a ser incorporados durante la síntesis. Probablemente el uso etanol para mejorar la miscibilidad del TEOS y el solvente ácido altera la dinámica de las reacciones de polimerización, facilitando el ingreso de todos los precursores a la estructura en formación y la mayor disponibilidad de cationes produce un vidrio en el cual el cobalto es capaz de entrar como un modificador de red.

**Tabla 4.** Composiciones teóricas y medidas por fluorescencia de rayos x de los vidrios sintetizados por el método 2.

<b>Código Vidrio</b>	<b>Composición teórica en %peso de los biovidrios. En paréntesis los valores experimentales</b>				
	<b>Método síntesis 2</b>	<b>SiO<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>CaO</b>	<b>CoO</b>
n58s		59,41 (64,73)	7,32 (5,87)	33,27 (29,38)	-- --
nCo1		58,37 (66,9)	7,19 (11,37)	31,78 (19,35)	2,67 (2,31)
nCo2		57,35 (55,73)	7,05 (7,67)	30,33 (29,5)	5,25 (7,05)
nCo4		55,43 (54,98)	6,83 (8,12)	27,59 (24,83)	10,15 (12,05)

Así también, se estudió el área superficial de los vidrios sintetizados mediante BET, cuyos resultados se presentan en la Tabla 5 y que presentan una diferencia en los valores, considerando que todos se sintetizan de la misma manera. Estos no pasan por un proceso de molienda y tamizado, por lo que el tamaño de partícula solo está determinado por las condiciones en las que se lleva la polimerización, en el cual se utiliza etanol para mantener las partículas dispersas, previniendo el crecimiento del coloide formado y catalizando la policondensación y disminuyendo el tiempo de gelación mediante la solución de amoníaco, obteniéndose partículas más pequeñas[87].

**Tabla 5.** Áreas superficiales de los vidrios sintetizados por el método 2.

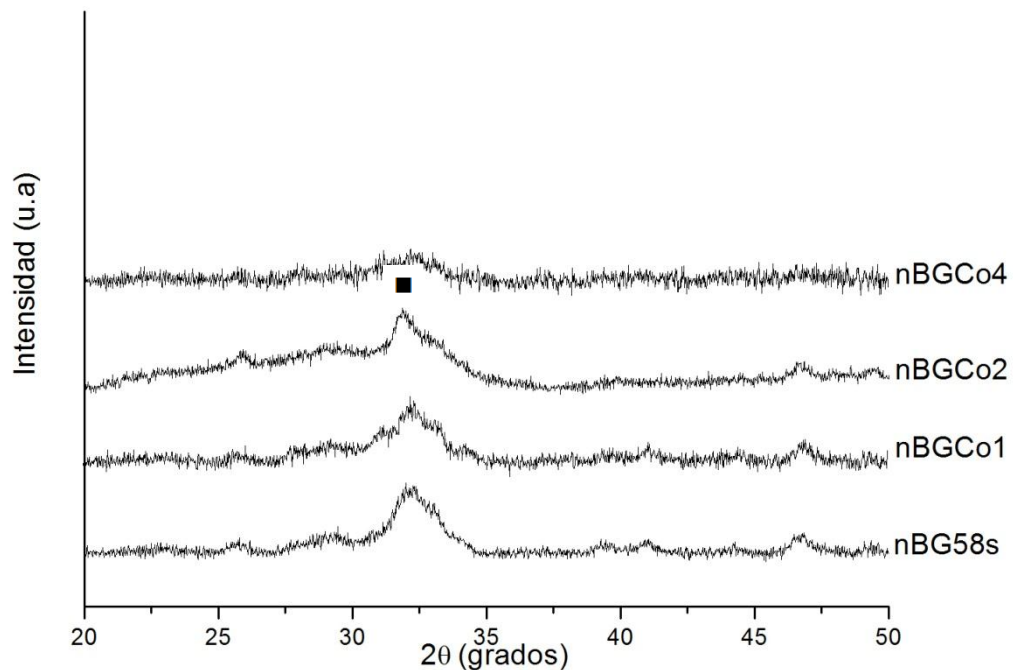
<b>Código del vidrio</b>	<b>Área superficial [m<sup>2</sup>/g]</b>
nBG58s	75,6
nBGCo1	133,6
nBGCo2	216,7
nBGCo4	210,7

El tamaño de partículas final dependerá tanto de los precursores utilizados como el pH, presión, temperatura, razón agua/alcohóxico, etc. [88]. En general es imposible establecer una relación general entre iones dopantes y cambio del área superficial, pero en este caso se observa un aumento del área específica a medida que aumenta la cantidad de cobalto incorporado al vidrio, mientras que para vidrios dopados con zinc, a modo de ejemplo, se ha reportado previamente una



disminución del área superficial al ser incorporado a los vidrios[89]. Así también, este aumento en el área superficial es coherente con lo observado previamente en la Figura 20, donde el vidrio nBGCo4 presento una nanotopografía irregular en comparación con el vidrio MBGCo4, con una superficie más plana y por consiguiente, un área superficial menor ( $151 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

Al igual que para la síntesis 1, se sintetizaron materiales con estructura amorfa. Como se puede ver a continuación en la Figura 21, hay presente una cristalización parcial de silicato de calcio, la que ocurre durante el proceso de calcinación a  $700 \text{ }^\circ\text{C}$  [78] y que no merma las capacidades bioactivas del vidrio. Tal como ocurrió en el método de síntesis anterior, para el vidrio dopado con 4%mol de cobalto presentó la menor intensidad en el pico  $2\theta=32^\circ$ .

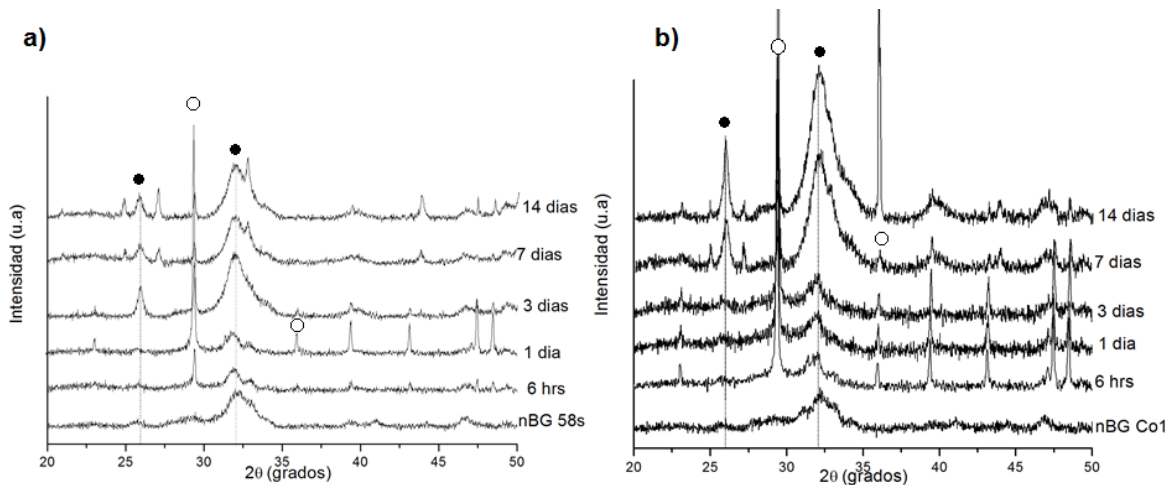


**Figura 21.** Difractogramas de los vidrios ternarios y dopados con cobalto sintetizados mediante el método 2. La fase cristalina marcada como (■) corresponde a silicato de calcio  $\text{Ca}_2\text{SiO}_4$  (00-029-0369).

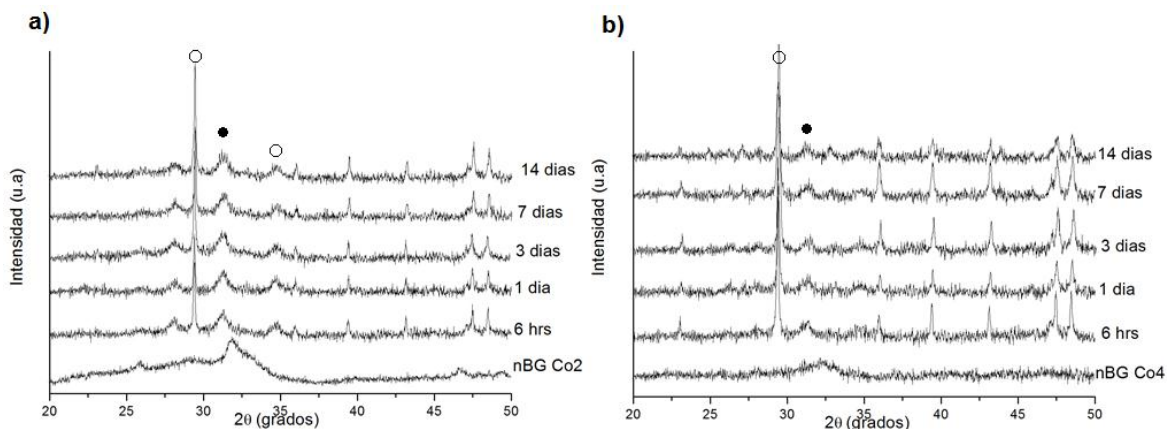
### 5.2.2 Bioactividad: Formación de apatita y liberación de iones

Los vidrios fueron sumergidos durante 1, 3, 7 y 14 días a una solución de SBF para determinar sus propiedades bioactivas. Todos los materiales mostraron la capacidad de formación de una capa de apatita, la cual fue corroborada por microscopía electrónica de barrido y difractogramas de rayos X.

Se puede observar en la Figura 22 los difractogramas correspondientes a los vidrios con 0% y 1%mol de cobalto después del ensayo de bioactividad, que presentan los picos relacionados con la hidroxiapatita en  $2\theta=25.9^\circ$  y  $31.5^\circ$  y como aumenta la intensidad de estos a medida que aumenta el tiempo de inmersión en SBF. Los difractogramas para los vidrios dopados con 2 y 4%mol de cobalto se presentan en la Figura 23, donde se puede ver que no se logró una medición relacionada con la formación de hidroxiapatita.



**Figura 22.** Difractogramas de rayos X de los vidrios **a)** nBG58s y **b)** nBGCo1 después de su inmersión en SBF durante 6 horas, 1, 3 7 y 14 días. Las fases cristalinas corresponden a hidroxiapatita (●) y calcita (o).



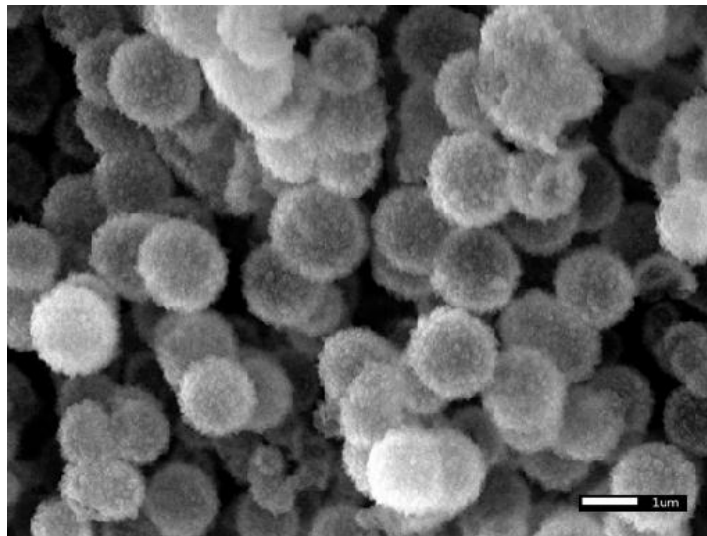
**Figura 23.** Difractogramas de rayos X de los vidrios **a)** nBGC02 y **b)** nBGC04 después de su inmersión en SBF durante 6 horas, 1, 3 7 y 14 días. Las fases cristalinas corresponden a hidroxiapatita (•) y calcita (o).

Se puede observar como destaca un pico de alta intensidad en  $2\theta=29^\circ$  para todos estos vidrios, como se mencionó anteriormente, corresponde a la formación de calcita. Dado que estos vidrios poseen una mayor área superficial en comparación con los vidrios sintetizados por el método 1 es consecuente que liberen una mayor cantidad de calcio al medio. Como se mencionó anteriormente, está alta tasa de liberación es la que promueve la co-nucleación de calcita junto con la capa de apatita amorfa, produciendo una medición de mayor intensidad para estas estructuras cristalinas.

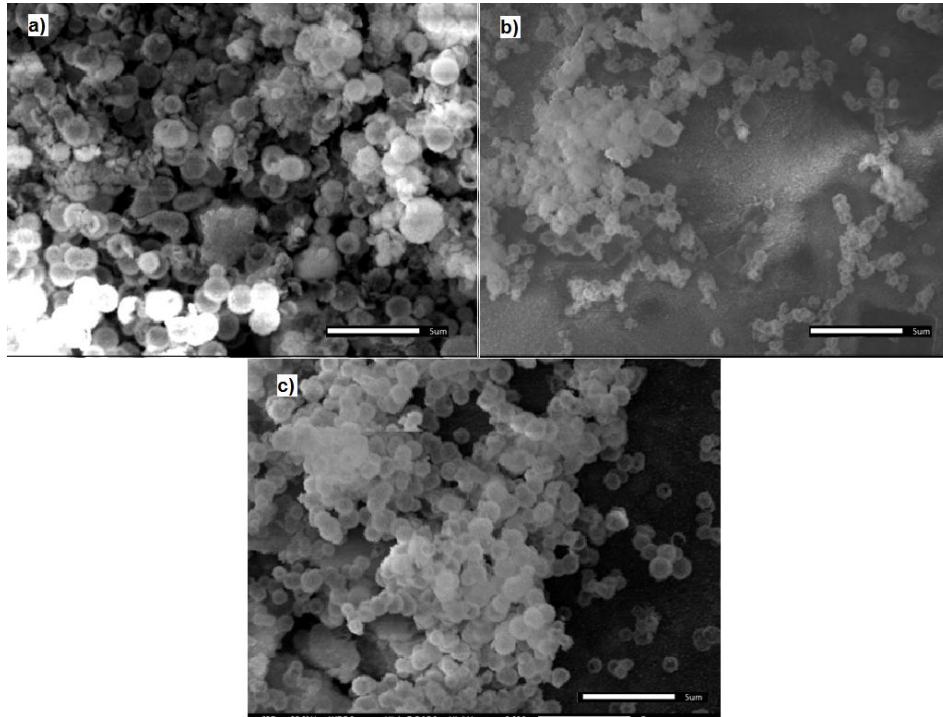
Es probable que en estos vidrios, el rol predominante del cobalto sea como modificador de red y no como óxido intermediario, como fue el caso de los vidrios del método 1. Cuando predomina este rol de modificador de red, se ha visto que su incorporación hasta un 2%mol no produce una disminución significativa en su reactividad, pero al pasar este valor, Azevedo et al.[37] describió un aumento considerable de la temperatura de transición vítrea la cual está relacionada a una menor reactividad en ambiente fisiológico. En los vidrios del método 1 se obtuvieron materiales con una red degradable, que permite liberar iones fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) hacia el medio, mientras que acá, la estabilidad que otorga el cobalto como modificador hace que la red sea menos propensa a degradarse. Aun así, estos vidrios cuentan con mayores cantidades de calcio en su composición y altas áreas específicas, por lo que estos materiales liberan grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  producto del intercambio iónico. Estos iones reaccionan con los iones  $\text{PO}_4^{3-}$  que ya se encuentran presentes en el SBF, permitiendo la nucleación de apatita en menores cantidades y una alta nucleación de calcita. Por otro lado, en la Tabla 4 se observa que la medición experimental del vidrio nBGC02 la cantidad

de cobalto incorporado supera este valor crítico del 2%mol (5,25% en peso) lo que explicaría la baja intensidad de los picos relacionados con la hidroxiapatita.

Se confirmó mediante microscopía SEM la formación de cristales de hidroxiapatita, que como se pueden observar en la Figura 24 corresponden a cristales de HCA en forma de aguja que conforman esferas con un tamaño menor a 2 [um] de diámetro, formaciones que también fueron observadas en los vidrios sintetizados por el método 1. Paralelamente se observó una disminución en la cantidad de cristales formados al incorporar cobalto en el vidrio pero esta vez la disminución en la nucleación fue igual en todos los vidrios con cobalto, esto se puede apreciar en la Figura 25, que los vidrios nBGCo1 y nBGCo4 presentan zonas libres de cristales.

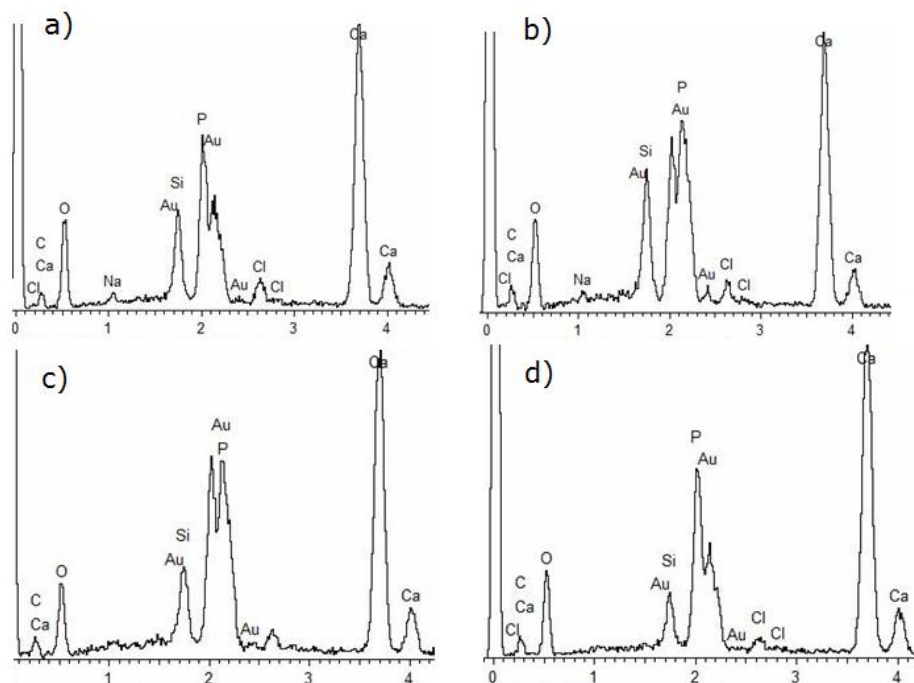


**Figura 24.** Imagen SEM de los cristales formados sobre el vidrio nBG58s después de 7 días de inmersión en SBF.



**Figura 25.** Imágenes SEM de las muestras inmersas durante 7 días en SBF. Los vidrios correspondientes son **a)** nBG58s, **b)** nBGCo1, **c)** nBGCo4.

Por otro lado, en estos vidrios no se vieron las estructuras huecas presentes en los materiales dopados con cobalto sintetizados por el método 1, las cuales estaban relacionadas con la formación de aglomerados de la apatita amorfa, que con el tiempo cristaliza lentamente a HCA. Hasta el momento, la mayor diferencia entre ambos materiales radica en el rol que cumple el cobalto en la estructura. En los materiales del método 1, la mayor degradación de la estructura a mayor dopaje con cobalto se traduce en una gran disponibilidad de puntos de nucleación y en una mayor liberación de iones  $\text{PO}_4^{3-}$  hacia el medio. Ambos son elementos fundamentales para la nucleación de la apatita amorfa y la cristalización de esta depende de la concentración de  $\text{CO}_3^{2-}$  presentes en el medio SBF. El paso de apatita a HCA es mucho más lento que la formación de apatita sobre la capa rica en sílice producto de la degradación de la red[64], por lo que la nucleación descontrolada de este apatita podría provocar un agotamiento de la cantidad de  $\text{CO}_3^{2-}$  en el SBF, dejando estas estructuras sin finalizar su cristalización. En el caso de los vidrios del método 2, la menor nucleación de apatita permite que estas cristalicen gradualmente, sin mermar las concentraciones de carbonatos, sin dejar rastros de apatita sin cristalizar a los 7 días de inmersión en SBF.



**Figura 26.** Análisis composicional por EDS para a) nBG58s, b) nBGCo1, c) nBGCo2 y d) nBGCo4.

El análisis composicional presentado en la Tabla 6 muestra que la capa de apatita formada en los materiales al ser sumergidos en SBF por 7 días tiene una razón Ca/P mayor que para los vidrios sintetizados por el método 1.

**Tabla 6.** Razón Ca/P de los vidrios sintetizados por el método 2 sumergidos durante 7 días en SBF

<b>Código del vidrio</b>	<b>Razón Ca/P</b>
nBG58s	1,92
nBGCo1	2,09
nBGCo2	2,2
nBGCo4	2,09

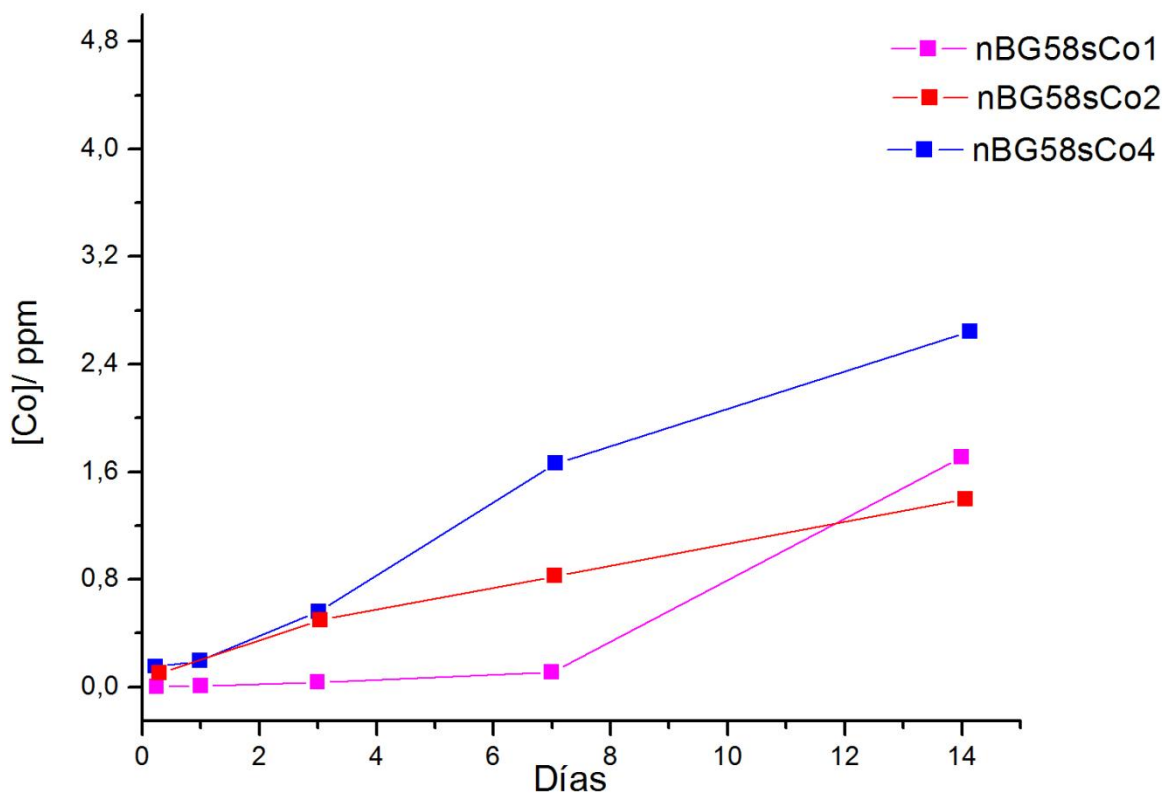
Esto se explica por la co-nucleación ya mencionada de calcita, que se traduce en mayores cantidades de calcio en la superficie. Se observa como esta razón aumenta a medida que los vidrios presentan mayores áreas, producto de las mayores cantidades de calcio liberado, el vidrio

nBGCo2 presentó la mayor área superficial y mayor razón Ca/P. En el caso del vidrio nBG58s, que presenta casi la mitad del área superficial que su contraparte micrométrica, la medición de la razón Ca/P es bastante similar (1,85 para el vidrio mBG58s) ya que ambos vidrios son bastante reactivos, por lo que la superficie de la muestra analizada está compuesta principalmente de apatita amorfa.

También se puede observar en la Figura 26 que ninguna muestra presentó incorporación de cobalto en los cristales formados, mientras que para el vidrio con 4%mol con cobalto sintetizado por el método 1 si presento en pequeñas cantidades.

### 5.2.3 Liberación de Co y cambio de pH

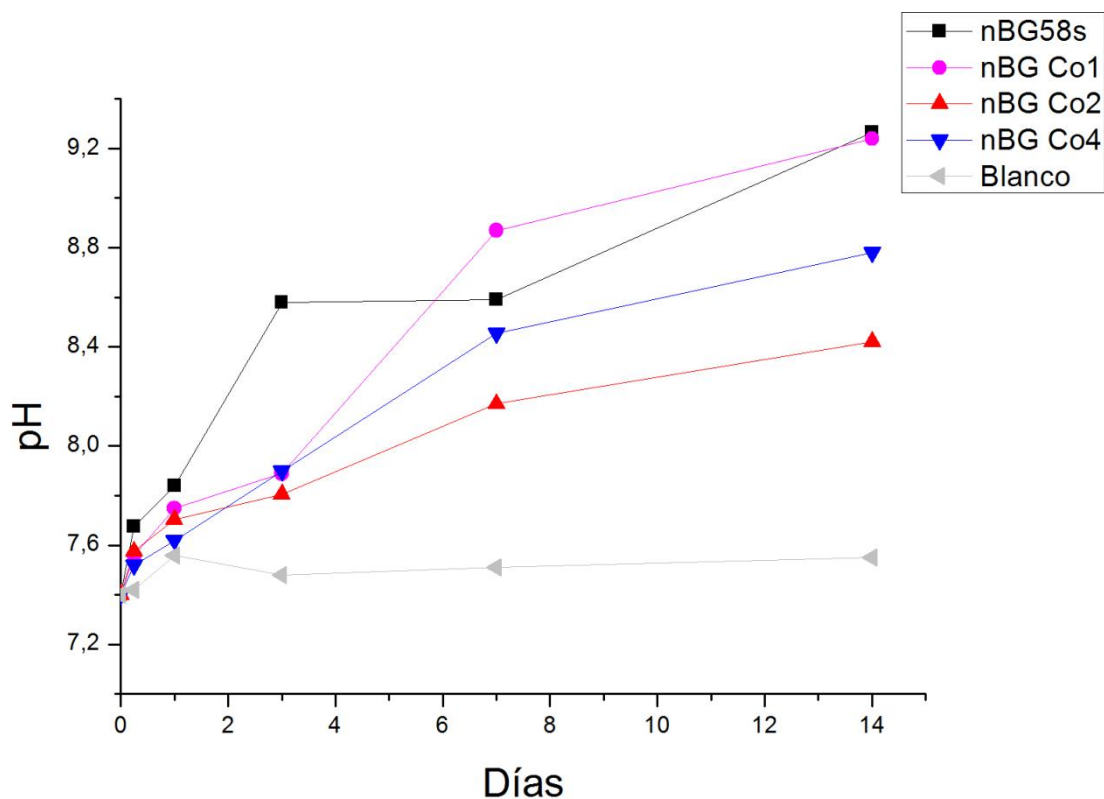
A cada muestra sometida al ensayo de bioactividad en SBF se midió pH y liberación de iones de Co si correspondía. A diferencia de los materiales sintetizados por el método 1, no se observó el comportamiento esperado, considerando que los vidrios dopados con cobalto presentan mayor área superficial pero menor liberación de cobalto para todos los días sumergidos en SBF.



**Figura 27.** Liberación de  $\text{Co}^{2+}$  desde los vidrios sintetizados por el método 1 hacia el SBF para 6 horas, 1, 3, 7 y 14 días de inmersión.

Si bien para los vidrios sintetizados por el método 1 se aprecia un aumento considerable en la liberación de iones cobalto a medida que aumenta el dopaje, en la Figura 27 se puede observar que la liberación no aumenta considerablemente a medida que se incorpora más cobalto en el material. Tal como se mencionó anteriormente, para estos vidrios en donde el cobalto actúa como modificador de red, el dopaje con un 1%mol no disminuye su reactividad. Este vidrio presenta liberaciones similares a la de su contraparte micrométrica al pasar 14 días inmerso en SBF. Ya para el vidrio nBGCo<sub>2</sub>, el cual tiene una composición de cobalto mayor al 2%mol, la estabilidad otorgada por estos iones, actuando como modificadores de red, limita la liberación de cobalto a un proceso de intercambio iónico con el medio mientras la liberación del cobalto presente en la red de silicatos se ve disminuida al no degradarse la red. La degradación de la red es fundamental para el inicio de la formación de la capa de apatita, por lo que estos vidrios menos reactivos se vuelven menos bioactivos. Esto se traduciría en una liberación más lenta pero prolongada, a diferencia del vidrio mBGCo<sub>2</sub> que es capaz de liberar iones cobalto a una mayor tasa inicialmente y en un retardo en la formación de hidroxiapatita. El mismo fenómeno ocurre para el vidrio nBGCo<sub>4</sub> que producto de su mayor estabilidad de red se ve mermada la liberación de cobalto y degradación de la red en comparación con el vidrio mBGCo<sub>4</sub>, a pesar de presentar una mayor área específica. De esta manera, los vidrios nBGCo<sub>2</sub> y nBGCo<sub>4</sub> verían reducida su capacidad bioactiva, lo que puede ser observado en los difractogramas de la Figura 23, donde estos vidrios no presentan mediciones intensas relacionadas con cristales de hidroxiapatita.



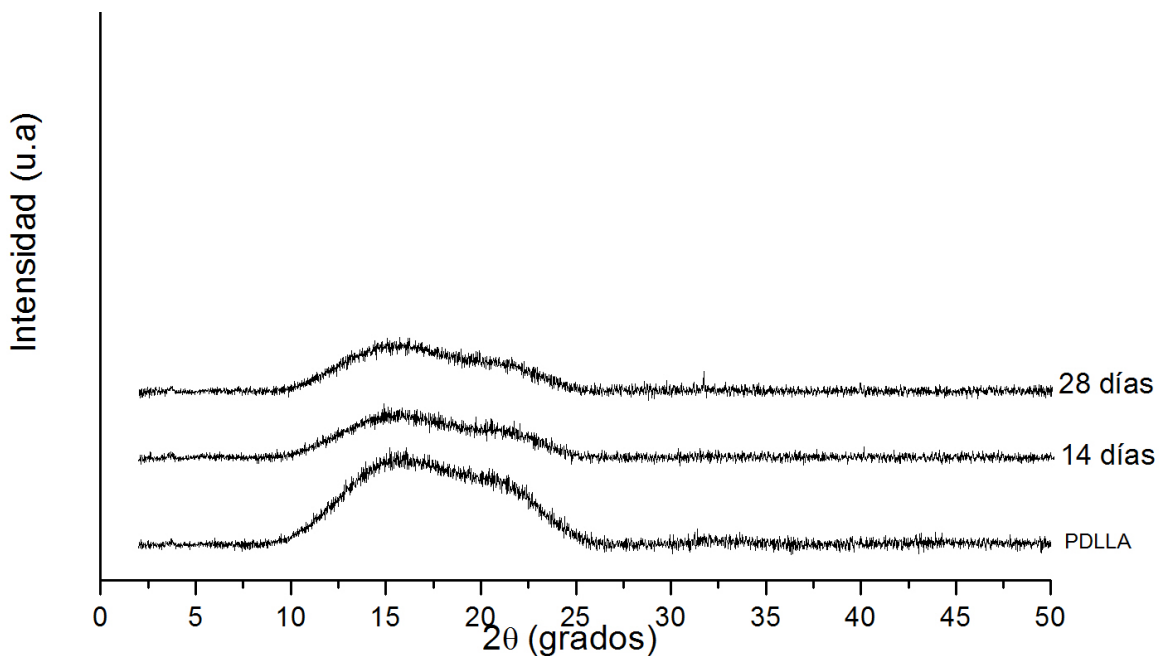


**Figura 28.** Cambio de pH en el medio SBF producto de la disolución de los vidrios durante el ensayo de bioactividad, donde el blanco corresponde al medio sin vidrios.

Por otra parte, a diferencia de los materiales anteriores que presentaron un aumento consistente del pH a medida que aumentaban los días de inmersión o la cantidad de cobalto incorporado, estos materiales no siguieron la misma tendencia tal como se puede ver en la Figura 28, siendo el material sin cobalto el que produjo la mayor alcalinización del medio a los 14 días, seguido por el vidrio con 1, 4 y 2%mol. Como se mencionó anteriormente, la incorporación de cobalto en el vidrio ternario hasta un 2%mol no disminuye la reactividad de este. En este caso, los materiales nBG58s y nBGCo1 presentan una reactividad similar, liberando iones con mayor facilidad que los vidrios nBGCo2 y nBGCo4, conllevando a mayores cambios de pH. La mayor capacidad alcalinizante del vidrio nBGCo4 en comparación con nBGCo2 debe ser producto de la mayor liberación de cobalto, ya que si vemos a los 3 días, ambos presentan la misma liberación de cobalto y mismo pH, pero a medida que pasan los días la diferencia entre estas variables comienzan a aumentar de manera proporcional.

### 5.3 Caracterización de materiales compuestos PDLLA/Biovidrios 1

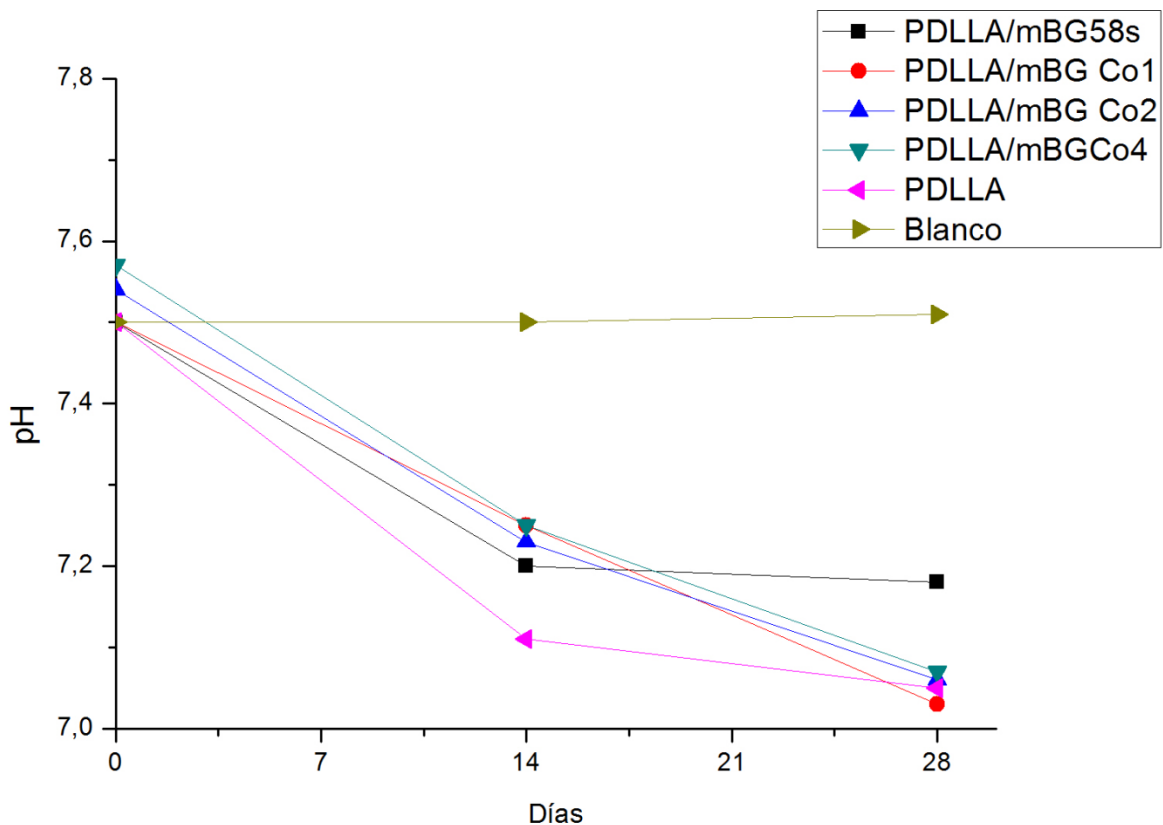
Si bien todos los materiales comparten la habilidad de producir una capa de apatita al ser sumergidos en SBF y la liberación de cobalto, los materiales sintetizados por el método 2 presentan un comportamiento difícil de predecir tanto en liberación de cobalto, cambio de pH y tamaño de partícula. El proceso de tamizado por el cual pasan los materiales del método 1 permite obtener un material con una baja dispersión en el tamaño de partícula y por lo tanto sus propiedades son más consistentes que las de los materiales del método 2. Es por esto que se realizaron compósitos utilizando los microvidrios. Se utilizaron los discos preparados según la metodología previamente descrita para realizar ensayos de bioactividad, sumergiendo las muestras en SBF durante 14 y 28 días.



**Figura 29.** Diffractogramas de rayos X del polímero PDLLA utilizado en los compósitos, inmerso durante 0, 14 y 28 días en SBF.

Este polímero, al ser caracterizado por difracción de rayos x, suele presentar un hombro entre  $2\theta=10^\circ$  y  $25^\circ$ , cuya intensidad disminuye a medida que se degrada producto de la inmersión en un medio acuoso lo cual fue corroborado en este caso y puede observarse en la Figura 29. Maquet et al. [46] reportó este fenómeno tanto para el polímero como para *scaffolds* porosos de PDLLA/BG y PGLA/BG inmersos en PBS durante 8, 16 y 30 días, obteniendo un material con capacidades bioactivas y con una tasa de degradación menor al polímero sin vidrios.

Esto se debe a que en medios acuosos, las moléculas de agua son capaces de difundir en la región amorfa del polímero e hidrolizar las uniones éster de la cadena, que corresponde a un proceso de escisión aleatoria de esta y que se ve catalizada por ácidos[90]. Dado que este polímero es un poliácido y los oligómeros producto del corte de las cadenas son ácidos carboxílicos, estos actúan de manera autocatalítica, reduciendo el pH del medio local y acelerando la degradación desde el seno del material, produciéndose zonas huecas en el interior llenas de estos productos ácidos[91] y una vez que se compromete la integridad del material, estas burbujas son capaces de romperse y liberar especies capaces de acidificar el medio en el que se encuentra el polímero[53]. En cambio, al introducir partículas de biovidrios en una matriz como esta, se ve retardada o incluso mitigada en algunos casos la degradación, ya que estos vidrios son capaces de liberar iones alcalinos que producen un efecto tampón de manera local, de modo que estorba la reacción autocatalítica[38],[39].

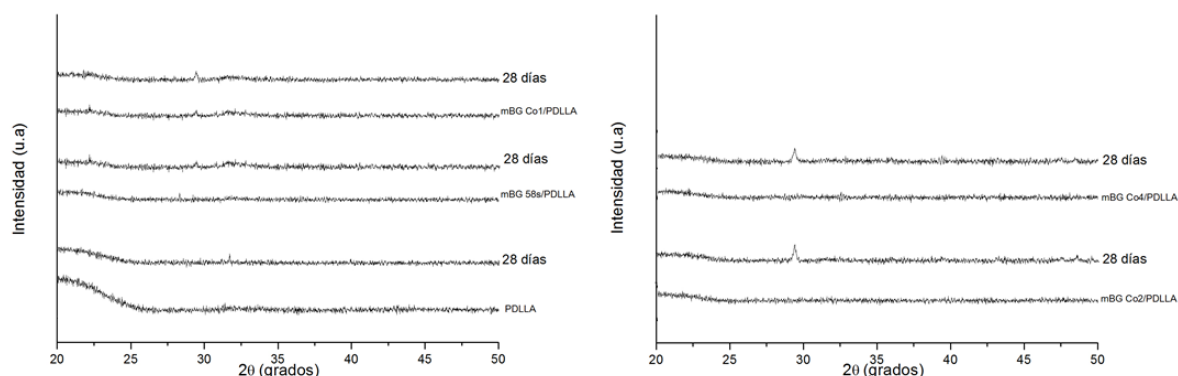


**Figura 30.** Cambio de pH en el medio SBF durante el ensayo de bioactividad, donde el blanco corresponde al medio sin materiales a estudiar.

A pesar de esto, se observa en la Figura 30 que a diferencia de los ensayos de inmersión en SBF para los vidrios solos, que fueron capaces de alcalinizar el medio, los compósitos acidificaron la solución a medida

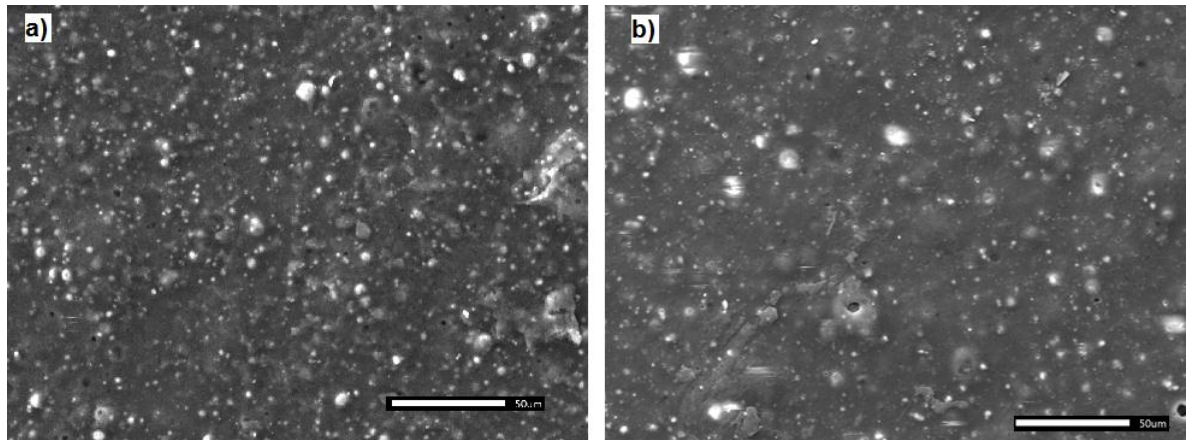
que pasan los días. Los valores del pH para los compósitos fueron mayores en comparación con el polímero sin vidrios a los 14 días de inmersión, producto del efecto alcalinizador de los vidrios mencionado anteriormente, mientras que ya para los 28 días los vidrios con cobalto no fueron capaces de contrarrestar el efecto acidificante que tienen los productos de disolución del PDLLA. Debido a la naturaleza poco porosa del material preparado, la mayor parte de las partículas embebidas no fueron expuestas a la solución de SBF, disminuyendo la cantidad de vidrio disuelto y por lo tanto mitigando la capacidad de prevenir la degradación. Maquet et al.[46], [53] obtiene menor acidificación de los medios para los compósitos con 10%p/p de biovidrio, presentando valores del pH mayores que 7,2 en todo el tiempo evaluado, pero utiliza el biovidrio comercial 45s5, que posee una tasa de disolución menor que los vidrios de base ternaria[92], pero al realizar scaffolds que pasan por un proceso de liofilizado, obtiene un material altamente poroso, cuyas partículas son expuestas al medio y son capaces de reaccionar y ejercer el efecto tampón.

Los compósitos inmersos en SBF durante 14 y 28 días fueron enviados a analizar mediante rayos X, pero solo se presentan en la Figura 31 los difractogramas de los materiales sin inmersión y después de 28 días ya que no hubo cambios importantes en los datos registrados.



**Figura 31.** Difractogramas de rayos X de los compósitos después de su inmersión en SBF durante 28 días.

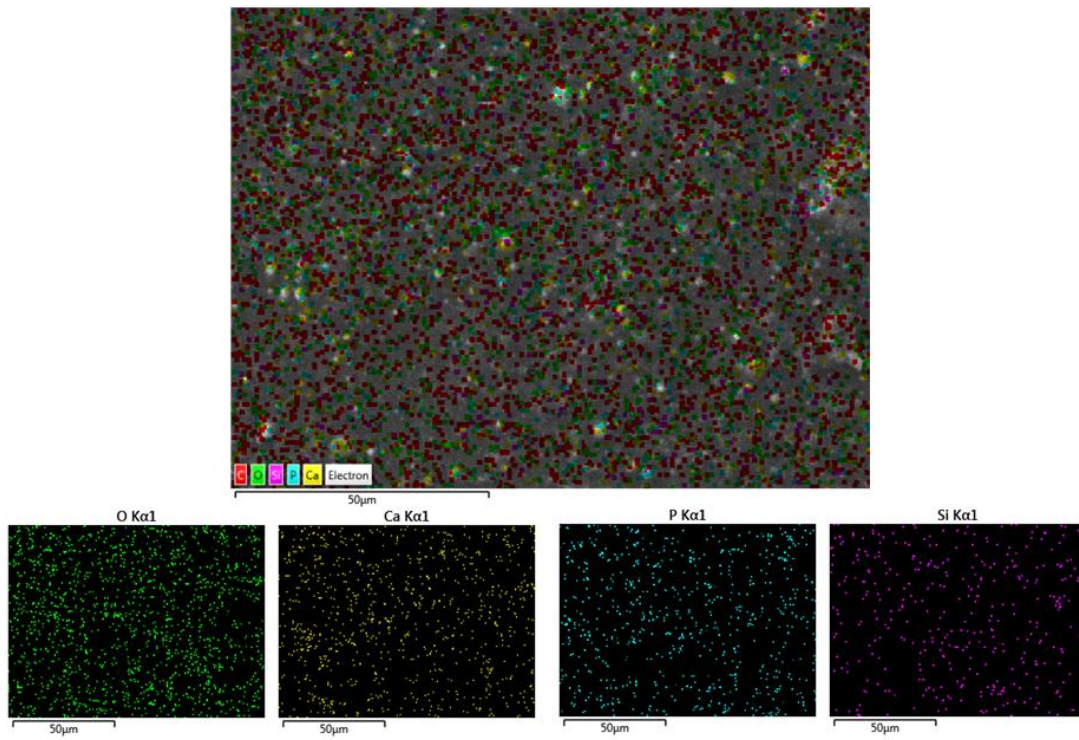
Los pequeños picos alrededor de  $2\theta=29^\circ$  corresponden a calcita, que pudo precipitar sobre el vidrio ya que el medio SBF se encuentra saturado de iones como el calcio, mientras que no se observan picos relacionados con la hidroxiapatita. Se estudiaron las superficies de los materiales mediante microscopía electrónica de barrido y no se hallaron indicios de fases cristalinas como apatita o calcita, sino solo se encontraron partículas embebidas en el polímero y pequeños poros (Figura 32).



**Figura 32.** Imágenes SEM de las muestras a) PDLLA/mBG58s y b) PDLLA/mBGCo4, inmersas durante 28 días.

Dado que la muestra que se sumerge en SBF corresponde a un disco sólido de PDLLA con vidrios bioactivos y no un scaffold poroso, el cual posee una mayor área específica, la cantidad de vidrios expuestos es baja, lo que no permite la nucleación de hidroxiapatita en grandes cantidades. Es importante recordar el rol que cumple el vidrio como sitio de nucleación para la apatita, ya que los grupos silanol que se forman al momento de la hidrólisis del vidrio permiten la nucleación heterogénea de los cristales, por lo que su formación se verá disminuida si los vidrios embebidos en el polímero no se encuentran expuestos a medio.

Se realizó un estudio de la composición de la superficie mediante EDS, en donde se midió que la razón Ca/P para los compósitos PDLLA/mBG58s y PDLLA/mBGCo4 son de 1,47 y 1,71 respectivamente. Se observaron mayores cantidades de oxígeno en las mediciones, con respecto a los vidrios solos, debido a los grupos éster presentes en la cadena de los polímeros que conforman el compósito. Se puede observar en la Figura 33 que hay medición de elementos Si, P y Ca en zonas donde no parece haber partículas expuestas. A pesar de que el haz de electrones es capaz de penetrar la superficie al realizar la medición, aunque se encontrase con partículas de vidrios, las razones Ca/P no corresponden a estos biovidrios, los cuales presentan valores mayores a 3. Las mediciones realizadas presentan valores que corresponden a apatita amorfa, por lo que es necesario realizar un estudio a mayores magnificaciones.



**Figura 33.** Análisis de composición de la superficie del compuesto PDLLA/mBG58s mediante EDS.

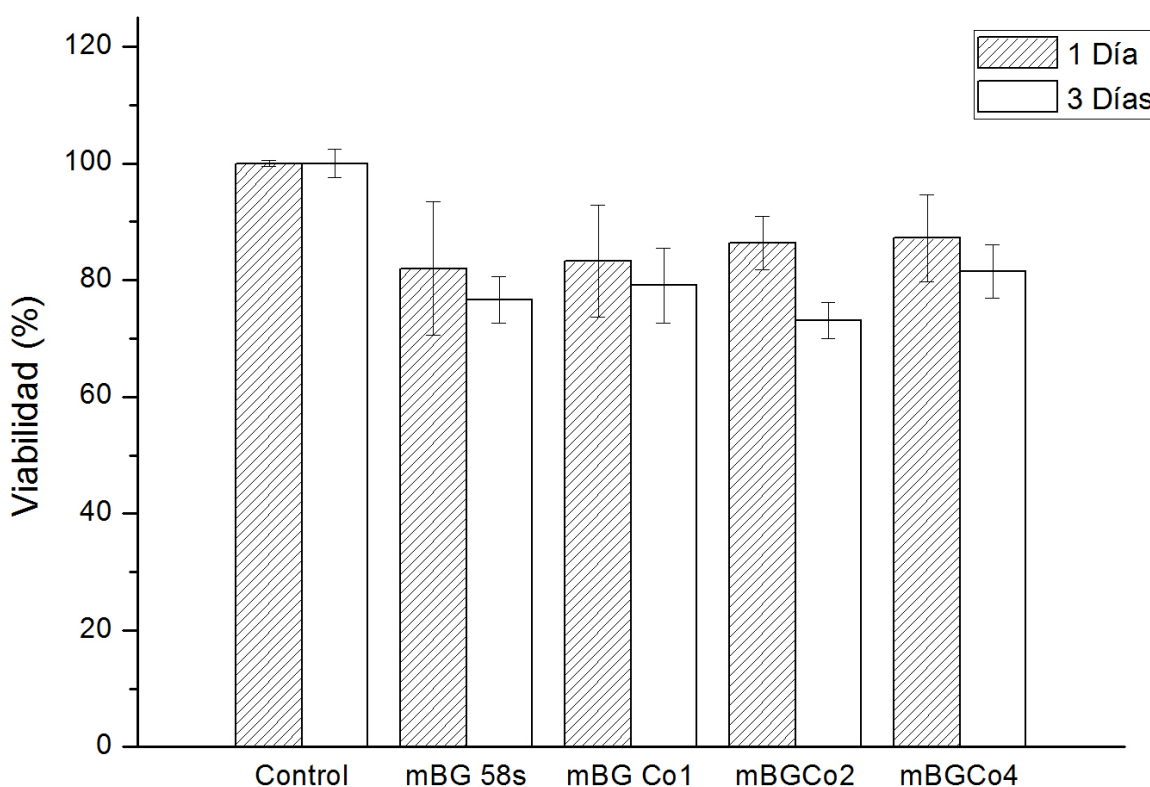


## 5.4 Ensayos biológicos

Se realizaron distintos experimentos para evaluar el potencial uso de los cerámicos y de los compósitos en el ámbito de la ingeniería de tejidos. Específicamente se realizó un ensayo de citocompatibilidad para estudiar cómo afectan los materiales a la viabilidad celular y distintos ensayos de migración, que pueden dar indicios si potencialmente el material posee propiedades angiogénicas.

### 5.4.1 Citocompatibilidad

Se utilizó el protocolo descrito en la metodología para estudiar la citocompatibilidad de los vidrios sintetizados por el método 1 y 2. Se evaluó los efectos de los materiales sintetizados en células SaOS-2 a 1 y 3 días de exposición.

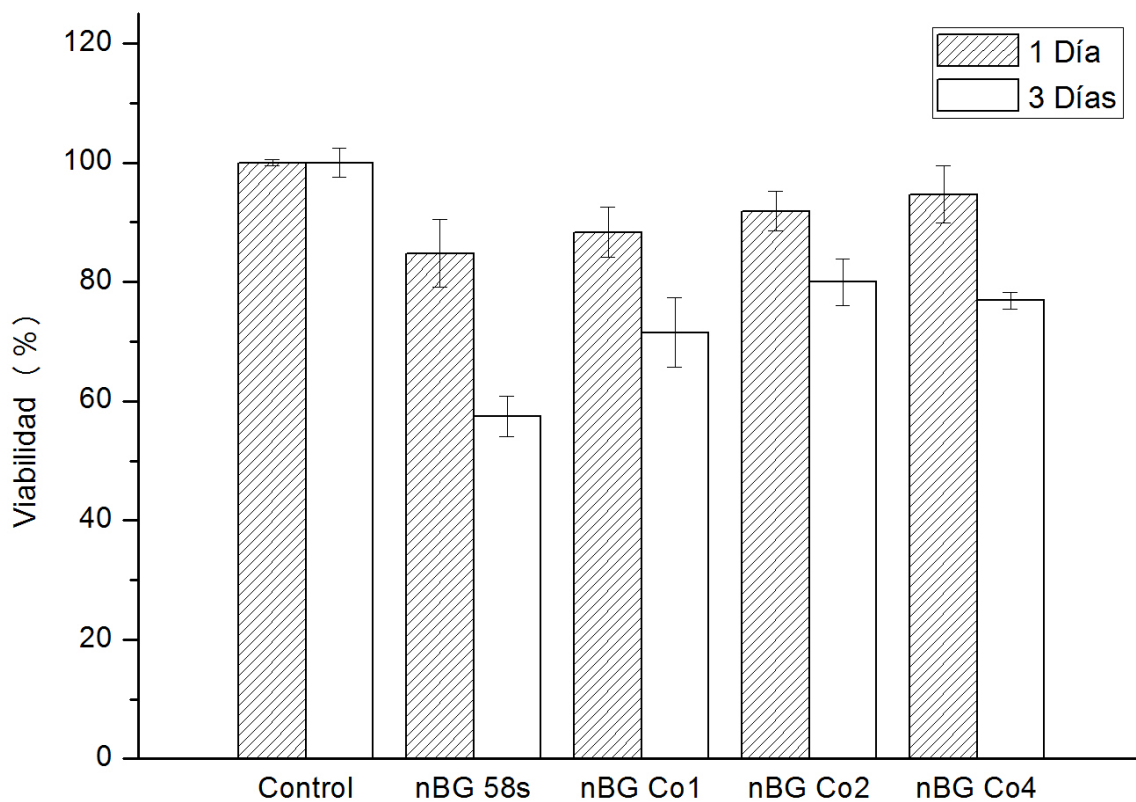


**Figura 34.** Ensayo de MTT para evaluar la citocompatibilidad de los vidrios sintetizados por el método 1 en células SaOS-2.

La Figura 34 muestra los resultados para los vidrios sintetizados por el método 1, donde se puede apreciar que la viabilidad no disminuye considerablemente a medida que aumenta el porcentaje de cobalto en el

vidrio o a medida que aumenta el tiempo de exposición. Recordemos que el cambio de pH que produjeron estos vidrios durante el ensayo de bioactividad a tiempos tempranos no fue drástico, mientras que solo para los vidrios con 2 y 4%mol cobalto después de 3 días de inmersión el pH se alcalinizó hasta alcanzar valores mayores a 8. De este modo se explica por qué el vidrio mBGCo2 presentó la menor viabilidad, pero no así con el mBGCo4.

Del mismo modo, se realizó el ensayo utilizando los vidrios sintetizados por el método 2, en donde se encontraron mayores diferencias a medida que el tiempo de exposición aumentaba.



**Figura 35.** Citocompatibilidad de los vidrios sintetizados por el método 2.

En la Figura 35 se puede observar que a diferencia de los otros materiales, acá hay una disminución significativa pasado los 3 días de exposición. Se vio que el vidrio nBG58s causa un aumento drástico en el pH del medio, cercano a 8,6 a los 3 días de inmersión, lo que produce una disminución de la viabilidad al crear un ambiente nocivo para las células. Los otros 3 vidrios no produjeron un cambio en el pH mayor a 8 al realizar el ensayo de bioactividad, aun así, presentaron menores viabilidades en comparación con los microvidrios. Esto puede explicarse por cómo se llevó a cabo el experimento.



Todos los materiales se resuspendieron en medio de cultivo para luego ser colocados sobre la monocapa de células a estudiar. Con los microvidrios se obtuvieron mezclas bien dispersas, de modo que los materiales se encontraban bien distribuidos en los pocillos con células. En cambio, los nanovidrios presentaron una fase que precipitaba rápidamente al resuspender las partículas en medio, debido a aglomerados de mayor tamaño que se podían ver a simple vista. Estos aglomerados no se observan en las imágenes SEM debido a que los materiales se sonicaban en etanol para dispersar las partículas y se extraían soluciones para estudiar en microscopía, descartándose los precipitados, que correspondían a estas estructuras de mayor tamaño.

De este modo, al colocarse en los pocillos, el material no se dispersó homogéneamente, lo que pudo perturbar de manera local a las células que se encontraban en zonas con aglomerados, disminuyendo la viabilidad de estas células. Rocha et al.[93] estudió los efectos en distintos ensayos biológicos para las micro y nanopartículas de un vidrio ternario similar al estudiado en este trabajo, donde las nanopartículas presentaron mayores viabilidades y actividades, a partir de medición de fosfatasa alcalina, en osteoblastos. Ambos materiales presentaron viabilidades mayores a la del control, pero en este estudio utilizaron una cantidad de material de 1 mg/ml por ensayo, que corresponde a una concentración 10 veces menor al realizado en este ensayo. Hoppe et al.[94] estudió como afecta la concentración de vidrio en un rango de 0-1mg/ml para distintos ensayos biológicos en osteoblastos MG63, utilizando vidrios BG1393 (41,2% SiO<sub>2</sub>, 5,1% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 36,1% CaO, 7,1% Na<sub>2</sub>O, 3,3% MgO y 7,2% K<sub>2</sub>O) dopados con cobalto al 1 y 5% reemplazando al calcio en la composición. En la aplicación directa de los polvos durante 2 días, concluyó que este vidrio BG1393 y su versión dopada al 1% con cobalto no disminuían ni la actividad mitocondrial ni el número de células dentro del rango 0-1 mg/ml, mientras que para el vidrio con 5% de cobalto el número de células disminuyó constantemente a medida que se aumentaba la concentración de vidrio hasta llegar a un 55% de viabilidad al utilizar 1 mg/ml de vidrio. En esta tesis se utilizaron los polvos de manera directa, al igual que en el trabajo de Hoppe, pero en concentraciones de 10 mg/ml y no se observa una drástica disminución de la viabilidad a medida que aumenta la cantidad de cobalto incorporado de 0 a 4%mol, poniendo en duda un efecto citotóxico por parte del cobalto.

Por otra parte, Kargozar et al.[95] estudió el vidrio BG1393 dopado con 0,5% de cobalto en células HUCPVC. Su vidrio demostró una capacidad alcalinizadora similar a la de los vidrios mBGCo2 y mBGCo4, que al ser utilizado en una concentración de 4 mg/ml de medio,

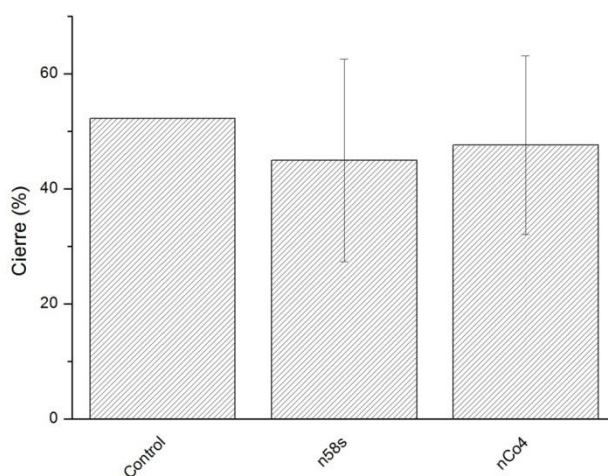
alcalinizó el medio a un valor ph de 8 a las 24 y 48 horas. Sus ensayos de citocompatibilidad resultaron en una disminución de 20% de la viabilidad al exponer las células durante 1, 3 y 7 días, mientras que los vidrios mBGCo2 y mBGCo4 presentaron resultados similares solo después de 3 días y con mayores cantidades de cobalto incorporado en sus estructuras.

Considerando todos estos antecedentes se concluye los iones cobalto liberados por todos los vidrios estudiados no alcanzan concentraciones que produzcan citotoxicidad en las células SaOS-2, por lo que se estima que la disminución de la viabilidad se debe solo al aumento de pH del medio de cultivo, producto de la capacidad alcalinizadora de los vidrios, ya sean sintetizados por el método 1 o 2.

## **5.4.2 Migración**

### **5.4.2.1 Ensayos preliminares de ensayos de migración**

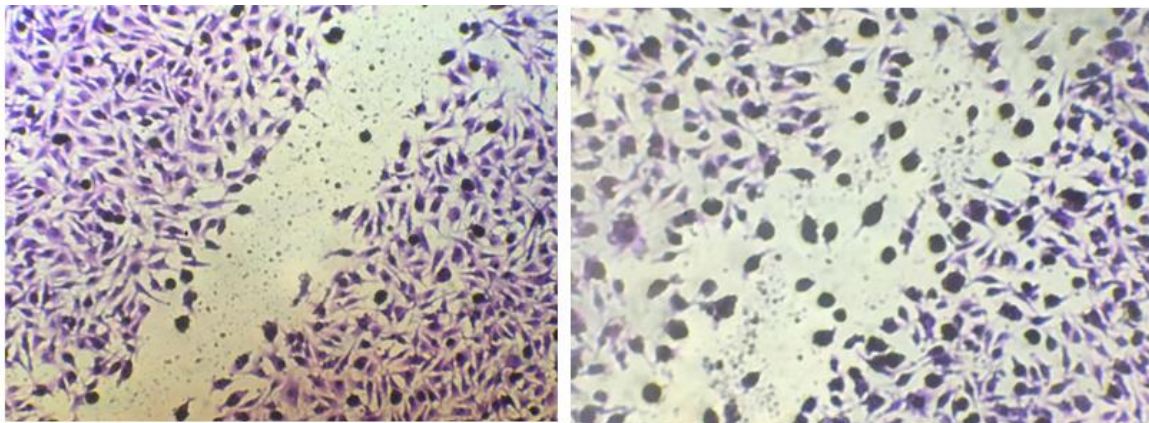
Inicialmente se decidió realizar los primeros experimentos de migración enfocados en estudiar los vidrios nBG58s y nBGCo4, dado que este último tiene mayor área superficial, mayor cantidad de cobalto y no se contaba con los resultados de liberación. Se esperaba que este vidrio liberase la mayor cantidad de cobalto, con tal de ver efectos terapéuticos de este ión, específicamente, un mayor cierre de las heridas realizadas en las monocapas celulares Ea.HY.



**Figura 36.** Ensayo de migración con células expuestas a las partículas de vidrio.

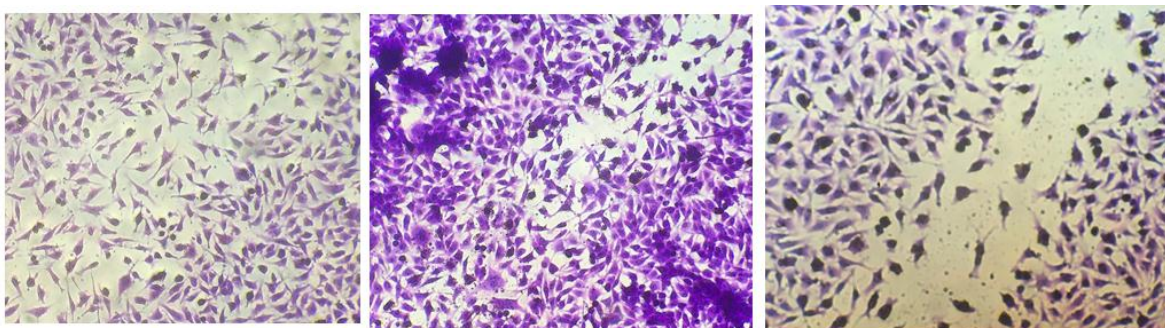
El primer acercamiento consistió en lavar los vidrios durante la noche utilizando PBS, con el fin de disminuir la capacidad alcalinizadora

de estos y resuspenderlos en medio de cultivo para luego ser aplicados directamente en las células. A pesar de que en los primeros ensayos observaron mayores cierres para el vidrio con cobalto en comparación con el control y el vidrio nBG58s, los resultados no fueron replicables, presentándose grandes diferencias de cierre de las heridas entre experimentos (Figura 36).



**Figura 37.** Ensayos de herida aplicando directamente polvos de nBGCo4 mostrando la alta variabilidad de los ensayos.

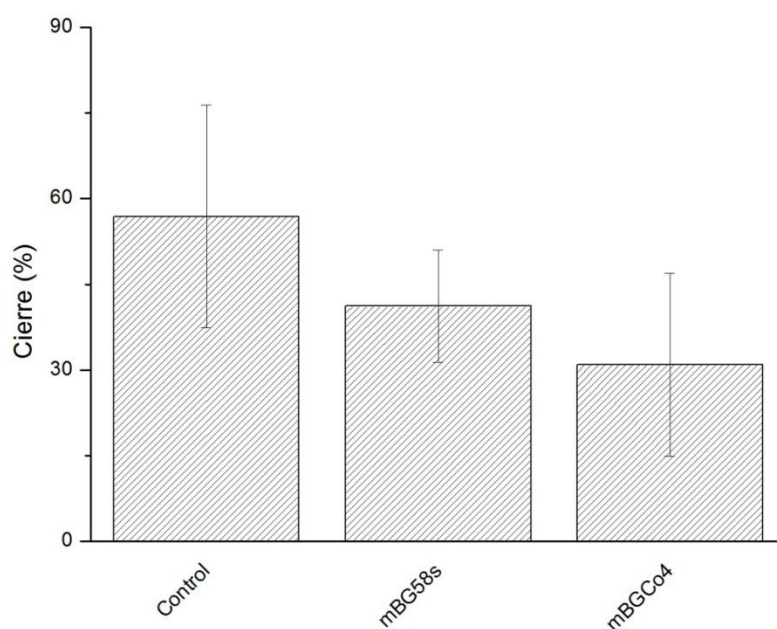
Como se puede observar en la Figura 37, el vidrio nBGCo4 presentó alta variabilidad en los cierres a medida que se repetían los ensayos. En el caso del vidrio nBG58s, se puede observar en la Figura 38 que en algunos ensayos se alcanzó el cierre total pasada las 16 horas mientras que en otras repeticiones el cierre fue bastante menor.



**Figura 38.** Ensayo de herida aplicando directamente polvos de nBG58s mostrando la alta variabilidad de los ensayos.

Se dedujo que la variabilidad de los resultados podría ser debido al contacto de los vidrios con las células, perturbando la migración. Se decidió realizar los ensayos de migración utilizando los productos de disolución de los vidrios en medio de cultivo DMEM. Junto a esto, se obtuvieron las curvas de liberación de iones de los ensayos de

bioactividad, por lo que se decidió cambiar los materiales a estudiar. Se estudió el vidrio mBG58s y mBGCo4, que eran capaces de formar suspensiones fáciles de manejar debido al menor tamaño de partículas producto del proceso de tamizado por el que pasan durante su síntesis y como vimos en la sección "Liberación de cobalto y cambio de pH" presentaron un mejor comportamiento, con una tasa de liberación y cambio de pH predecibles. Se procedió a lavar los vidrios durante la noche para posteriormente separarlos y resuspenderlos en DMEM durante 24 horas. Durand et al.[96] utilizó un protocolo similar al estudiar los efectos de vidrios cuaternarios dopados con boro, ión con efectos óseo y angiogénicos, en células endoteliales HUVEC, donde demostró que la incorporación de este elemento en un 2% en peso promueve la migración celular y la expresión de proteínas relacionadas con este fenómeno a las 8 horas de exposición a los productos de disolución.

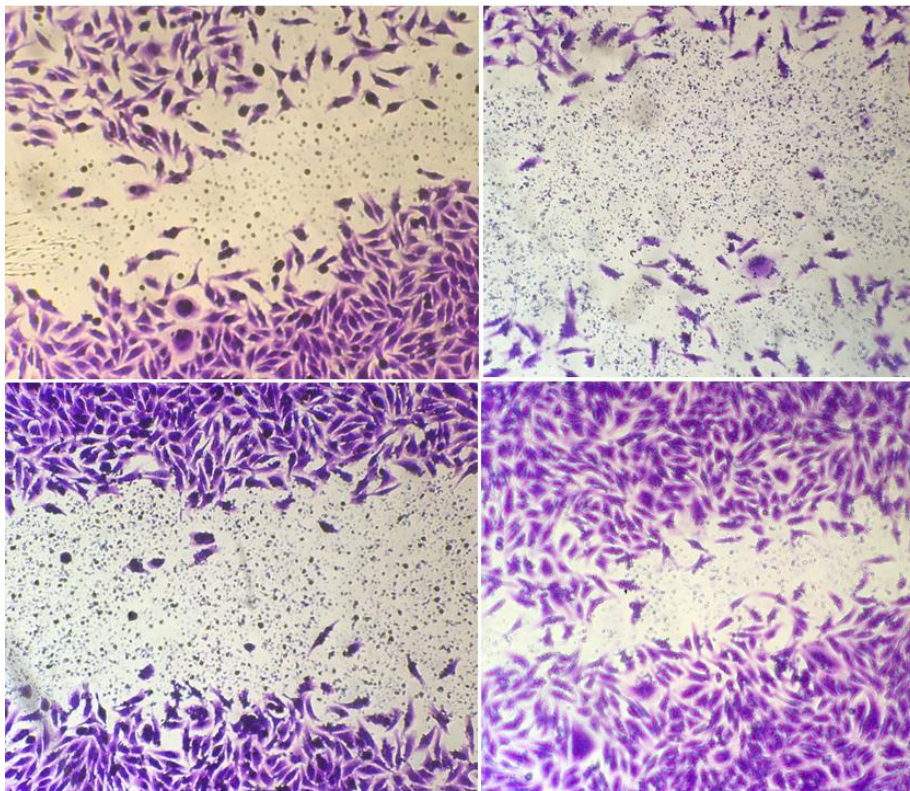


**Figura 39.** Ensayo de migración con células expuestas a los productos de disolución de los microvidrios, disueltos durante 24 horas.

Pero al igual que para los intentos anteriores, los experimentos no fueron reproducibles, presentándose variaciones no solo en las mediciones de los cierres por parte de las células expuestas a los productos de disolución de los vidrios sino también para el control, tal como se presenta en la Figura 39. Durante las iteraciones de este procedimiento se identificó que las soluciones se volvían alcalinas, presentando valores de pH sobre 8, impactando negativamente sobre el



comportamiento de las células. La Figura 40 presenta imágenes de los cierres para las células expuestas al vidrio mBGCo4 para varios experimentos, en donde se observa que en algunas instancias, el cierre de la herida fue muy bajo, en otras las células se desprendieron del sustrato en el cual estaban adheridas y en algunos casos estas presentaron un cierre considerable. Aina et al.[97] estudió el efecto que tienen los biovidrios en células endoteliales BAE-1, concluyendo que el cambio brusco en el pH del medio afecta negativamente este tipo de células, disminuyendo la adhesión y dispersión celular, mientras que la incorporación de iones en la estructura que disminuyen la reactividad de estos permiten mitigar estos efectos negativos.



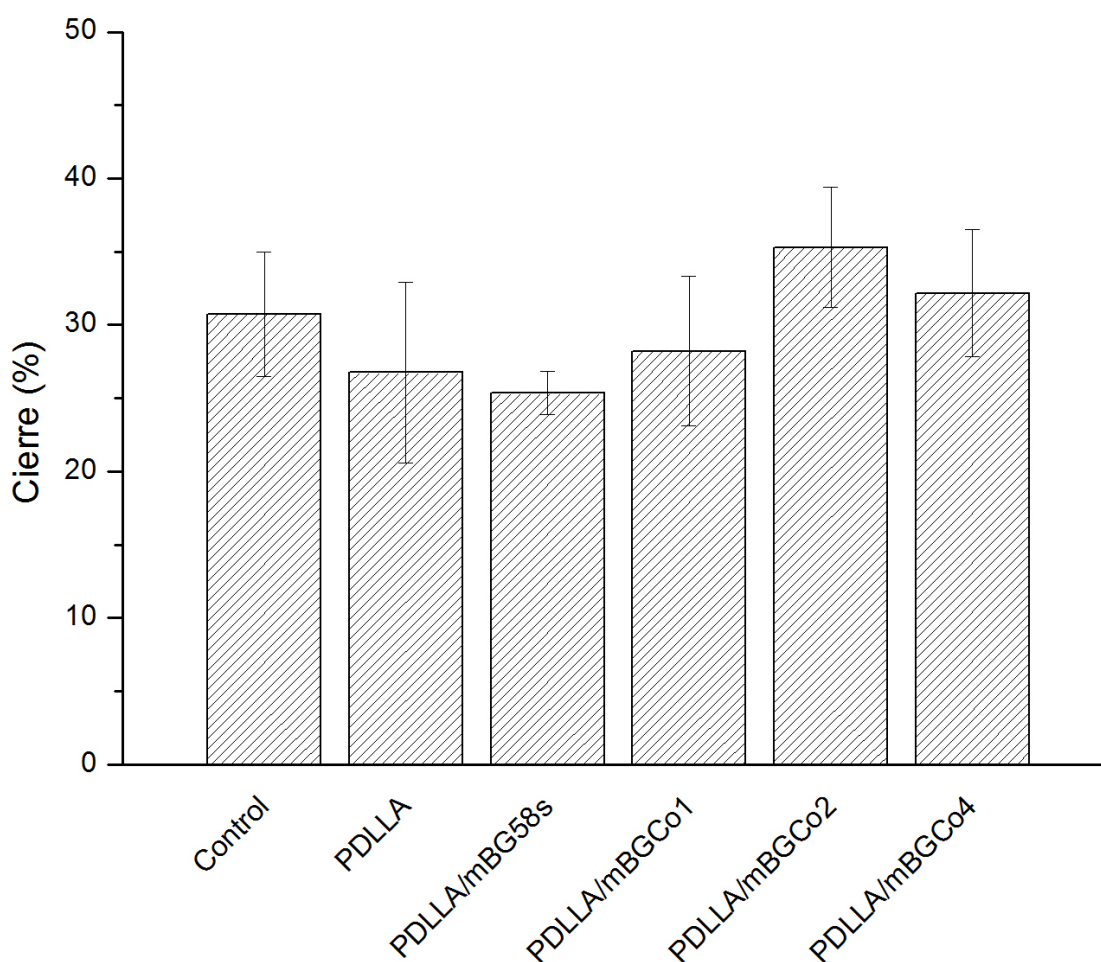
**Figura 40.** Variaciones en el cierre de herida para las células expuestas a los productos de disolución del vidrio mBGCo4.

Para mitigar los efectos alcalinizadores de los vidrios se titularon los medios obtenidos con tal de que se encontrasen en valores de pH cercanos a 7,4 y se repitieron los experimentos con tal de excluir el efecto del pH básico en la migración celular, pero luego de las 16 horas de exposición se observó un viraje del pH muy brusco, principalmente hacia valores ácidos, en donde no se pudo determinar la razón de esto.

Se concluyó que para este tipo de ensayos, el efecto alcalinizador de los vidrios no permite evaluar los efectos terapéuticos que tiene el cobalto.

#### 5.4.2.2 Ensayo de migración en compósitos

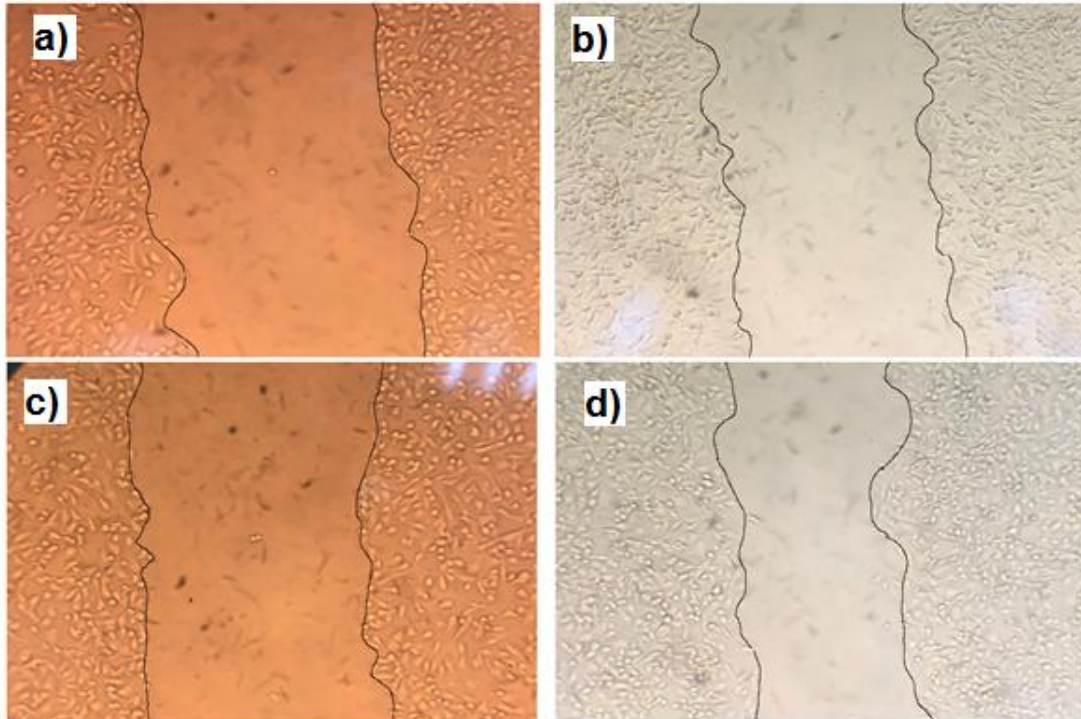
Una manera de mitigar el efecto alcalinizador es incorporando los materiales a estudiar en una matriz polimérica de PDLLA, en donde se utilizaron discos de 6mm del compósito para realizar el mismo ensayo de herida obteniéndose resultados más consistentes. Estos ensayos se realizaron colocando estos discos en pocillos de 15,6 mm de diámetro con una monocapa de células Ea.HY.



**Figura 41.** Ensayo de migración con células expuestas a los compósitos de PDLLA y microvidrios.

La Figura 41 presenta los resultados de los cierres de herida en donde se observó un menor cierre para el vidrio ternario en comparación con sus versiones dopadas con cobalto. En esta iteración solo se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el

vidrio sin dopar y su versión dopada con un 2%mol de cobalto, mientras que para las versiones con 1 y 4%mol de cobalto, si bien presentaron una mayor tendencia a cerrar no se puede concluir que presentan una mejora producto de la incorporación de cobalto.



**Figura 42.** Ensayo de migración utilizando a) y b) PDLLA/mBG58s, antes y después de 16 horas de exposición y c) y d) PDLLA/mBGCo4, antes y después del mismo intervalo.

En la Figura 42 se puede observar la diferencia en la migración por parte de las células Ea.HY al evaluar los efectos de los compósitos de PDLLA con los vidrios mBG58s y mBGCo4, donde este último presentó mayores cierres después de 16 horas de exposición. Si bien es difícil atribuir esta mejora a la liberación de iones por parte de los compósitos, ya que previamente se discutió como estos no presentaban una exposición de partículas de vidrio en sus superficies que permitiesen una liberación considerable de iones hacia el medio, se descarta que esta diferencia se deba a efectos del pH sobre las células, dado que en la Figura 30 se observa que el cambio de pH es similar para todos los compósitos y el valor de este se puede estimar cercano al pH fisiológico a tiempos tempranos.

En la Figura 41 se puede observar que el mayor cierre lo presentó el compósito con el vidrio mBGCo2, seguido por el mBGCo4, mBGCo1 y mBG58s. Este mismo orden se observa en la Figura 15 al momento de estudiar las liberaciones de cobalto en SBF a 1 día de inmersión en un medio. Si bien, las cantidades liberadas por los vidrios a 1 día son

bastante bajas (menores a 0,5 ppm) y la matriz polimérica actúa como una barrera a la difusión de iones hacia el medio, es posible que estas bajas concentraciones permitan un efecto promigratorio de manera local, afectando a las células cercanas a la pastilla utilizada en el ensayo. Se discutió anteriormente que Steinbrech et al.[80] reportó efectos promigratorios y expresión de VEGF al utilizar concentraciones de 0,1 ppm de cobalto en el medio.

Para corroborar que estas bajas concentraciones producen una respuesta biológica que se traduzca en mayores migraciones es necesario realizar mediciones de las proteínas asociadas a este fenómeno, como VEGF o HIF-1. Esto queda propuesto para trabajos futuros.



## CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

Se logró sintetizar vidrios ternarios dopados al 1, 2 y 4%mol de cobalto mediante dos métodos sol-gel, utilizando una síntesis *top-down* y una síntesis *bottom-up*. El primer método permitió obtener materiales con características homogéneas, tanto en tamaño de partículas, áreas superficiales y propiedades de liberación acorde al porcentaje de dopado gracias al rol de óxido intermediario del cobalto, mientras que con el segundo método se obtuvieron materiales con un tamaño de aglomerados de partículas mayores, un aumento del área superficial a medida que aumenta la cantidad de cobalto incorporado, una mayor rugosidad a un nivel nanométrico, pero a expensas de una mayor estabilidad del vidrio producto del cobalto actuando como modificador de red, traducándose en materiales menos reactivos al dopar con más de 2%mol. Todos los vidrios formaron una capa de apatita al ser sumergidos en SBF durante 7 días.

La incorporación de cobalto en todos los vidrios produjo una disminución en la capacidad de formar una capa de hidroxiapatita por parte de los vidrios. En los vidrios del método 1 se observó que esta inhibición es proporcional al cobalto incorporado, debido a las interacciones de los iones  $\text{Co}^{2+}$  liberados con los fosfatos del medio, mientras que para los vidrios del método 2 esta inhibición se debe a la menor degradación de la red. En ensayo MTT, los materiales del método 1 presentaron viabilidades cercanas al 80% con respecto al control después de 1 y 3 días de exposición, mientras que los materiales del método 2 presentaron menores valores a los 3 días, asociado a su mayor área específica, mayor liberación de calcio y una mala dispersión de los vidrios sobre los cultivos celulares.

El efecto alcalinizador de los vidrios tuvo efectos negativos en los ensayos de migración celular. La incorporación de microvidrios en matrices poliméricas de PDLLA en un 10% p/p mitigó los efectos en el cambio de pH, observándose un mayor cierre para el compósito con vidrio mBGCo2 con respecto al compósito con vidrio ternario. Se realizaron ensayos de bioactividad con los compósitos a 14 y 28 días. Los difractogramas e imágenes SEM indican que no hubo una formación de hidroxiapatita, pero EDS presentó una razón Ca/P relacionada a esta. Dado el potencial uso de estos biomateriales en regeneración de tejidos se sugiere realizar estudios utilizando scaffolds en vez de estructuras

sólidas y evaluar expresión de proteínas acordes al fenómeno de angiogénesis.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] O. Johnell, "The socioeconomic burden of fractures: today and in the 21st century," *Am J Med*, vol. 103, pp. 20–25, 1997.
- [2] M. Navarro, a Michiardi, O. Castaño, and J. a Planell, "Biomaterials in orthopaedics.," *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137–1158, Oct. 2008.
- [3] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: from Hench to hybrids.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4457–86, Jan. 2013.
- [4] V. Mourin, J. P. Cattalini, and A. R. Boccaccini, "Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments," *J. R. Soc. Interface*, no. December 2011, pp. 401–419, 2012.
- [5] D. Buck and G. Dumanian, "Bone Biology and Physiology: Part II. Clinical Correlates.," *Plast Reconstr Surg*, vol. 129, no. 6, p. 950e–956e, 2012.
- [6] M. S. Kamath, S. S. S. J. Ahmed, M. Dhanasekaran, and S. W. Santosh, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 183–95, 2014.
- [7] P. Pietschmann, *Principles of osteoimmunology*, Second Edi. 2016.
- [8] M. Flemming, "The Skeletal System," 2013.
- [9] C. Campusano, "Fisiología Ósea." .
- [10] C. Aparicio and M.-P. Ginebra, Eds., *Biomineralization and Biomaterials*. 2016.
- [11] M. S. Kamath, S. S. S. J. Ahmed, M. Dhanasekaran, and S. W. Santosh, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 183–95, 2014.
- [12] S. J. Lee and A. Atala, *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*. Elsevier Ltd, 2014.
- [13] M. M. Stevens, "Biomaterials for bone tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 11, no. 5, pp. 18–25, 2008.

- [14] P. V. Giannoudis, T. A. Einhorn, and D. Marsh, "Fracture healing: The diamond concept," *Injury*, vol. 38, no. 4 SUPPL., pp. 3–6, 2007.
- [15] D. Mohamad Yunos, O. Bretcanu, and A. R. Boccaccini, "Polymer-bioceramic composites for tissue engineering scaffolds," *J. Mater. Sci.*, vol. 43, no. 13, pp. 4433–4442, Apr. 2008.
- [16] M. Wang, "Developing bioactive composite materials for tissue replacement," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2133–2151, Jun. 2003.
- [17] T. Kokubo, H.-M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161–2175, Jun. 2003.
- [18] Y. Liu, J. Lim, and S. H. Teoh, "Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 5, pp. 688–705, 2013.
- [19] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 79–83, Mar. 1992.
- [20] T. Kokubo, "Formation of biologically active bone-like apatite on metals and polymers by a biomimetic process," *Thermochim. Acta*, vol. 280–281, pp. 479–490, Jul. 1996.
- [21] T. Kokubo, "Surface Chemistry of Bioactive Glass-Ceramics," *J. Non-Crystalline Solids*, vol. 120, pp. 138–151, 1990.
- [22] L. L. Hench, "Life and death: the ultimate phase transformation," *Thermochim. Acta*, vol. 280/281, pp. 1–13, 1996.
- [23] E. K. F. Yim, E. M. Darling, K. Kulangara, F. Guilak, and K. W. Leong, "Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 31, no. 6, pp. 1299–306, Feb. 2010.
- [24] J. Kim, H. N. Kim, K. T. Lim, Y. Kim, S. Pandey, P. Garg, Y. H. Choung, P. H. Choung, K. Y. Suh, and J. H. Chung, "Synergistic effects of nanotopography and co-culture with endothelial cells on osteogenesis of mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 34, no. 30, pp. 7257–7268, 2013.

- [25] H. Wang, D. Ph, S. C. G. Leeuwenburgh, P. D. Y. Li, D. Ph, J. A. Jansen, and D. Ph, "The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration," vol. 18, no. 1, pp. 24–39, 2012.
- [26] Y. Li, Q. Hu, G. Miao, Q. Zhang, B. Yuan, Y. Zhu, X. Fu, X. Chen, and C. Mao, "Size-Dependent Mechanism of Intracellular Localization," vol. 12, no. 5, pp. 863–877, 2016.
- [27] M. Tavakoli, E. Bateni, M. Rismanchian, M. Fathi, A. Doostmohammadi, and A. Rabiei, "Genotoxicity effects of nano bioactive glass and Novabone bioglass on gingival fibroblasts using single cell gel electrophoresis ( comet assay ): An in vitro study," vol. 9, no. 3, pp. 314–320, 2012.
- [28] S. Nosouhian, M. Razavi, N. Jafari, and M. Rismanchian, "Comparative evaluation of hydroxyapatite and nano - bioglass in two forms of conventional micro - and nano - particles in repairing bone defects ( an animal study )," pp. 366–371, 2015.
- [29] S. K. Misra, D. Mohn, T. J. Brunner, W. J. Stark, S. E. Philip, I. Roy, V. Salih, J. C. Knowles, and A. R. Boccaccini, "Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass?? composites," *Biomaterials*, vol. 29, no. 12, pp. 1750–1761, 2008.
- [30] M. Alves, D. Zea, S. G. Caridade, E. G. Merino, and A. R. Boccaccini, "Chitosan membranes containing micro or nano-size bioactive glass particles : evolution of biomineralization followed by in situ dynamic mechanical analysis," vol. 20, pp. 173–183, 2013.
- [31] H. Palza, R. Quijada, and K. Delgado, "Antimicrobial polymer composites with copper micro-and nanoparticles: Effect of particle size and polymer matrix," *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 30, no. 4, pp. 366–380, 2015.
- [32] J. Bejarano, P. Caviedes, and H. Palza, "Sol-gel synthesis and in vitro bioactivity of copper and zinc-doped silicate bioactive glasses and glass-ceramics," *Biomed. Mater.*, vol. 10, no. 2, p. 25001, 2015.
- [33] W. Fan, R. Crawford, and Y. Xiao, "Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 13, pp. 3580–9, May 2010.

- [34] R. Buttyan, P. Chichester, B. Stisser, S. Matsumoto, M. Ghafar, and R. Levin, "Acute Intravesical Infusion of a Cobalt Solution Stimulates a Hypoxia Response, Growth and Angiogenesis in the Rat Bladder," *J. Urol.*, vol. 169, no. 6, pp. 2402–2406, 2003.
- [35] J. K. Leach, D. Kaigler, Z. Wang, P. H. Krebsbach, and D. J. Mooney, "Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration.," *Biomaterials*, vol. 27, no. 17, pp. 3249–55, Jun. 2006.
- [36] A. Hoppe, B. Jokic, D. Janackovic, T. Fey, P. Greil, S. Romeis, J. Schmidt, W. Peukert, J. Lao, E. Jallot, and A. R. Boccaccini, "Cobalt-Releasing 1393 Bioactive Glass-Derived Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 4, pp. 2865–2877, 2014.
- [37] M. M. Azevedo, G. Jell, M. D. O'Donnell, R. V. Law, R. G. Hill, and M. M. Stevens, "Synthesis and characterization of hypoxia-mimicking bioactive glasses for skeletal regeneration," *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 40, p. 8854, 2010.
- [38] C. Wu, Y. Zhou, W. Fan, P. Han, J. Chang, J. Yuen, M. Zhang, and Y. Xiao, "Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, pp. 2076–2085, 2012.
- [39] B. a. Allo, D. O. Costa, S. J. Dixon, K. Mequanint, and A. S. Rizkalla, "Bioactive and Biodegradable Nanocomposites and Hybrid Biomaterials for Bone Regeneration," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 2, pp. 432–463, Jun. 2012.
- [40] I. H. Marshall, "An Introduction to Composite Materials," *Journal of Mechanical Working Technology*, vol. 7, no. 3. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 298–299, 1983.
- [41] L. L. Hench, N. Roki, and M. B. Fenn, "Bioactive glasses: Importance of structure and properties in bone regeneration," *J. Mol. Struct.*, vol. 1073, pp. 24–30, Apr. 2014.
- [42] Z. Hong, R. L. Reis, and J. F. Mano, "Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles.," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 5, pp. 1297–306, Sep. 2008.
- [43] C. Luo, L. Li, J. Li, G. Yang, S. Ding, W. Zhi, J. Weng, and S. Zhou, "Modulating cellular behaviors through surface nanoroughness," *J.*

*Mater. Chem.*, vol. 22, p. 15654, 2012.

- [44] I. V. Antoniac, *Handbook of bioceramics and biocomposites*. 2016.
- [45] R. L. Simpson, S. N. Nazhat, J. J. Blaker, A. Bismarck, R. Hill, A. R. Boccaccini, U. N. Hansen, and A. A. Amis, "A comparative study of the effects of different bioactive fillers in PLGA matrix composites and their suitability as bone substitute materials: A thermo-mechanical and in vitro investigation," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 50, pp. 277–289, 2015.
- [46] V. Maquet, a R. Boccaccini, L. Pravata, I. Notingher, and R. Jerome, "Porous poly(alpha-hydroxyacid)/Bioglass (R) composite scaffolds for bone tissue engineering. I: preparation and in vitro characterisation," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4185–4194, Aug. 2004.
- [47] J. J. Blaker, S. N. Nazhat, V. Maquet, and a R. Boccaccini, "Long-term in vitro degradation of PDLLA/Bioglass?? bone scaffolds in acellular simulated body fluid," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 2, pp. 829–840, Feb. 2011.
- [48] J. J. Blaker, V. Maquet, R. Jerome, a R. Boccaccini, and S. N. Nazhat, "Mechanical properties of highly porous PDLLA/Bioglass (R) composite foams as scaffolds for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 1, no. 6, pp. 643–652, Nov. 2005.
- [49] L. Ji, W. Wang, D. Jin, S. Zhou, and X. Song, "In vitro bioactivity and mechanical properties of bioactive glass nanoparticles/polycaprolactone composites.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 46, pp. 1–9, Jan. 2015.
- [50] Z. Hong, R. L. Reis, and J. F. Mano, "Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 88, no. 2, pp. 304–13, Feb. 2009.
- [51] M. Dziadek, J. Pawlik, E. Menaszek, E. Stodolak-zych, and K. Cholewa-kowalska, "Effect of the preparation methods on architecture , crystallinity , hydrolytic degradation , bioactivity , and biocompatibility of PCL / bioglass composite scaffolds," pp. 1–14, 2014.
- [52] E. Tamjid, R. Bagheri, M. Vossoughi, and A. Simchi, "Effect of particle size on the in vitro bioactivity , hydrophilicity and mechanical properties of bioactive glass-reinforced polycaprolactone composites," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 31, no. 7,

pp. 1526–1533, 2011.

- [53] V. Maquet, A. R. Boccaccini, L. Pravata, I. Notingher, and R. Je, "Preparation , characterization , and in vitro degradation of bioresorbable and bioactive composites based on Bioglass □ -filled polylactide foams," 2002.
- [54] Y. Gao and J. Chang, "Surface Modification of Bioactive Glasses and Preparation of PDLLA/Bioactive Glass Composite Films," 2009.
- [55] S. Verrier, J. J. Blaker, V. Maquet, L. L. Hench, and A. R. Boccaccini, "PDLLA / Bioglass s composites for soft-tissue and hard-tissue engineering : an in vitro cell biology assessment," vol. 25, pp. 3013–3021, 2004.
- [56] R. L. Reis, J. A. Jansen, X. F. Walboomers, and J. F. Mano, "Asymmetric PDLLA membranes containing Bioglass ® for guided tissue regeneration : Characterization and in vitro biological behavior," vol. 9, pp. 427–436, 2013.
- [57] W. Lu, K. Ji, J. Kirkham, Y. Yan, A. R. Boccaccini, M. Kellett, and Y. Jin, "Bone tissue engineering by using a combination of polymer / Bioglass composites with human adipose-derived stem cells," 2014.
- [58] E. Quinlan, S. Partap, M. M. Azevedo, G. Jell, M. M. Stevens, and F. J. O'Brien, "Hypoxia-mimicking bioactive glass/collagen glycosaminoglycan composite scaffolds to enhance angiogenesis and bone repair," *Biomaterials*, vol. 52, no. 1, pp. 358–366, 2015.
- [59] X. Yu, C. Lu, H. Liu, S. Rao, J. Cai, S. Liu, A. J. Kriegel, A. S. Greene, M. Liang, and X. Ding, "Hypoxic Preconditioning with Cobalt of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Cell Migration and Enhances Therapy for Treatment of Ischemic Acute Kidney Injury," vol. 8, no. 5, 2013.
- [60] L. Lamalice, F. Le Beouf, and J. Huot, "Endothelial Cell Migration During Angiogenesis," 2007.
- [61] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–15, May 2006.
- [62] D. Arcos and M. Vallet-regí, "Sol – gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 6, pp. 2874–2888, 2010.



- [63] V. K. Vyas, A. Sampath Kumar, S. P. Singh, and R. Pyare, "Effect of Cobalt Oxide Substitution on Mechanical Behaviour and Elastic Properties of Bioactive Glass and Glass-Ceramics," *Trans. Indian Ceram. Soc.*, vol. 75, no. 1, pp. 12–19, 2016.
- [64] A. Boccaccini, D. Brauer, and L. Hupa, Eds., *Bioactive Glasses, Fundamentals, Technology and Applications*. RSC Smart Materials.
- [65] C.-J. Shih, P.-S. Lu, C.-H. Hsieh, W.-C. Chen, and J.-C. Chen, "Effects of bioglass powders with and without mesoporous structures on fibroblast and osteoblast responses," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 314, pp. 967–972, Sep. 2014.
- [66] S. Jebahi, H. Oudadesse, N. Jardak, I. Khayat, H. Keskes, a Khabir, T. Rebai, H. El Feki, and a El Feki, "Biological therapy of strontium-substituted bioglass for soft tissue wound-healing: responses to oxidative stress in ovariectomised rats.," *Ann. Pharm. françaises*, vol. 71, no. 4, pp. 234–42, Jul. 2013.
- [67] J. H. Jo, E. J. Lee, D. S. Shin, H. E. Kim, H. W. Kim, Y. H. Koh, and J. H. Jang, "In vitro/in vivo biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly(e-caprolactone) composite materials," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 91, no. 1, pp. 213–220, 2009.
- [68] S. Midha, T. B. Kim, W. van den Bergh, P. D. Lee, J. R. Jones, and C. a Mitchell, "Preconditioned 70S30C bioactive glass foams promote osteogenesis in vivo.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 11, pp. 9169–82, Nov. 2013.
- [69] L. Bi, S. Jung, D. Day, K. Neidig, V. Dusevich, D. Eick, and L. Bonewald, "Evaluation of bone regeneration , angiogenesis , and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds," pp. 1–9, 2012.
- [70] M. Mačković, a Hoppe, R. Detsch, D. Mohn, W. J. Stark, E. Spiecker, and a R. Boccaccini, "Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: in vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 14, no. 7, p. 966, Jun. 2012.
- [71] J. R. Jones, P. Sepulveda, and L. L. Hench, "Dose-Dependent Behavior of Bioactive Glass Dissolution," no. June, pp. 720–726, 2001.
- [72] M. Mozafari, F. Moztarzadeh, and M. Tahriri, "Investigation of the

physico-chemical reactivity of a mesoporous bioactive SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> glass in simulated body fluid,” *NOC*, vol. 356, no. 28–30, pp. 1470–1478, 2010.

- [73] M. Mami, A. Lucas-girot, H. Oudadesse, and R. Dorbez-sridi, “Applied Surface Science Investigation of the surface reactivity of a sol – gel derived glass in the ternary system SiO<sub>2</sub> – CaO – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,” vol. 254, pp. 7386–7393, 2008.
- [74] a. Hoppe, B. Sarker, R. Detsch, N. Hild, D. Mohn, W. J. Stark, and a. R. Boccaccini, “In vitro reactivity of Sr-containing bioactive glass (type 1393) nanoparticles,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 387, pp. 41–46, Mar. 2014.
- [75] M. T. Souza, M. C. Crovace, C. Schröder, H. Eckert, O. Peitl, and E. D. Zanotto, “Effect of magnesium ion incorporation on the thermal stability, dissolution behavior and bioactivity in Bioglass-derived glasses,” *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 382, pp. 57–65, Dec. 2013.
- [76] J. M. Nedelec, E. Jallot, and J. Soulie, “Influence of Mg doping on the early steps of physico-chemical reactivity of sol – gel derived bioactive glasses in biological medium,” 2009.
- [77] E. . Eanes, J. . Termine, and M. U. Nysten, “An Electron Microscopic Study of the Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Its Transformation to Crystalline Apatite,” *Calc. Tiss. Res.*, vol. 158, no. 12, pp. 143–158, 1973.
- [78] Y.-F. F. Goh, A. Z. Alshemary, M. Akram, M. R. Abdul Kadir, and R. Hussain, “In vitro study of nano-sized zinc doped bioactive glass,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 137, no. 3, pp. 1031–1038, Jan. 2013.
- [79] S. Kulanthaivel, B. Roy, T. Agarwal, S. Giri, K. Pramanik, K. Pal, S. S. Ray, T. K. Maiti, and I. Banerjee, “Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 648–658, 2016.
- [80] D. S. Steinbrech, B. J. Mehrara, P. B. Saadeh, J. A. Greenwald, J. A. Spector, G. K. Gittes, M. T. Longaker, S. Douglas, B. J. Mehrara, B. Pierre, J. A. Greenwald, J. A. Spector, K. Gittes, and M. T. Longaker, “VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism,” no. 11, pp. 853–860, 2000.
- [81] G. S. Lázaro, S. C. Santos, C. X. Resende, and E. Araujo, “Individual and combined effects of the elements Zn , Mg and Sr

on the surface reactivity of a  $\text{SiO}_2 \cdot \text{CaO} \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$  bioglass system," vol. 386, pp. 19–28, 2014.

- [82] S. Fagerlund, L. Hupa, and M. Hupa, "Dissolution patterns of biocompatible glasses in 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) buffer.," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 2, pp. 5400–10, Mar. 2013.
- [83] R. G. Hill and D. S. Brauer, "Predicting the bioactivity of glasses using the network connectivity or split network models," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 357, no. 24, pp. 3884–3887, 2011.
- [84] L. P. Singh, S. K. Bhattacharyya, R. Kumar, G. Mishra, U. Sharma, G. Singh, and S. Ahalawat, "Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications.," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 214C, pp. 17–37, Nov. 2014.
- [85] X. Chen, B. Lei, Y. Wang, and N. Zhao, "Morphological control and in vitro bioactivity of nanoscale bioactive glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 355, no. 13, pp. 791–796, May 2009.
- [86] M. Mackovic, A. Hoppe, R. Detsch, D. Mohn, W. J. Stark, E. . Spiecker, and A. R. Boccaccini, "Bioactive glass ( type 45S5 ) nanoparticles: in vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility," 2012.
- [87] W. Xia and J. Chang, "Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol-gel method," *Mater. Lett.*, vol. 61, no. 14–15, pp. 3251–3253, Jun. 2007.
- [88] J. Brinker, *Sol-Gel Science- The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic press limited, 1990.
- [89] A. S. Materials, *Biocompatible Glasses*. Springer, 2016.
- [90] H. Antheunis, J. Van Der Meer, M. De Geus, and W. Kingma, "Improved Mathematical Model for the Hydrolytic Degradation of Aliphatic Polyesters," pp. 2462–2471, 2009.
- [91] A. C. Vieira, J. C. Vieira, J. M. Ferra, F. D. Magalhães, R. M. Guedes, and A. T. Marques, "Mechanical study of PLA – PCL fibers during in vitro degradation," vol. 4, pp. 451–460, 2011.
- [92] P. Saravanapavan, J. R. Jones, R. S. Pryce, and L. L. Hench, "Bioactivity of gel – glass powders in the  $\text{CaO-SiO}_2$  system: A

comparison with ternary ( CaO-P 2 O 5 -SiO 2 ) and quaternary glasses ( SiO 2 -CaO-P 2 O 5 -Na 2 O )," pp. 17–19, 2003.

- [93] A. Rocha, D. Alves, L. Silveira, S. Maria, H. Sander, and M. Pereira, "Synthesis , characterization and cytocompatibility of spherical bioactive glass nanoparticles for potential hard," vol. 25011.
- [94] A. Hoppe, A. Brandl, O. Bleiziffer, A. Arkudas, R. E. Horch, B. Jokic, D. Janackovic, and A. R. Boccaccini, "In vitro cell response to Co-containing 1393 bioactive glass," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 157–163, 2015.
- [95] S. Kargozar, N. Lotfibakhshaiesh, J. Ai, M. Mozafari, P. Brouki, S. Hamzehlou, M. Barati, F. Baino, R. G. Hill, and M. Taghi, "Strontium- and cobalt-substituted bioactive glasses seeded with human umbilical cord perivascular cells to promote bone regeneration via enhanced osteogenic and angiogenic activities," *Acta Biomater.*, 2017.
- [96] L. A. H. Durand, M. P. Zago, A. Baldi, and A. Gorustovich, "In vitro endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive," pp. 7620–7630, 2014.
- [97] V. Aina, G. Malavasi, A. F. Pla, L. Munaron, and C. Morterra, "Zinc-containing bioactive glasses: Surface reactivity and behaviour towards endothelial cells," *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1211–1222, 2009.