



Universitat Ramon Llull

TESIS DOCTORAL

Título Estructura composición y superficie como vectores directores en el diseño de biomateriales. Aplicación al desarrollo de scaffolds poliméricos y a superficies bioactivas

Realizada por David Horna Tomás

en el Centro Institut Químic de Sarrià

y en el Departamento Bioenginyeria

Dirigida por Dr. Salvador Borrós i Gómez y Dr. Manuel A. Gonzalez de la Peña

Resumen

En este trabajo se describe el diseño, síntesis y caracterización de diferentes biomateriales y su posible aplicación en biomedicina. Se ha hecho especial énfasis en resaltar la importancia que tienen la estructura, la composición y la actividad superficial en las propiedades finales del biomaterial.

Así, se ha desarrollado un biomaterial biodegradable y elastomérico, altamente poroso, con una gran interconectividad que permite la difusión de nutrientes y de células, una vez sea implantado. La viabilidad de este material se ha demostrado tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. La síntesis del mismo se ha realizado mediante calefacción asistida por microondas, lo que ha permitido una reacción más rápida sin necesidad de catalizadores y evitando las etapas posteriores de purificación.

Se ha desarrollado también un material biodegradable e inyectable a temperaturas de 45°C, que, al enfriarse hasta los 37°C, se endurece y puede emplearse como soporte estructural a la vez que actúa como liberador de fármacos. La aplicación de dicho material como cemento óseo mejora los problemas de biocompatibilidad, tanto de composición como mecánica, de los actuales productos en el mercado, abriendo una nueva vía de aplicación de este tipo de materiales. Por otro lado, el compuesto desarrollado se ha ensayado en aplicaciones bioadhesivas, donde ha demostrado unos excelentes resultados en la unión de tejido intestinal.

Por último, se ha conseguido desarrollar una superficie con capacidad de reprogramar células con el simple contacto entre la célula y la superficie. Con esta tecnología, denominada *cell reprogramming surface (CRS)*, se han obtenido células pluripotentes inducidas (iPS) de una forma mucho más eficiente y rápida que los métodos habituales de trabajo.

Resum

En aquest treball es descriu el disseny, síntesi i caracterització de diferents biomaterials i la seva possible aplicació en biomedicina. S'ha fet especial èmfasi a ressaltar la importància que tenen l'estructura, la composició i l'activitat superficial en les propietats finals del biomaterial.

Així, s'ha desenvolupat un biomaterial biodegradable i elastomèric, altament porós, amb una gran interconnectivitat que permet la difusió de nutrients i de cèl·lules, un cop sigui implantat. La viabilitat d'aquest material s'ha demostrat tant en assaigs *in vitro* com *in vivo*. La síntesi del mateix s'ha realitzat mitjançant calefacció assistida per microones, cosa que ha permès una reacció més ràpida sense necessitat de catalitzadors i evitant les etapes posteriors de purificació.

S'ha desenvolupat també un material biodegradable i injectable a temperatures de 45°C, que, en refredar fins als 37°C, s'endureix i pot emprar com a suport estructural al mateix temps que actua com a alliberador de fàrmacs. L'aplicació d'aquest material com ciment ossi millora els problemes de biocompatibilitat, tant de composició, com mecànica, dels actuals productes en el mercat, obrint una nova via d'aplicació d'aquest tipus de materials. D'altra banda, el compost desenvolupat s'ha assajat en aplicacions bioadhesives, on ha demostrat uns excel·lents resultats en la unió de teixit intestinal.

Finalment, s'ha aconseguit desenvolupar una superfície amb capacitat de reprogramar cèl·lules amb el simple contacte entre la cèl·lula i la superfície. Amb aquesta tecnologia, anomenada *cell reprogramming surface* (CRS), s'han obtingut cèl·lules pluripotents induïdes (iPS) d'una forma molt més eficient i ràpida que els mètodes habituals de treball.

Summary

This paper describes the design, synthesis and characterization of different biomaterials and their possible applications in biomedicine, highlighting the importance of the structure, composition and surface activity in the final properties of the biomaterial.

Thus, a biodegradable and elastomeric biomaterial, highly porous, with a strong interconnectivity that allows diffusion of nutrients and cells, once it is implanted has been developed. The feasibility of this material has been demonstrated both in vitro and in vivo assays. The synthesis has been performed using microwave-assisted heating, which has allowed a faster reaction without catalysts and avoiding the later stages of purification.

It has also been developed a biodegradable and injectable material, at temperatures of 45°C, which, when cooled to 37°C, it hardens and can be used as structural support while acting as drug delivery. The application of such material as bone cement avoid biocompatibility problems, both in composition and mechanics, of the current products on the market, opening a new way of application of such material. On the other hand, the compound has been tested in bioadhesive applications, where it has shown excellent results in the union of intestinal tissue.

Finally, a surface with ability to reprogram cells with simple contact between the cell and the surface has been developed. With this technology, called cell reprogramming surface (CRS), induced pluripotent cells (iPS) have been obtained in a much more efficient and faster way than the usual methods.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN 1

1.1 INTRODUCCIÓN.	3
1.1.1 LA INGENIERÍA DE TEJIDOS	3
1.1.2 LA CIENCIA DE LOS BIOMATERIALES	11
1.1.2.1 Composición	12
1.1.2.1.1 Los polímeros.	14
1.1.2.1.2 Cerámicas	17
1.1.2.1.3 Composites	20
1.1.2.2 Estructura	22
1.1.2.2.1 Forma del biomaterial	23
1.1.2.2.2 Tamaño de poro	24
1.1.2.2.3 Tridimensionalidad	25
1.1.2.2.4 Topografía superficial	25
1.1.2.3 Superficie.	26
1.2 OBJETIVOS	30
1.3 BIBLIOGRAFÍA	31

CAPÍTULO 2: LA ESTRUCTURA DEL BIOMATERIAL 37

2.1 INTRODUCCIÓN	39
2.2 OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	44
2.3 EL SCAFFOLD DE BIORUBBER	45
2.3.1 INTRODUCCIÓN	44
2.3.1.1 La síntesis del biomaterial por microondas.	44
2.3.1.2 El composite utilizado.	51
2.3.2 PLAN DE TRABAJO	53
2.3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	53
2.3.3.1 Síntesis de la alternativa uno	53
2.3.3.2 Pruebas in vivo	55
2.3.3.3 Síntesis de la alternativa segunda	56
2.3.3.4 Pruebas in vivo de las segunda alternativa	57
2.3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	58
2.3.5 RESUMEN.	70
2.4 LA ESPUMA DE BIORRUBBER	72
2.4.1 PLAN DE TRABAJO	76
2.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	76
2.4.2.1 Síntesis y fabricación del scaffold	76
2.4.2.2 Ensayos in vivo.	80
2.4.2.2.1 Migración celular en el biorubber.	80
2.4.2.2.2 Pruebas in vivo para regeneración ósea.	80
2.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
2.4.4 RESUMEN	106
2.5 EL BIORUBBER COMO SCAFFOLD CARDIACO.	108
2.5.1 PLAN DE TRABAJO	109
2.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	110
2.5.2.1 Cera fundida:	110
2.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	113
2.5.4 SUMARIO	116
2.6 BIBLIOGRAFIA	118

CAPITULO 3: EL COMPUESTO 123

3.1 INTRODUCCIÓN	125
3.2 OBJETIVOS	131

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.	132
3.3.1 SÍNTESIS DEL COMPOSITE:	132
3.3.2 Determinación del peso molecular por MALDI TOF MS.	133
3.3.3 ANÁLISIS DINAMOMECÁNICO Y REOMETRÍA.	137
3.3.4 ADHESIÓN	138
3.3.5 PRUEBAS IN VIVO.	139
3.4 RESULTADOS	141
3.5 DISCUSIÓN.	164
3.6 BIBLIOGRAFÍA	170

CAPÍTULO 4: LA SUPERFICIE 173

4.1 INTRODUCCIÓN	175
4.2 OBJETIVOS	183
4.1.1 PLAN DE TRABAJO	183
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	186
4.3.1 RECUBRIMIENTO CON PFM.	186
4.3.2 INMUNOFUORESCENCIA	186
4.3.3 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM)	187
4.3.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)	188
4.3.5 TAPIZADO CON LENTIVIRUS E INCUBACIÓN CON CÉLULAS DE MAMÍFERO.	188
4.3.6 ALMACENAJE DE PLACAS TAPIZADAS	189
4.3.7 INFECCIÓN CON RAWA-H8	190
4.3.8 OBTENCIÓN DE iPSC	191
4.3.9 DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITOS	193
4.3.10 USO DE LAS SUPERFICIES MODIFICADAS <i>IN VIVO</i>	193
4.3.11 ESTUDIOS ANATOMOPATOLÓGICOS.	195
4.3.12 CULTIVO CELULAR	196
4.3.13 TRANSFECCIÓN	196
4.3.14 PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES.	197
4.4 RESULTADOS.	198
4.4.1 MODIFICACIÓN CON PFM	198
4.4.2 ANCLAJE DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES	199
4.4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS PARTÍCULAS LENTIVIRALES ANCLADAS/OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA	204
4.4.4 ALMACENAMIENTO DE LAS PLACAS	209
4.4.5 TRANSFERENCIA GENÉTICA EMPLEANDO OTROS VECTORES (NO LENTIVIRALES)	211
4.4.6 TRANSFERENCIA DE siRNA	212
4.4.7 OBTENCIÓN DE iPSC	214
4.4.8 PRUEBAS PRELIMINARES IN VIVO	221
4.5 DISCUSIÓN	223
4.6 BIBLIOGRAFÍA	226

5 CONCLUSIONES 229

5.1 CONCLUSIONES.	230
--------------------------	------------

6 ARTICULOS Y PATENTES 235

6.1 ARTÍCULOS Y PATENTES	237
---------------------------------	------------

Acrónimos

AFM	Microscopio de fuerzas atómicas
APEG	Amino-Poli Etilen Glicol
BLI	Bioluminiscencia
CAD	Diseño asistido por Ordenador
CRS	Cell Reprograming Surface
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMA	Análisis Dinamo Mecánico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EA	Energía de Activación
EB	Cuerpos embrionarios
ECM	Matriz extracelular
ES	Células madre embrionarias
FBS	Suero Fetal Bovino
FTIR	Espectroscopia de infrarrojos
FTSC	Fluoresein-5-thiosemicarbazide
GFP	Green Fluorescein Protein
GLP	Buenas prácticas de laboratorio
GMP	Buenas prácticas de fabricación
HPSEC	High performance size exclusion
IM	Intramuscular
iMEF	Fibroblastos embrionarios de raton inactivados
iPSC	Células de pluripotencia inducida
Maldi TOF	Desorción/Ionización Láser asistida por matriz mediante tiempo de vuelo
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
microCT	Microtomografía axial computerizada
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
PBS	Phosphate bufferes Saline

PD	Petri Dish
PDMS	Poli Dimetil Siloxano
PEG	Poli Etilen Glicol
PFM	PentaFLuoro Fenil Metacrilato
PLGA	Poli (lactic-co-gilic acid)
PLLA	Ácido Poli-L-Lactico
Pluc	Luciferasa de Photinus pyralis
PMMA	Poli Metil Metacrilato
RT-PCR	Reacción de la cadena de polimerasa en trasncripción reversa
SC	Subcutaneos
SEM	Microscopio electrónico de Barrido
TC	Tissue culture plate
TEM	Microscopio electróico de transmisión
Tf	Temperatura de fusión
Tg	Temperatura de transición vitrea
TGF	Factor de crecimiento de transformación.
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VSV.g	Glicoproteina del virus de la estomatitis vesicular

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN.

1.1.1 La ingeniería de tejidos

Cada día se llevan a cabo miles de procesos quirúrgicos para reemplazar o reparar tejidos dañados. Para ello, hay una nueva corriente la ingeniería de tejidos que se ha desarrollado como herramienta principal para regenerar tejidos dañados combinando células provenientes del cuerpo con materiales altamente porosos, los cuales actúan como soporte para la ingeniería tisular guiando el crecimiento de los nuevos tejidos. Como es bien sabido, los tejidos biológicos constan de células, matriz extracelular y sistemas de señalización, los que juegan un rol importante en la activación diferencial de los genes en cascada, para la construcción y diferenciación del tejido.

El campo de la ingeniería de tejidos es altamente multidisciplinar y engloba especialistas de ramas como clínica médica, ingeniería mecánica, ciencia de materiales, genética y disciplinas relacionadas con la ingeniería y las ciencias de la vida. La ingeniería de tejidos se apoya en gran medida por el uso de andamios (*scaffolds*) para obtener el ambiente apropiado en la regeneración de tejidos y órganos. Esos andamios actúan como soporte para la formación del tejido, donde normalmente se siembran células y factores de crecimiento. Estos composites, (células-*scaffold*), se pueden cultivar in vitro para preparar un tejido que posteriormente se implantará en la zona dañada y producir así la regeneración in vivo. Esta combinación de células, señales y andamios se denomina comúnmente como la triada de la ingeniería de tejidos (Figura 1.1).



Figura 1.1: La triada de la ingeniería de tejidos, formada por los andamios, las células y los factores de crecimiento.

Es importante tener en cuenta que el comportamiento individual de las células y el estado dinámico multicelular de los tejidos está regulado por las interacciones moleculares recíprocas entre las células y sus alrededores. Este microambiente extracelular está constituido por proteínas hidratadas y redes de geles de base proteoglicanas que comprenden señales físicas además de las interacciones célula-célula. Pero además, también entran en juego enlaces específicos de estas señales con los receptores células-superficie induciendo unas cascadas complejas dentro de la célula que convergen para regular la expresión celular, estableciendo el fenotipo celular y directamente la formación del tejido, la homeostasis y la regeneración [1]. La lista de señales no está resuelta en su totalidad por la gran cantidad y complejidad que existe en ello. Entre otros están PLC, fosfolipasas C, GAGs, Ras, PI3K, glycosaminoglycanos, PGs, Proteoglicanos, CAMs, moléculas de adhesión celular [2] (Figura 1.2).

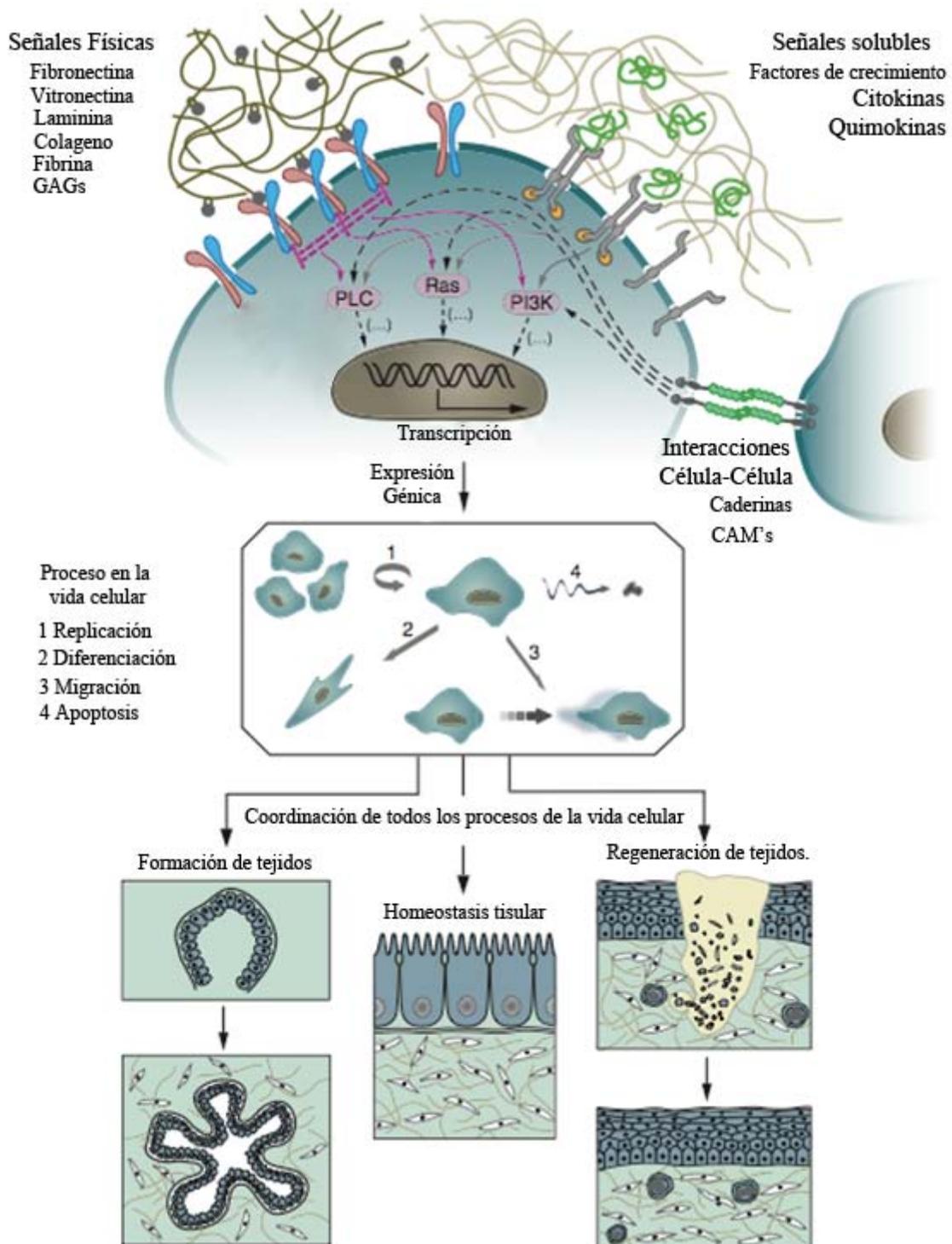


Figura 1.2: Esquema de la interacción que se produce entre las células y con el microambiente de señalización celular [2].

Dentro de la ingeniería de tejidos, una de las terapias más utilizadas es la implantación autóloga de las células, que consiste en la implantación de las propias células del paciente. La estrategia de la ingeniería tisular para reparar o regenerar un tejido dañado consiste en obtener una biopsia celular del paciente, aislarla y

expandirla en cultivos celulares de dos dimensiones para obtener una cantidad suficiente de células que después se pasarán a una estructura tridimensional porosa y biodegradable que actuará como andamio (*Scaffold*) para la formación del nuevo tejido. Esta estructura se fabrica para permitir la adhesión celular, la proliferación, la migración y la diferenciación y, así, desarrollar el nuevo tejido. Este composite (andamio-célula) será implantado posteriormente sobre la zona dañada que se desea regenerar, consiguiendo con esto una estructura homogénea y continua con el tejido natural que se encuentra alrededor del implante (Figura 1.3).

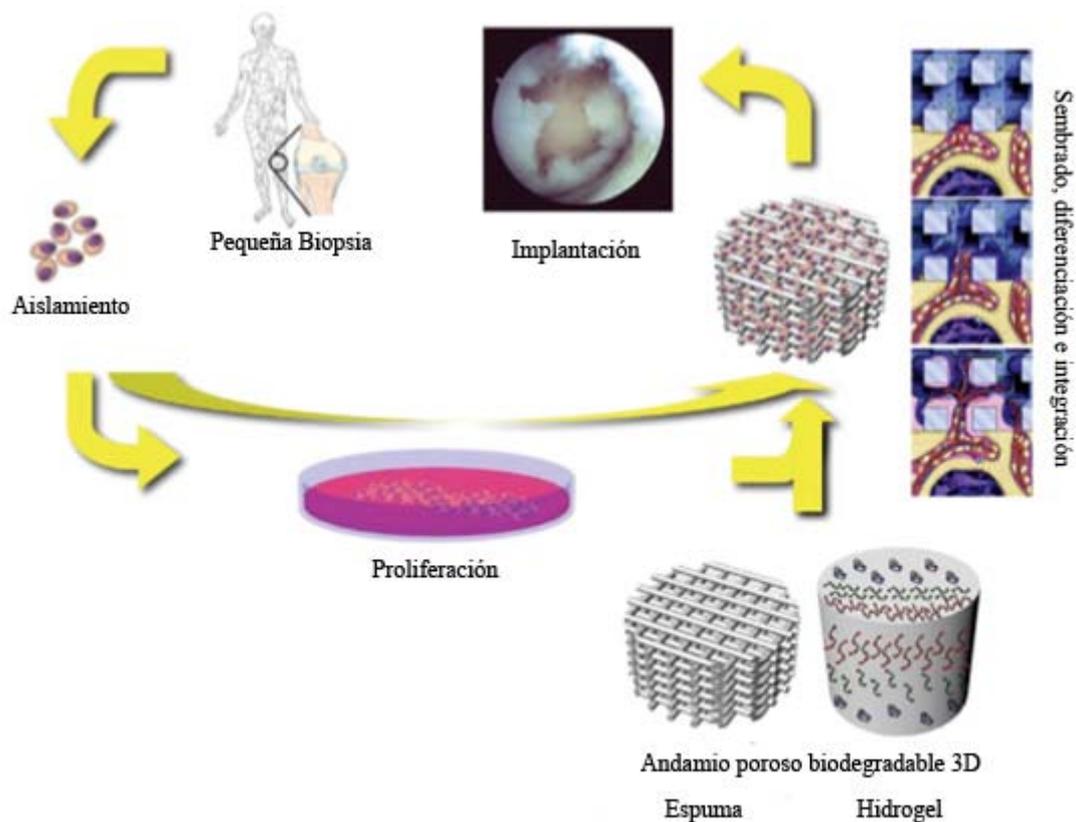


Figura 1.3: Esquema de una terapia celular, desde que se realiza la biopsia para obtener las células hasta que se vuelven a implantar, pasando por la expansión celular, la proliferación y la introducción en un andamio (*scaffold*) para orientar el crecimiento [3]

Queda claro que la interacción células-andamio es un punto clave en el desarrollo de la ingeniería de tejidos y, que la composición de dicho andamio juega un papel determinante en la eficacia del mismo. Por ello, es fundamental desarrollar

biomateriales que permitan construir el andamio con la forma y la composición deseadas.

De todas maneras, debe indicarse que la utilización de biomateriales no es

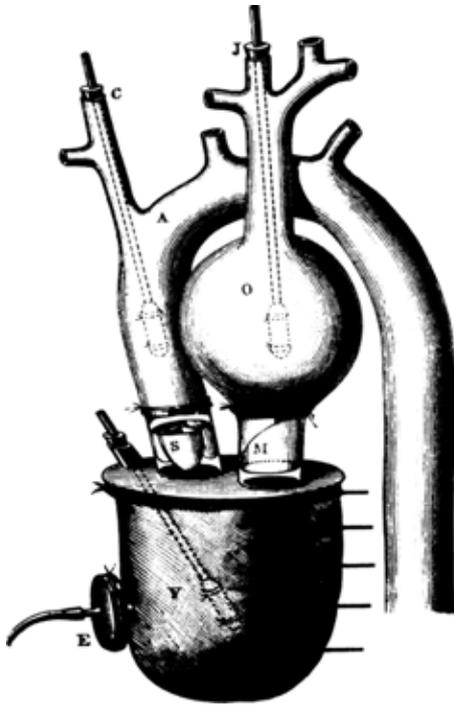


Figura 1.4: Dibujo de un corazón artificial del siglo XIX [ref]

exclusiva de la medicina moderna. A lo largo de la historia existen muchas menciones a materiales utilizados en medicina. Ya en el año 1881 Étienne-Jules publicó unos estudios describiendo un dispositivo artificial de un corazón, aunque probablemente nunca se llegó a construir [4] (Figura 1.4)

Curiosamente ya en el siglo XVII se desarrollaron materiales para trasplantes. Se tiene constancia que fue en este siglo cuando se utilizaron los primeros metales con aplicación directa en medicina. En la Figura 1.5 se puede ver la evolución de los materiales aplicados en medicina a lo largo de los siglos. Durante los

primeros años y hasta bien entrado el siglo XX, se comenzaron a utilizar materiales metálicos, concretamente en la II Guerra Mundial, que se produjeron grandes avances en la ciencia de los implantes con el uso de los primeros polímeros como los acrilatos. Desde la II guerra mundial hasta principios de los años 60, hubo pocos pioneros que desarrollaron y comercializaron polímeros y metales fabricando implantes y aplicándolos medicamente. Existía poca regulación gubernamental de esta actividad, lo que permitió que biólogos, físicos, ingenieros y expertos en materiales, se unieran para crear las primeras colaboraciones. En los años 70 surgió la necesidad de buscar nuevos materiales para poder controlar la composición, la pureza y las propiedades físicas de los mismos. Estos nuevos materiales se desarrollaron de nuevo para su uso específico en medicina, como polímeros biodegradables y cerámicas activas. Transcurridos los años se fue mejorando y ampliando el conocimiento en la medicina regenerativa y la interacción de los materiales con las células y los tejidos, y los polímeros que se

fueron usando, tenían propiedades más adaptadas a cada uso. Por último, y en la fase en la que nos encontramos, en el principio del siglo XXI, se han unido todos los factores, las propiedades de materiales e interacción celular, para obtener el biomaterial más apropiado para cada uso [4].

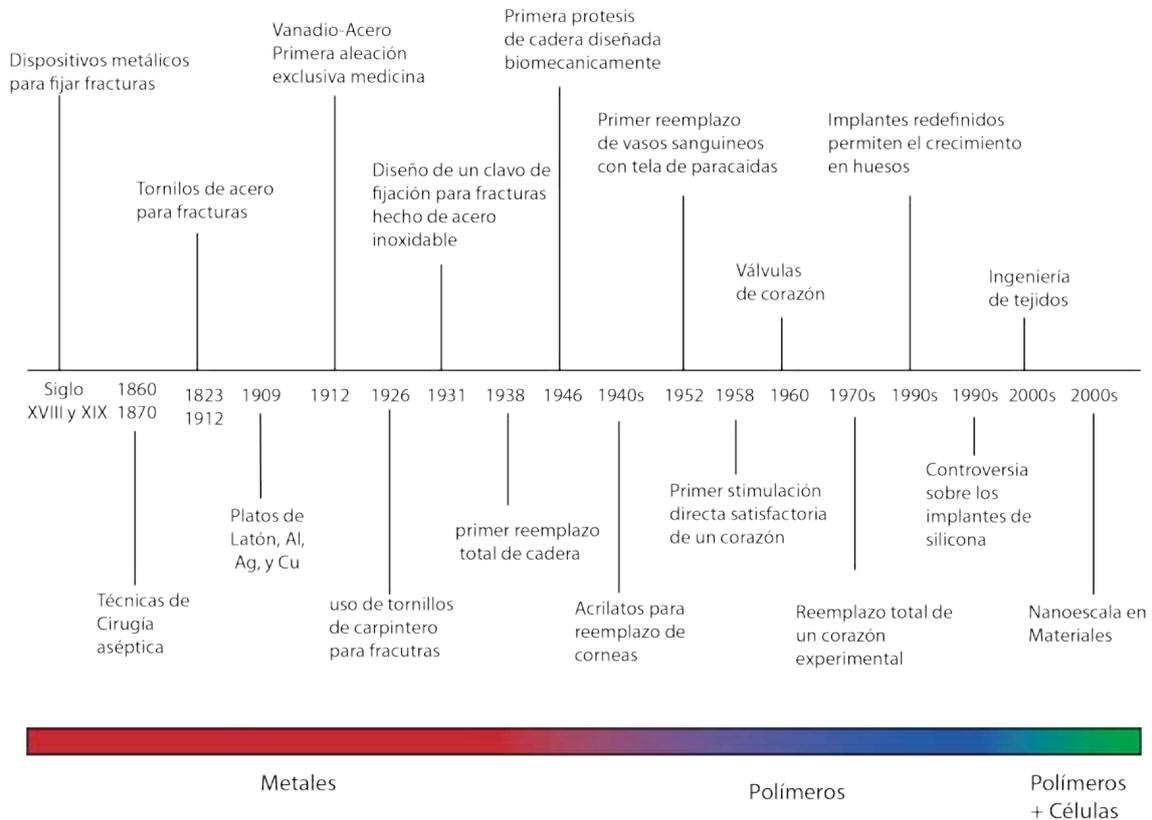


Figura 1.5: Línea de tiempo de los biomateriales, desde los primeros dispositivos para fijar fracturas, pasando por el uso de los primeros polímeros y terminando por la interacción célula biomaterial.

Desde el punto de vista moderno, se designa como biomaterial a aquellos materiales utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con los sistemas biológicos y que se aplican en diversas especialidades de la medicina. El uso de los biomateriales se ha extendido en gran medida cumpliendo funciones a lo largo de todo el cuerpo humano. Hoy en día, la ciencia y la ingeniería de los biomateriales son actividades multidisciplinarias que, tanto en el campo de la investigación y el desarrollo como en el de la industria y la aplicación clínica, engloban a un gran número de personal cualificado con distintos perfiles como médicos, ingenieros, biólogos, químicos.

En la actualidad un biomaterial debe cumplir una serie de requisitos para ser considerado como tal:

1. Ser biocompatible, es decir, debe ser aceptado por el organismo y no provocar que éste desarrolle sistemas de rechazo ante su presencia.
2. No ser tóxico, ni teratogénico.
3. Tener una resistencia mecánica y a la fatiga adecuada al lugar del implante

En un estudio realizado por la Fundación OPTI en el año 2004 se detallaron, dentro de los planes estratégicos de I+D, los biomateriales como punto estratégico [5]. Se llevaron a cabo hipótesis de desarrollo que se clasifican en las siguientes puntos:

Tabla 1.1 [5]: Plan estratégico establecido por la fundación OPTI en el año 2004 sobre el campo de los biomateriales.

<i>Hipótesis</i>	<i>Enunciado</i>	<i>Fecha de materialización</i>	<i>Capacidad Científica</i>	<i>Capacidad empresarial</i>	<i>Amplitud de aplicación</i>
6	Existirá material de implante que llegará a osteointegrarse en breves plazos de tiempo	2009-2014	Favorable	Desfavorable	Gran/Media Escala
9	La supervivencia a largo plazo de los implantes se incrementará con el empleo de materiales que mejoren la regeneración natural de los tejidos, tanto en su estructura como en sus funciones metabólica, bioquímica y biomecánica.	2009-2014	Desfavorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Gran/Media Escala
1	El desarrollo de las tecnologías que se utilizan en la ingeniería de tejidos permitirá la reparación, regeneración, etc., de tejidos e incluso de órganos del cuerpo humano	2009-2014	Desfavorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Gran/Media Escala
16	Se implantarán sistemas de dispensación de fármacos para tratamientos de larga duración que tendrán una respuesta adaptativa del material utilizado.	2009-2014	Favorable/Des favorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Gran Escala
5	Existirá material bioactivo implantable y modelable a medida en el propio quirófano.	2009-2014	Desfavorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Media Escala
19	Se generalizará la utilización de factores de crecimiento óseo para la reparación de grandes defectos óseos.	2009-2014	Favorable/Des favorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Gran/Media Escala
7	Se reducirá el volumen de material desgastado de las superficies articulares protésicas en un 70% como media.	Hasta 2008	Favorable/Des favorable	Desfavorable	Gran/Media Escala

14	Las prótesis cardiacas que requieren medicación anticoagulante de por vida serán sustituidas por bioprótesis fabricadas a partir de células madre o antólogas del paciente.	2015-2019	Favorable/Des favorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Media
24	Las nanotecnologías asociadas a la biología celular y molecular y a las TIC's convergerán en los futuros desarrollos que se produzcan en el campo de los Biomateriales	2015-2019	Favorable/Des favorable	Desfavorable/Muy desfavorable	Gran/Media Escala
3	El desarrollo de sistemas microelectrónicos biocompatibles permitirá la aplicación de sensores/actuadores implantables	2009-2014	Desfavorable	desfavorable	Gran/Media Escala
15	Se obtendrán esfínteres urinarios y fecales de accionamiento externo a voluntad del paciente fabricados con materiales biocompatibles, que resolverán graves problemas de incontinencia severa.	2009-2014	Desfavorable	Desfavorable	Gran/Media Escala
21	Se desarrollará una sangre artificial biocompatible de origen transgénico o químico que servirá de soporte temporal en casos de grandes pérdidas de volumen sanguíneo	2015-2029	Desfavorable	Muy desfavorable	Gran Escala

Como se puede ver en la Tabla 1.1, uno de los principales problemas de la ingeniería de tejidos y más concretamente en los biomateriales, es el entorno desfavorable en la capacidad empresarial de los proyectos a la hora de llevarlos a cabo de forma práctica y de comercializarlos. Esta problemática se extiende por toda Europa pero en especial es España.

Así por ejemplo, los desarrollos en nuevos materiales pueden tener implicaciones a largo plazo en el sistema sanitario. Con una población envejecida (el número de adultos jubilados se prevé que se incremente en un 50% para el 2025, llegando a tener un promedio superior al 30% de ciudadanos por encima de los 60 años) y una esperanza de vida mayor (Figura 1.6), según la organización mundial de la salud, los beneficios de los Biomateriales en la calidad de vida de los pacientes es primordial. Actualmente, se han desarrollado alrededor de 2.700 tipos de dispositivos médicos considerados como Biomateriales. En USA se estima que se implanten unos 3 millones de prótesis anuales, generando un mercado de más de

100 millones de dólares. En Europa, se implantan anualmente alrededor de 40.000 prótesis cardíacas y 275.000 prótesis de cadera. Se pronostica que el aumento del uso de prótesis crecerá a un ritmo de un 6% anual. (fuente Organización Mundial de la Salud) [5]

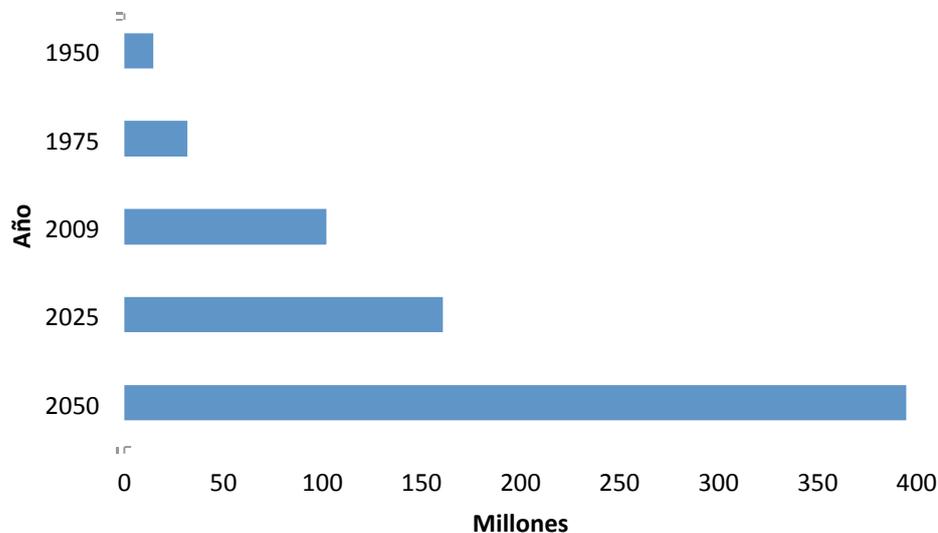


Figura 1.6 Población con 80 años o más en el mundo entre los años 1950 y 2050

El sector de los Biomateriales es enormemente dinámico. Las tendencias, tal como se ha comentado con anterioridad, apuntan al uso de la terapia génica para regenerar tejidos y en la observación de la naturaleza para imitar su composición [6, 7]. La terapia génica permitirá modificar células para poder curar enfermedades que hasta ahora no tenían solución, tal y como se verá en el capítulo 4 de esta tesis, consiguiendo un gran avance en las terapias celulares.

1.1.2 La ciencia de los biomateriales

Una vez presentada la realidad de los materiales en los procesos de desarrollo de nuevas terapias y, su impacto en la sociedad a medio y corto plazo, se describirá en este apartado las consideraciones básicas para el correcto diseño de un biomaterial. En primer lugar, debe afirmarse que para entender el funcionamiento de un biomaterial, deben tenerse en cuenta tres aspectos fundamentales,

composición, estructura y superficie, cada uno de ellos contribuye para obtener el biomaterial correcto en cada ocasión (Figura 1.7).

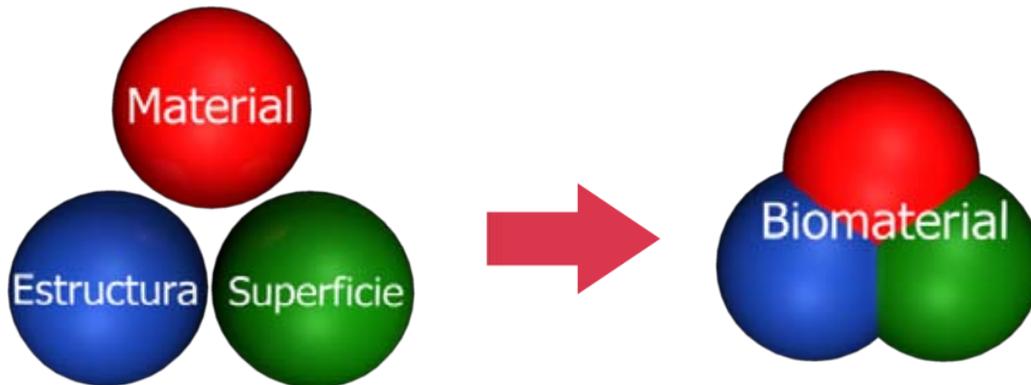


Figura 1.7: Un biomaterial está caracterizado principalmente por la composición del material, su estructura y su superficie. Se deben controlar todos estos aspectos para llevar a cabo la fabricación.

1.1.2.1 Composición



Referente a la composición existe una gran cantidad de biomateriales diferentes. Así, los biomateriales se pueden clasificar de varias formas en función de si son de uso temporal o permanente o, en función de si su localización, es intra o extracorpórea. Desde el punto de vista de su función, se pueden distinguir los dispositivos destinados al soporte[6], al diagnóstico [8] o al tratamiento [9]. Asimismo, algunos materiales contienen fármacos y son considerados medicamentos, incluso pueden incluir células vivas y constituir los llamados biomateriales híbridos[10].

Dentro de esta amplia clasificación, al intentar describir de forma resumida el campo de los biomateriales, el principal problema con el que uno se encuentra es la gran diversidad de desarrollos y aplicaciones finales (Figura 1.8). Por ese motivo, se ha preferido en este texto realizar una primera clasificación de los materiales en 4 grandes grupos, según su composición, para favorecer la explicación:

1. Polímeros.
2. Metálicos.
3. Cerámicos.
4. Materiales naturales.

En algunas ocasiones dos grupos de estos se combinan entre sí para formar los que sería la quinta clase que son los materiales compuestos (también composites), como los formados por el poli (ácido láctico) con hidroxiapatita donde el primero actúa como matriz de soporte y la segunda como biocerámica bioactiva dando además soporte mecánico [11, 12].

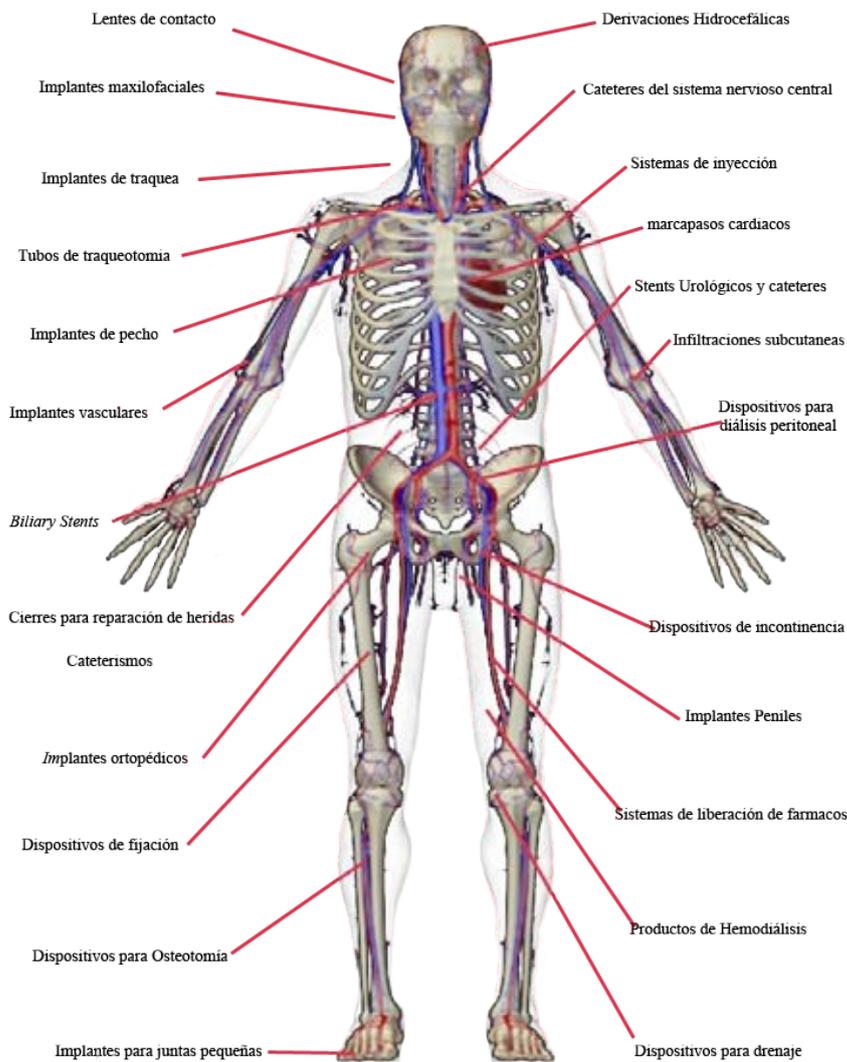


Figura 1.8: Principales usos de los biomateriales en el cuerpo humano.

Dentro de esta tesis solo se tomarán en consideración los **polímeros, los materiales cerámicos y los composites**, por tener una mayor aplicación en biomedicina.

1.1.2.1.1 Los polímeros.

Para poder explicar el comportamiento de los biomateriales y predecir sus propiedades se debe comprender en primer lugar su estructura atómica, microscópica y macroscópica. Los polímeros se pueden dividir en tres grandes grupos, polímeros termoplásticos, termoestables o elastoméricos. Los primeros son polímeros compuestos por cadenas poliméricas unidas entre sí por fuerzas débiles de Van der Waals y fuerzas dipolo-dipolo. Estos compuestos, al aumentar la temperatura, romperán sus fuerzas de atracción y se volverán fluidos pudiendo ser fácilmente moldeables. Se pueden disolver con cierta facilidad, para formar films y otras estructuras. Además, presentan cierta facilidad a la degradación gracias a la hidrólisis [13] o por la acción de proteínas y polisacáridos [14].

Por otro lado se encuentran los polímeros termoestables, los cuales, presentan unas cadenas poliméricas unidas entre sí por enlaces covalentes (reticulación) lo que le confiere unas características diferentes en función del grado de estos enlaces (Figura 1.9). Las principales características de estos polímeros son que no se pueden fundir y no se pueden disolver sin romper su estructura interna. Dependiendo del grado de reticulación, los polímeros presentan estructuras muy diferentes, las cuales se verán a lo largo de la introducción y de la tesis.

Dentro de estas estructuras, existen otras composiciones en función de la forma de síntesis y del uso de uno o más monómeros, los cuales se verán en otros capítulos de la tesis.

Por último, se encuentran los elastómeros que suelen ser normalmente polímeros termoestables de bajo grado de reticulación, pero pueden ser también termoplásticos. Las largas cadenas poliméricas se enlazan durante el curado permitiendo la unión de las mismas y originando que tengan una estructura

normalmente amorfa. La elasticidad proviene de la habilidad de las cadenas para cambiar su posición por sí mismas y así distribuir una cierta tensión aplicada.

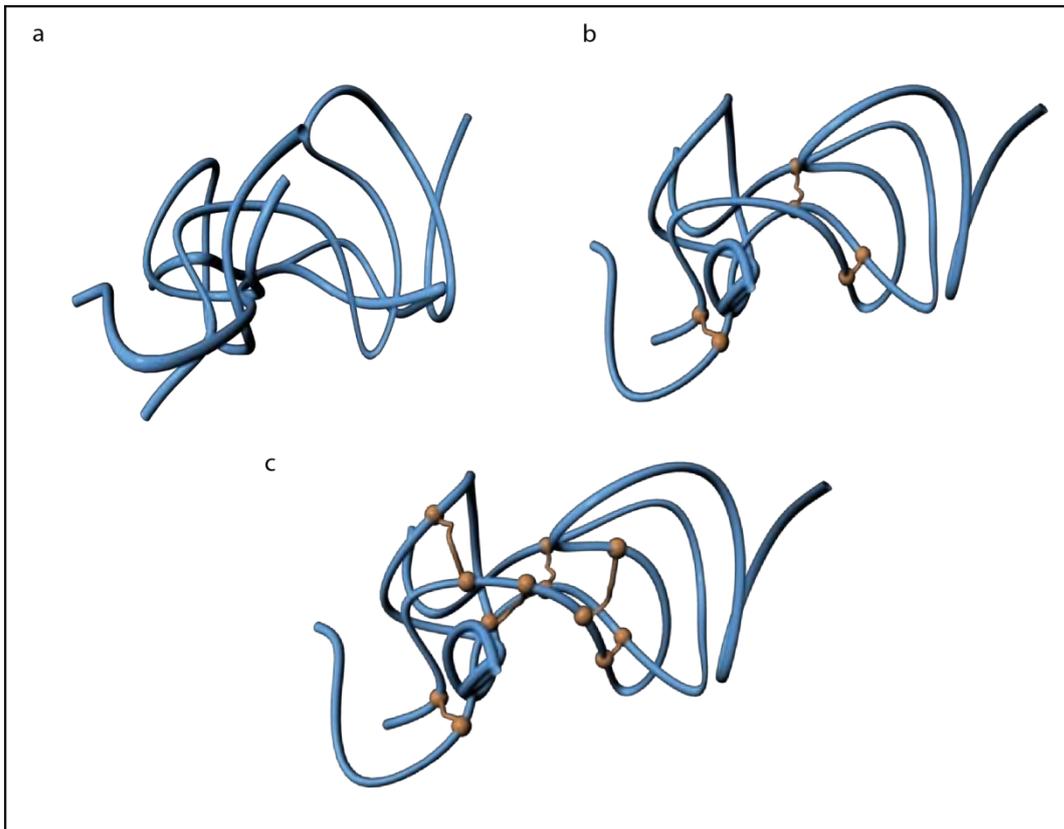


Figura 1.9: En función de la reticulación de los polímeros, estos obtendrán una propiedades u otras, ya que este enlace covalente evita el movimiento de las cadenas por aplicación de calor.

Dentro del campo de los polímeros con aplicación para biomedicina (biopolímeros) se podría hacer una clasificación entre los siguientes tipos,

- *Polímeros solubles en agua.*

Los polímeros solubles en agua se pueden usar para una gran variedad de aplicaciones. Se pueden absorber o unir covalentemente sobre la superficie para hacer el material más hidrofílico, menos trombogénico, y con una mayor lubricación. Se pueden usar también como recubrimientos protectores para prevenir daños durante operaciones. Por ejemplo, el ácido hialurónico se usa en operaciones oftalmológicas para prevenir el daño de la córnea y el iris. Estos polímeros pueden entrecruzar sus cadenas para formar hidrogeles para reemplazar tejidos blandos o incluso para aplicaciones de liberación de fármacos. Algunos de los biopolímeros solubles en agua más utilizados son Poly

(N-vinyl-pyrrolidona)[15], el Poli etilen glicol[16], ácido Hialurónico[17] y Dextran [18].

- *Polímeros gelificantes.*

Los polímeros gelificantes son polímeros en solución que se transforman en una estructura en red rígida con un cambio en la temperatura o por adición de agentes iónicos reticulantes. Esta clase de polímeros se usan ya que se pueden formar en condiciones templadas. Estos polímeros pueden, por tanto, ser usados para inmovilizar células para inyectarlos in vivo. Normalmente, se usan como recubrimientos para controlar la liberación in vivo. Alginato [19, 20], Gelatina [21, 22], Fibrina[23, 24].

- *Hidrogeles*

Los hidrogeles son materiales que se hinchan cuando están en ambientes acuosos. Muchos materiales naturales como el colágeno o el quitosano absorben grandes cantidades de agua y pueden ser considerados también hidrogeles. Los hidrogeles deben su comportamiento a la gran movilidad de las cadenas gracias a la presencia del agua. Sus propiedades mecánicas dependen de la cantidad de agua que posean. El módulo elástico y el límite elástico decrece con el contenido del agua, mientras que la elongación aumenta al incrementar el contenido de agua. Ejemplos de estos hidrogeles están el poli (Hidroxietil metacrilato) [25], el Chitosan[26, 27] ,o el Colageno [28, 29].

- *Elastómeros*

Las siliconas [30-32] y los poliuretanos [33-36]son dos de las clases de elastómeros usados para aplicaciones in vivo. Ambos son polímeros versátiles con un rango ancho de propiedades mecánicas. Los poliuretanos tienden a ser más rígidos y fuertes que las siliconas, mientras que éstas son más inertes y tienen la ventaja de ser permeables al oxígeno. Existen otros tipos de elastómeros utilizados en biomedicina como se verá a lo largo de la tesis[9, 37, 38]

- *Polímeros Rígidos*

Muchos de los polímeros rígidos y bioinertes son plásticos que han sido desarrollados para otras aplicaciones no médicas. Debido a su estabilidad química y su naturaleza no tóxica muchos plásticos se usan como materiales para implantes. Existe una gran cantidad de materiales de este tipo (Tabla 1.2) con propiedades diferentes en función de su composición.

Tabla 1.2: Propiedades físicas de poliésteres biodegradables (polímeros rígidos)[4]

Material	Fuerza de tensión (psi)	Modulo elástico, Ksi	T_g (°C)	T (°C)
Poliglicólico	10000	1.000	35-40	225-230
Poli (L-Lactide)	8000-12.000	600	60-65	173-178
50/50 poli (DL-Lactide-co-Glicolide)	6.000-8.000	400	45-50	Amorfo
poli (DL-Lactide)	4.000-6.000	400	55-60	Amorfo
Policrapolactoana	3.000-5.000	50	-65	58-63
Poli (3HB)	5.800	500	4	177
Poli (3HB-co-20%3HV)	4.600	170	-1	145
Poli (4HB)	15.100	33	-50	60
Poli (3HB-co-16%4HB)	3.800		-8	152

1.1.2.1.2 Cerámicas

Dentro de la clasificación que se ha hecho anteriormente de los compuestos principales están los biomateriales cerámicos bioactivos, que, a su vez, se procesan en cuatro tipos fundamentales de superficies y propiedades asociadas a las adhesión celular [39] (1) completamente densos, cerámicas cristalinas relativamente inertes que se adhieren al tejido (2) porosas, relativamente inertes donde el tejido crece en los poros, creando una atracción mecánica entre el implante y el tejido. (3) Complemente densos, con una superficie reactiva, la cual atrae el tejido vía enlaces químicos. (4) cerámicas reabsorbibles que se integran con el tejido y eventualmente se sustituyen por un nuevo tejido.

El concepto de bioactividad para los biomateriales cerámicos viene dado por la hipótesis de que la biocompatibilidad del implante es óptima si permite la formación de un tejido normal sobre su superficie y si establece una interfase continua para soportar las cargas que sufre el lugar donde esta sito la cerámica.

Existen tres tipos principales de biocerámicas: Cristales cerámicos y cristales bioactivos, cerámicas de fosfatos de calcio y composites de cristales y cerámicos. Además se pueden incorporar factores de inducción para aumentar la bioactividad. Todos estos materiales se pueden usar en diferentes formas: Implantes totales, recubrimientos de metales e implantes cerámicos, *scaffolds* para hueso e ingeniería de tejidos, rellenos para cementos o *scaffolds* y como vehículos para la liberación de fármacos.

- *Cristales Bioactivos y "Glass ceramic".*

Los cristales bioactivos (bioactive glasses) se usan de muchas formas diferentes, como implantes en bruto, como recubrimiento de metales o implantes cerámicos, y también, como *scaffolds* para guiar las terapias biológicas [40-43] Los cristales limitan su actividad a su superficie. El grado de actividad y respuesta fisiológica depende de la composición química del cristal. Ejemplos de estos cristales son el Bioglass®, el ceravital, un derivado de este, o el A-W glass-ceramic, el cual está formado por oxiapatita cristalina, fluoroapatita y Beta-Wollastonita en la matriz cel cristal.[41, 44, 45].

- *Cerámicas de fosfato de calcio*

Este tipo de biocerámicas con la fórmula química $M_{10}(XO_4)_6Z_2$ han sido ampliamente estudiadas como un biomaterial relevante. La apatita más conocida y más estudiada para usos en medicina y odontología es la hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ pudiendo tener dos estructuras principales (Figura 1.10).

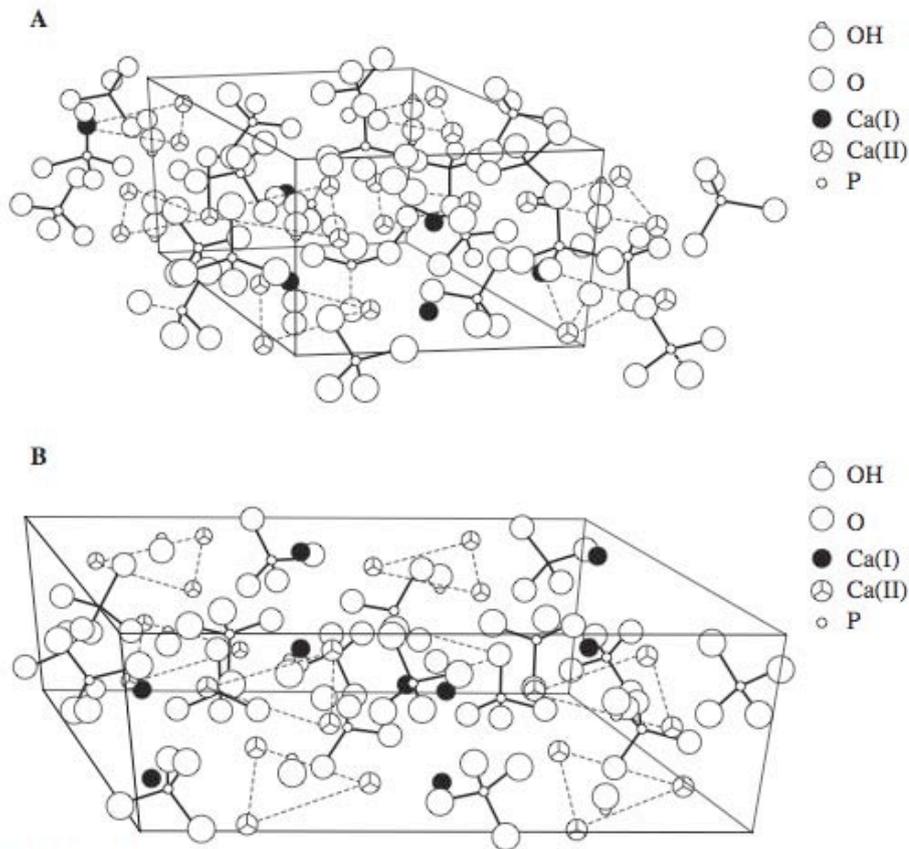


Figura 1.10: Esquema de las dos estructuras cristalinas de la hidroxiapatita (a) hexagonal (b) monoclinica [46]

Se ha generalizado el uso de de la hidroxiapatita sintética como biomaterial, debido a su similitud con la fase mineral del hueso y los dientes. Además de esto, otras de las ventajas es la baja conductividad térmica y eléctrica, la elasticidad similar a la del hueso natural, el control de la degradación in vivo y el potencial que presenta como recubrimiento. [47].

- *Composites bioactivos cerámicos.*

Las cerámicas bioactivas generalmente presenta una baja rigidez y tenacidad, por ello, en la fabricación de estos materiales muchas veces las propiedades que se deben cumplir son un poco restrictivas. Los composites biocerámicos surgen para solucionar estos problemas y aumentar las propiedades mecánicas de los materiales bioactivos. Existen tres aproximaciones para el uso de los composites biocerámicos: (1) usar la respuesta biológica de las biocerámicas, pero recargando la cerámica con una segunda fase para aumentar las propiedades mecánicas (2) utilizar los materiales biocerámicas

como una segunda fase para conseguir una deseable rigidez (3) realizar *scaffolds* sintéticos para la regeneración de tejidos [48]

1.1.2.1.3 Composites

Por último, otro de los compuestos fundamentales de los que está constituido un biomaterial son los composites. Un material compuesto consiste en dos o más materiales física y/o químicamente distintos, y con una distribución adecuada con una interfase que separa ambos materiales (Figura 1.11). El composite tiene unas características que cada uno de los materiales por separado no podrían tener, por ello para conseguir esa característica se combinan los materiales. Un composite principalmente consta de las siguientes partes:

- Matrices

La matriz en un composite es la fase continua del total, la cual envuelve parcialmente o en su totalidad la fase de refuerzo. Esto permite que las fibras o partículas estén en su estado y en su dirección, otorgando las propiedades finales del material. La matriz también aplica la carga sobre el refuerzo y redistribuye el estrés.

- Fibras

La gran mayoría de materiales son más fuertes y resistentes en su forma de fibras. Esto explicaría el uso de fibras en el diseño de un composite, concretamente en aplicaciones estructurales, donde ellos son el componente principal en el soporte de carga.

- Partículas

Se pueden añadir partículas a la matriz para mejorar la propiedades mecánicas tales como la dureza o la Resistencia. Otras propiedades como la estabilidad dimensional, el aislamiento eléctrico, o la conductividad térmica, se pueden controlar gracias a las partículas, especialmente cuando se añaden sobre matrices poliméricas. El refuerzo de la partícula se distribuye aleatoriamente sobre la matriz, resultando composites isotrópicos.

- Interfase.

La transferencia y distribución del estrés desde la matriz a las fibras o partículas ocurre a través de la interfase de separación. El área de la interfase y la longitud de unión afecta en gran medida a las propiedades del composite final. Una baja interfase denota una pobre humedad de la fibra con el material de la matriz

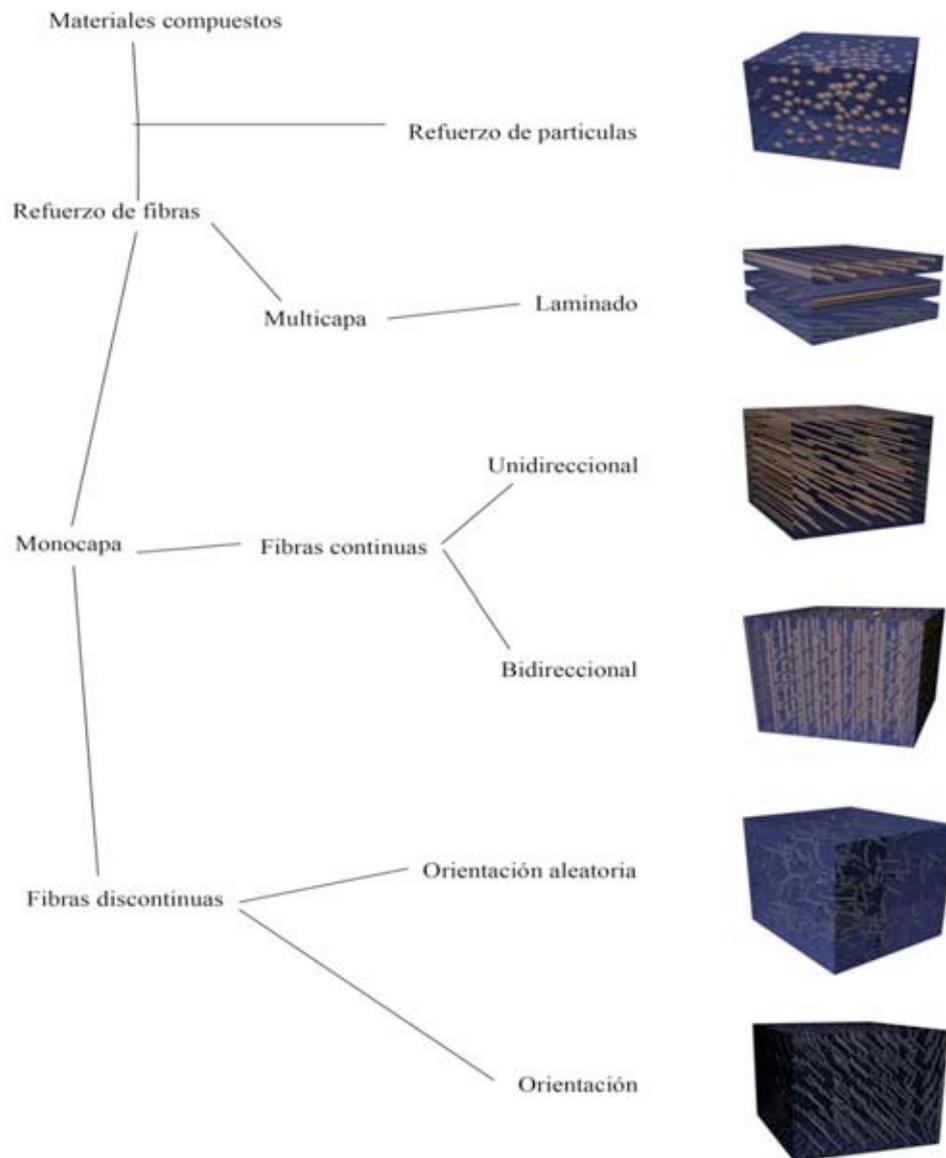


Figura 1.11: Esquema de compuestos biocerámicos

1.1.2.2 Estructura



Siguiendo con la caracterización de los biomateriales, otro punto importante es la estructura en la que se presentan y la forma en la que se van a implantar. En la regeneración de tejidos hay dos aspectos estructurales importantes, por un lado, el microambiente en el que se encuentra el biomaterial y, por otro lado, la carga estructural que ha de soportar (ambas se verán en el capítulo 1 de la tesis). Aunque los biomateriales se pueden presentar para muchas otras aplicaciones como, por ejemplo, la liberación de fármacos en forma de hidrogeles termosensibles mediante cambios de temperatura o, como se verá en el capítulo 2 de la tesis, polímeros biodegradables con liberación controlada.

La estructura es importante dado que define sus propiedades mecánicas. Para realizar una apropiada guía para regeneración de tejidos, un biomaterial debe satisfacer los requerimientos estructurales del tejido nativo. Para cada tipo de tejido y aplicación, el implante se debe diseñar con la arquitectura física y las propiedades mecánicas y químicas apropiadas para ayudar a conservar las funciones del implante. En la tabla se recogen ejemplos de aproximaciones que utilizan estas propiedades para regeneración de tejidos. [46]

La caracterización de un biomaterial viene dado por sus propiedades física, mecánicas y químicas Tabla 1.3.

Tabla 1.3: Ejemplos de técnicas estructurales para el diseño de biomateriales para regeneración.

Parámetro de diseño	Biomaterial	Aplicación	Referencias
Propiedades físicas			
Forma	Láminas de PLGA		[49]
	Microcarriers gelatina	Implantación de epitelios retinales en humanos	[50]
Tamaño	Fibras de PGA	Transplante SMC	[51]
	Sustrato de Agar	Crecimiento en 3D	[52]
Tamaño de poro	Hidroxiapatita	Formación de poros en red 3D	[53]
	PDLLA-PELA con poros longitudinales	Regeneración de nervios	[54]
Tridimensionalidad	Parcículas de alginato	Cultivo de hepatocitos en 3D	[55]
	Hidrogeles de agarosa	Cultivo 3D de neuronas	[56]
Topografía superficial	Poliuretano texturizado	Expansión BAEC	[57]
	Fibras alineadas submicron-PAN-MAA	Regeneración de nervios	[58]

Propiedades mecánicas			
Composites reforzados	PLGA con Hidroxiapatita	regeneración de huesos	[59]
	PPF con PLGA	Regeneración de huesos	[60]
Cargas mecánicas	PGA/poli-4-hidroxibutirato	Inertos vasculares	[61]
	Agarosa	Diferenciación de condrocitos	[62]
Estimulos eléctricos	láminas PP-HA y PP/PSS bicapas	Implantes para vascularización	[63]
	Polipirrol	Aumento de la extensión de neurita	[64]
Propiedades químicas			
Hidrofilicidad	PLGA con variación de hidrofilicidad	Adhesión fibroblastos	[65]
	Films de silica con PEG	Inhibición de adhesión celular	[66]
Cargas mecánicas	PLLA y PLGA con polilisina	Incremento de la adhesión condrocitos	[67]
	Agarosa hidrogel con quitosano	Inducción de extensión neurita	[68]
Biodegradación	PLA y PLGA con radiación e-Beam	ratios ajustables de biodegradación	[69]
	Hidrogel MMP sensitivos	ratios ajustables de biodegradación	[70]

Dentro de las propiedades del biomaterial destacan las siguientes características a tener en cuenta:

1.1.2.2.1 Forma del biomaterial

La forma que presentan los biomateriales debe ser dictada en función de la aplicación a la que van destinados. Para facilitar el crecimiento in vitro e in vivo de células se forman finos films de materiales naturales y polímeros como, por ejemplo, films de PLGA [49] que se usan para el cultivo de células epiteliales, o, el colágeno, para hepatocitos [71] fibroblastos y células endoteliales [72]; los films de colágeno poliactivo recubierto para keratinocitos humanos [73]. Entre las formas en las que se pueden encontrar los biomateriales están las espumas, microesferas, microtubos, nanopartículas. Los tejidos con una compleja estructura tridimensional requieren técnicas más sofisticadas de fabricación que asemejen el biomaterial a la zona donde va a ser implantado. El *scaffold* se puede construir con un detalle micrométrico permitiendo la construcción ingenieril del tejido para cada paciente de forma independiente [74]. Estos estudios ilustran la gran variedad de métodos

disponibles para la creación de casi cualquier tipología de material que fuese necesaria.

Otra tipología de biomateriales son los materiales continuos para liberación de factores de crecimiento o de fármacos o, incluso, liberación controlada de células. Para actuar como liberador de fármacos o factores de crecimiento, las formas más usadas son las microparticulas, nanoparticulas o los microtubos. Por ejemplo, microparticulas de poli (etilen glicol) PEG-PLGA se cargan con factores de crecimiento de transformación β -1 (TGF) para incrementar la proliferación celular en ratas [75].

1.1.2.2 Tamaño de poro

El buen funcionamiento del biomaterial depende principalmente de la estructura de los andamios usados para ingeniería tisular. Los andamios deben tener una estructura porosa interconectada, y una alta porosidad para permitir la difusión de nutrientes a las células dentro de la construcción y para la correcta invasión celular. Esta misma estructura también debe tener una interconectividad suficiente para eliminar los productos de desecho fuera del andamiaje, al igual que los productos derivados de la degradación del material y así eliminarlos del cuerpo sin interferencia con otros órganos o tejidos. Este tema de eliminación de residuos es muy importante para la correcta integración del biomaterial [76, 77]. Otro punto importante es el tamaño de poro. Las células en primer lugar interaccionan vía grupos químicos (ligandos) en la superficie del material. Para ello, los biomateriales sintéticos derivados de materiales extracelulares naturales, poseen ligandos como Arg.Gly.Asp (RGD), mientras que a los andamios fabricados sintéticamente se les deben incorporar sintéticamente ligandos para que se puedan acoplar proteínas. Los poros deben ser lo suficientemente grandes como para que las células puedan migrar dentro de la estructura [78, 79].

Cuando se implanta un nuevo material existe una respuesta de vascularización a la invasión que da lugar a todos los mecanismos necesarios para hacer frente a este cuerpo extraño. Este mecanismo es lento, suele llevar 3 semanas para *scaffolds* de PLLA relativamente pequeños (5mm) [80]. La distancia a donde llegan estas vascularizaciones es importante tenerla en cuenta a la hora del

diseño del andamio, para permitir que todos los nutrientes y factores necesarios, lleguen a todos los puntos del material.

1.1.2.2.3 Tridimensionalidad

Los tejidos in vivo se construyen en estructuras tridimensionales, por lo tanto el cultivo de células en 3D se asemejará en gran medida a los escenarios in vivo. Se ha demostrado que el cultivo en dos dimensiones (2D) o en tres dimensiones afecta al fenotipo celular. El cultivo de hepatocitos en partículas de alginato (400 μm de diámetro) segregan más albumina, fibronectina, α -1-antitripsina, α -1-ácido glicoproteína, y protrombina que el cultivo en sistemas similares en 2D. Además los niveles producidos por las células en partículas de alginato se aproximan más a los hepatocitos normales obtenidos in vivo, quizás porque la estructura celular 3D es mucho más similar a la que se encuentra in vivo [55]. Estas diferencias pueden ser el resultado de la interacción entre las integrinas y los receptores, los eventos producidos por las señales, y la diferente composición de las proteínas de la matriz extracelular (ECM) [81]. Bajo el sistemas de cultivo 2D, la superficie cubierta con las proteínas de la ECM confieren rigidez a las células, esta es una de las mayores diferencias entre el 2D y el 3D. Esta diferencia de la rigidez de la matriz causa un nivel diferente y una distribución da la adhesión y resulta en una respuesta y una regulación en las señales producida en tumores [82] .

1.1.2.2.4 Topografía superficial

La modificación de la topografía superficial y la rigidez del material es otro punto que mejora la interacción entre el implante y el tejido. Cuando la topografía de una matriz extracelular subendotelial se reproduce con un poliuretano biomédico, las células endoteliales aorticas bovinas se extienden más rápido y con una apariencia mucho más similar a las células cultivadas en un ambiente natural, en comparación con las células cultivadas en un poliuretano no texturizado [57].

1.1.2.3 Superficie.



Por último, un aspecto fundamental en un biomaterial es el mimetismo con el ambiente celular, o lo que es lo mismo la interacción célula-superficie. La respuesta biológica al biomaterial se controla mediante la química y la estructura de la superficie [25]. En la interacción célula-superficie existen dos parámetros importantes que caracterizan la superficie[46]:

- Hidrofilicidad.

La hidrofilicidad es un aspecto que afecta en gran medida al comportamiento de las células en un biomaterial. La mayoría de las células mamarias se adhieren exclusivamente a superficies que tengan receptores apropiados al efecto. En el caso de no tener estos receptores, como es el caso de la mayoría de los biomateriales sintéticos, estas células no se adhieren. Sin embargo, la absorción de proteínas en biomateriales da como resultado la adhesión celular sobre la superficie con una ordenada hidrofilicidad (20° a 40° de ángulo de contacto en agua) [83]. Esto muestra que superficies de moderada hidrofilicidad en presencia de las proteínas del suero, permite la adhesión de células en policarbonato [84] y PLGA [85] en cristal [86].

- Carga

Además de la hidrofilicidad superficial, otro punto importante para la adhesión celular es la carga positiva de la superficie. Los polímeros que poseen cargas positivas en la superficie a pH fisiológico, aproximadamente 7.4, aumenta la adhesión de las células y el crecimiento en presencia de proteínas [87]. Las células prefieren superficies hidrofílicas y cargadas positivamente que unas superficies neutras o negativas [88]. Algunos ejemplos demuestra que los condrocitos aumentan su adhesión es superficies de PLLA o PGLA recubiertas con polilisina (proteína cargada positivamente) [67]. Por consiguiente, un andamio cargado positivamente puede inducir de mejor forma la formación de un tejido [89].

Por ello, cuando la superficie no es adecuada para el crecimiento celular y para la integración, la modificación superficial cobra su sentido de modo que podamos

predecir y actuar en la manera en la que la célula interactúa mientras que el resto del material actúa como soporte. En la Figura 1.12 se muestran las principales formas de modificación superficial. En general, la modificación superficial se divide en dos categorías (1) la modificación de los átomos, compuestos o moléculas existentes en la superficie, mediante alteración química o física. (2) recubrimiento de la superficie existente con un material de composición diferente (Figura 1.12) [4].

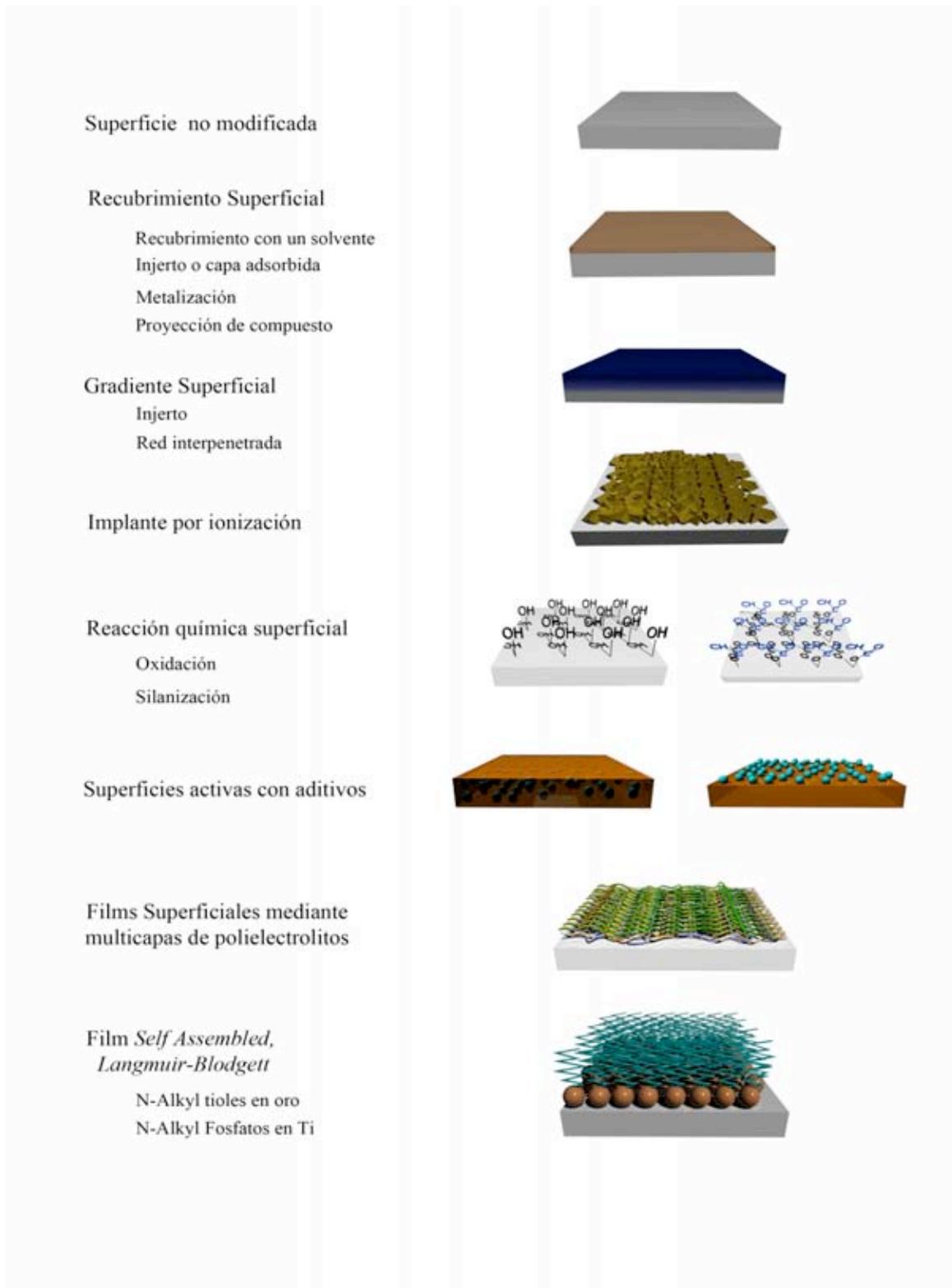


Figura 1.12: Esquema en el que se representan los principales tipos de recubrimientos superficiales. [4]

Durante la fabricación de materiales se pueden añadir, en bajas concentraciones, compuestos activos para que reaccionen de forma espontánea y se queden en la

superficie [90, 91]. Estas superficies modificadas con aditivos, son muy utilizadas en sistemas orgánicos e inorgánicos. Un ejemplo reciente de esto, es un trabajo realizado por el Dr Dirk Grafahrend en el cual desarrolló un poliéster biodegradable con una superficie química controlada para la absorción específica de materiales bioactivos [92] Figura 1.13. Este sistema se verá más ampliamente explicado en el capítulo 4 de la tesis.

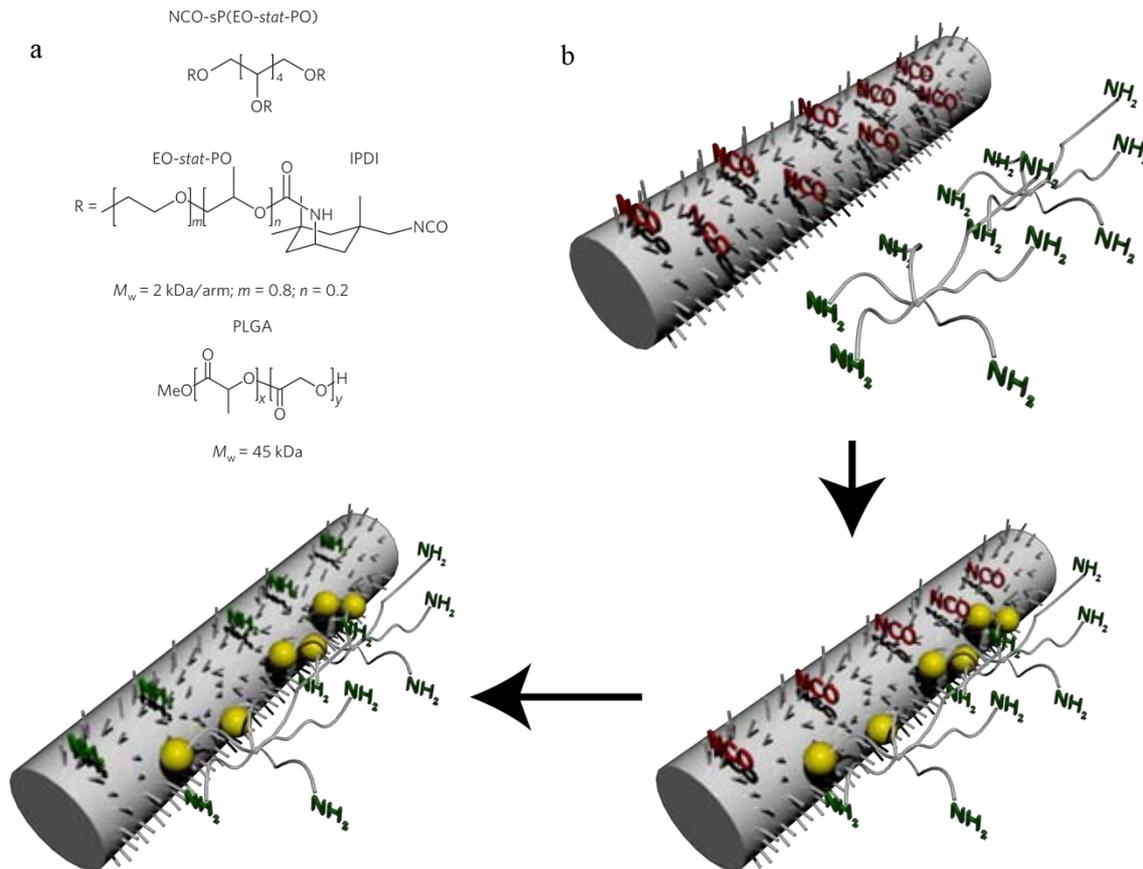


Figura 1.13: (a) Composición química del poliéster (b) esquema del enlace covalente de las fibras y de la diana. Los grupos NCO (rojos) en la superficie de la fibra se unen covalentemente a los grupos amino del sustrato (verdes) resultando en enlaces uretano (esquemáticamente en amarillo) el resto de grupos NCO no enlazados de la superficie de la fibra se pueden usar para reaccionar posteriormente e hidrolizarse a grupos amino. [92].

1.2 OBJETIVOS

La presente tesis nace de las dificultades en el desarrollo de biomateriales, la necesidad de nuevos materiales biocompatibles con propiedades equivalentes a los no biocompatibles y el desarrollo de materiales que presenten señalización celular .

Por consiguiente, el objetivo de la tesis es el desarrollo de una serie de biopolímeros avanzados con capacidad regeneradora y reparadora. Para ello, se toman los tres aspectos fundamentales anteriormente descritos para los biomateriales. En todos estos aspectos se integrará la cuarta característica que son las células, integrando el efecto del biomaterial sobre las células a nivel de expresión.

- Estructura: Obtención de una estructura porosa biodegradable elástica con capacidad regeneradora.
- Composición: Obtención de un nuevo biomaterial biodegradable, inyectable y con una alta resistencia mecánica, que permita liberar fármacos a medida que mantiene las propiedades mecánicas.
- Superficie: Desarrollo de una superficie inteligente con capacidad de modificación genética de células para una mayor integración y regeneración celular.

1.3 BIBLIOGRAFÍA

1. Kleinman, H.K., D. Philp, and M.P. Hoffman, *Role of the extracellular matrix in morphogenesis*. *Curr Opin Biotechnol*, 2003. **14**(5): p. 526-32.
2. Lutolf, M.P. and J.A. Hubbell, *Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(1): p. 47-55.
3. Moroni, L. and J.H. Elisseeff, *Biomaterials Engineered for integration*. *Materials Today*, 2008. **11**(5).
4. B.D. R., *Biomaterials Science: An introduction to materials in Medicine* 1996, San Diego: Academic Press.
5. Morato, A., I. Narváez, and C. Toribio, *El futuro de los Biomateriales*, 2004, Fundación Opti FENIN: Madrid.
6. Engelmayer, G.C., Jr., et al., *Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy*. *Nat Mater*, 2008. **7**(12): p. 1003-10.
7. Mahdavi, A., et al., *A biodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(7): p. 2307-12.
8. Bonnemain, B., [*Nanoparticles: the industrial viewpoint. Applications in diagnostic imaging*]. *Ann Pharm Fr*, 2008. **66**(5-6): p. 263-7.
9. Amsden, B.G., *Biodegradable elastomers in drug delivery*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2008. **5**(2): p. 175-87.
10. Freimark, D., et al., *Use of Encapsulated Stem Cells to Overcome the Bottleneck of Cell Availability for Cell Therapy Approaches*. *Transfus Med Hemother*, 2010. **37**(2): p. 66-73.
11. Ignjatovic, N., et al., *Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-L-lactide composite biomaterials*. *Biomaterials*, 1999. **20**(9): p. 809-16.
12. Zheng, X., et al., *Shape memory properties of poly(D,L-lactide)/hydroxyapatite composites*. *Biomaterials*, 2006. **27**(24): p. 4288-95.
13. Wang, H.T., et al., *Degradation of poly(ester) microspheres*. *Biomaterials*, 1990. **11**(9): p. 679-85.
14. Tsuji, H., Y. Kidokoro, and M. Mochizuki, *Enzymatic Degradation of Biodegradable Polyester Composites of Poly(L-lactic acid) and Poly(ϵ -caprolactone)*. *Macromolecular Materials and Engineering*, 2006. **291**(10): p. 1245-1254.
15. Lai, M.C., et al., *Chemical stability of peptides in polymers. 1. Effect of water on peptide deamidation in poly(vinyl alcohol) and poly(vinyl pyrrolidone) matrixes*. *J Pharm Sci*, 1999. **88**(10): p. 1073-80.
16. Almany, L. and D. Seliktar, *Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures*. *Biomaterials*, 2005. **26**(15): p. 2467-77.
17. Bae, K.H., J.J. Yoon, and T.G. Park, *Fabrication of hyaluronic acid hydrogel beads for cell encapsulation*. *Biotechnol Prog*, 2006. **22**(1): p. 297-302.

18. Kim, S.H., C.Y. Won, and C.C. Chu, *Synthesis and characterization of dextran-maleic acid based hydrogel*. J Biomed Mater Res, 1999. **46**(2): p. 160-70.
19. McLennan, G., et al., *Kinetics of release of heparin from alginate hydrogel*. J Vasc Interv Radiol, 2000. **11**(8): p. 1087-94.
20. Senuma, Y., et al., *Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization*. Biotechnol Bioeng, 2000. **67**(5): p. 616-22.
21. Welz, M.M. and C.M. Ofner, 3rd, *Examination of self-crosslinked gelatin as a hydrogel for controlled release*. J Pharm Sci, 1992. **81**(1): p. 85-90.
22. Ozeki, M., et al., *Controlled release of hepatocyte growth factor from gelatin hydrogels based on hydrogel degradation*. J Drug Target, 2001. **9**(6): p. 461-71.
23. Ahmed, T.A., M. Griffith, and M. Hincke, *Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds*. Tissue Eng, 2007. **13**(7): p. 1469-77.
24. Hall, H., *Modified fibrin hydrogel matrices: both, 3D-scaffolds and local and controlled release systems to stimulate angiogenesis*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(35): p. 3597-607.
25. Marí-Buyé, N., et al., *Functionalized, Swellable Hydrogel Layers as a Platform for Cell Studies*. Advanced Functional Materials, 2009. **19**(8): p. 1276-1286.
26. Noble, L., et al., *A non-covalently cross-linked chitosan based hydrogel*. Int J Pharm, 1999. **192**(2): p. 173-82.
27. Ishihara, M., et al., *Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis*. J Artif Organs, 2006. **9**(1): p. 8-16.
28. Rosenblatt, J., B. Devereux, and D.G. Wallace, *Injectable collagen as a pH-sensitive hydrogel*. Biomaterials, 1994. **15**(12): p. 985-95.
29. Murray, M.M., et al., *Collagen-platelet rich plasma hydrogel enhances primary repair of the porcine anterior cruciate ligament*. J Orthop Res, 2007. **25**(1): p. 81-91.
30. Musolf, M.C., et al., *Development of blood compatible silicone elastomers*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1969. **15**: p. 18-24.
31. Zhang, Y.Z., et al., *Tissue response to commercial silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures*. Biomaterials, 1996. **17**(23): p. 2265-72.
32. Andreopoulos, A.G. and M. Plytaria, *Biomedical silicone elastomers as carriers for controlled release*. J Biomater Appl, 1998. **12**(3): p. 258-71.
33. Coury, A.J., et al., *Factors and interactions affecting the performance of polyurethane elastomers in medical devices*. J Biomater Appl, 1988. **3**(2): p. 130-79.
34. Szycher, M., et al., *Blood compatible polyurethane elastomers*. J Biomater Appl, 1987. **2**(2): p. 290-313.
35. Skarja, G.A. and K.A. Woodhouse, *Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing and amino acid-based chain extender*. J Biomater Sci Polym Ed, 1998. **9**(3): p. 271-95.
36. Zia, K.M., et al., *Evaluation of biocompatibility and mechanical behavior of polyurethane elastomers based on chitin/1,4-butane diol blends*. Int J Biol Macromol, 2009. **44**(1): p. 18-22.

37. Guan, J., et al., *Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility*. *Biomaterials*, 2004. **25**(1): p. 85-96.
38. Bruggeman, J.P., C.J. Bettinger, and R. Langer, *Biodegradable xylitol-based elastomers: in vivo behavior and biocompatibility*. *J Biomed Mater Res A*, 2010. **95**(1): p. 92-104.
39. H, K.D. and P. Ducheyne, *Materials for Bone, Joint and Cartilage Replacement*. *Medical and Dental Materials*1992.
40. Kohn, D.H., P. Ducheyne, and J. Awerbuch, *Acoustic emission during fatigue of porous-coated Ti-6Al-4V implant alloy*. *J Biomed Mater Res*, 1992. **26**(1): p. 19-38.
41. Nakamura, T., et al., *A new glass-ceramic for bone replacement: evaluation of its bonding to bone tissue*. *J Biomed Mater Res*, 1985. **19**(6): p. 685-98.
42. Radin, S., et al., *In vitro transformation of bioactive glass granules into Ca-P shells*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **49**(2): p. 264-72.
43. Reilly, G.C., et al., *Differential alkaline phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass*. *Biomaterials*, 2007. **28**(28): p. 4091-7.
44. Kitsugi, T., et al., *Bone bonding behavior of three kinds of apatite containing glass ceramics*. *J Biomed Mater Res*, 1986. **20**(9): p. 1295-307.
45. Hench, L.L., *The story of Bioglass*. *J Mater Sci Mater Med*, 2006. **17**(11): p. 967-78.
46. Kutz, M., *Standard handbook of biomedical engineering and design*2003, New York: McGraw-Hill. 1 v. ([pg. mltiple]).
47. Koeneman, J., et al., *J Appl Biomater*, 1990. **1**: p. 79-90.
48. Ducheyne, P., *Bioceramics: material characteristics versus in vivo behavior*. *J Biomed Mater Res*, 1987. **21**(A2 Suppl): p. 219-36.
49. Giordano, G.G., et al., *Retinal pigment epithelium cells cultured on synthetic biodegradable polymers*. *J Biomed Mater Res*, 1997. **34**(1): p. 87-93.
50. Stover, N.P., et al., *Intrastratial implantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in advanced Parkinson disease*. *Arch Neurol*, 2005. **62**(12): p. 1833-7.
51. Eiselt, P., et al., *Development of technologies aiding large-tissue engineering*. *Biotechnol Prog*, 1998. **14**(1): p. 134-40.
52. Folkman, J. and M. Hochberg, *Self-regulation of growth in three dimensions*. *J Exp Med*, 1973. **138**(4): p. 745-53.
53. Jun, I.K., et al., *Novel hydroxyapatite (HA) dual-scaffold with ultra-high porosity, high surface area, and compressive strength*. *J Mater Sci Mater Med*, 2007. **18**(6): p. 1071-7.
54. Maquet, V., et al., *Poly(D,L-lactide) foams modified by poly(ethylene oxide)-block-poly(D,L-lactide) copolymers and α -FGF: in vitro and in vivo evaluation for spinal cord regeneration*. *Biomaterials*, 2001. **22**(10): p. 1137-46.
55. Selden, C., et al., *Three-dimensional in vitro cell culture leads to a marked upregulation of cell function in human hepatocyte cell lines--an important tool for the development of a bioartificial liver machine*. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **875**: p. 353-63.
56. Balgude, A.P., et al., *Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extension in 3D cultures*. *Biomaterials*, 2001. **22**(10): p. 1077-84.

57. Goodman, S.L., P.A. Sims, and R.M. Albrecht, *Three-dimensional extracellular matrix textured biomaterials*. *Biomaterials*, 1996. **17**(21): p. 2087-95.
58. Kim, Y.T., et al., *The role of aligned polymer fiber-based constructs in the bridging of long peripheral nerve gaps*. *Biomaterials*, 2008. **29**(21): p. 3117-27.
59. Devin, J.E., M.A. Attawia, and C.T. Laurencin, *Three-dimensional degradable porous polymer-ceramic matrices for use in bone repair*. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1996. **7**(8): p. 661-9.
60. Hasirci, V., et al., *PLGA bone plates reinforced with crosslinked PPF*. *J Mater Sci Mater Med*, 2002. **13**(2): p. 159-67.
61. Hoerstrup, S.P., et al., *Tissue engineering of small caliber vascular grafts*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2001. **20**(1): p. 164-9.
62. Elder, S.H., et al., *Effect of compressive loading on chondrocyte differentiation in agarose cultures of chick limb-bud cells*. *J Orthop Res*, 2000. **18**(1): p. 78-86.
63. Collier, J.H., et al., *Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **50**(4): p. 574-84.
64. Schmidt, C.E., et al., *Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(17): p. 8948-53.
65. Khang, G., et al., *Interaction of fibroblast cells on poly(lactide-co-glycolide) surface with wettability chemogradient*. *Biomed Mater Eng*, 1999. **9**(3): p. 179-87.
66. Alcantar, N.A., E.S. Aydil, and J.N. Israelachvili, *Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **51**(3): p. 343-51.
67. Sittering, M., et al., *Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes*. *J Biomed Mater Res*, 1996. **33**(2): p. 57-63.
68. Dillon, G.P., X. Yu, and R.V. Bellamkonda, *The polarity and magnitude of ambient charge influences three-dimensional neurite extension from DRGs*. *J Biomed Mater Res*, 2000. **51**(3): p. 510-9.
69. Leonard, D.J., et al., *The modification of PLA and PLGA using electron-beam radiation*. *J Biomed Mater Res A*, 2009. **89**(3): p. 567-74.
70. Kraehenbuehl, T.P., et al., *Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel*. *Biomaterials*, 2008. **29**(18): p. 2757-66.
71. Hansen, L.K., J. Wilhelm, and J.T. Fassett, *Regulation of hepatocyte cell cycle progression and differentiation by type I collagen structure*. *Curr Top Dev Biol*, 2006. **72**: p. 205-36.
72. Tiller, J.C., et al., *Improving biomaterial properties of collagen films by chemical modification*. *Biotechnol Bioeng*, 2001. **73**(3): p. 246-52.
73. Shved Iu, A., et al., *[Cultured skin cells interaction with polylactide surface coated by different collagen structures]*. *Tsitologiya*, 2007. **49**(1): p. 32-9.
74. Peltola, S.M., et al., *A review of rapid prototyping techniques for tissue engineering purposes*. *Ann Med*, 2008. **40**(4): p. 268-80.
75. Peter, S.J., et al., *Polymer concepts in tissue engineering*. *J Biomed Mater Res*, 1998. **43**(4): p. 422-7.
76. Ko, H.C., B.K. Milthorpe, and C.D. McFarland, *Engineering thick tissues--the vascularisation problem*. *Eur Cell Mater*, 2007. **14**: p. 1-18; discussion 18-9.

77. Phelps, E.A. and A.J. Garcia, *Update on therapeutic vascularization strategies*. Regen Med, 2009. **4**(1): p. 65-80.
78. Murphy, C.M., M.G. Haugh, and F.J. O'Brien, *The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials, 2010. **31**(3): p. 461-6.
79. Murphy, C.M. and F.J. O'Brien, *Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds*. Cell Adh Migr, 2010. **4**(3): p. 377-81.
80. Voigt, M., et al., *Cultured epidermal keratinocytes on a microspherical transport system are feasible to reconstitute the epidermis in full-thickness wounds*. Tissue Eng, 1999. **5**(6): p. 563-72.
81. Keely, P.J., et al., *Investigating integrin regulation and signaling events in three-dimensional systems*. Methods Enzymol, 2007. **426**: p. 27-45.
82. Paszek, M.J., et al., *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 241-54.
83. van Wachem, P.B., et al., *Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities*. Biomaterials, 1985. **6**(6): p. 403-8.
84. Chang, S.J., et al., *Amination of polycarbonate surface and its application for cell attachment*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 1999. **27**(3): p. 229-44.
85. Munirah, S., et al., *The use of fibrin and poly(lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis*. Eur Cell Mater, 2008. **15**: p. 41-52.
86. Webb, K., K.D. Caldwell, and P.A. Tresco, *A novel surfactant-based immobilization method for varying substrate-bound fibronectin*. J Biomed Mater Res, 2001. **54**(4): p. 509-18.
87. McKeenan, W.L. and R.G. Ham, *Stimulation of clonal growth of normal fibroblasts with substrata coated with basic polymers*. J Cell Biol, 1976. **71**(3): p. 727-34.
88. Webb, K., V. Hlady, and P.A. Tresco, *Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(3): p. 422-30.
89. Rashid, S.T., et al., *Cellular engineering of conduits for coronary and lower limb bypass surgery: role of cell attachment peptides and pre-conditioning in optimising smooth muscle cells (SMC) adherence to compliant poly(carbonate-urea)urethane (MyoLink) scaffolds*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2004. **27**(6): p. 608-16.
90. Ward, R.S., *Surface modifying additives for biomedical polymers*. Eng. Med. Biol. Mag, 1989. **June**: p. 22-25.
91. Wen, J.M., et al., *XPS study of surfac composition of a segmented polyurethane block copolymer modified by PDMS end groups and its blends with phonoxy*. Macromolecules, 1997. **30**: p. 7206-7213.
92. Grafahrend, D., et al., *Degradable polyester scaffolds with controlled surface chemistry combining minimal protein adsorption with specific bioactivation*. Nat Mater, 2011. **10**(1): p. 67-73.



CAPÍTULO 2: LA ESTRUCTURA DEL BIOMATERIAL

2.1 INTRODUCCIÓN

La industria de los biomateriales, tal y como se ha comentado en el capítulo anterior, será en un futuro próximo un mercado potencial debido, entre otros motivos, al progresivo envejecimiento de la población, potenciando y ayudando a la ingeniería de tejidos y a la medicina regenerativa. Para ello, es necesario que la integración del nuevo tejido formado sea la adecuada en el ambiente natural que le va a rodear. Aunque la administración de células por si solas tiene potencialidad para curar ciertos tipos de enfermedades, es necesario estimular dichas células para la formación de nuevos tejidos o estimular a las células locales para reponer los tejidos dañados [1]. Para obtener una correcta integración de los nuevos sistemas son necesarios unos soportes inteligentes fabricados con biomateriales que actúen como andamios para el crecimiento, no solo en el soporte físico, sino también en la integración, favoreciendo la diferenciación y el crecimiento tridimensional.

El desarrollo de andamios (*scaffolds*) que permitan la adhesión celular y el crecimiento de tejidos ha ganado especial importancia en los últimos 10 años [2-5]. Inicialmente, eran los biopolímeros orgánicos, especialmente el colágeno, los más usados como componentes principales para tales andamios [6, 7]. Sin embargo, estos materiales tienen limitaciones desde el punto de vista de sus propiedades mecánicas (especialmente cuando son sometidos a cargas de estrés)[8].

Se han realizado muchos esfuerzos para intentar solventar estas limitaciones desarrollando polímeros sintéticos que intenten solucionar los problemas descritos por los biopolímeros naturales. Estos polímeros deben ser biocompatibles y biodegradables, teniendo un marco complejo y una microestructura para el desarrollo del tejido [9, 10].

Un nuevo campo en los polímeros biodegradables son los llamados bioelastómeros (*Biorubbers*). En los últimos años ha habido un gran incremento en el número de artículos publicados sobre ellos y sus aplicaciones finales [10-17]. Estos polímeros muestran un comportamiento elastomérico similar a los cauchos comunes usados en la industria, pero con una biodegradabilidad que les permite ser usados como biopolímeros. Poseen propiedades como la compresión y la deformación, las cuales dan al material utilidad en aquello en lo que dichas propiedades mecánicas sean necesarias. Por ejemplo, pueden ser usados para solventar problemas donde el comportamiento elástico sea importante para unir la columna vertebral, o para desarrollar manguitos elastomérico para reemplazar venas dañadas [10].

Los dispositivos fabricados con materiales biodegradables presentan grandes ventajas y son una buena alternativa para fijaciones internas temporales, así como para diferentes tipos de tejidos dañados. Esto ha sido analizado en gran medida durante las primeras etapas del daño tisular (en hueso, tendón, músculo, piel, etc) [1, 3]. Los implantes biodegradables son capaces de mantener el tejido dañado en su lugar y, con el paso del tiempo, se descomponen progresivamente y la presión se transfiere gradualmente al nuevo tejido sano [8]. Una buena razón para utilizar este tipo de materiales es el hecho de que los dispositivos de cirugía biodegradables no requieren una operación para eliminar el material, lo que es sustancialmente beneficioso, tanto económicamente como para la calidad de vida y seguridad del paciente. Además, la corrosión, el fallo por fatiga y la liberación de iones metálicos, tales como el níquel o el cromo, causada por pérdidas del implante, pueden ocasionar reacciones alérgicas o cualquier otro malestar en pacientes que utilicen materiales no biodegradables como el titanio u otros similares, algo que no ocurrirá con estos nuevos biopolímeros.

Uno de los principales materiales usados como elastómeros es el poli (diol citrate), desarrollado recientemente por Guillermo Ameer y Robert Langer, el cual reúne unas buenas características de interés tanto de elasticidad como de biodegradabilidad [16, 18]. Este material será usado y desarrollado con nuevos métodos de síntesis en la presente tesis y se usará de base del desarrollo de las nuevas estructuras.

En la construcción de *scaffolds*, ya en el año 1999, Robert Langer desarrollo una espuma polimérica, utilizando sal como generador del poro comúnmente denominado *salt leaching*[19]. La técnica consiste en introducir partículas de sal en el interior de un prepolímero que, al ser curado, mantenga dichas partículas en el interior. Una vez que el polímero tenga la estructura deseada, se introduce en un disolvente, como puede ser el agua, para disolver estas partículas. Así, se obtiene una estructura interna con la forma de las partículas de sal [19](Figura 2.1).

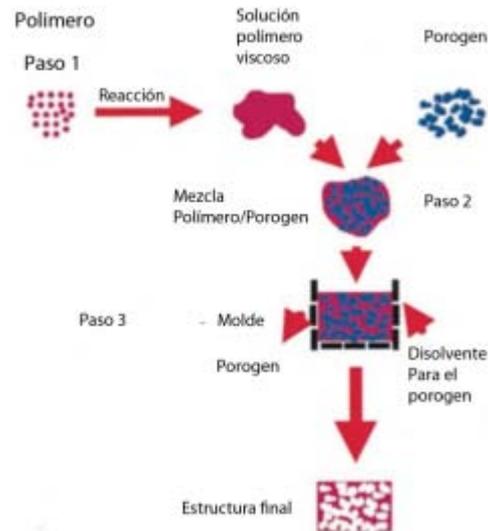


Figura 2.1: Método para la realización de scaffolds desarrollado por R. Langer en el año 1999. El método se conoce con el nombre de salt leaching

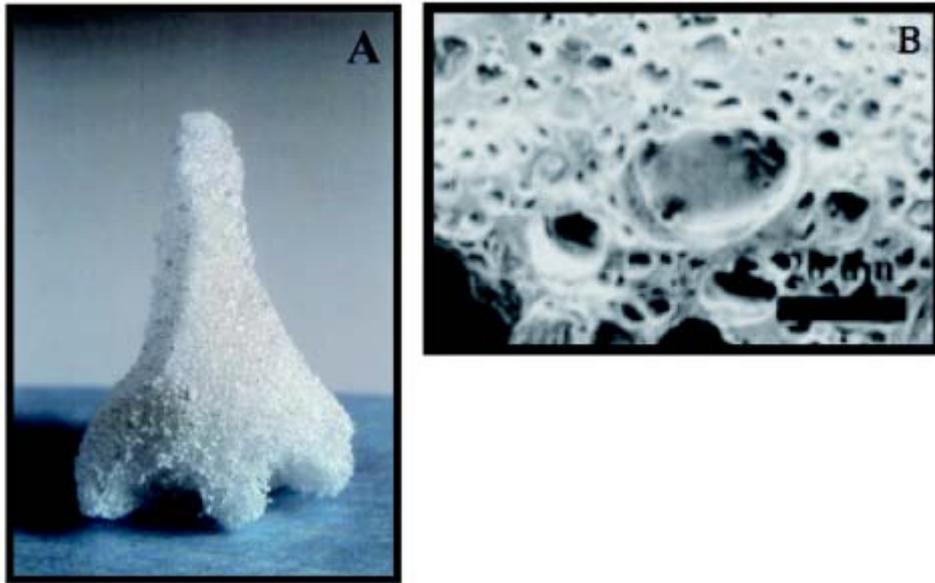


Figura 2.2 A) Nariz desarrollada mediante diseño por ordenador. B) Scaffold utilizando el método de salt Leaching

De esta forma se puede obtener cualquier tipo y forma de estructura (Figura 2.2) utilizando diseño por CAD (Computer-aided Design) para generar moldes que contengan la reticulación del polímero junto con la partículas, llamadas porógenos. El problema que presenta esta tecnología es la del control del poro interno, ya que es muy complicado obtener una interconectividad apropiada, y que permita la difusión de nutrientes y el oxígeno necesario para la supervivencia celular y para el desarrollo del nuevo tejido[19], como se ha indicado en el capítulo anterior.

Para solventar estos problemas existen técnicas nuevas de generación de matrices para confeccionar los *scaffolds*. El prototipado rápido ha ganado gran popularidad en los últimos años [20-22]. Esta técnica ofrece caminos para producir microestructuras controladas y regulares con un rango muy amplio de materiales y puede ser automatizada e integrada con las técnicas de imagen para producir *scaffolds* hechos a medida para cada paciente, incluyendo la construcción de las microestructuras, el tamaño de poro y la forma de la pieza. Pero estas técnicas, como se verá en el presente capítulo, no serán válidas en todas las ocasiones, teniendo que diseñar nuevos patrones de fabricación con materiales adaptados a las necesidades. Por ello, en el presente capítulo se desarrollan diferentes técnicas

para conseguir un andamio que tenga una interconectividad apropiada para la difusión tanto celular como de nutrientes, utilizando técnicas de *salt leaching* mejoradas, espumación de polímeros y prototipado rápido. Además, el *scaffold* perfecto debe cumplir una serie de características principales como el ser biodegradable, biocompatible, y poseer unas propiedades mecánicas que permitan la regeneración tisular.

2.2 OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

Dentro del presente capítulo se pretende realizar un andamio elastomérico, dado que los biomateriales existentes en la actualidad son poco apropiados para la regeneración de hueso y cartílago, pues ninguno presenta las propiedades de elasticidad y biodegradación requeridas. Recientemente se han comenzado a utilizar materiales elastoméricos biodegradables para estas aplicaciones, pero es necesario disponer de un abanico más amplio de biomateriales con biodegradabilidad, elasticidad y porosidad controladas.

Por ello, el objetivo del presente capítulo es el desarrollo de un andamio elastomérico, poroso, con biodegradación controlada, interconectado, y con unas propiedades superficiales que faciliten la interacción células-superficie, para que de esta forma sea óptimo como andamiaje (*scaffold*) en regeneración de tejidos. Este material se llamará *Biorubber*.

Para obtener el *biorubber* apropiado, en primer lugar se ha desarrollado un nuevo método de síntesis de este polímero mediante microondas, lo cual permite acelerar la reacción y, con ello, obtener nuevas estructuras.

En este capítulo se han desarrollado tres estructuras principales:

1. Un composite *Biorubber*/hidrogel desarrollado mediante la técnica de salt leaching para favorecer la regeneración.
2. Una espuma formada mediante el efecto de las microondas.
3. Un andamio estructurado para la ordenación celular interna.

De esta forma se persigue obtener la mejor estructura para cada función.

2.3 EL SCAFFOLD DE *BIORUBBER*

2.3.1 Introducción

2.3.1.1 La síntesis del biomaterial por microondas.

Una disciplina que poco a poco se va desarrollando en la actualidad es la ciencia de las microondas, la cual, en los últimos años, ha experimentado un importante aumento de uso en síntesis de laboratorio, por su rapidez y por la eliminación, en algunos casos, del uso de catalizadores y de otros compuestos ajenos a la reacción [23]. Es por ello que la síntesis por microondas es una buena herramienta para la fabricación de biomateriales limpios y de una forma rápida.

La irradiación por microondas se conoce desde los años 40, pero no fue hasta el 1986, con una publicación del profesor Richard Weddell y los profesores Raymond J. Giguere y George Majetich, cuando las microondas comenzaron a tomar parte en los laboratorios de química orgánica [24, 25]. Gedye y Giguere/majetich encontraron aplicación de la irradiación por microondas frente a las técnicas convencionales de calentamiento, ya que eran mucho más rápidas en la formación de los productos finales. Reacciones que normalmente tardan alrededor de 8 horas en completarse, con las microondas con unos minutos era suficiente.

Durante los años 80 y principio de los años 90, aparecieron algunas referencias acerca del uso de la irradiación por microondas, pero era una tecnología desconocida todavía [24, 26, 27]. El concepto de representación de reacciones en cortos períodos de tiempo con esta avanzada fuente de energía comenzó a tener éxito, pero no todo lo esperado debido, en gran parte, a la instrumentación que era necesaria. Los primeros hornos microondas que se utilizaron en estos primeros artículos eran hornos de cocina convencionales, los cuales no disponían de control para realizar reacciones de química orgánica en el laboratorio, por ejemplo, no disponían de sistemas de agitación, ni tampoco monitorización de temperatura. El control de la potencia también era algo de lo que carecían estos equipos. Como resultado, al usar estos microondas tan imprecisos, era complicado el poder reproducir las síntesis químicas y, además, había peligros de seguridad, pudiendo

explotar las reacciones en recipientes cerrados. Los generadores de microondas debían evolucionar para poder utilizarlos en investigación [28].

Todos estos retrocesos planteados con los primeros hornos microondas fueron solventados con el uso de hornos microondas de uso industrial, en los que, sí era posible la monitorización de la temperatura, además tenían agitación incorporada y un aparato conocido como el modo agitador, podía reducir el número de “puntos calientes” o poner alta o baja energía, para conseguir reproducir las condiciones. El uso de microondas industriales con sistemas de monitorización de presión, también aumentó la seguridad a la hora de usar los microondas en recipientes presurizados.

Había, sin embargo, una necesidad para explorar reacciones a pequeña escala. Una simple reacción de unos pocos mililitros proveía cambios para los microondas multimodo sin modificaciones. Para conseguir dirigir toda la energía al punto donde interesa, en reacciones de escala miligramo, a finales de los años 90 se desarrollaron los microondas monomodo [28].

La principal diferencia entre el nuevo monomodo y el anteriormente existente multimodo, es la generación de un simple modo (en contraposición de los múltiples modos) de energía durante los ciclos de irradiación. El microondas en una onda, constantemente en movimiento hacía adelante y en transición entre valores negativos y positivos. Como la onda se mueve, genera impulsos de alta energía o de baja energía como una onda en movimiento sin reforzar ni cancelar. Esto encabeza la presencia de campos de alta energía, baja energía y puntos en los que la cantidad de energía es igual a cero, lo que es llamado el nodo (Figura 2.3)



Figura 2.3: Modos y nodos en las microondas

En vez de permitir la presencia de los modos múltiples y los nodos de energía microondas, la cavidad del monomodo se diseña para una sola longitud de onda, donde se generará solamente un modo de energía microondas. La onda genera en el centro un campo electromagnético de alta intensidad, con una distribución homogénea de energía en la cavidad donde se produce la síntesis (Figura 2.4). En un sistema multimodo, hay muchos centros con alta intensidad energética, llamados puntos calientes, pero también hay muchos otros de baja energía, creando los llamados puntos fríos. El modo con agitación origina que las microondas se muevan alrededor de la cavidad, reduciendo en gran medida la diferencia entre puntos caliente y puntos fríos. Cuando se realizan reacciones en paralelo, o con grandes tamaños de muestra, la presencia de estas múltiples áreas de energía no es tan significativa, ya que las muestras son lo suficientemente grandes como para absorber eficientemente la energía existente. Pero, sin embargo, con muestras de menor tamaño, el cambio de una muestra de unos pocos mililitros en volumen dentro de la cavidad puede ser muy significativo, ya que no será capaz de absorber la energía y el rendimiento será muy bajo, con el resultado de un bajo perfil de calentamiento y una gran cantidad de energía perdida [29].

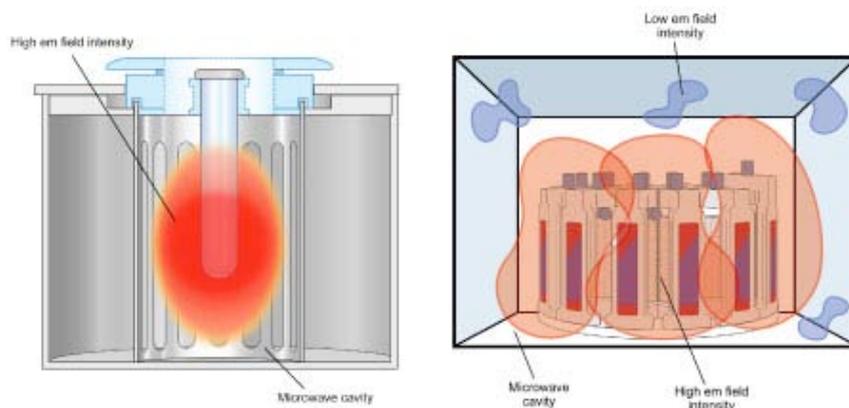


Figura 2.4: Distribución del nodo simple de energía en el monomodo vs generación de nodos el microondas multimodo.

La otra diferencia entre ambos modos es la densidad de energía. Aunque el monomodo tiene un máximo de potencia de 300 Watts, la cantidad de energía dada en una cantidad de espacio en la cavidad es muchísimo mayor. En el modo simple, sólo existe en un pequeño espacio, un área de energía de microondas, mientras que, por el contrario, en el multimodo hay varias áreas de energía, por lo que existe un aumento de energía por unidad de área. Como comparación, una cavidad típica de modo simple con un volumen de 0.5 l, puede generar 900 W/l con una potencia de 300 W aplicado a la reacción, mientras que el modo multimodo generará 20-25 W/l con 1200 W de energía aplicada. La irradiación por microondas es una forma de energía relativamente baja en el espectro electromagnético, por debajo de los rayos-X, Uv, Visible, e infrarrojo en el espectro de energía (Figura 2.5) con una frecuencia entre 300 y 300.000 MHz. Debido a ello, las ondas microondas provocan la rotación de los enlaces químicos, no su rotura [29].

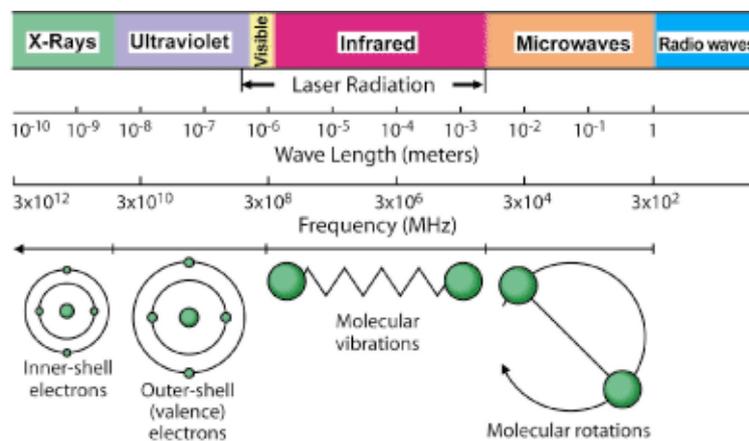


Figura 2.5: Espectro electromagnético

Cada disolvente y reactivo puede absorber las microondas de forma diferente. De ellas cada una tiene un grado diferente de polaridad dentro de la molécula, y por ello, le afectará más o menos por el cambio del campo de microondas. Un solvente que es muy polar, por ejemplo, tendrá un fuerte dipolo para causar más movimientos rotacionales en un esfuerzo por alinearse con el cambio de campo. Un componente que es menos polar, sin embargo, no se verá tan afectado por el cambio de campo, y por ello no absorberá muchas microondas. Desafortunadamente, la polaridad del solvente no es el único factor que determina

la verdadera absorbancia de la energía de microondas, pero proporciona una referencia. Muchos solventes orgánicos, pueden ser clasificados en tres categorías diferentes: baja, media o alta absorbancia, como se muestra en la Tabla 2.1 [30].

Tabla 2.1 Cuadro de disolventes

Nivel de absorbancia	Solventes
Alto	DMSO; EtOH; MeOH; Propanol; Nitrobenzeno; Ácido Fórmico; Etilen Glicol
Medio	Agua; DMF:NMP; Butanodiols; HMPA; Metil Etil Cetona; Nitrometano; o-Diclorobenceno; 2-metilHetoxtanol; Ácido acético; ácido Trifluoroacético
Bajo	Cloroformo; Diclorometano; Tetracloruro de Carbono; 1,4-Dioxano; THF; etil acetato; Piridina; trietilamina; Tolueno; Benceno; Clorobenceno; Xileno; Pentano; Hexano;

La energía transferida generada por la irradiación por microondas, tiene una gran velocidad, ocurre cada nanosegundo (10^{-9} segundos). La energía casi constante de entrada se consigue con un ratio mayor que la relajación de las moléculas, la cual tiene lugar en un tiempo del orden de 10^{-5} segundos. Debido a que la energía que se aporta al sistema evita la completa relajación molecular, todas las moléculas de la disolución estarán en constante desequilibrio. Esta situación da más que suficiente energía como para llegar a la barrera de la energía de activación (E_a) y conducir la reacción a su estado final (Figura 2.6)[29].

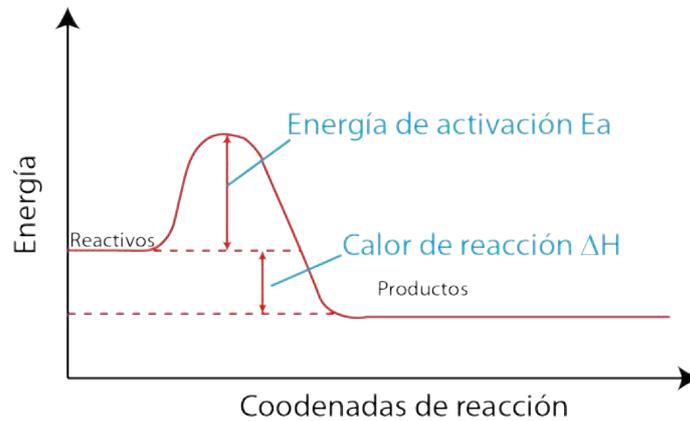


Figura 2.6: Necesidades energéticas en la reacción.

Como ejemplo de polimerización por microondas, comparado con la polimerización estándar, pueden encontrarse en la bibliografía algunos ejemplos explicativos. Uno de ellos es el polímero formado por el 1,4 butanediol (5 mmol), ácido succínico (5mmol) y el catalizador (0,1 mmol) (Figura 2.7) los cuales se ponen en un reactor y se irradian con un reactor monomodo. La mezcla se agita a 200°C bajo atmosfera de nitrógeno con una potencia máxima de 200 W. El polímero formado (el poli (butilen succinato, PBS)) se disuelve en cloroformo y se precipita en metanol. En el caso de la solución polimerizada, se añade decalina (5 mmol de reactivo por 10 ml de decalina) a la mezcla de reacción para atrapar el agua. Para comparar la polimerización bajo condiciones normales, se ha realizado la síntesis durante 5 horas en un baño de aceite precalentado a 200°C. El PBS se disolvió en cloroformo y precipitó también en metanol. Se ha encontrado que bajo la irradiación de microondas, el PBS se consiguió en 20 minutos con un peso molecular (M_w) de 1.03-1.04 g/mol, mientras que bajo condiciones normales, un valor similar de peso molecular medio se obtuvo a las 5 horas de reacción. Los resultados cinéticos de la síntesis del PBS por calefacción convencional e irradiación por microondas se muestran en la Figura 2.8 [31].

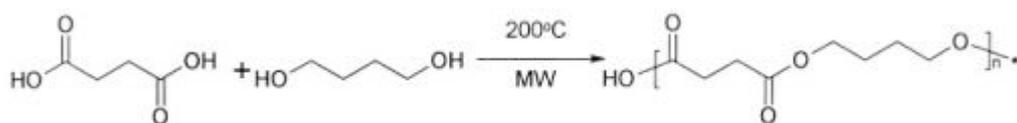


Figura 2.7. Reacción de polimerización del 1,4 butanediol con el ácido succínico.

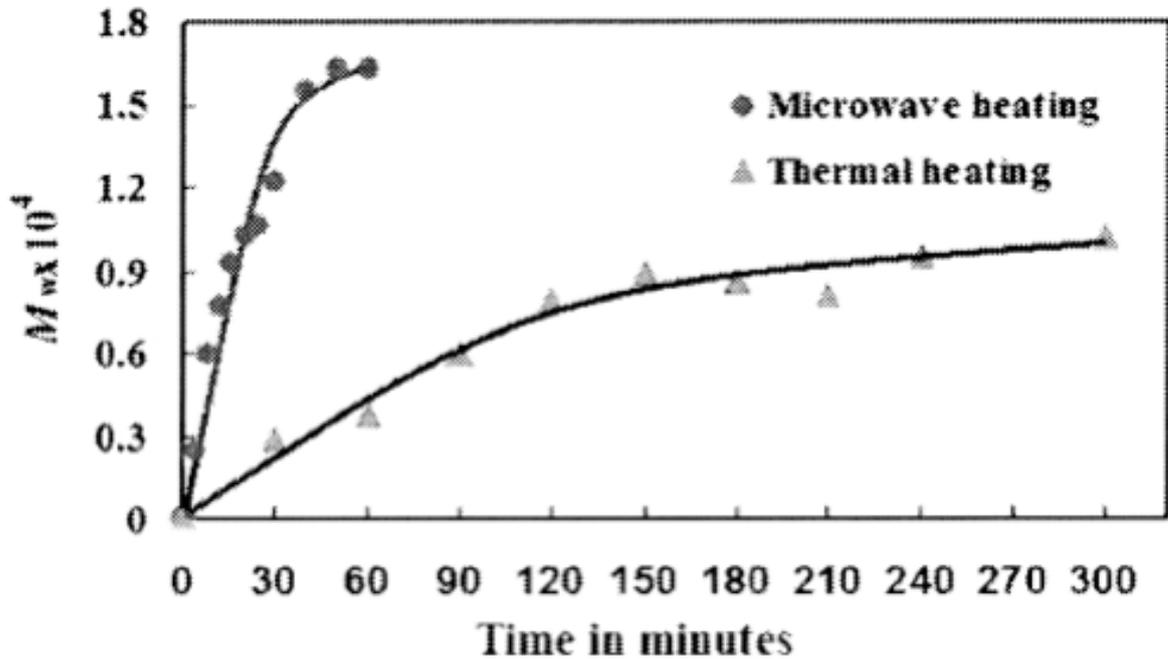


Figura 2.8: Diferencia de tiempo a la hora de realizar la síntesis mediante la reacción con microondas (el más corto) y la reacción en condiciones normales.

Viendo la posible eficiencia de las microondas en la síntesis orgánica, se ha optado por utilizar este sistema en la síntesis del poli (diol citrate) con el objetivo de disminuir el tiempo de reacción de formación de dicho polímero, denominado *biorubber*, a la vez que se elimina el uso de catalizadores y/o disolvente.

2.3.1.2 El composite utilizado.

Aprovechando los avances descritos en la ciencia de las microondas, se ha desarrollado un *scaffold* estructural para cumplir con los requerimientos mecánicos en zonas exigentes de implante. Pero es importante crear un ambiente tridimensional en el cual las células puedan proliferar y diferenciarse para la regeneración de tejidos. Por ello, además del biomaterial elastomérico se añade a

la composición un hidrogel autoensamblable que genera el microambiente necesario para tal efecto.

El colágeno I autoensamblable generado por la matriz dérmica, un andamio natural blando con tamaño de poros en el rango de las 50-200 nm [32], está siendo estudiado por la bioingeniería del tejidos blandos para su empleo como sustituto de los mismos. Dentro del amplio rango de materiales de estudio destacan las matrices polipeptídicas autoensamblables, algunas de ellas comerciales en la actualidad. Uno de estos materiales es el RAD 16-I, un péptido AcN-(RADA)₄-CONH₂, que se autoensambla para formar un hidrogel de estructura tridimensional, que imita la matriz extracelular [33]. Este péptido se ha utilizado satisfactoriamente para el crecimiento de hepatocitos, tejido nervioso, condrocitos, células endoteliales, células madre mesenquimales, fibroblastos y otros tipos celulares [33-38]. También se ha visto que este material no es tóxico *in vivo* y que favorece la regeneración de hueso en defectos calvarios de hueso [39, 40]. Sin embargo, una limitación importante de este péptido es la tendencia a romperse bajo estrés mecánico.

Por ello, para mejorar sus propiedades mecánicas, se ha usado un material compuesto formado por el RAD 16-I [41] y el *scaffold* de biorrubber poroso anteriormente descrito [18]. Las características distintivas del composite propuesto se basan en que está constituido por un material con una estructura tridimensional, formada por las nanofibras del RAD 16-I, el cual dará el microambiente a las células para el crecimiento celular, y un material microporoso, como el *biorubber*, que le dará las propiedades mecánicas.

Para el seguimiento de los experimentos se empleó un procedimiento de imagen por bioluminiscencia, basado en la detección de los fotones de luz visible generados por la luciferasa expresada por las células implantadas, la cual es un excelente método para garantizar la viabilidad de la combinación célula-*scaffold* [42]. La luciferasa de *Photinus pyralis* (PLuc) cataliza la oxidación de la luciferasa en la presencia de ATP y coenzima A, produciendo luz y CO₂.

En este capítulo se ha empleado la técnica de imagen por bioluminiscencia (BLI) para el estudio de la proliferación de la expresión de PLuc de fibroblastos

embrionarios de ratón, cultivados, por un lado, en RAD 16-I y, por otro, en el composite RAD16-I/*biorubber* para evaluar la biocompatibilidad de uso de este material poroso.

2.3.2 Plan de trabajo

En primer lugar se ha intentado obtener un *biorubber* poroso que permita el crecimiento celular en el interior, intentando demostrar de esta forma la biocompatibilidad del *biorubber* y la biodegradabilidad *in vivo*. Además, con este método se pretende mejorar las propiedades mecánicas de un hidrogel mediante la combinación con un material elastomérico poroso.

Para ello, se han realizado dos procedimientos diferentes:

El primer desarrollo se ha realizado en colaboración con el grupo del Dr. Carlos E. Semino del IQS y el grupo del Dr. Jerónimo Blanco, del centro de investigaciones cardiovasculares (CSIC-ICCC) del hospital de la Santa Creu i Sant Pau, en el que se ha obtenido un *biorubber* poroso mediante la técnica del salt leaching, realizado mediante microondas.

En el segundo caso se ha colaborado con el Dr Mikael Wendel y el Dr. Ion Tcacencu, del Centro de Biología Oral (COB) en el Instituto Karolinska de Estocolmo, en donde se han realizado las pruebas *in vivo* del nuevo *scaffold* que se ha obtenido mediante una prensa térmica.

2.3.3 Materiales y métodos.

2.3.3.1 Síntesis de la alternativa uno

Para realizar los experimentos se han utilizado dos tipos diferentes de materiales: un *scaffold* formado por nanofibras peptídicas de 16 aminoácidos (RAD 16-I) [18, 38-41] (Puramatrix_, BD, Erembodegem, Bélgica) y un composite formado por el RAD 16-I y el *biorubber* [21], una estructura porosa de poli (diol citrato). El *biorubber* poroso se produjo mediante 4 etapas: La síntesis del prepolímero, la preparación de un porogen, usado como máscara, el curado del prepolímero y la extracción del porogen usando un disolvente apolar. El prepolímero se obtuvo

mezclando en un vial 1,3 g de ácido cítrico (Sigma) (6,8 M) y 1 g de 1,8 octanodiol (Sigma) (6,8 M). El vial se selló y se introdujo en el microondas (CEM Discovery, Mathews, NC, USA) donde se calentó a 100°C durante 6 minutos, con agitación, para crear el prepolímero. La estructura del porogen, está constituida por esferas de poliestireno de 200 micras (Goodfellow, Huntington, R.U.) que se ensamblaron unas con otras mediante el sinterizado por microondas durante 2 minutos, este le dará la porosidad necesaria al polímero final (Figura 2.9). Seguidamente, se añadieron 10 ml del prepolímero a la máscara de porogen, cuyas medidas son 13,5 mm de diámetro y 50 mm de alto, y la mezcla se curó a 120°C, en un desecador de vacío durante 4 días para terminar de reticular el *biorubber* y obtener así las propiedades finales. Finalmente, la máscara de poliestireno, se extrajo con tolueno y se cortó con las dimensiones deseadas. La microestructura del *biorubber* se caracterizó con la ayuda de un Microscopio electrónico de Barrido (SEM). Para ello, el *biorubber* se congeló con nitrógeno líquido y se rompió sin deformar la estructura del material. El *biorubber* se recubrió con una capa de oro y se analizó usando un JEOL *scanning electron microscope* (JSM-5310).

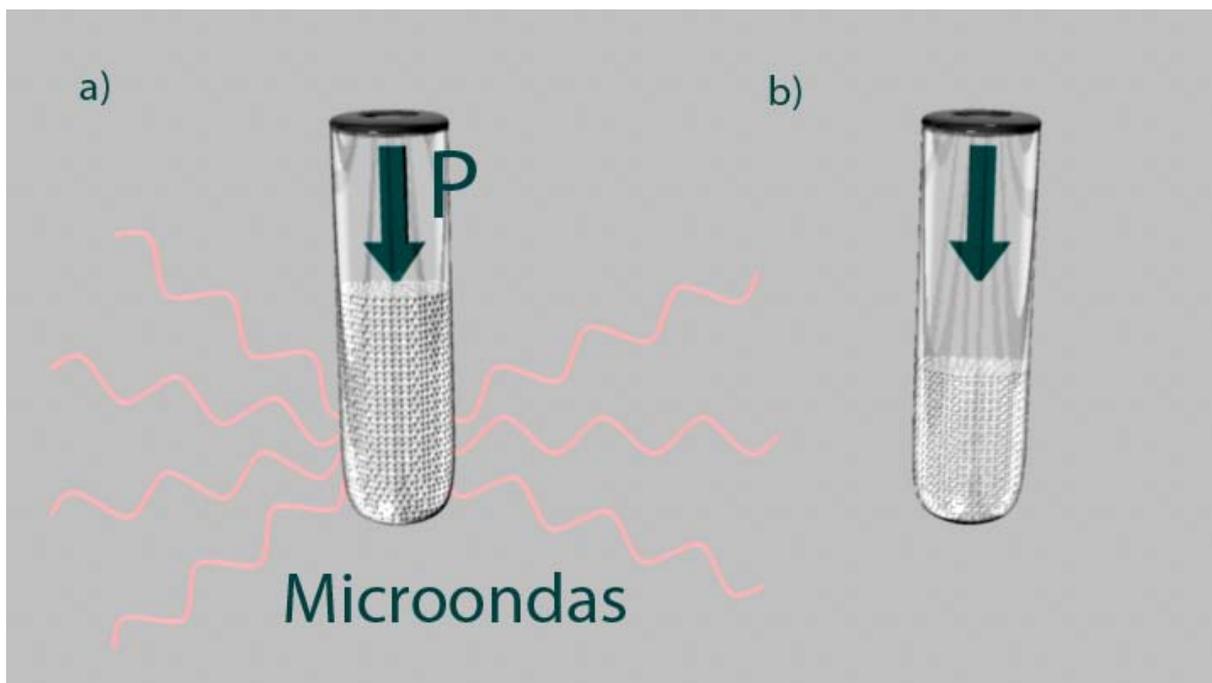


Figura 2.9: Esquema de la fabricación de la máscara con microondas. El sinterizado se realizó en un recipiente cerrado, donde al aplicar la temperatura por microondas, la presión aumenta y permite aprovechando la temperatura la semifusión entre las partículas.

2.3.3.2 Pruebas *in vivo*

Las pruebas *in vivo* se realizaron en el Hospital de San Pau, en el laboratorio del Dr. Jerónimo Blanco. Los MEFs (Mouse embryonic fibroblasts) utilizados en las pruebas *in vitro* fueron aislados de embriones C57BL/6 de 14 semanas, obtenidos de la ATCC (Manassas, VA, EE.UU.) expandidos en medio de fibroblastos, con DMEM con alta concentración de glucosa, suplementado con 15% (v/v) de FBS (Suero Fetal Bovino), 4mM L-Glutamina, 50 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml streptomina. Después de la expansión, las células fueron tripsinizadas de un flask de 75 cm², suspendidas en sacarosa al 10%, y mezcladas con el péptido autoensamblable RAD 16-I 0,5% (BD, Eremblodegem, Bélgica) para obtener una concentración final de células de 2·10⁶ células/ml y 0,25% de RAD 16-I. Para cultivar los MEFs.Pluc en el composite, RAD 16-I/*biorubber*, el biomaterial se introdujo en inserts (Millipore) y se sembró sobre el *biorubber* una suspensión de (2·10⁶ células/ml en RAD 16-I para que ocupasen los poros del sistema.

La incubación del RAD16-I y RAD16-I + *biorubber* se llevó a cabo a 5°C con 5% de CO₂ y se cambiaba el medio cada 2 días. El cultivo se llevó a cabo durante 15 días, antes de ser introducidos en los ratones.

Los ratones utilizados para evaluar la biocompatibilidad fueron BALB/cAnNCrI de 6 semanas y para monitorizar el comportamiento *in vivo* de los MEFs-Pluc solos o sembrados en el composite se utilizaron ratones BALB/c homocigotos nude (Nu/nu) de 6 semanas. Todos los animales fueron comprados a Charles-River (Wilmington, MA, EE.UU.). Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de cuidado animal del Centro de Investigación Cardiovascular del Gobierno de Cataluña.

Antes de la implantación, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de ketamina (Merail, Duluth, GA) y 3.3 mg/kg cilacine (Henry Schein, Melville, NY) y una inyección analgésica subcutánea de 0,05 mg/kg de buprenorfina (Schering-Plough, Kenilworth, NJ) Se llevaron a cabo 4 implantes en cada uno de los ratones, dos subcutáneos (SC) en la parte trasera y uno intramuscular (IM) en cada muslo. En el lado derecho se implantó Puramatrix gel o

Puramatrix gel+ MEFs. Pluc y en el lado izquierdo puramatrix+*biorubber* o Puramatrix+*biorubber*+MEFs-Pluc.

2.3.3.3 Síntesis de la alternativa segunda

Como segunda opción en la porosidad de la muestra se optó por utilizar un porogen similar al anterior pero con una pequeña variante. Se intentó que la malla de poliestireno fuese una malla unida físicamente entre las diferentes partículas. Para ello, se utilizó una prensa térmica con el objetivo de conseguir una fusión entre las diferentes partículas de poliestireno. Aprovechando que éste es un material termoplástico, al aplicarle una temperatura entre 50 y 100°C se consiguió que las partículas se fusionaran entre sí, permitiendo de esta forma que existiera una unión física que al añadir el prepolímero no se separará, consiguiendo una mayor conectividad en el polímero final (Figura 2.10).

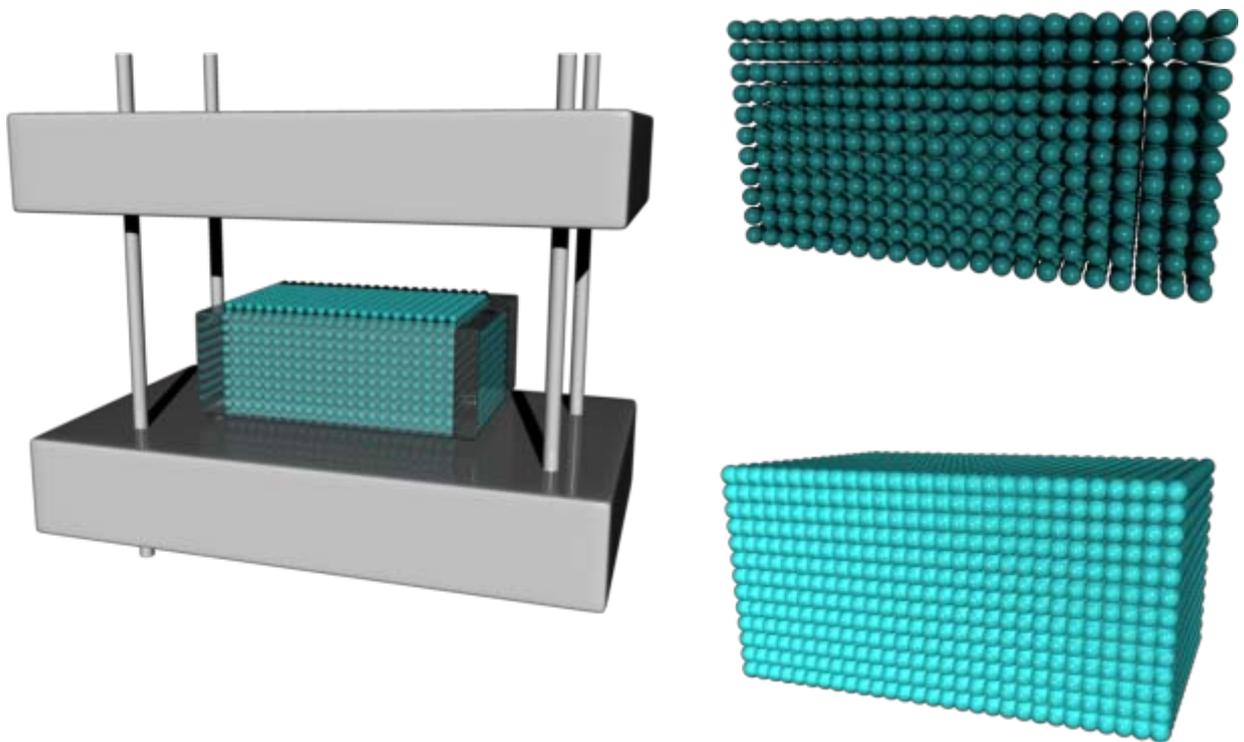


Figura 2.10: Esquema de fabricación de las muestras los porogenes. La prensa ejerce presión sobre un molde a la vez que se aplica calor para sinterizar las partículas. Las partículas de poliestireno, gracias a la presión y al calor ejercidos, se unen, dejando huecos que serán rellenados por el *biorubber* en la posterior etapa.

Se realizaron tres mallas diferentes con la prensa térmica en la que se variaron el tiempo de prensado, la temperatura y la presión ejercida (Tabla 2.3)

Tabla 2.3: Condiciones empleadas en el desarrollo de las malla para fabricar los *scaffold* de *biorubber*.

Muestra	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Presión (kg/cm ²)
1	30	100	6
2	20	70	5,5
3	20	50	5,5

Una vez obtenida la malla se procedió a sintetizar el *biorubber*. El sintetizado de la muestra final se realizó de la misma forma que en la muestra anterior.

2.3.3.4 Pruebas *in vivo* de las segunda alternativa

Las pruebas *in vivo* del composite se realizaron en el Karolinska Institute de la mano del Dr. Ion Tcacencu del grupo del Dr. Mikael Wenden del Centre for Oral Biology (COB).

Se operaron 3 ratas macho Sprague-Dawley con el *biorubber*. Las ratas fueron anestesiadas usando un inhalador de isoflurano (4% induction, 2-3% maintenance). Se afeitó la cabeza de las ratas y se lavaron con una solución de iodo. Se separó la piel y las capas subcutáneas, incluido el músculo temporal, para exponer el hueso calvario. Se creó un defecto circular de 8 mm y transóseo en el lado izquierdo de la región parietal, usando un taladro trépano y con un enfriamiento con medio salino. El defecto se cubrió con un disco estéril del composite (~40 mg, ~8 mm de diámetro). El disco se mantuvo en una solución salina al 0.9% antes de la implantación (Figura 2.11).

Tras la operación, la incisión fue cerrada con una sutura simple de dos capas. Las ratas fueron sacrificadas por inhalación de CO₂ 12 semanas tras la operación. Para el análisis histológico se recolecto el hueso calvario.

A su vez se analizó la biodegradación del material y la biocompatibilidad del mismo mediante microscopía óptica.

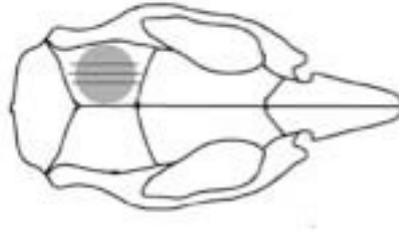


Figura 2.11: Esquema del defecto calvario que se efectuó, sobre el que se realiza la incisión y se pone el implante de *biorubber*.

2.3.4 Resultados y discusión.

En primer lugar se sintetizó el *scaffold* de *biorubber*. Para ello existen dos métodos, por un lado, está el método convencional con un reactor con camisa y con un catalizador [16, 18] y por otro lado se tiene el reactor de microondas. Comparar los dos métodos es arduo debido a la gran diferencia de tiempo existente entre uno y otro. Mientras que el tiempo necesario para precurar el *biorubber* por el método tradicional es de 8 horas a 120°C junto a una post-polimerización de 4 días a 80 grados [16], en el caso del microondas en tan solo 3 minutos se obtienen unos grados de reticulación necesarios para la síntesis del material. Posteriormente, se postcura a 140°C durante 24 h para eliminar las posibles burbujas de agua del material que se generan a causa de la policondensación.

Una vez se obtuvo el polímero se procedió a la confirmación mediante un análisis por infrarrojo (IR) de que la polimerización era la correcta. En el análisis por infrarrojo se comprobó que efectivamente la policondensación tuvo lugar. El ácido cítrico antes de la polimerización muestra una banda en 1.710 cm^{-1} del ácido carboxílico, que es su grupo más característico. En este punto aparece un hombro que corresponde tanto a los carboxilo libres como a los asociados. El 1,8 octanodiol muestra la banda en 1.050 cm^{-1} , perteneciente al grupo hidroxilo el cual también se ve antes de que ocurra la polimerización. Por último, en el Poli (diol citrate) el grupo más característico, y que difiere de los otros, es el grupo éster, cuya banda de absorción está en 1.735 cm^{-1} (Figura 2.12).

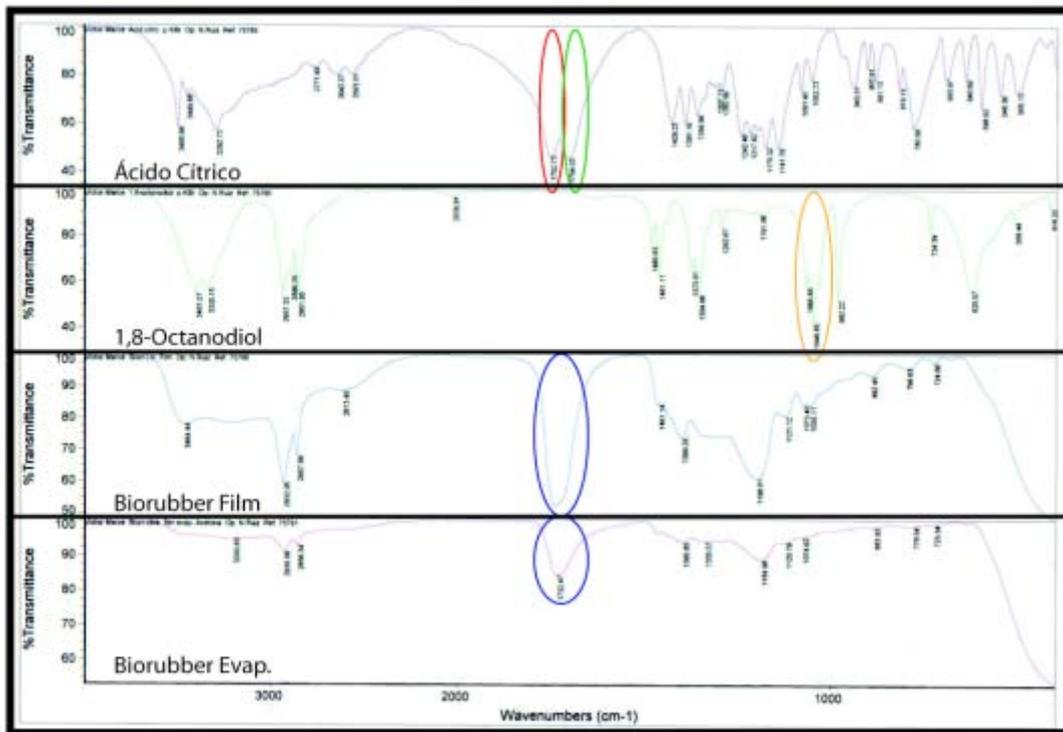


Figura 2.12 Espectro de infrarrojos, en el que se pueden ver todos los elementos que toman parte en la reacción de polimerización del poli (diol citrato).

Para comprobar el efecto de las microondas en la reacción que tiene lugar en la policondesación del *biorubber*, se realizó un experimento en el que, tomando el mismo tiempo de reacción, se utilizaron diferentes potencias de microondas. Para poder realizarlo se utilizó aire comprimido, lo que enfrió la mezcla de reacción para poder así mantener la temperatura prefijada, con lo que se consiguió que la potencia de microondas fuera lo máxima posible a lo largo de todo el tiempo. En la Figura 2.13a se puede ver cómo al usar el power max con aire comprimido el efecto de las microondas (Línea roja) es mucho mayor que en la Figura 2.13b. Como se puede ver en la Figura 2.13a este efecto produce una mayor reticulación en el *biorubber* y, por consiguiente, una solidificación del mismo; además el color amarillento, y en algunas zonas marrón, indica una reticulación excesiva del material, que llegó a quemarse. Por el contrario, en la Figura 2.13b se puede ver como el *biorubber* sigue siendo líquido y de un color blanquecido, no habiendo obtenido el *biorubber* solidificado.

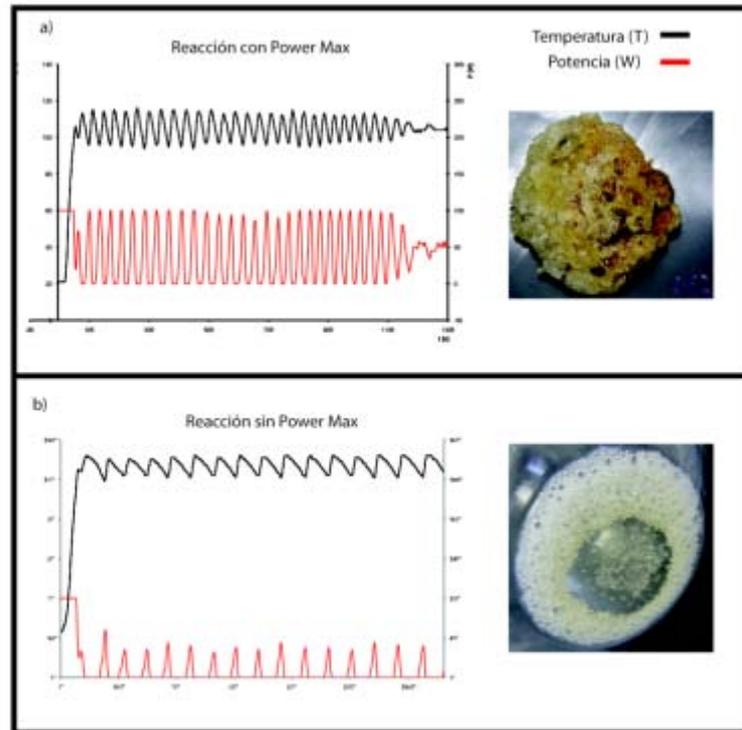


Figura 2.13: Efecto de las microondas en la síntesis del poli (diol citrato). a) síntesis de microondas aprovechando el efecto de las microondas donde se aplicó aire comprimido para enfriar el reactor y así aplicar más ondas microondas. b) Síntesis donde no se aplica aire comprimido, con lo que las ondas microondas actúan de menor forma.

La síntesis del biomaterial por tanto quedó resuelta mediante las ondas microondas, con la consiguiente ventaja en tiempo y en eliminación de catalizadores, con respecto al método tradicional.

A continuación se procedió a caracterizar mecánicamente el composite péptido/*scaffold* obtenido mediante la técnica de salt Leaching,

El análisis del esfuerzo cortante del hidrogel RAD 16-I (Figura 2.14a) mostró que el material mantenía su estructura hasta un valor de 9 Pa, después del cual la velocidad de flujo aumentaba drásticamente, produciéndose el comportamiento típico de un hidrogel reticulado. Para proteger la estructura integral del RAD 16-I y ganar deformación mecánica, se generó un composite poroso formado por RAD-16-I/*biorubber* que combinase las características de crecimiento celular del RAD 16-I y el comportamiento del *biorubber* típico de los elastómeros. Con la presencia del RAD 16-I se produjo una pequeña reducción del módulo elástico y del límite elástico de compresión, probablemente debido al efecto plastificante del RAD 16-I. El límite elástico de compresión del composite es considerablemente más alto (25000 Pa) que el del RAD 16-I solo (9 Pa). Además, un análisis de fluencia (creep)

mostró el comportamiento a la deformación por compresión, el cual también es característico de materiales elastoméricos (Figura 2.14c), viéndose en el RAD 16-I /*biorubber* una ligera reducción de resistencia a la deformación.

La caracterización estructural del *biorubber* por SEM muestra una uniformidad razonable en la distribución de los tamaños de poro (100-150 micras), que está dentro del rango de tamaño de células, pero con una baja interconectividad de poro.

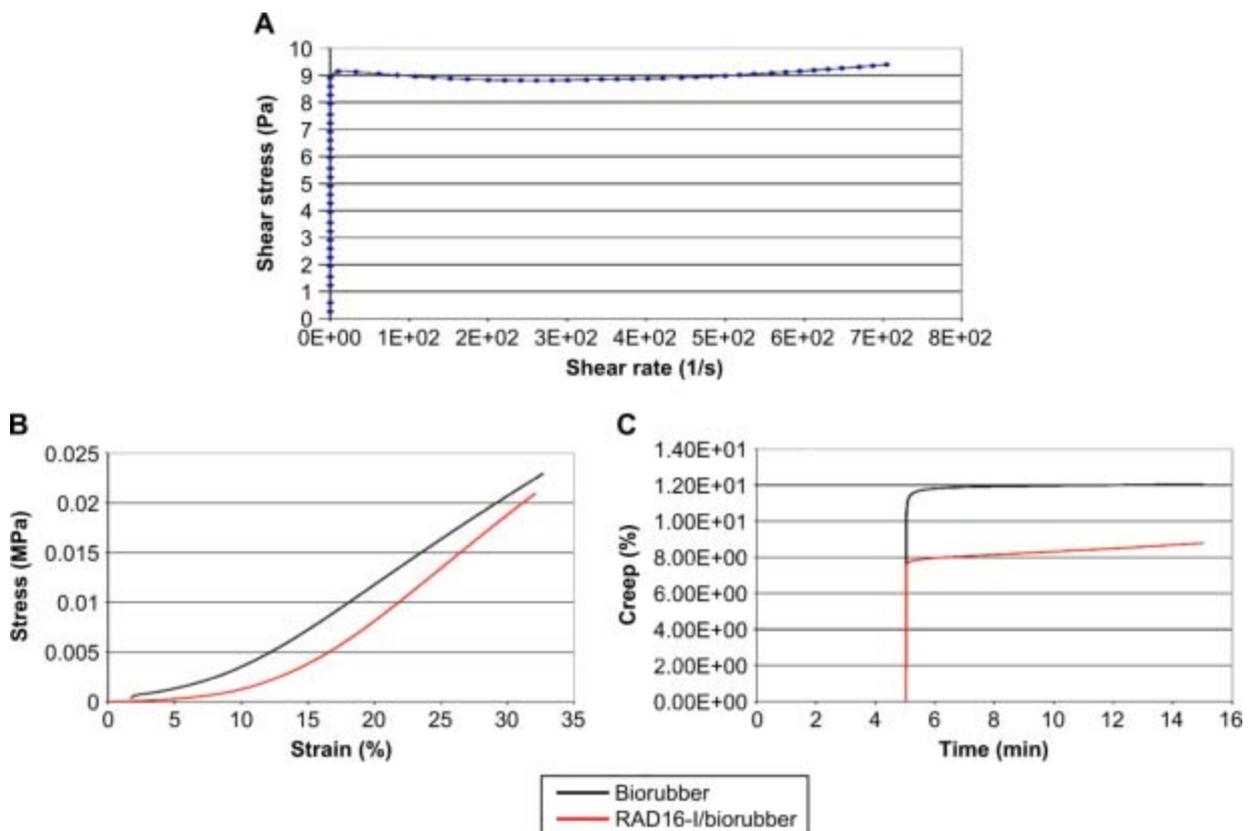


Figura 2.14: Propiedades mecánicas del RAD 16-I y RAD 16-I/*Biorubber*. A) Curva de geometría, esfuerzo cortantes vs Resistencia a la torsión B) Tensión de compresión vs Fatiga c) Comportamiento a una tensión constante del *biorubber* y del composite RAD 16-I/*biorubber*

Las células se sembraron en RAD 16-I y en el composite RAD 16-I/*Biorubber* y se mantuvieron durante tres meses *in vitro*. La distribución de células dentro de los dos *scaffolds* se analizó mediante tinciones de hematoxilina-eosina de secciones histológicas (10 μm de espesor). En la Figura 2.15 A-D se muestra que, mientras que las células G·Luc-C57BL/6 sembradas en el hidrogel RAD 16-I retienen una morfología redonda y crecen formando clusters dentro del biomaterial (Figura 2.15c), las mismas células sembradas en el composite ni penetran en el *biorubber*

ni se adhieren a la superficie del material, pero colonizan solo el hidrogel RAD 16-I (Figura 2.15a, b). Además el *biorubber* parece desempeñar un papel estructural solamente (Figura 2.15d). El SEM (Figura 2.15e y f) realizado al *biorubber* sólo muestra un tamaño de poro entre las 100 y 150 μm .

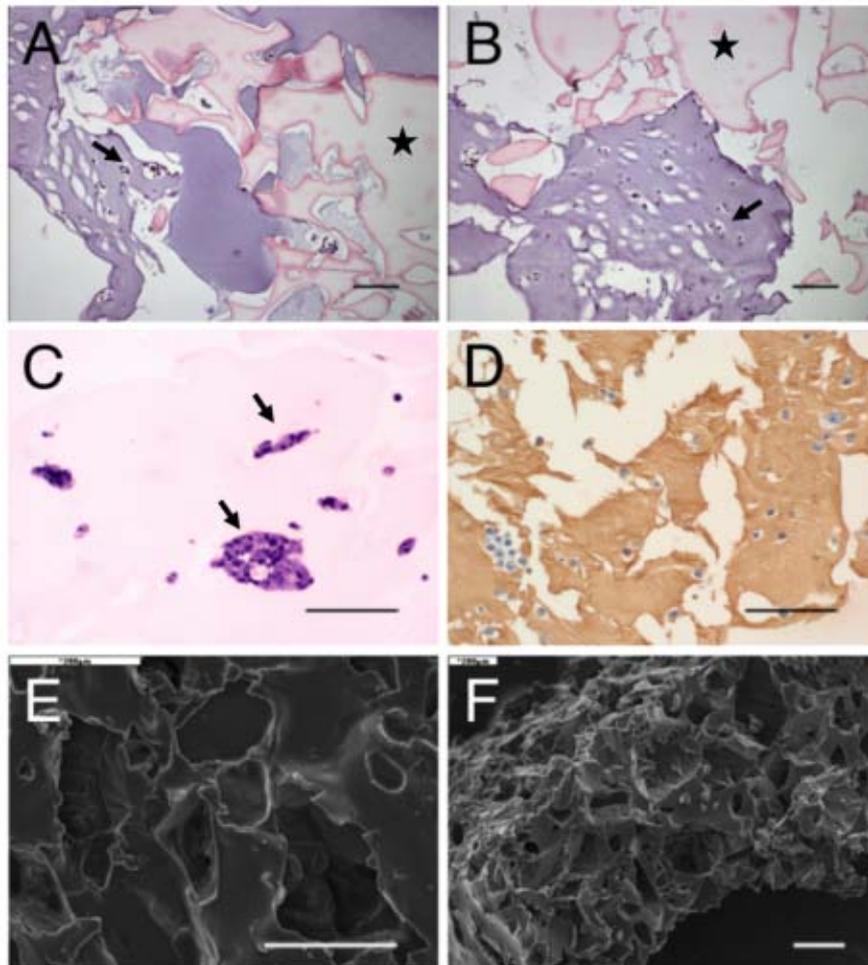


Figura 2.15: Cultivo de células *In vitro* en el Hidrogel RAD 16 I y el composite RAD 16 I/*biorubber*. (A, B) se añadieron Células G·Luc-C57BL/6 suspendidas en el Péptido RAD 16-I al *biorubber* y después fueron mezcladas con el medio de cultivo para inducir la gelificación del RAD 16-I. Una vez curado el hidrogel, las muestras se fijaron, se deshidrataron y se embebieron en parafina para poderlas cortar. Posteriormente se tiñeron como hematoxilina-eosina donde se muestran las células en el hidrogel (flecha) pero no en el *biorubber* (estrella). (C) Clusters de células (flecha) en las secciones de Rad 16_I sembradas con células G·Luc-C57BL/6 teñidas con hematoxilina-eosina. (D) Secciones del Hidrogel sembrado con células G·Luc-C57BL/6 y cultivadas *in vitro*. Se detectó una biotinización del RAD 16 Ib con el tinte de ABC y de células con el tinte con hematoxilina-eosina. (E,F) Imágenes de Microscopía electrónica de barrido del *biorubber* roto con nitrógeno líquido y recubierto con oro.

Para determinar la posibilidad de generación de inmunorespuestas a los biomateriales del estudio, los materiales RAD 16-I y el composite se han implantado subcutánea e intramuscularmente en seis ratones inmunocompetentes BALB/c. Los implantes se han recogido con 15, 30 y 45 días post-implantación. No existe ninguna señal macroscópica de inflamación o rechazo en ninguno de los lugares implantados para el ensayo. Además, los nódulos linfáticos tenían una apariencia y un tamaño normal en todos los animales. Para el análisis se han realizado secciones de parafina de los implantes intramuscular (IM) que se tiñeron con hematoxilina -eosina (Figura 2.16) y se probaron con la tinción ABC para localizar la etiqueta de biotina del RAD 16-I. Sin embargo, no se detectó ninguna señal de RAD 16-I en las secciones de tejido desde los implantes más tempranos (15 días) a los más tardíos (45 días) lo que indica que los péptidos fueron degradados y eliminados. Por el contrario, el *biorubber* se detecta claramente en la tinción hematoxilina eosina, y no muestra señales de degradación mientras se implanta en el tejido muscular (Figura 2.16 a-f) o en la cavidad subcutánea (SC). Aunque se observa una capa de tejido fibrótico alrededor el *biorubber* (Figura 2.16 a-d), y algunas células huésped que parecen haber migrado al *scaffold* (Figura 2.16 e y f), no hay señales de respuesta inmune basada en la infiltración de linfocitos del cuerpo.

Como es normal, se realizó una evaluación macroscópica de los implantes en ratones inmunodeficientes BALB/c nu/nu para ver señales de rechazo o reacciones inflamatorias (Figura 2.17 H, I, K y L) y sólo en el *biorubber*, pero no el RAD16-I, se han detectado en los implantes IM y SC. En este caso, también se ha detectado una capa de tejido fibrótico.

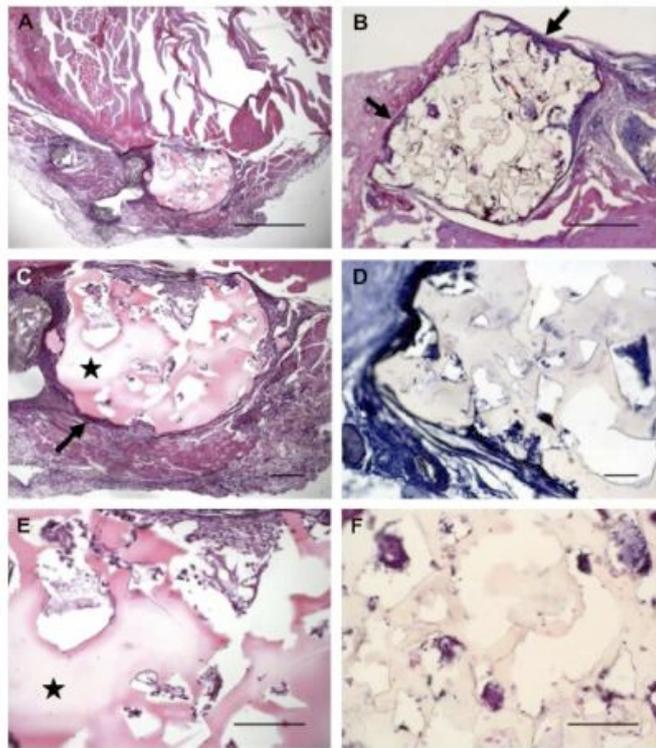


Figura 2.16: Histología de los implantes en los ratones Balb/c. Secciones de tejido (10 micras) de los implantes intramusculares a los 15 días (A,B,C) o 45 días (B,D,F) después de la implantación, se tiñó con hematoxilina-eosina (A-C, E,F) o con biotina más hematoxilina (D). El RAD 16-IB no se detectó, mientras que el *biorubber* (estrella en C,D) estaba presente en todas las secciones del implante de RAD 1-1/*biorubber*. La flecha (B,C) indica la capa fibrótica situada en el *scaffold* de *biorubber*.

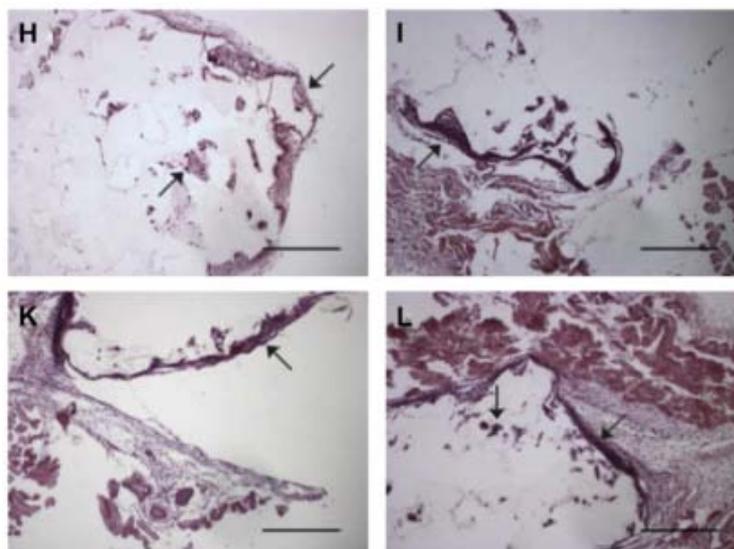


Figura 2.17: Histología de los implantes en ratones BALB/c un/un. (H,I,K,L) Se muestran Tinciones de hematoxilina-eosina de las secciones de *biorubber* después de 90 días, de los implantes en ratones con los *scaffolds* RAD 16-1/*Biorubber*, y la presencia de un tejido fibrótico producido en los implantes (flecha)

La clave de estos análisis fue el uso de un modelo basado en unas técnicas no invasivas de imagen por bioluminiscencia de luciferasa, para detectar las células sembradas en el *scaffold* y para analizar la aplicación del RAD 16-I (12-18) y del composite RAD 16-I/*Biorubber* en la regeneración de tejidos. Se utilizaron embriones de fibroblastos de ratón C57Bl/c, capaces de crecer y diferenciarse *in vitro* a células osteogénicas en el hidrogel RAD 16-I (13, 31) , y así analizar la capacidad del material para sustentar el crecimiento de las células *in vivo*. A pesar de su buena capacidad para mantener la proliferación, la baja resistencia al shear stress (9 Pa) del RAD 16-I podría dar lugar a una rápida degradación del *scaffold* y por tanto una importante restricción para sus aplicaciones en muchos tejidos. Para evitar este inconveniente se combinó el RAD 16-I con un elastómero biodegradable, que posee unas mejores características de shear-stress (25000Ps) dentro del rango de tejidos animales (cerebro: 100-200 Pa, cartilago del disco (nucleo pulposo): 300- 400 Pa, esqueleto y músculo cardiaco: 3000-4000 Pa, cartilago: 1-10 MPa) y una relativa uniformidad en la distribución del tamaño de poro (100-150 micras)

In vitro, las células C57BL/6 se agregaron por infección con vectores lentivirales para la expresión de PLuc y EGFP (G·Luc-C57BL/6), produciendo 7,6 RLU¹s/células de forma estable a través de la duración del experimento (90 días) Las células implantadas *in vivo* se detectan con gran facilidad, y el análisis de imágenes por BLI, desde un predeterminado número de células G·Luc-C57BL/6 implantadas en el muslo de los ratones BALB/c nu/nu, muestra que es posible detectar un mínimo de 1000 células y que hubo una correlación lineal entre la cantidad de luz detectada y el número de células implantadas, con una inclinación de 24,8 PHC/célula². La capacidad del RAD 16-I y del composite RAD 16-I/*biorubber* para soportar el crecimiento de células G·Luc-C57BL/6 fue analizado

¹ Relative lighth units

² Period to acquire photons

primero *in vitro* y luego, *in vivo* por imagen BLI de células sembradas en el *scaffold* e implantadas, IM o SC, en ratones BALB/c nu/nu. *In vitro*, las células G-Luc-C57BL/6 penetraron el hidrogel RAD 16_I y crecieron formando cluster [13]. Sin embargo, no se observaron células dentro del *biorubber*, sugiriendo que, aunque el *biorubber* es no tóxico para las células, algunas de las características del *scaffold*, tal como la interconectividad de los poros, la estructura de la superficie o la composición, limitaron la colonización y la penetración de las células [32]. La supervivencia de las células implantadas en ratones fue condicionada por el lugar de la implantación. Además, en los implantes SC, las células G-Luc-C57BL/6 fueron incapaces de sobrevivir hasta el final del experimento, sin considerar si las células se sembraron o no en scaffolds [19].

En cambio, el crecimiento de las células G-Luc-C57BL/6 implantadas IM sin *scaffold* sufrieron una pronunciada crisis dentro de la primera semana después de la implantación, pero luego alcanzaron un estado fijo. En general, las células sobreviven mejor en sitios IM tanto si han sido sembrados en el *scaffold* o no. Ninguno de los 16 implantes mantuvieron las células después de las 12 semanas. Es posible que la diferencia de supervivencia de células en IM y SC puede ser debida a su capacidad para promover un adecuado suministro de sangre [20]. Los materiales testados tenían una clara diferencia en la capacidad para mantener el crecimiento celular. Todos los hidrogéles RAD 16-I fueron satisfactoriamente colonizados por las células G-Luc-C57BL/6 *in vitro*, y cuando las células sembradas en los materiales se han implantado IM, en todos, menos en un caso, las células sobrevivieron y proliferaron hasta el final del experimento. Sin embargo, el *biorubber* no pudo ser colonizado por las células *in vitro* e *in vivo*, no promovieron la proliferación de las células sembradas al combinarlo con el RAD 16-I. Esto tiene como explicación que el *biorubber* tienen una baja interconexión entre poros para permitir tanto el crecimiento del tejido, como la vascularización y la difusión de nutrientes [43]. Los resultados muestran que el uso del RAD 16-I como un *scaffold* para implante de células en animales vivos tiene un efecto de aumento en su proliferación y supervivencia, en comparación con las células implantadas sin *scaffold*. En los análisis histológicos que se realizaron de los implantes de ambos tipos de materiales en el ratón, muestran que, mientras el *biorubber* se mantiene

sin degradar durante mucho tiempo, el RAD 16-I se biodegradó y no se pudo detectar al finalizar los experimentos *in vivo*, debido a la hidrólisis de los linkers del péptido. Ninguno de los materiales parece provocar una respuesta inmune en animales normales, a juzgar por la falta de linfocitos infiltrados o inflamación. Sin embargo, el implante del composite RAD 16-I/*Biorubber* se encontró rodeado de una capa fibrótica como se había mostrado en otros trabajos [44, 45]. El fallo del material, a la hora de mantener la colonización de células y su supervivencia *in vivo*, se puede explicar por la baja interconectividad de los poros y la alta rigidez del biomaterial, comparada con el tejido vivo (25 kPa), que muestra una tendencia a encapsular el *biorubber*,

Los resultados ilustran la aplicación de células sembradas en un hidrogel RAD 16-I en ingeniería de tejidos debido a su capacidad para mantener el crecimiento celular *in vivo* y la ausencia de respuesta inmunológica. Es posible que la combinación de RAD 16-I con otros biomateriales que muestren unas mejores propiedades mecánicas pueda ser de gran utilidad en la reparación de muchos tejidos. Se ha concluido que la variación del tamaño de poro, superficie y características de degradación del *biorubber* podrían mejorar el composite RAD 16-I/*biorubber* para el uso en ingeniería de tejidos.

Además, la combinación de estos materiales sembrados con otros tipos de células, como células endoteliales y periovascuales, los cuales promueven la formación de una red vascular, al sembrarse en *scaffold* e implantes *in vivo* [36], también podrían mejorar las aplicaciones del RAD 16-I y el composite RAD 16-I/*biorubber*.

Tal y como se ha comentado en el plan de trabajo, tras esta primera muestra, se realizó una segunda muestra con la intención de mejorar la interconectividad del material. Para ello se optó por una prensa térmica para la fabricación de la malla de poliestireno. En total se realizaron 3 muestras con diferentes grados de reticulación (tabla 2.3).

La muestra 1 debería tener una mayor porosidad, en términos de interconectividad, ya que el tamaño de poro al utilizar las partículas con el mismo tamaño debería ser mayor. Pero dado que a la máscara 1 se le aplicó una temperatura de 100°C y una presión de 6 kg/cm², en los puntos centrales, que son

donde mayor presión se ejerció, ya que había más cantidad de poliestireno, llegaron a fusionarse por completo, dejando una porosidad nula en la malla. Por lo que en esta muestra se consideraron para el análisis los extremos más óptimos. Mientras que en la muestra 2 todos los puntos de la máscara fueron óptimos. De esta forma se esperaba una mayor interconectividad en la *biorubber* 2.

Para comprobar la porosidad entre las diferentes muestras se realizó una microscopia electrónica de barrido. En la Figura 2.18 se muestran las imágenes obtenidas de los *biorubber* 1, 2 y 3. Como era de esperar, la porosidad de la muestra 2 es mayor que la de la muestra 1, sobre todo en términos de interconectividad. Dentro de las muestras 2 y 3, si se comparan la Figura 2.18 e y f se puede observar como en la primera existe un mayor número de poros unidos unos con otros, lo que indica que la fusión entre partículas ha sido más fructífera en este *biorubber*. Esto se debe especialmente a que la temperatura de prensado que se utilizó fue de 70°C lo que permitió una mayor fusión entre las partículas de poliestireno.

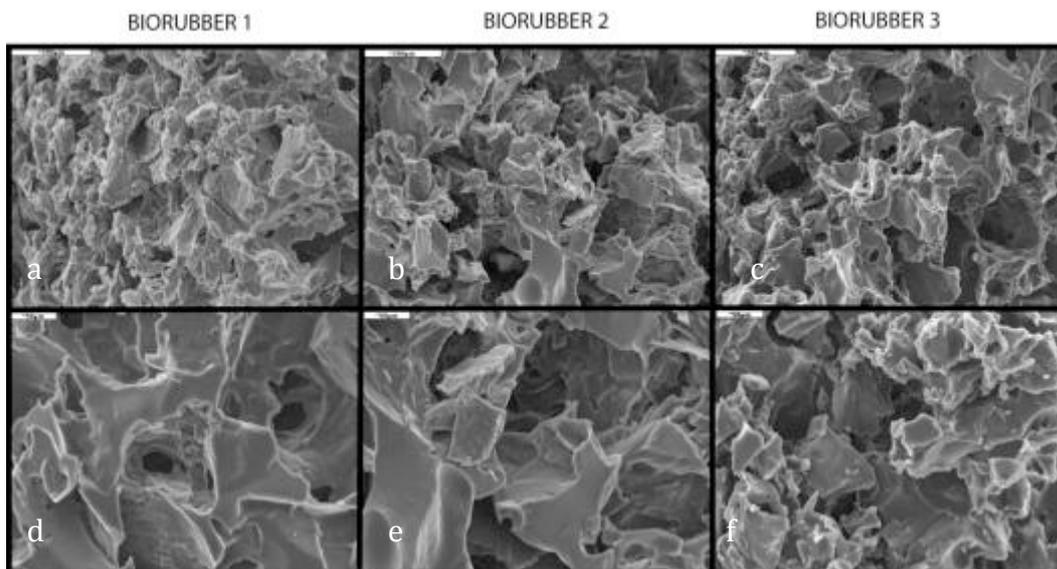


Figura 2.18: Imágenes de microscopia electrónica de barrido donde, se muestran las tres estructuras obtenidas (a,b,c). Aumento de las muestras donde se detalla la interconexión y la porosidad de las muestras del *biorubber* (d,e,f)

Una vez analizada la porosidad de este proceso sería conveniente compararla con la porosidad de la muestras obtenida por el método anterior, con el cual teníamos

una serie de dificultades a la hora de la interconexión (Figura 2.19). La interconexión con este nuevo procedimiento ha aumentado con respecto a la de la alternativa 1.

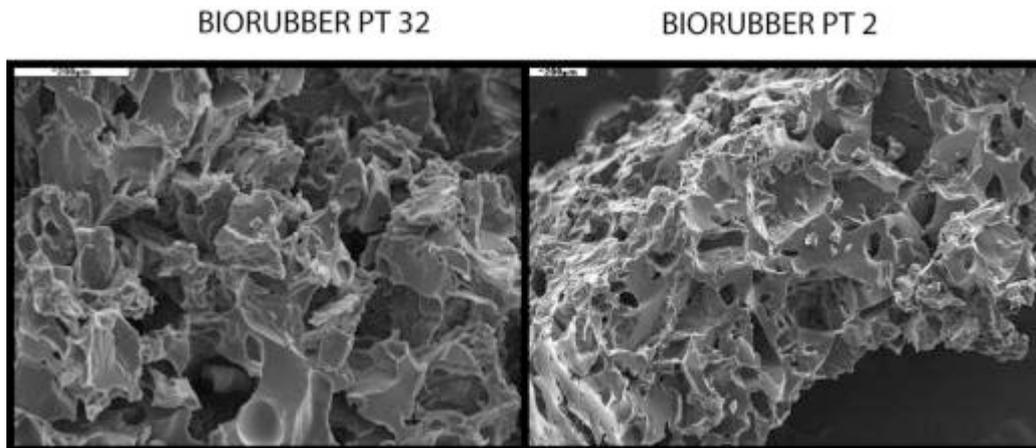


Figura 2.19: Comparación de las estructuras obtenidas por dos métodos diferentes. a) muestra obtenida mediante la prensa con temperatura. b) Muestra realizada mediante el sinterizado de las partículas de poliestireno con el microondas. Se puede observar como la muestra a) presenta una mayor porosidad e interconectividad que la b.

Finalmente, y viendo que se aumentó la porosidad de la muestra, se realizó un análisis *in vivo* de la muestra más óptima, el *biorubber 2*.

En cuanto a las pruebas *in vivo*, se realizaron en el Instituto Karolinska de Estocolmo. Se practicó una incisión y un defecto calvario en el cráneo de un ratón. Tras la optimización del tamaño de poro para este método de fabricación, se consideró utilizar solo el *biorubber* con mayor interconectividad y mayor porosidad para disminuir el número de ensayos *in vivo*, cumpliendo así la legislación sobre ensayos en animales. El único objetivo que se perseguía en este experimento es el de ver si el aumento de interconectividad permitía una mayor integración del material en el animal. Y como consecuencia de esto ver si el sistema aceptaba mejor el nuevo implante.

Tras realizar el implante, se mantuvo el animal durante 12 semanas, tras las cuales se sacrificó para realizar una histología de la zona donde estaba afincado el *biorubber*. En la Figura 2.20 b se muestra la histología del *biorubber* implantado, en

donde se puede ver la gran invasión que hay de dentro del material apreciándose incluso lo que podrían ser inicios de vascularización.

Por otro lado, se analizó el grado de biodegradación donde se puede ver como al cabo de las doce semanas, el material no ha desaparecido con lo que sigue siendo un punto negativo en el material.

En un principio no se observó ningún tipo de inflamación, más allá de la respuesta inmunológica causada por la presencia de un cuerpo extraño. Por lo que el material en el lugar donde fue implantado fue aceptado por el organismo.

Si se compara el material con el realizado por el método anterior, se puede ver como se ha mejorado en gran medida el grado de interconexión del material. En la nueva aproximación no aparecen zonas necróticas por lo que se intuye que gracias a la nueva interconexión se consigue una mayor difusión de nutrientes y oxígeno, evitando la muerte celular y por tanto una mayor biocompatibilidad del material (Figura 2.20).

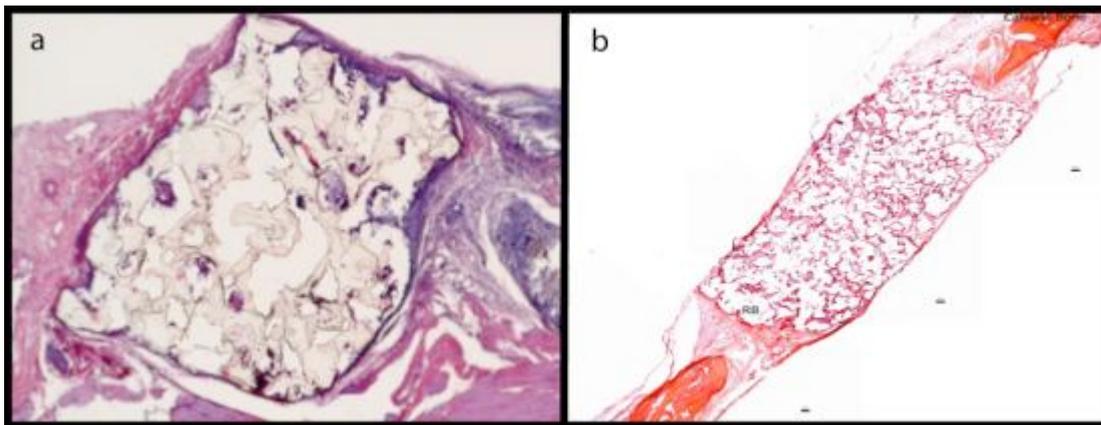


Figura 2.20: Histología de las muestras de *biorubber* producidas por los diferentes métodos. A) muestra obtenida por sinterizado con microondas, donde se ve la necrotización de las células alrededor del implante. B) Muestra realizada mediante fabricación con la prensa térmica. Se puede observar como el *biorubber* es invadido por células epiteliales, lo que podría ser un indicio de vascularización dentro del *biorubber*.

2.3.5 Resumen.

Se ha podido comprobar por tanto que la reacción ha tenido lugar mediante calentamiento por microondas con un tiempo muy inferior al del método tradicional con calefacción convencional. Será, por tanto, con este método de

síntesis con el que se comenzará a desarrollar los nuevos *scaffolds* de *biorubber*. Realizando las nuevas aproximaciones para obtener un *biorubber* lo suficientemente poroso e interconectado para llevar a cabo el cometido del material.

Tal y como se perseguía en un primer momento, se ha desarrollado un nuevo método para fabricar un *scaffold* de *biorubber* más poroso y que esté más interconectado, permitiendo de esta forma que se integre en el organismo y que exista una mayor difusión de nutrientes en el material, habiendo así un crecimiento de vasos sanguíneos y la migración de células al interior del material. De esta forma también se comprueba la viabilidad en el uso de este material en aplicaciones *in vivo*

Sin embargo, el material presenta un nivel de biodegradación bajo *in vivo*. El biomaterial sigue estando presente en el cuerpo transcurridas las tres semanas del implante, siendo este un problema que tiene que ver con el método de síntesis, en especial en el grado de reticulación del material.

2.4 LA ESPUMA DE BIORRUBER

Como se ha visto en la sección anterior, el biomaterial fabricado mediante salt leaching tiene la dificultad de realizar una correcta interconexión entre los poros, lo que dificulta en gran medida la migración celular y la difusión de nutrientes, provocando la consiguiente necrosis.

Por ello, se requiere generar un mayor tamaño de poro en los biomateriales utilizados, aumentando así la interconectividad. Para ello se pensó en realizar espumas de *biorubber* de forma similar a como se hacen las espumas de poliuretano, que son ampliamente utilizadas como materiales en ingeniería de tejidos [46-52]. Las esponjas y espumas pueden ser obtenidas por varias técnicas de procesado. Para ingeniería de tejidos, la interconectividad entre poros, como ya se ha comentado con anterioridad, es una propiedad fundamental, ya que las células deben migrar y crecer a través de los poros del *scaffold*. Las técnicas de espumación industrial, usadas, por ejemplo, en la fabricación de fundas de muebles, no son aplicables a la fabricación de *scaffolds* para ingeniería de tejidos, ya que estas espumas están diseñadas como espumas de “poros cerrados”, mientras que los en ingeniería de tejidos es necesario una estructura de “poros abiertos” [53].

La preparación de una espuma polimérica envuelve primero la formación de burbujas de un gas en un sistema líquido, seguido del crecimiento y estabilización de estas burbujas, mientras la viscosidad del líquido polimérico crece, resultando en la solidificación de la matriz polimérica.

Las espumas pueden prepararse por dos métodos fundamentalmente. En uno de ellos, un gas se dispersa en un líquido para formar un sistema coloidal con el gas como fase dispersante. Estos gases suelen ser oxígeno o nitrógeno, para evitar la reactividad con el líquido. En el segundo método, el gas es generado dentro de la fase líquida y aparece como burbujas separadas dispersadas en dicha fase. El gas puede ser el resultado de una generación específica mediante una reacción, tal como la formación de dióxido de carbono en reacciones de isocianato con agua en la formación de espumas de poliuretanos, o como en el caso del presente capítulo,

generación de agua dentro de la propia reacción de policondensación [54]. El gas también se puede generar mediante volatilización de un disolvente con bajo punto de ebullición en la fase dispersa, cuando tienen lugar una reacción exotérmica.

Saunders y Hansen han tratado en detalle el aspecto coloidal de la formación de espuma utilizada en los agentes de expansión [55]. La formación de espumas de expansión interna tiene lugar en varias etapas. En la primera el agente genera un gas en la solución de una fase líquida hasta que el gas alcance el límite de saturación en la solución y llegue a estar sobresaturado. El gas finalmente sale de la solución en forma de burbujas. La formación de burbujas representa un proceso de nucleación desde la nueva fase formada. La presencia de una segunda fase, que puede consistir en un dispositivo sólido o alguna dispersión de aceites de silicona, o incluso una superficie irregular sólida como un agitador o la pared del recipiente, puede actuar como agente de nucleación. A la hora de formar la espuma de *biorubber* se utilizaron dos tensioactivos diferentes, un polietersiloxano y un polietilenglicol.

DeVries ha estudiado en profundidad los factores que afectan a la estabilidad y crecimiento de las burbujas en espumas acuosas [56]. Para dispersar un volumen dado de un gas en una unidad de volumen de líquido, uno debe incrementar la energía libre del sistema por una cantidad de energía ΔF como sigue:

$$\Delta F = \gamma \cdot A$$

Donde γ es la tensión superficial y A es el área interfacial total. Cuando la tensión superficial de un líquido es baja, o por calor o por adición de un surfactante, la energía libre asociada a la dispersión de un gas se verá reducida y ayudará en el desarrollo de finas celdas correspondientes a un gran valor de A .

Según la teoría clásica, la presión del gas en una burbuja esférica es más grande que la presión en el líquido de alrededor con una diferencia de presión Δp , como se muestra en la siguiente ecuación: $\Delta P = \frac{2 \cdot \gamma}{R}$

Donde R es el radio de la burbuja. De ahí que la presión en una pequeña burbuja es más grande que en una burbuja grande.

En el caso de dos burbujas de radio R_1 y R_2 , la diferencia en presión es Δp^2 , viene dada por la siguiente ecuación:

$$\Delta p^2 = 2 \cdot \gamma \left(\frac{1}{R_2} - \frac{1}{R_1} \right)$$

Por tanto, en un sistema líquido una difusión de un gas tiene lugar desde la burbuja pequeña a la burbuja grande, resultando la desaparición de la burbuja pequeña, mientras la otra crece en tamaño con el tiempo. Esto también aparece a bajos valores de γ , como, por ejemplo, por adición de un reductor de tensión superficial tal como los surfactantes siliconados, reduciendo la diferencia de presión entre burbujas de diferentes tamaños y así conseguir una mejor estabilidad de burbujas y medias más pequeñas de tamaños de celdas..

En la formación de espumas poliméricas se pueden aplicar las relaciones descritas abajo, al menos en alguna extensión, cuando la fase polimérica es todavía un líquido. Para formar una espuma estable, debe haber al menos dos componentes, uno de los cuales es absorbido en la superficie. El teorema de Gibbs nos enseña que la tensión superficial depende del tipo y cantidad de soluto absorbido como sigue [57, 58]:

$$d\gamma = \Sigma \Gamma d\mu$$

donde Γ es el exceso de superficie de un componente con un potencial químico μ . Esta relación explica la resistencia a un incremento del área superficial o una disolución de las membranas de las celdas. Debido a que las membranas más delgadas tienden a romperse más fácilmente, la resistencia a la disolución ayuda a la estabilidad de la celda.

Cuando una membrana se expande y la concentración de un tensioactivo en la interfase decrece, existen dos mecanismos para restaurar la concentración en la

superficie de surfactante. El primer mecanismo, denominado el “efecto Marangoni”, se refiere al hecho de que la superficie que fluye puede arrastrar con él algunas de las capas subyacentes, es decir, la capa superficial puede fluir desde áreas de baja tensión superficial, además de restablecer el espesor del film. Es además una fuente de la resiliencia o elasticidad del film [59].

En el segundo mecanismo, el “efecto Gibbs”, se repone la deficiencia superficial por difusión desde el interior y se disminuye la tensión superficial para obtener un nivel deseable. Para la mejor estabilización de la espuma lo que es deseable es una concentración óptima de surfactante así como un óptimo ratio de difusión [55].

Otro factor que afecta a la estabilidad de la burbuja es la temperatura: un incremento de la misma reduce la tensión superficial y la viscosidad, lo que resulta en una disolución de la membrana de las celdas que puede provocar la ruptura de las mismas.

Existe otro factor en la estabilidad de la celda, que es la eliminación del líquido desde la pared de la burbuja, debida a la acción de la gravedad y de la capilaridad. El desagüe desde ambas acciones se puede retardar por un incremento de la viscosidad, especialmente en la superficie del film. Esto es particularmente importante en sistemas termosensibles, los cuales implican polimerizaciones simultáneas y componentes espumantes del líquido. Para obtener una espuma estable se debe proporcionar un balance entre la viscosidad y la evolución del gas pero no sólo para esto sino también para tener el mayor volumen de espuma posible. Es obvio que si la viscosidad incrementa demasiado rápido (como resultado de una rápida polimerización) la evolución del gas se interrumpirá eventualmente antes de que alcance el volumen de espuma deseado, especialmente para la producción de espumas de baja densidad. Por otro lado, si la viscosidad es demasiado alta, cuando la mayoría de la evolución de la espuma ha pasado, la estabilización de la espuma puede ser muy difícil y puede resultar que la espuma colapse [55].

El balance apropiado entre viscosidad y evolución del gas se puede controlar con un número de factores tales como un tipo adecuado de catalizador y surfactante en una concentración adecuada, la presencia de un agente nucleante y el control de la

temperatura de reacción [59, 60]. También se deben considerar otros factores adicionales, como el uso de agentes de expansión química adecuados, los cuales son importantes en la formación de espumas termoplásticas, y la formación de prepolímeros que muestran grados de viscosidad más altos que los monómeros en la preparación de las espumas termosensibles (espumas de poliuretanos). Todos estos factores deberán ser estudiados en profundidad para conseguir una espuma óptima para cada aplicación.

2.4.1 Plan de trabajo

El método que se utilizó para generar las espumas de *biorubber* se basa en la síntesis por microondas explicado en el capítulo 2.3, lo que permite reducir los tiempos de síntesis y ajustar las condiciones finales de la espuma. Utilizando diferentes tensioactivos, se puede controlar la porosidad del *scaffold*.

Por lo tanto, los objetivos que se pretende conseguir en este capítulo son los siguientes:

- Aumentar el tamaño de poro del *biorubber*.
- Mejorar la interconectividad
- Mejorar la biodegradabilidad.
- Mejorar la hidrofiliidad del material para aumentar así la adherencia celular.

2.4.2 Materiales y métodos

2.4.2.1 Síntesis y fabricación del *scaffold*

La espuma de *biorubber* se obtuvo mediante síntesis por microondas, calentando una cantidad equimolecular de ácido cítrico y 1,8-octanediol dentro de un molde de silicona. La reacción que tiene lugar es una policondensación con la consiguiente liberación de agua. Este agua es utilizada como agente espumante en la formación de la espuma. Como estabilizante de celda se utilizaron tres tensioactivos diferentes, igeal-co 520, tritón X-114, y Tegostab 8300. La reacción

se realizó a tres temperaturas diferentes, 60, 80 y 100°C y a diferentes tiempos comprendidos entre 1 y 5 minutos. Figura 2.21, Figura 2.22, Figura 2.23.



Figura 2.21: Esquema de la situación del molde de *biorubber* dentro del vial que se utilizó para la síntesis por microondas.

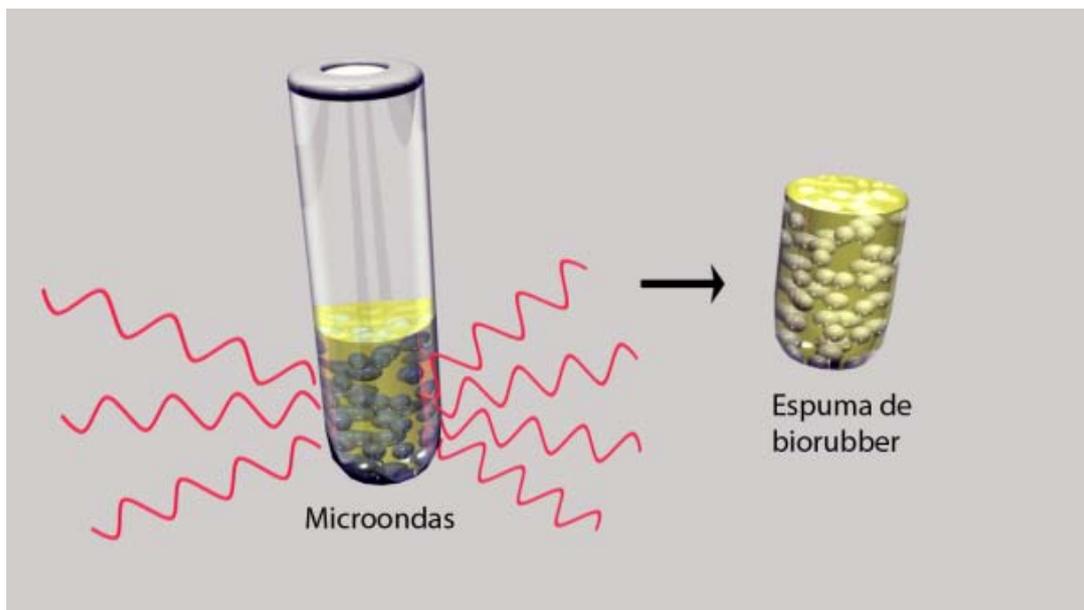


Figura 2.22 Esquema de la producción de la espumación del *biorubber* mediante el uso de las microondas. Gracias a estas, se produce la policondensación con la suficiente rapidez como para reticular el material a medida que se produce la espuma.

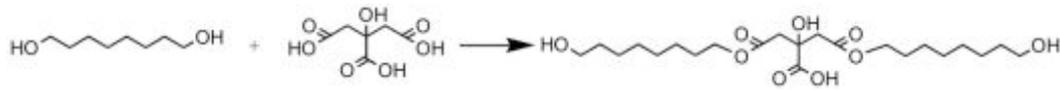


Figura 2.23: Esquema de la reacción de policondensación del poli (diol citrato)

Para realizar el recubrimiento superficial del material se siguió el siguiente proceso:

1. Se utilizó un reactor de plasma propio del grupo de materiales del IQS.
2. Las condiciones iniciales de este reactor fueron: presión inicial 0,03 mbar potencia del plasma 40 W, plasma no pulsado.
3. En primer lugar se hizo pasar un plasma de argón durante 5 minutos para activar la superficie de trabajo (presión de entrada de argón 0,06 mbar) Una vez concluido esto se hizo pasar el PFM durante un tiempo de 5 minutos (presión previa a la entrada de PFM 0,04 mbar) (presión a la entrada del PFM 0,1 mbar).
4. En el caso del acrílico el experimento fue el siguiente: P=40W plasma de argón P₀=0,01 mb a la entrada del argón P₁=0,03 mb. Se hace pasar el Ar durante 5 minutos. Para posteriormente pasar el ácido acrílico (P₀=0,01 P₁=0,03) durante otros 5 minutos

Para analizar la estructura de la espuma se utilizó un microscopio electrónico de barrido.

1. Se rompió la muestra con nitrógeno líquido consiguiendo una rotura frágil, con el fin de no deformar la estructura de la espuma.
2. Posteriormente la muestra se recubrió con oro y se analizó utilizando un SEM JEOL 5310.

La temperatura de transición vítrea (T_g) del material se analizó usando un DMA (*dynamical mechanical analyzer*, Q800) de TA instruments. Se usó una mordaza de compresión y una temperatura constante de 35°C. El experimento que se llevó a cabo fue un multifrecuencia con frecuencias máximas de 1 Hz, mediante compresión en el que se analizó la G' y la G'' frente a la temperatura, utilizando nitrógeno líquido para llegar a temperaturas de - 60°C.

Para realizar el análisis superficial de las muestras se utilizó un ángulo de contacto, con el que se añade una gota de agua sobre la superficie y se analiza el ángulo que deja dicha gota sobre la superficie. En función de la hidrofobicidad de la superficie el ángulo será diferente pudiendo ver la efectividad del recubrimiento.

Para la degradación del material se llevó a cabo un experimento con un buffer salino para una biodegradación lo más similar al cuerpo humano. Todas las muestras fueron incubadas a 37°C en el buffer durante tiempos predeterminados. Después de la incubación, las muestras se lavaron con agua y se secaron en una estufa a 40°C durante 1 semana. Se calcula la pérdida de masa con respecto al peso inicial. Para realizar las gráficas se tomaron 6 muestras de la misma pieza y se fueron cogiendo a diferentes tiempos. Posteriormente, utilizando la ecuación se obtuvo la gráfica de biodegradación [18].

$$\text{Pérdida de Peso} = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100$$

Las pruebas *in vitro* se llevaron a cabo como sigue. Se cultivaron fibroblastos de ratón en botellas de 50 ml con medio de cultivo DMEM, propio de estas células. Se mantuvieron en la incubadora hasta que crecieron lo suficiente como para inyectarlas en el *biorubber*. Se tomaron muestras de unos 6 cm de diámetro en pocillos de 96 donde se inyectaron las células. Todos los polímeros fueron esterilizados con anterioridad con tres ciclos de lavados con etanol al 70% y agua estéril durante 10 minutos cada uno. Posteriormente, se expusieron a luz ultravioleta durante 30 minutos para eliminar las posibles impurezas. Las células (aprox. 500.000) se sembraron en el *biorubber* en placas de 96 pocillos con medio de cultivo DMEM con suero FBS, y se dejaron una semana, cambiando el medio diariamente dos veces, debido a la acidificación que sufría por la biodegradación del *biorubber*. Para analizarlas se realizó un análisis histológico en el Parc Científic de la UB, cortando con parafina después de haber fijado las muestras con paraformaldehído durante la noche a 4°C. Por último se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron con un microscopio óptico

2.4.2.2 Ensayos *in vivo*.

2.4.2.2.1 Migración celular en el *biorubber*.

Los ensayos *in vivo* se realizaron en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares en colaboración con el Dr. Toni Diez. Los factores de complemento C3a y C5a fueron introducidos dentro de una matriz de matrigel® fabricado según instrucciones del fabricante. Antes de gelificar se prepararon tres muestras de *biorubber* con C3a y C5a y un blanco solo con matrigel. Para la gelificación del matrigel se introdujeron en un incubador durante 30 minutos.

Posteriormente se implantaron en un ratón de forma subcutánea, esperando tres días para su posterior análisis mediante histología. Para realizar esta histología una vez parafinadas y cortadas las muestras, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron en el microscopio.

2.4.2.2.2 Pruebas *in vivo* para regeneración ósea.

Los experimentos se realizaron en colaboración del Dr. Miguel Angel Ruiz Ibán de la Unidad de Cirugía Artroscópica Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal, en colaboración del Médico Fausto González Lizán, que fueron los encargados de realizar la cirugía y la parte de análisis del ensayo.

El experimento se llevó a cabo en 12 conejos de Nueva Zelanda hembra con un peso de 3 a 3,5 kg. Se obtuvo la autorización del Comité de Bienestar Animal del centro donde se realizó el estudio.

El modelo de pseudoartrosis usado es una variación del descrito por Brownlow [61] y Eckardt [62] modificado para crear un defecto segmentario. Los animales fueron sometidos a dos intervenciones:

En la primera se anestesiaron con Propofol (Dipriván®) al 1% con una dosis de inducción de 30 mg por vía intravenosa y dosis de mantenimiento de 1,5-3mg/minuto. Se administró también profilaxis antibiótica y analgesia para el postoperatorio. Se utilizó siempre la pata trasera izquierda, que se preparó

mediante afeitado y lavado con solución antiséptica. Con el animal en decúbito supino se inocularon 2 ml de bupivacaina al 1% subcutánea en la vía de abordaje. Se realizó una incisión longitudinal anterior sobre la tibia de 4 cm. Se identificó el tercio medio de la tibia y se desperiostizó circunferencialmente a lo largo de 5 cm; se colocó una placa de tercio de caña de cinco orificios fijada proximal y distalmente con dos tornillos bicorticales de 3,5mm. Se retiró la placa y los tornillos y se realizó una doble osteotomía en la zona central retirando una sección tubular de 6mm de largo del tercio medio de la tibia. Se colocaron de nuevo la placa y los tornillos (Figura 2.24).

Se cerró el subcutáneo con puntos sueltos de Vicryl 4/0 y la piel con sutura intradérmica continúa de Vicryl rapid 5/0. Se aplicó solución antiséptica yodada en la herida.

La segunda intervención se realizó 7 semanas después. Por la misma vía y con la misma técnica se expuso la placa y los tornillos, se retiraron y se reseco cualquier resto de tejido conjuntivo o hueso en el espacio intermedio, se desperiostizaron los extremos proximal y distal a lo largo de un centímetro y se fresan intramedularmente a lo largo de un centímetro. A continuación, se colocaron de nuevo la placa y los tornillos dejando el defecto segmentario de 6mm en el centro (Figura 2.24).

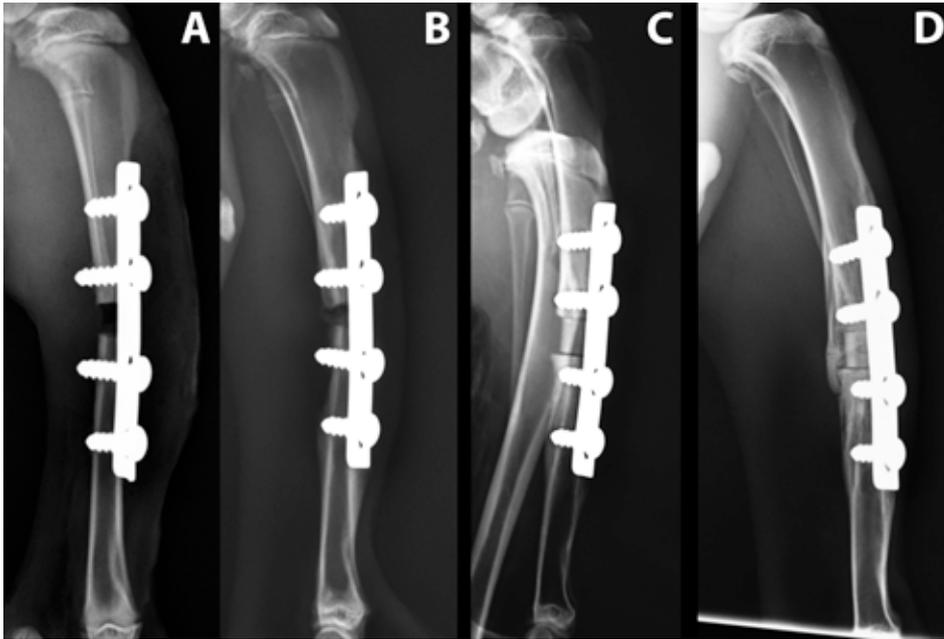


Figura 2.24: Secuencia de la operación, una vez fijado el hueso, se hace un corte y se extrae la parte central del mismo A) y B) posteriormente se coloca el corte de nuevo para ayudar a la regeneración C) y D)

Una vez realizado el modelo de estudio, se procedió a producir el injerto. Como injerto de cortical desvitalizado se utilizaron secciones tubulares de 6mm de tibia obtenidas de otros conejos que habían sido sacrificados con otros propósitos. Tras la extracción se limpiaron de partes blandas y se fresó la cavidad medular con una broca de 3,5mm para después someterlos a un ciclo de autoclavado estándar a 121°C durante 20 minutos (Figura 2.25c y d).

Como péptido se utilizó VEGF-A-165 recombinante (R&DSystems, Alemania) un péptido homodimérico formado por dos unidades polipeptídicas de 165 aminoácidos glicosiladas sintetizado a partir de una secuencia de ADN y expresado en células de insecto Sf21, con un sistema de expresión por baculovirus. Como se puede observar en la Figura 2.25b el VEGF posee en su estructura una gran cantidad de grupos amino libres, por donde se puede anclar a la superficie del biomaterial.

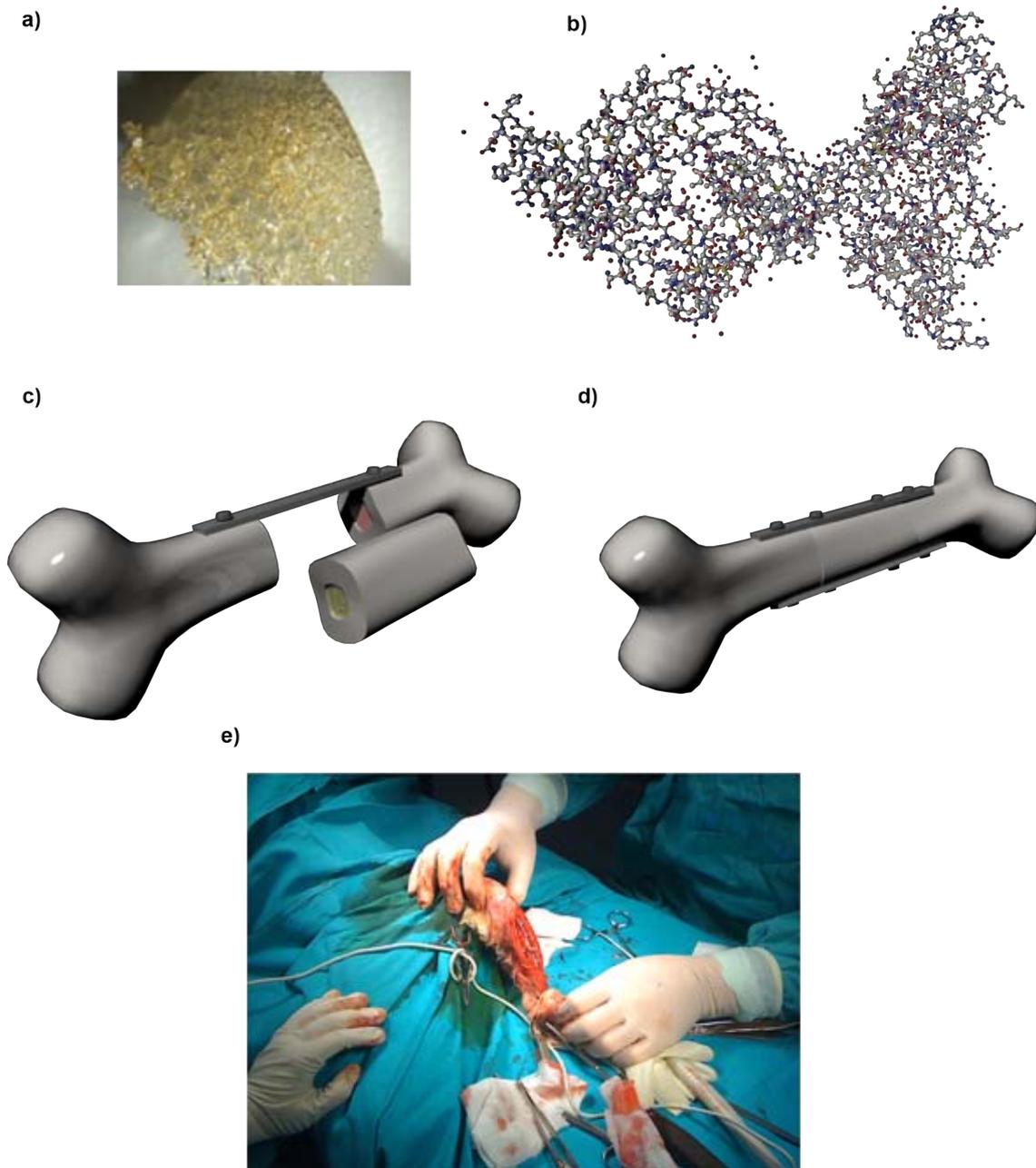


Figura 2.25: a) Muestra de *biorubber* utilizada en el experimento, en este caso es una espuma de *biorubber* fabricada con Tegostab 8300. b) Proteína VEGF utilizada en el experimento, donde se pueden observar el gran número de grupos amino libres, por los que puede reaccionar con el PFM de la superficie del *biorubber*. c) y d) Infografía del hueso injertado con el *biorubber* en el medio modificado para favorecer la regeneración. e) Imagen de la operación del conejo, donde se puede ver las barras de hierro que sirven para sujetar el hueso tras la operación.

Para realizar los análisis los animales se dividieron en tres grupos de 6 conejos cada uno:

En el primero (VEGF) al terminar la segunda intervención y una vez colocada de nuevo la placa se situó en el defecto uno de los injertos corticales de tibia en cuya

cavidad medular se instiló una dosis de 2 µg de VEGF diluido en 50 µl de Matrigel (BD Biosciences, Estados Unidos de América) en fase gel. El matrigel es una solución protéica que proviene del exudado de un cultivo de células de sarcoma murino que se gelifica a la temperatura corporal. El injerto se sujetó en su sitio mediante una sutura de vicril del 0 que lo anudaba a la placa.

En el segundo (Control) se colocó de manera idéntica uno de los injertos corticales con solo 2 µg de VEGF en 50 µl de PBS en el interior de la cavidad medular.

El tercer grupo (biomaterial) se colocó de manera idéntica a las anteriores, para ello se utilizó una espuma de *biorubber* sintetizada mediante microondas, tal y como se ha explicado en esta última sección. Una vez obtenida la espuma de *biorubber*, de la forma anteriormente descrita, se procedió al recubrimiento superficial para anclar el VEGF.

Para realizar el recubrimiento superficial del material con PFM se siguió el procedimiento descrito en esta misma sección. Una vez que la espuma estuvo modificada superficialmente con PFM se hizo reaccionar con VEGF (4 µg en 100 µl de suero salino) durante 30 minutos a temperatura ambiente aprovechando los grupos amino que posee este péptido. De esta forma el péptido quedará anclado en la superficie a través de un grupo peptídico. Tras el anclaje del VEGF sobre la superficie, se lavó la muestra con abundante PBS para eliminar las moléculas no ancladas.

Terminada la operación de implante de los tres sistemas, se procedió a la evaluación de los animales. A todos los animales se les realizó un control con radiografías simples en dos proyecciones tras la primera cirugía, a las tres semanas de la primera cirugía, pre y postoperatoriamente a la segunda cirugía, a las tres semanas de la segunda cirugía, y en el momento del sacrificio.

Los animales se mantuvieron en sus jaulas individuales sin restricción para el movimiento de las extremidades durante 12 semanas tras la segunda cirugía. Fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de 60 mg de Propofol. Se

realizó una incisión longitudinal sobre la tibia y se extrajo la tibia intervenida completa, retirando la placa y los tornillos y las partes blandas adyacentes. Se congelaron las muestras a -20°C .

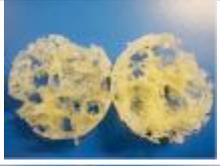
Se realizó una microtomografía axial computerizada (microTC) de haz cónico Aarhus PET/CT (Sedecal S.A., Madrid). Los parámetros de adquisición fueron: 360 proyecciones angulares en un recorrido de 360° , tensión de aceleración en el tubo de rayos X de 45kV y filtrado del haz de 1mm de A1. Las adquisiciones se hicieron a un tamaño de pixel de 0,075mm, con una resolución de aproximadamente 0,125mm.

El análisis de imagen se realizó con el programa ImageJ ver. 1.43u (National Institutes of Health, EE.UU.). Se analizaron las interfaces entre el hueso nuevo creado y el aloinjerto y los extremos de hueso proximal y distal. En cada polo del aloinjerto se evaluó la continuidad trabecular a máxima resolución entre el aloinjerto y el hueso cortical de los extremos.

2.4.3 Resultados y discusión

En la Tabla 2.4 se muestran los diferentes factores que se tienen en cuenta a la hora de realizar la espuma de *biorubber*. Se consideraron como factores limitantes los siguientes: temperatura, potencia de las microondas y tensioactivo utilizado.

Tabla 2.4: Condiciones y resultados de algunas de las reacciones realizadas para la obtención de la espuma de *biorubber*:

	Tensioactivo	Cantidad Tensioactivo	Temperatura	Tiempo	Vacio	Foto
1	Jabón	3 gotas	100	2 min	NO	
4	Jabón	5 gotas	100	3 min	NO	
8	Jabón	3 gotas	100	3 min	NO	
14	Triton X-114	5 gotas	100	2 min y 20 seg	NO	
18	Igepal CO-520	5 gotas	80	3 min	NO	
22	Igepal CO-520	5 gotas	100	3 min	no	
36	Igepal CO-520	5 gotas	80	3 min + 2 min	NO	

40	Igepal CO-520	5 gotas	80	3 min + 3,30min	NO	
135	Tegostab 8300	5 gotas	100	0h 3m 0s	No	

Uno de los problemas que se tuvieron fue la repetitividad de los resultados. Una de las posibilidades que se baraja es la heterogeneidad del molde que se utilizaba, que provocaba distribuciones de las microondas diferentes en el interior del reactor. Además, dentro de la misma muestra existen diferentes grados de reticulación, como se verá más adelante en el apartado de la biodegradabilidad. Esto fue originado porque las microondas son de tipo monomodal, por lo que están focalizadas en único punto. Así, todo lo que quede fuera del alcance de este punto, absorberá menos energía de microondas y por consiguiente tendrá menor grado de reticulación.

Analizando los factores que influyen en la reacción uno por uno, se pueden obtener unas condiciones optimas de reacción para la formación de la espuma de *biorubber*.

La temperatura es una de las claves a la hora de la formación de la espuma. Como método de evaluación se realizó de forma visual, dependiendo de la porosidad final que se obtenga, ya que lo que se busca es conseguir una estructura lo más homogénea posible y con una porosidad adecuada, y de esta forma descartar aquellas que no cumplen estas condiciones para luego analizar y desarrollar aquellas que sean más convenientes para el cultivo celular.

En un principio es interesante el trabajar a una temperatura baja, ya que es importante que la ebullición del agua formada en la policondensación no sea muy brusca, y poder controlarla, ya que si no nos daría como resultado la formación de estructuras poco homogéneas y con porosidad elevada (Muestra 1 y 4). Al utilizar una temperatura menor (80°C) se puede ver cómo la burbuja disminuye y se vuelve más homogénea. (muestra 18 y 22). Esto es debido a que la energía de

microondas que se aplica es menor y la brusquedad de la ebullición del agua también lo es, así se puede controlar mejor la forma las burbujas. Además una temperatura menor origina una mayor viscosidad, dando lugar a una mayor capa y una mayor estabilidad en la formación de la burbuja, lo cual permite tener burbujas más pequeñas de forma estable.

En cuanto al estabilizador de la celda se tienen en cuenta 4 tipos fundamentales: Jabón comercial, Igepal , Triton X-114 y tegostab 8300.

Los tres primeros son los tensioactivos más frecuentes, a la hora de hablar de sustancias líquidas, mientras que el tegostab es un agente espumante altamente usado en la química de los poliuretanos. Analizando la estructura química de todos ellos se pueden llegar a conclusiones con respecto a la formación de la espuma. En el caso de los tensioactivos se analizarán más adelante mediante las microscopias electrónicas de barrido (SEM)

El tiempo es otro factor realmente importante con el que se puede conseguir diferentes grados de reticulación del material y con ello diferentes propiedades mecánicas del mismo. Además, es un dato importante para la biodegradación ya que, a mayor grado de reticulación, menor biodegradación del material, debido a la existencia de más enlaces éster y, por consiguiente, más complicado de biodegradar. Se puede ver cómo a mayor tiempo de reacción dentro del microondas, se obtiene un mayor grado de reticulación: a tiempos inferiores a los 2 minutos el polímero no llegó a formar la espuma, mientras que a tiempos mayores la espuma terminó de solidificar.

Analizando la microestructura de las dos especies (espuma formada con tegostab y con triton X-114) (Figura 2.26) ambas presentan una estructura porosa e interconectada, pero se llegó a la conclusión de que el mejor espumante para nuestro fin era el tegostab, dado que permitió obtener una estructura mucho más homogénea, y con un diámetro de poro más pequeño, lo cual será más adecuado para el fin que se persigue.

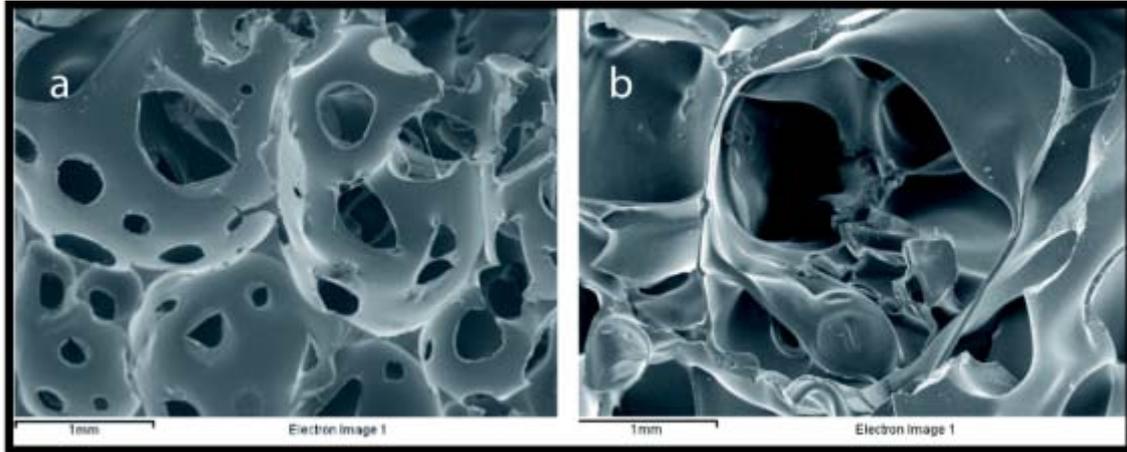


Figura 2.26: Imágenes de microscopía electrónica de barrido de dos muestras de espuma de *biorubber*, a) espuma realizada con tegostab 8300, en la que se ve claramente una uniformidad en el poro además de la interconexión entre todos los poros. B) Espuma realizada con Triton, X-100 en la que se observa una heterogeneidad en el tamaño de poro, a lo largo de toda la muestra.

A la hora de analizar la estructura porosa hay que remitirse al propio tensioactivo y a su fórmula molecular (Figura 2.27).

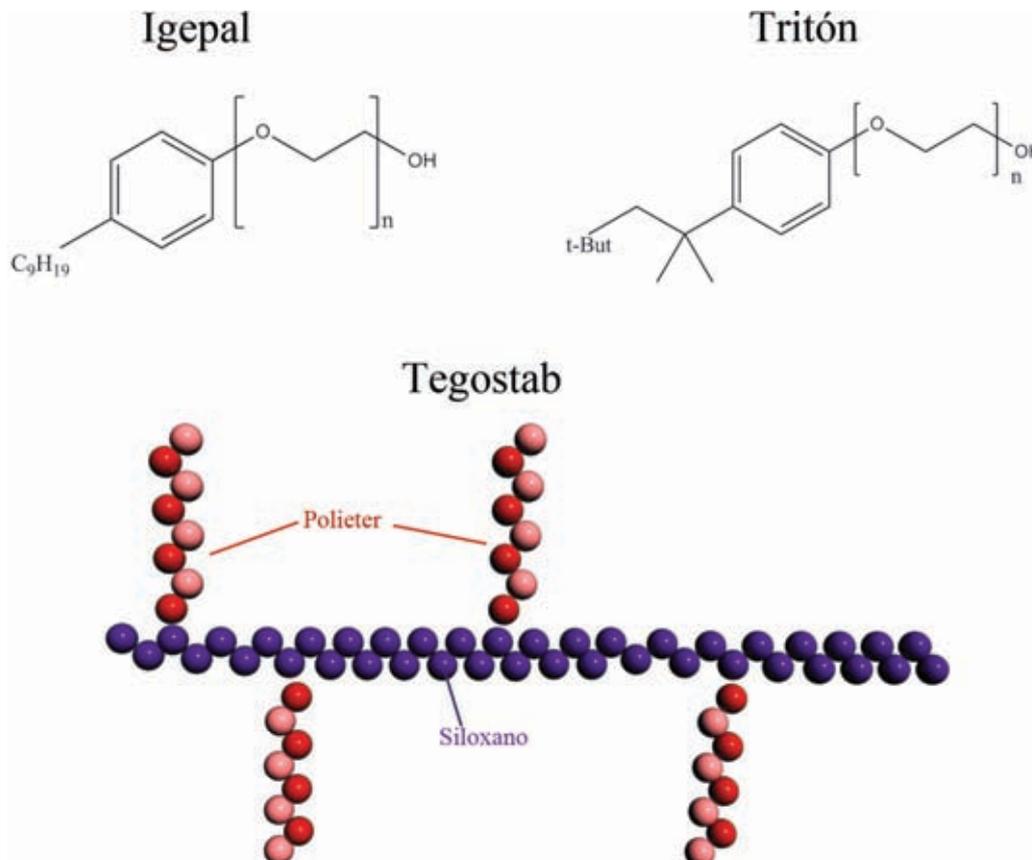


Figura 2.27: Fórmulas moleculares y estructuras de los tres principales tensioactivos utilizados en la síntesis del *biorubber*.

EL Triton X-100 $C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$ es un tensioactivo no iónico con polietilenoglicol como grupo hidrofílico (con una media de 9,5 unidades de oxido de etileno) y un grupo hidrocarbonado lipofílico o hidrofóbico. Mientras que el tegostab [63] es un poliéter siloxano que le confiere una estructura totalmente diferente a los anteriores. Posee una cadena de siloxanos que será la que se sitúe bordeando la burbuja de agua, mientras que el poliéter se situará interaccionando consigo mismo, para dar una estructura espumante lo más unida posible, Figura 2.28. Lo que se consigue con todos ellos es un aumento de la densidad de la superficie lo que da una mayor estabilidad de la espuma, siendo el que mayor estabilidad otorga el tegostab, entre otras cosas porque es el que mayor densidad tiene. Además es el que mayor interacción tiene con la superficie. De esta forma también se pueden tener espumas abiertas, algo imprescindible para obtener una buena interconectividad [64].

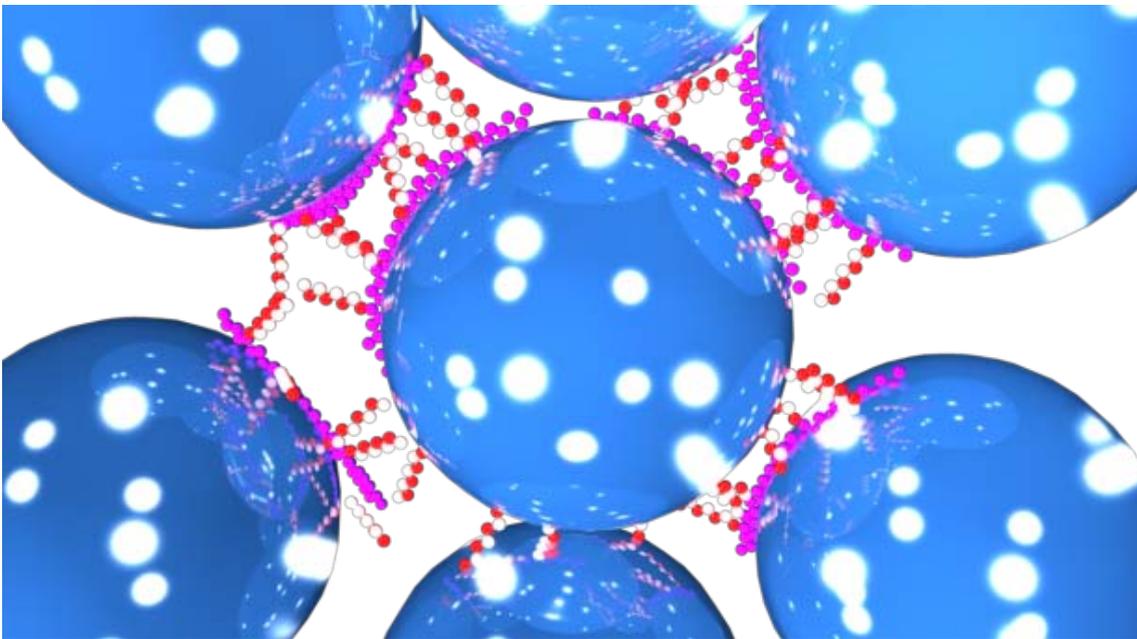


Figura 2.28 Interacción del tegostab con las muestras de *biourubber*, interaccionando y uniendo las burbujas de aire obteniendo una uniformidad mayor en las muestras [65].

Una vez obtenida la porosidad necesaria en la espuma, se pasa a la modificación de la superficie para poder obtener un biomaterial más biocompatible o incluso con propiedades bioactivas en el cuerpo humano, como por ejemplo la estimulación para la adhesión celular, el crecimiento y la proliferación, mientras se mantienen las propiedades mecánicas del material en sí. Para ello se añaden a la superficie del

material ligados específicos para las interacciones célula-sustrato. Uno de los sistemas más utilizados para inmovilizar ligandos, consiste en crear uniones covalentes en las cadenas laterales del polímer.

La polimerización mediante plasma (Figura 2.29), utilizando como monómero el pentafluorfenil metacrilato (PFM), desarrollado por el laboratorio de biomateriales del IQS, ofrece un grupo éster altamente reactivo, el cual ofrece la posibilidad potencial de reaccionar con el grupo amino (Figura 2.30) de proteínas, como por ejemplo integrinas, y otros ligandos biológicos[66].

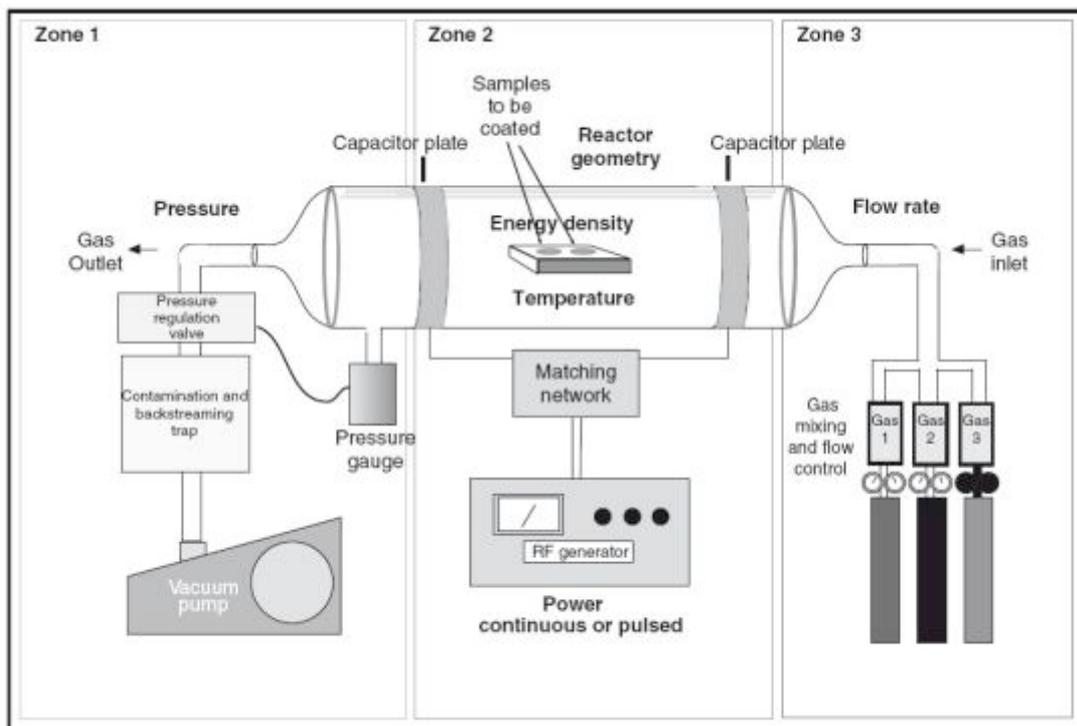


Figura 2.29: Esquema del reactor de plasma utilizado en la modificación superficial de las muestras de *biorubber*

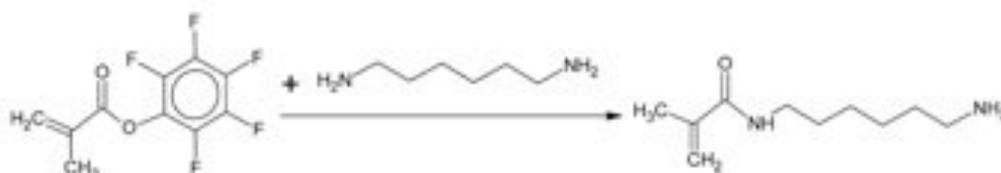


Figura 2.30: Reacción del pentafluorfenil metacrilato con los grupos amino de las proteínas y péptidos. Mediante esta reacción se conseguirá unir cualquier sustancia que tenga grupos amino libres sobre la superficie del *biorubber* [66]

Varios estudios han mostrado que las células madre mesenquimales o líneas celulares osteoblásticas se adhieren a pequeños péptidos, los cuales contienen el motivo de unión de la fibronectina, el tripéptido RGD (arginina-glicina-aspartato), que es una secuencia de adhesión muy utilizada, donde además las células adheridas pueden diferenciarse en un linaje osteoblástico [67, 68]. Como ejemplo, cabe destacar el caso del péptido GRGDSPK, el cual es un inductor de adhesión [69].

Por este hecho, nos interesa en gran medida el recubrimiento superficial de las superficies, en concreto del *biorubber*, para poder realizar posteriores estudios sobre adhesión, diferenciación y proliferación en la superficie del *biorubber* [70]. Así, en este apartado se hizo una primera aproximación del recubrimiento del material, para comprobar la eficacia de dicho recubrimiento.

Se realizaron varios experimentos con el fin de ver la posibilidad de modificación superficial del *biorubber*. El primero de ellos consistió en un recubrimiento con ácido acrílico mediante plasma frío. Se depositó una pequeña cantidad de este monómero mediante grafting, aprovechando las características químicas del polímero. Lo que se pretendía conseguir con este ensayo era facilitar la entrada de agua a través de los poros gracias al aumento de hidrofiliidad del ácido acrílico. Es importante demostrar la viabilidad de interconexión de los poros y, por ello, con el *biorubber* recubierto será más fácil que el propio agua circule a través de los poros y no se quede obstruido. El *biorubber* es un poliéster el cual tiene gran cantidad de grupos ionizables, COOH, OH, etc. a través de los cuales se puede añadir el PFM o el acrílico mediante reacción química. De esta forma se conseguiría cambiar la hidrofiliidad superficial del material y con ello facilitar la interacción con puentes de hidrógeno entre el agua y la superficie, lo que facilitaría el acceso del agua al interior de los poros. Por otro lado, al modificar la hidrofiliidad de la superficie, se consigue en este caso al aumentar la carga electronegativa, con lo que las células se verán más atraídas y se conseguirá una mayor adhesión de las proteínas de membrana [71].

En la Figura 2.31 se muestra una prueba inicial del tratamiento superficial de la espuma. En el recipiente de la izquierda (a) se muestra un *biorubber* modificado con ácido acrílico el cual es mucho más hidrofílico que la superficie de poliéster que tiene el polímero sin recubrir (b) y, por lo tanto, interactúa con las moléculas de agua permitiendo que estas entren en el interior del poro desalojando el aire retenido. Por ello, en la muestra (a) el agua penetra en los poros con mucha mayor facilidad que con en el (b), como consecuencia de esto la muestra caerá hacia el fondo al introducirla en agua. Así, se demuestra en una primera etapa la posibilidad del recubrimiento del material mediante plasma frío y su posterior uso para la inclusión de sustancias polipeptídicas en la superficie [72].



Figura 2.31: Resultado de la modificación superficial del *biorubber*. La muestra de la izquierda fue modificada con ácido acrílico, el cual, gracias a su grupo carboxílico, tiene una mayor interacción con el agua que el *biorubber* sin modificar. Muestra de ello es el hundimiento de la muestra modificada.

Aprovechando el recubrimiento que se ha realizado del *biorubber* mediante el plasma se ha realizado una prueba para comprobar la interconectividad del mismo. Se trataron dos muestras, una con PFM y la otra con ácido acrílico, para ver cual es el efecto del recubrimiento en el paso del agua (Figura 2.32).

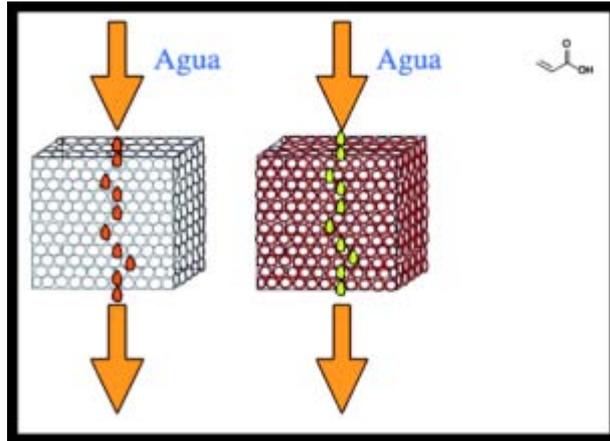


Figura 2.32: Esquema de cómo el agua ha de atravesar el *biorubber*.

El sistema que se siguió fue utilizar agua coloreada con rojo fenol para poder divisar el recorrido del agua. En la Figura 2.33 se puede ver el recorrido en ambos casos. El agua fue inyectada con una jeringuilla en la parte superior de la espuma. Se puede ver como el agua no sale en ningún momento por las partes laterales, sino que sigue un recorrido descendente. Con ello se demuestra en un primer paso, la interconectividad de los poros. También se puede ver cómo el agua no se acumula en ninguno de los puntos.

Centrándonos más en el recubrimiento se puede ver como a priori el recubrimiento de ácido acrílico es más rápido que el del PFM, debido a la mayor hidrofiliidad del monómero(Figura 2.33).

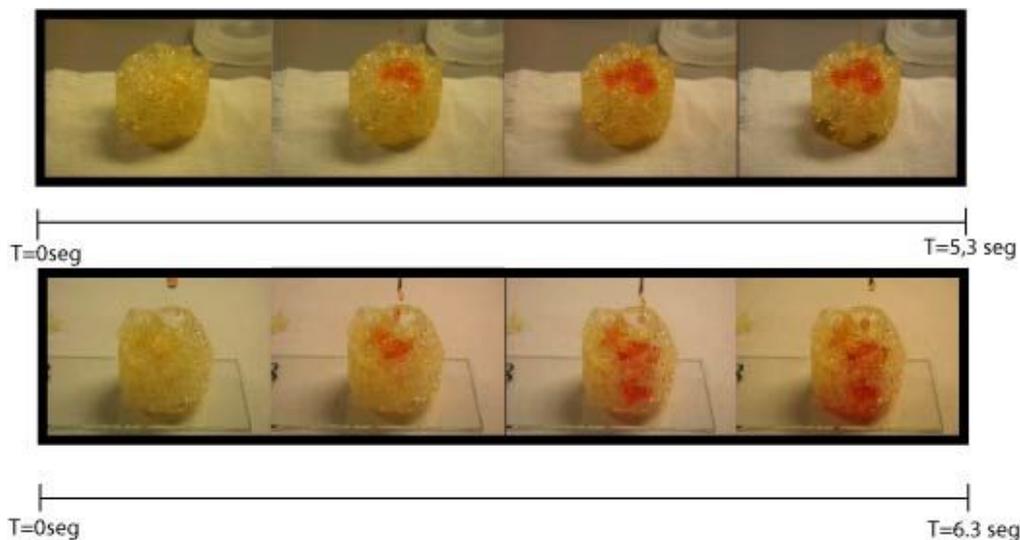


Figura 2.33: Resultado del tiempo que tarda una muestra en atravesar el *biorubber*. En la parte superior el modificado con ácido acrílico, y en la parte inferior el modificado con PFM.

Por ello se concluye que el polímero está totalmente interconectado y tendría facilidad para dejar pasar corriente sanguínea. Además, el material es fácilmente modificable mediante plasma, lo cual permite abrir un amplio rango de estudio en cuanto a la interacción célula-*biorubber* se refiere.

Para terminar y comprobar que el *biorubber* se modifica, se ha realizado un análisis de ángulo de contacto (Figura 2.34) en el que se ve la diferencia de ángulo entre la superficie tratada y la sin tratar. En el caso del *biorubber* modificado, se ve cómo el ángulo es bastante mayor, lo que da una idea de la hidrofiliidad de la superficie.

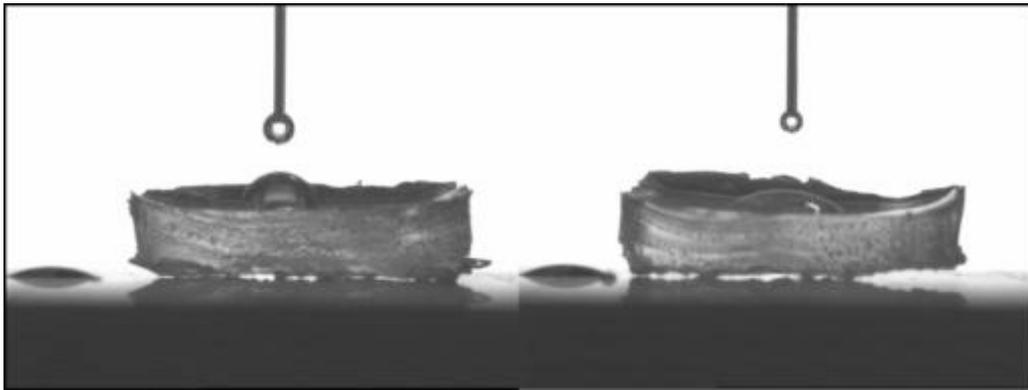


Figura 2.34: Resultados del análisis de ángulo de contacto del *biorubber*. La muestra de la izquierda no tiene ningún tipo de modificación, mientras que la de la derecha es una muestra modificada con Plasma de Ar y PFM.

Otro punto a tratar en el desarrollo de este nuevo biomaterial es la biodegradabilidad del mismo (Figura 2.35), dado que el material será implantado en el cuerpo humano y será utilizado para terapia regenerativa, es importante que se degrade en un tiempo controlable y dentro de unos márgenes conocidos [1]. La Figura 2.35 muestra la degradación de dos muestras diferentes (27 y 36) con dos grados de reticulación diferente. La muestra 27 posee un mayor grado de reticulación que la 36. Como resultado se ve que al colocarlo en un buffer salino durante 10 semanas, el resultado es que la degradación es muy similar, y además es heterogénea dentro de la misma muestra, ya que, como se ha explicado en el protocolo de biodegradabilidad, lo que se hizo fue cortar dentro de la misma

muestra cinco piezas similares y depositarlas en tubos eppendorf independientes, y cada semana se sacaba una para su posterior análisis [73]. En este caso se puede comprobar como el reticulado en los diferentes puntos de la muestra es diferente, debido al diferente grado de microondas que se aplica en cada uno de los puntos del *biorubber* a la hora de la formación de la espuma.

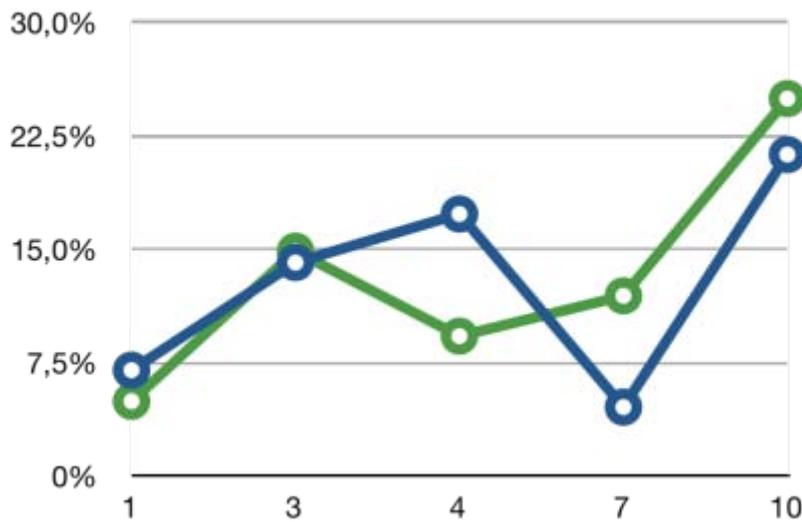


Figura 2.35: Gráfico de biodegradabilidad vs tiempo de las muestras 27 y 36, las cuales deberían presentar grados de reticulación diferentes. Sin embargo los gráficos muestran una incoherencia debida al diferente grado de reticulación dentro de la misma muestra.



Figura 2.36: Mecanismos de degradación de los poliésteres.

No obstante, uno de los mecanismos que se ha estudiado para facilitar la degradación del material y disminuir el tiempo en el que el polímero desaparece es la hidrólisis del poliéster (Figura 2.6) mediante un autoclavado de la muestra [74]. La Figura 2.37 muestra un análisis de compresión de la muestra en función de la

temperatura. Se realizó un aumento de la temperatura de -60°C hasta los 100°C , con el objetivo de ver la variación en la Tg del material.

Para analizar el efecto del autoclavado en la biodegradación del material se optó por el análisis de la temperatura de transición vítrea, con el cual se puede ver el cambio de la Tg, debido a la rotura de las reticulaciones, facilitando de esta forma la posterior biodegradación. Para analizar este efecto un método común es mediante un análisis dinamo-mecánico, en el cual se analizan la G' y la G'' en función de la temperatura. En los gráficos se muestran las propiedades del biomaterial utilizando las mordazas de compresión. La tg se puede medir mediante $\text{Tan } \delta$. En el caso del *bi rubber*, por la estructura de espuma que tiene, fue complicado realizar otro ensayo que no fuese el de compresión, ya que las mordazas no ajustaban a la estructura. Para poder realizar estos ensayos había que comprimir previamente la muestra y luego realizar un enfriado con Nitrógeno líquido a -60°C desde donde se partía para hacer una rampa de temperatura y ver como evolucionan las gráficas (Figura 2.37). En el caso de este biomaterial, cuando se sobrepasó la Tg cambió la conformación del material provocando un desajuste y un análisis incoherente. Este punto en el que se inicia la deformación es donde se considera que hay un cambio de la Tg del material.

Tabla 2.5: Tg de las muestras autoclavadas y sin autoclavar.

Muestra sin autoclavar	Muestra Autoclavada
10 °C	2.5 °C

La temperatura de transición vítrea aproximada de la muestra sin autoclavar es de 10°C mientras que la muestra autoclavada es de 2.5°C (Tabla 2.5) tomando como referencia el pico de la pérdida de módulo, lo cual quiere decir que al autoclavar la muestra, se han producido roturas en las reticulaciones mediante hidrólisis, permitiendo una elasticidad a menor temperatura que si no estuviera autoclavado. Este hecho corrobora que al estar autoclavado tiene menos reticulaciones, con lo que la biodegradación será más rápida. Esto abre nuevas posibilidades para mejorar la biodegradación del material sin perder de forma significativa las propiedades mecánicas.

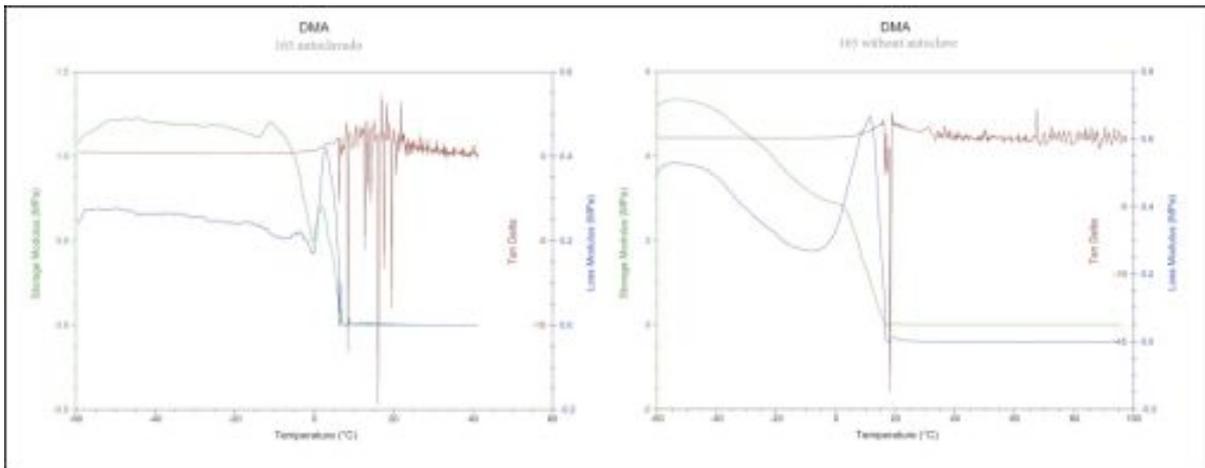


Figura 2.37: Análisis dinamo-mecánico de las muestras autoclavada y sin autoclavar

De esta manera se podrá jugar con la biodegradación del material en función del tiempo que queramos que permanezca en el cuerpo humano dando soporte. Esto es importante ya que existen aplicaciones en las que es interesante que el material se biodegrade con facilidad, como, por ejemplo, en aquellas en las que el material se utiliza simplemente como un liberador de factores localizado. Mientras que en otras es interesante que el material permanezca al menos 3 meses, como por ejemplo cuando el *biorubber* haga las veces de soporte.

Una vez analizas las variables mecánicas del material, se procedió al estudio de su interconectividad. Para ello, se realizaron pruebas *in vitro* con fibroblastos de ratón embebidos en el *biorubber*. El procedimiento fue el mismo para todos los experimentos, ya que todos ellos se realizaron en el mismo tiempo para evitar diferencias en el tratamiento.

En la Figura 2.38 se puede ver cómo el biomaterial adsorbe con mucha mayor facilidad que en los otros casos las células, lo que confirma la gran porosidad del material. Otra de las variables que se estudió fue la biocompatibilidad de la matriz tras su tratamiento con tensioactivos, para el caso de que quedase algún resto tras la formación de la espuma. En todos los casos no hubo células muertas más allá de las cantidades producidas por métodos tradicionales de cultivo. Por lo que se consiguieron los dos objetivos que se persiguieron con este experimento, primero

la introducción de las células en todas las partes de la espuma y, por otro lado, la biocompatibilidad con las células. Es importante destacar la no adhesión a la superficie de las células. En las imágenes se ve que forman cúmulos alrededor de las paredes, lo cual es debido seguramente a la forma de fijar las células a la matriz para realizar los cortes, ya que la cantidad de células que se sembraron (aprox. un millón de células) fue muy elevada para asegurarnos de que había células suficientes.

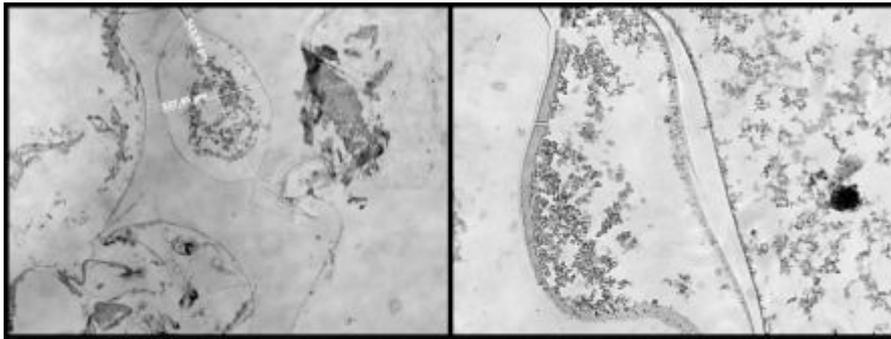


Figura 2.38: Imágenes de microscopía óptica de los fibroblastos de ratón implantados en el *bi rubber* *in vitro*. Resultados con una semana de incubación.

A la hora de realizar los experimentos *in vivo*, se fue un paso más allá aprovechando los conocimientos en regeneración por inflamación del grupo del Dr. Toni Díez del CNIC (Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares). En los últimos años se ha investigado el papel de los factores del complemento C3a y C5a en la capacidad de reparación cardíaca tras daño agudo [75]. Estos factores se expresan y modulan en diferentes poblaciones celulares (macrófagos, aSC y cardiomiocitos) que participan en el proceso de la inflamación.

Las células madre mesenquimales (MSCs) tienen un gran potencial para la reparación de tejidos, especialmente si se encuentran en el tejido dañado. Con este fin es de especial interés conseguir atraer a las zonas dañadas dichas células con capacidad pluripotencial. Los complementos C3a y C5a son dos factores quimiotácticos para las MSCs derivadas de la médula ósea humana, las cuales expresan estos receptores C3a y C5a en la superficie de la célula [76]. En el caso que nos ocupa, se introdujeron ambos factores junto a una matriz de matrigel [77]

dentro del *biorubber* para poder observar la migración de las células mesenquimales y los linfocitos producidos por la inflamación dentro del *biorubber* poroso y así analizar la porosidad del mismo *in vivo* y la capacidad de éste como inductor de la regeneración.

El objetivo del experimento era ver la migración de linfocitos dentro del *biorubber* y así poder analizar posteriormente la capacidad regeneradora que podría tener este efecto. Para ello, se prepararon tres muestras diferentes, una con matrigel y otras con matrigel más C3a ó C5a. Dichos composites se introdujeron en ratones normales de forma subcutánea y se dejaron durante tres semanas.

En la Figura 2.39 se puede ver los resultados tras las dos semanas de implante donde se observa cómo el control (aquel que no lleva complemento) no favorece la migración de células inflamatorias, mientras que aquel que si lo lleva, lo favorece en gran medida, invadiendo el material dichas células. De esta forma y, en un primer estadio, se puede demostrar como el complemento C3a tiene capacidad para favorecer la migración de linfocitos, macrófagos, etc dentro del *biorubber* y de una forma semicontrolada.

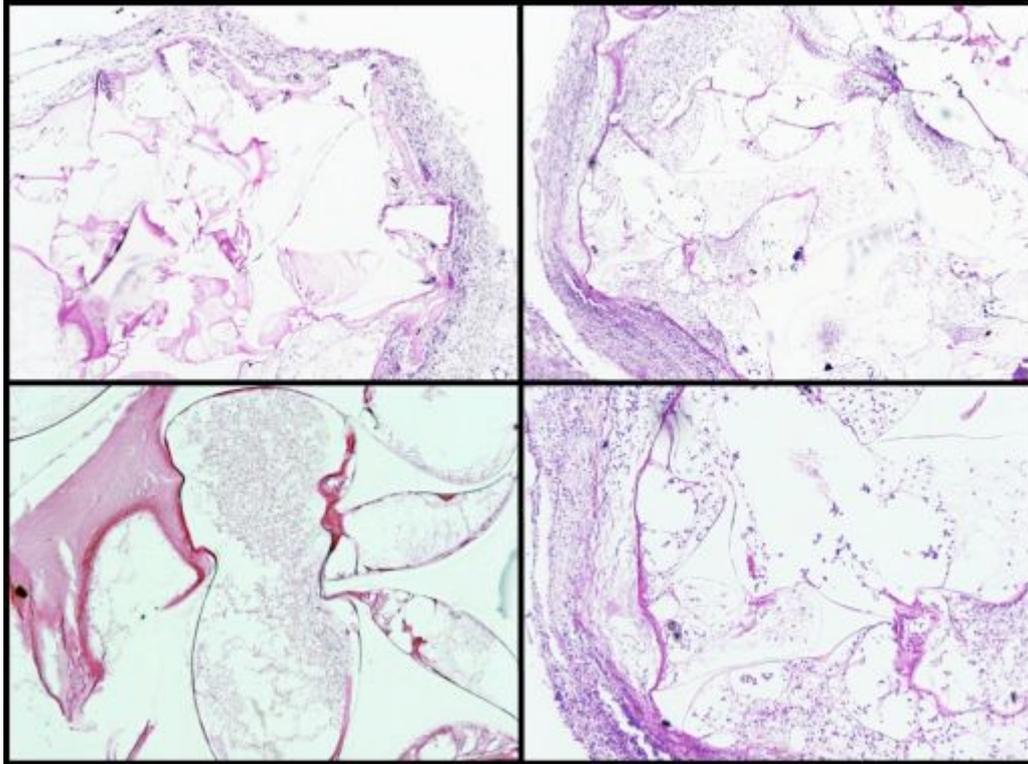


Figura 2.39: Histología de las muestras de *biorubber* con matrigel y con matrigel/C3a. (columna de la izquierda) *biorubber* sin complemento, donde se ve como las células están acumuladas en los alrededores del biourbber y no hay invasión del interior. (columna de la derecha) Detalle del *biorubber* con el complemento C3a donde se puede ver claramente la invasión por linfocitos del interior del material.

Al realizar estos experimentos se encontraron una serie de complicaciones en los ratones ocasionados por la gran cantidad de C3a y C5a que había en el *biorubber*. En este caso se tuvo que sacrificar el que llevaba este último factor y el que contenía el C3a se tuvo que analizar antes de tiempo. Por el contrario, el que se puso como control no sufrió ningún tipo de reacción adversa ni rechazo del material, demostrando nuevamente la compatibilidad del *biorubber in vivo*.

Para confirmar que se produjo una invasión de linfocitos en el *biorubber*, se realizó un análisis inmunohistológico a los cortes efectuados al ratón con C3a. En la Figura 2.40 se puede observar la gran cantidad de linfocitos que se encuentran dentro del *biorubber*. Ante una respuesta inmunológica de este tipo, en primer lugar acuden los linfocitos encargados de eliminar las bacterias infecciosas que pudieran aparecer. En segundo paso, se acercan las células mesenquimales, llamadas en este

caso por los complementos C3a y C5a, para reparar las zonas dañadas. Viendo la gran cantidad de linfocitos que acuden a la zona en los *biorubber*, que contenían el C3a, en contraposición con el blanco que se utilizó, sin estos factores se puede hacer una primera aproximación en la que el método es efectivo, ya que se consigue atraer, gracias a dichos factores, a los linfocitos y las células mesenquimales al lugar del daño, con el objetivo de poder regenerar zonas donde estuviera limitado el acceso de estas células, como, por ejemplo, en el tejido miocárdico.

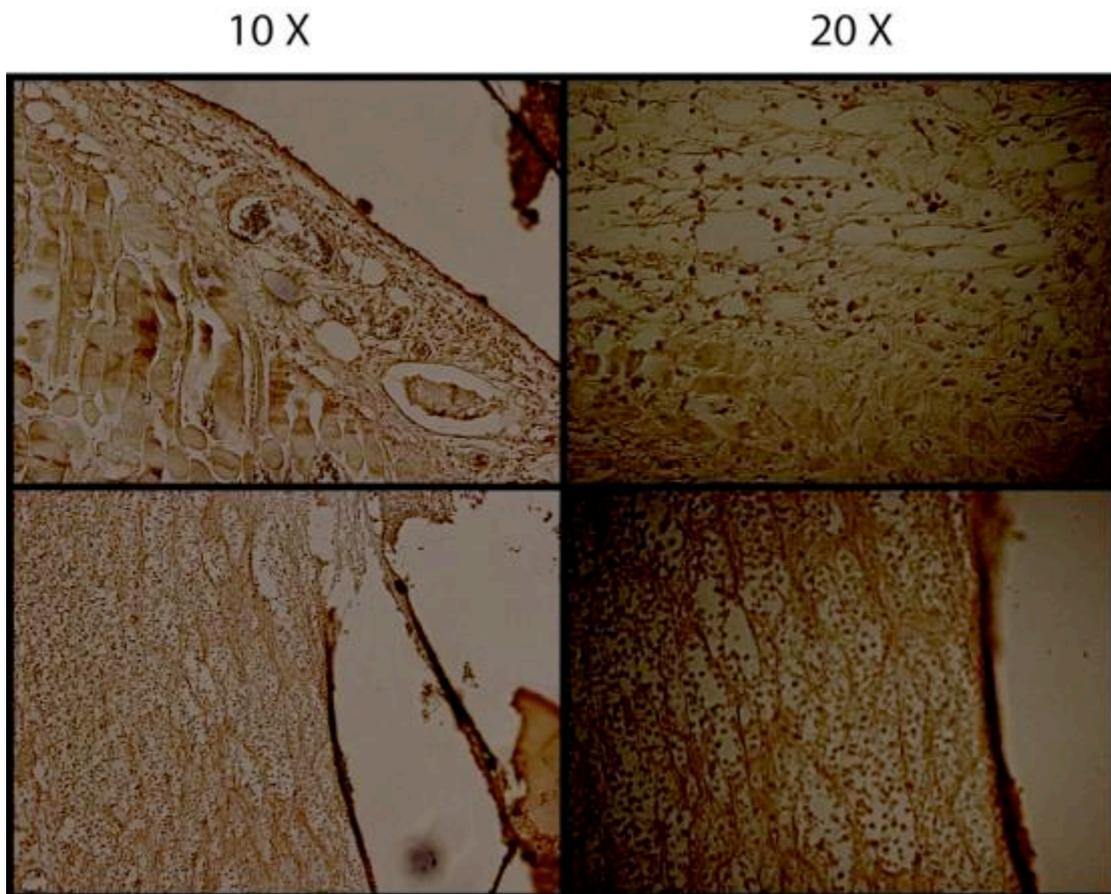


Figura 2.40: Inmunología teñida con Cd45 para ver los linfocitos en el *biorubber*. (parte superior) muestra de *biorubber* solo con matrigel, en donde se puede ver los linfocitos en la capa más externa del *biorubber*. (parte inferior) Interior del *biorubber* con matrigel y C3a. La invasión de los linfocitos en el interior es muy elevada.

Para concluir con la evaluación *in vivo* de la espuma de *biorubber* se procedió a hacer un estudio para ver la posibilidad de usar el biomaterial como implante de regeneración ósea. Dentro de este estudio existen tres aspectos principales que se querían observar, el grado de biodegradación que sufría este nuevo material, la

función estructural del material a la hora de realizar la osteointegración y la biocompatibilidad del biomaterial en el sistema.

Los defectos óseos segmentarios en huesos largos son un problema importante en cirugía ortopédica. Sean producidos por un proceso infeccioso, una fractura, un tumor u otra causa, su resolución representa un reto en muchas ocasiones y cuando los defectos son extensos las alternativas terapéuticas disponibles son técnicamente exigentes, laboriosas y tediosas [78]. Algunas de las alternativas más populares incluyen el acortamiento de la extremidad, los trasportes óseos y los autoinjertos óseos vascularizados. El uso de aloinjertos estructurales en este tipo de defectos es atractivo por su fácil disponibilidad y sus propiedades mecánicas [79, 80] pero plantea importantes limitaciones debido a las malas propiedades biológicas de éstos y al entorno local en este tipo de defectos con poco potencial de regeneración y escasa vascularización residual [78]. Todos estos factores disminuyen las posibilidades de consolidación de los bordes de los injertos y de integración completa a largo plazo.

La búsqueda de materiales y sustancias biológicamente activos que faciliten la reconstrucción de defectos óseos ha avanzado de manera revolucionaria en las últimas dos décadas [81]. La alternativa clásica ha sido el uso de injerto esponjoso autólogo, pero esta opción se ha visto complementada con la disponibilidad de sustancias y materiales artificiales, que tienen potencial osteoconductor [82], así como de agentes osteoinductores como la proteína morfogenética humana recombinante [83].

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés vascular endotelial growth factor) es una proteína homodimérica que se comporta *in vivo* e *in vitro* como un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales y presenta un poderoso efecto angiogénico [84]. Se ha utilizado de manera experimental con éxito para el tratamiento de fracturas [85] y pseudoartrosis [62] y, su inhibición entorpece la regeneración ósea [86].

Por ello, resulta de interés el realizar una estructura porosa con actividad superficial para la migración celular a lo largo de todo el hueso, provocando la señalización de la osteinducción celular. Si se consigue la vascularización interna del material, como ya se ha conseguido en los experimentos realizados en versiones anteriores del *biorubber*, la osteointegración será mucho mayor. Para analizar los resultados se realizaron, tras las 12 semanas de experimento, unas micrografías por MicroCT (Figura 2.41), en las cuales se pudo ver como el *biorubber* desapareció por completo en todos los experimentos. De aquí se deduce que este nuevo *biorubber* tiene una mayor biodegradación enzimática que los anteriormente descritos, debido, entre otros factores al menor grado de reticulación, ya que la temperatura de síntesis fue de 80°C, lo que permite un mayor control en el entrecruzado del material, además de la mayor porosidad del andamio, lo que permite una mayor interacción biológica entre la superficie y los factores de biodegradación. Es de destacar la inflamación que se produjo en las muestras que llevaban *biorubber*, seguramente debido a la liberación de ácido cítrico tras la degradación del material.

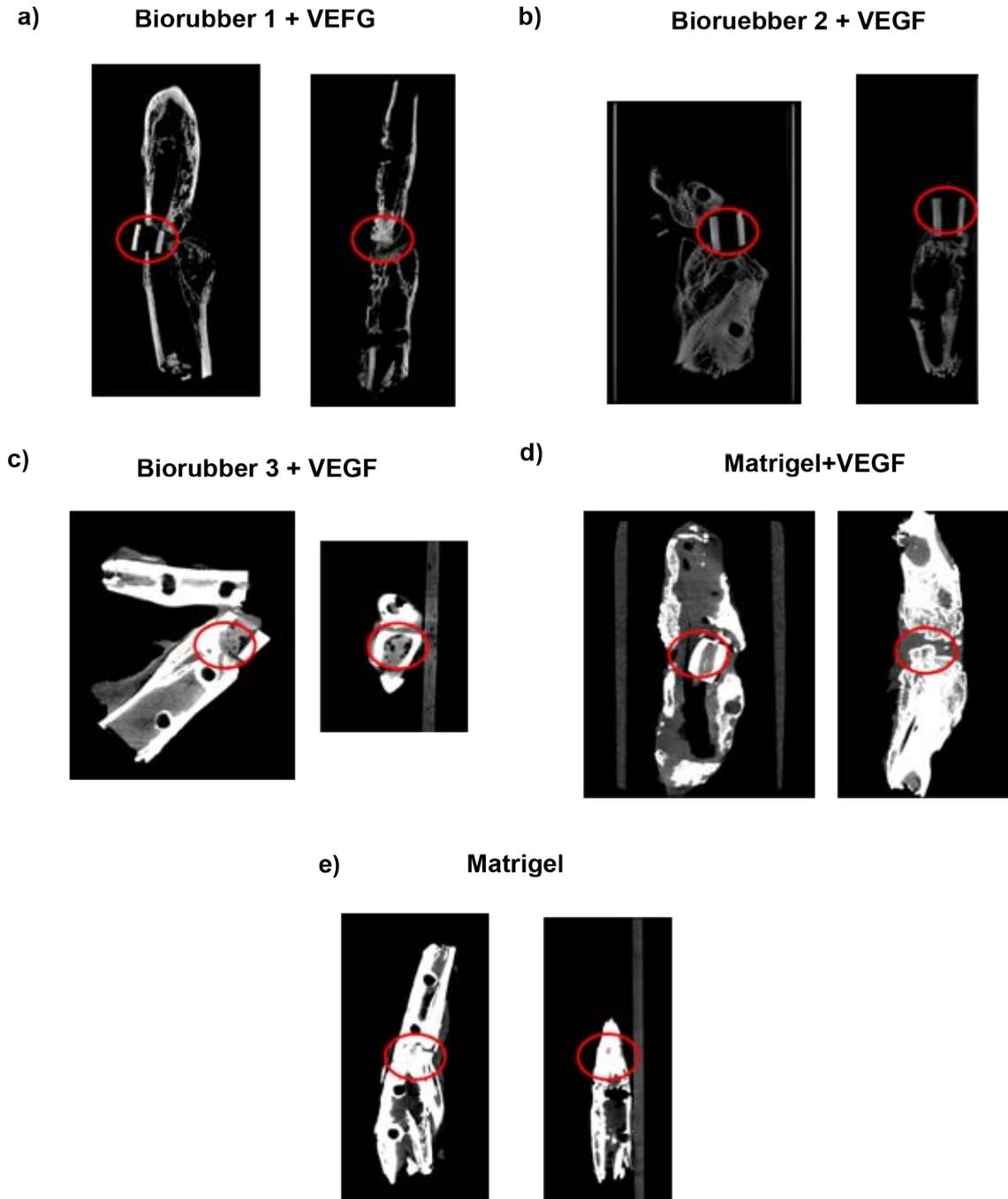


Figura 2.41: Imágenes de los cortes de microCT realizados en algunas de las muestras obtenidas. a) y b) *biorubber* con VEGF donde no se observa ninguna formación de callo en el interior del hueso. c) *biorubber* con VEGF donde se aprecia una formación de hueso en la parte inferior. D) matrigel+VEGF, la muestra inicio la formación pero no unió ninguna de las dos partes del hueso. e) muestra control compueseta solo por matrigel, donde se observa la formación del hueso y la unión por las dos partes.

Si comparamos los controles (matrigel), el compuesto matrigel+VEGF y el *biorubber* bioactivo con VEGF (Figura 2.41), el primero de ellos es el que más actividad biológica tiene provocando la formación de un callo mucho mayor y con una fusión entre partes mucho mayor en 4 de los 6 conejos operados. En el *biorubber* con VEGF se observa una formación de hueso en el extremo inferior

(Figura 2.41c) con la consiguiente unión débil con la parte inferior del hueso, en una de las muestras obtenidas. El hecho de que solo una de las muestras se anclase pudo ser debido a varios factores. En primer lugar el tiempo de reacción y la temperatura a la que se produjo la unión entre el VEGF y el PFM, pudo no ser la correcta, pero se prefirió realizar el experimento a temperatura ambiente durante 30 minutos, para no provocar la desnaturalización de la proteína y no tener a los animales mucho tiempo sobre la mesa de operaciones, ya que podría ser contraproducente. Además, la cantidad de VEGF que se encuentra en la superficie es mucho menor que la cantidad de proteína vascular de los otros experimentos. Esto puede indicar que la molécula no fue anclada en la superficie o que la cantidad utilizada no fue la suficiente.

Como conclusión de este experimento se deduce que la nueva espuma de *biorubber* es biodegradable en 12 semanas *in vivo*, provocando una cierta inflamación debida a la acción del ácido cítrico. Es de destacar también la unión producida en una de las muestras analizadas. No obstante, la actividad superficial del *biorubber* se puede mejorar, realizando una adecuada metodología en la que la proteína se ancle correctamente y en una mayor cantidad para provocar la migración y señalización celular. Además, se podría realizar una modificación en la que se deje expuesta en, mayor medida, la parte activa del VEGF.

2.4.4 Resumen

Tras los estudios realizados podemos llegar a conclusiones de tres aspectos fundamentales. El primero de ellos es que se ha conseguido obtener una espuma de *biorubber* biodegradable, mediante un proceso rápido, limpio y exento de materiales tóxicos. Gracias a la síntesis por microondas en menos de 10 minutos tenemos espumas de *biorubber* operativas y preparadas para ser usadas.

En un segundo aspecto se trabaja con la biodegradabilidad del material, algo difícil de efectuar, ya que debido al efecto de las microondas, el grado de reticulación de las muestras es diferente en cada punto de la espuma, lo que provoca resultados extraños en el análisis. No obstante, un dato importante es el efecto que tiene el autoclavado dentro de la biodegradación, favoreciendo el tiempo que se necesita

para degradar las muestras. Un aspecto importante que queda por analizar para próximos trabajos, es el efecto que tiene el autoclavado en la propiedades mecánicas.

Un tercer aspecto a tener en cuenta es la modificación superficial del material y como consecuencia de ello la biocompatibilidad del mismo. Gracias a la facilidad que presenta el plasma se ha podido modificar la superficie del *biorubber*, obteniendo diferentes grados de hidrofiliidad del mismo , algo con lo que se podrá jugar para obtener una adherencia óptima de las células al *biorubber*. Este último aspecto es de gran importancia, ya que es posible modificar la superficie con diferentes péptidos señalizadores, los cuales podrán realizar funciones de diferenciación celular en próximos estudios.

2.5 EL *BIORUBBER* COMO *SCAFFOLD* CARDIACO.

Una vez que se han obtenido estructuras tridimensionales desordenadas de poros interconectados con el biroubber (espumas de *biorubber*), se procedido al estudio para otras aplicaciones entre las que se encuentra una aplicación clínica de muy alta demanda que es la regeneración cardiaca. Actualmente existen diversas formas de sintetizado de *scaffold* de biomateriales para su utilización en corazón [5, 87-91] . Una de ellas es la que desarrollo Vunjak-Novakovic en la que se utilizó la técnica de salt leaching desarrollada entre los años 1998-1999 [19] creando en su interior además unos agujeros creados por láser, para permitir la difusión de nutrientes a las células del interior (Figura 2.42) [87]. Recientemente también ha sido creada una estructura de esta índole realizada también con láser, en la que se obtiene una estructura ordenada de los cardiomiocitos que se introdujeron en el interior (Figura 2.43). La ordenación celular es de gran importancia en especial en el corazón, dado que se debe ejercer una contracción y una expansión en la misma dirección [13].

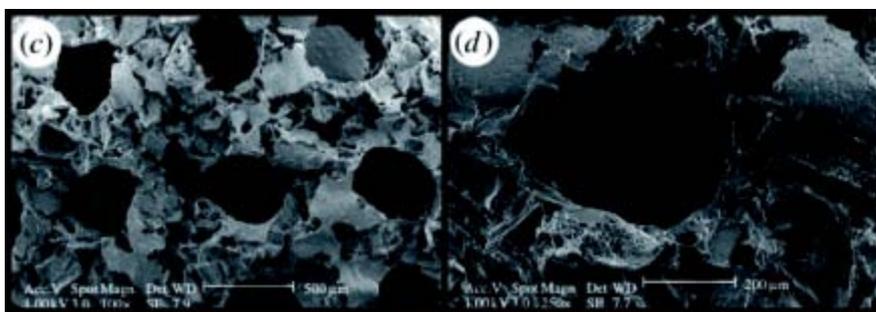


Figura 2.42: : Imágenes de microscopía electrónica de barrido del *Biorubber* producido mediante la adición de sales y posterior mecanizado con láser para producir unos orificios, por donde puedan difundir el oxígeno y los nutrientes.[87]

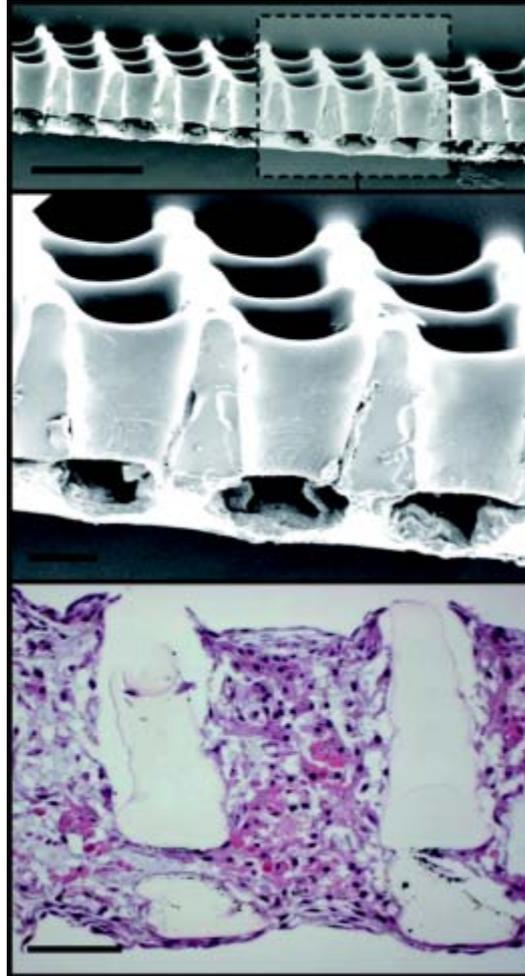


Figura 2.43: Imágenes de un *biorubber* estructurado para el crecimiento ordenado de cardiomiocitos. [13]

En cuanto a los materiales utilizados para este tipo de órganos se encuentran todos aquellos que presentan una propiedades elastoméricas apropiadas, ya que es una zona donde se van a soportar grandes dosis de esfuerzos mecánicos, algo que es imprescindible controlar a la hora del estudio de estos materiales. Por ello, el *biorubber* se presenta como una buena alternativa.

2.5.1 Plan de trabajo

Así, en este capítulo se tratará de obtener una estructura ordenada en el *biorubber* para el crecimiento celular de manera más barata que las técnicas por láser y con una mayor interconectividad entre los poros.

2.5.2 Materiales y métodos

A la hora de realizar una estructura ordenada, se consideraron fundamentalmente dos formas de fabricación. En ambas el concepto es el mismo, realizar una estructura ordenada que servirá como molde para la fabricación del *biorubber*. El problema residía en los materiales empleados para realizar estas estructuras. El *biorubber* en sí, como ya se ha explicado en anteriores capítulos, una vez que se sintetiza el prepolímero se obtiene de forma fluida, por lo que puede ser vertido en una malla que le confiera la forma interna. Esta estructura ha de ser extraíble de alguna forma. Se plantearon dos materiales para configurar la estructura. En primer lugar parafina, la cual se podría utilizar para configurar la malla mediante la técnica de cera perdida. Por otro lado se pensó en poliestireno, el cual es un material termoplástico, lo que permite obtener formas determinadas mediante la aplicación de calor, que fluirá y se podrá moldear. Otra variante de este último fue la utilización de algún disolvente, que permitirá el hinchamiento del material, lo que le daría la posibilidad de ser inyectable, dado que este disolvente se sitúa entre las cadenas poliméricas permitiendo que el material fluya. Una vez que la estructura deseada se ha conseguido, se evapora el disolvente, obteniendo una estructura rígida.

2.5.2.1 Cera fundida

En el esquema (Figura 2.44) se representa el proceso mediante el cual se realizó la malla. Los requerimientos iniciales de esta malla debían ser los siguientes:

- Temperatura de fusión 80-90°C. Para extraer la cera una vez que el material ha sido terminado.
- Debía permitir la interconexión entre cada uno de los poros.

Para ello se realizó un análisis por ordenador de la estructura que debería tener la malla (Figura 2.45). Los materiales se llevaron a una empresa fabricante de joyas y se obtuvo la muestra de la Figura 2.46, mediante microfabricación, que consiste en utilizar dos ceras de punto de fusión diferente. La estructura que nos interesa se realiza con la cera de punto de fusión más elevado (cerca de los 90°C) mientras que la otra tiene un punto menor. Esto es así para que una de las ceras (la de menor T_f)

haga de soporte de la otra. Una vez ha concluido el proceso, se introduce en el horno a una temperatura de unos 60°C para eliminar la cera soporte, consiguiendo la estructura final (Figura 2.45). La técnica consiste en dos inyectores de cera que van realizando diferentes pasadas construyendo la estructura plano por plano. Primero hace una pasada dibujando con las dos ceras, la de menor punto de fusión como soporte y la otra como estructura de interés. Cuando finaliza este primer paso, sube a un segundo plano para dibujar la segunda capa de la misma forma que la anterior, permitiendo de esta forma crear estructuras tridimensionales.

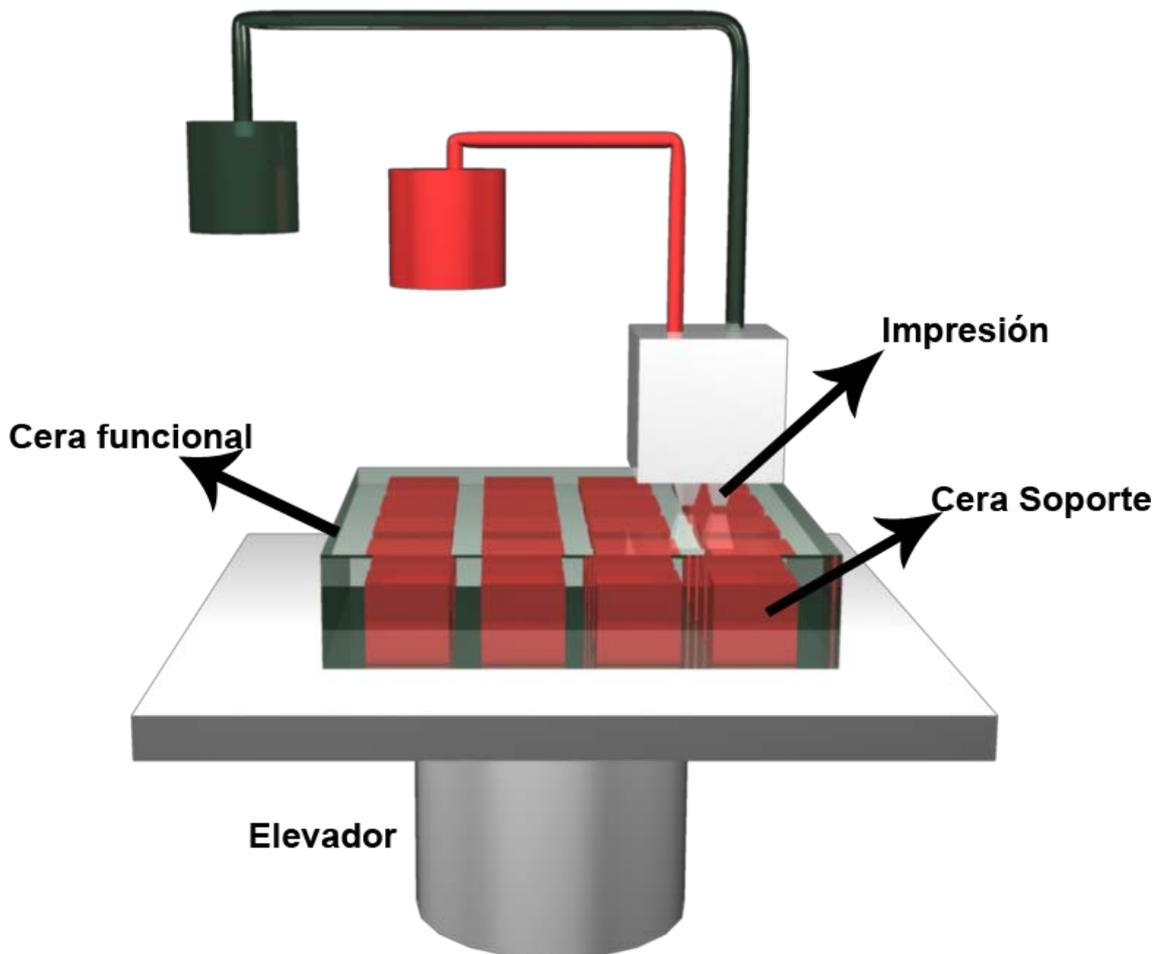


Figura 2.44: Esquema de funcionamiento de una máquina de microfabricación mediante la técnica de cera perdida.

Para la estructura objeto de estudio se diseñaron dos tipos de estructuras diferentes por ordenador. La primera de ellas consistía en esferas unidas por cilindros (Figura 2.46), la cual permitiría tener superficies más suaves para la adhesión de las células. El problema fue a la hora del cálculo por ordenador, dado que la cantidad de polígonos necesarios para la construcción tridimensional de la

estructura causaba una gran dificultad en el procesado de la imagen. Además, la precisión de la máquina de microfabricación [20, 64] no daría el aspecto deseado a la estructura final, por lo que se decidió realizar un segundo modelo. Este modelo era una simplificación del primero, considerando simplemente la estructura de la malla (Figura 2.46), con el objeto de facilitar la fabricación y el procesado de la imagen.

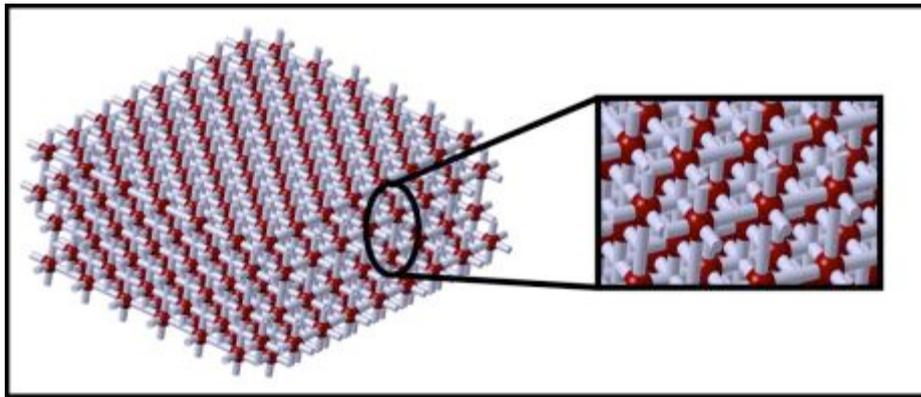


Figura 2.45: Estructura generada por CAD de la malla. En el detalle se ven las esferas en los vértices y los cilindros en las aristas.

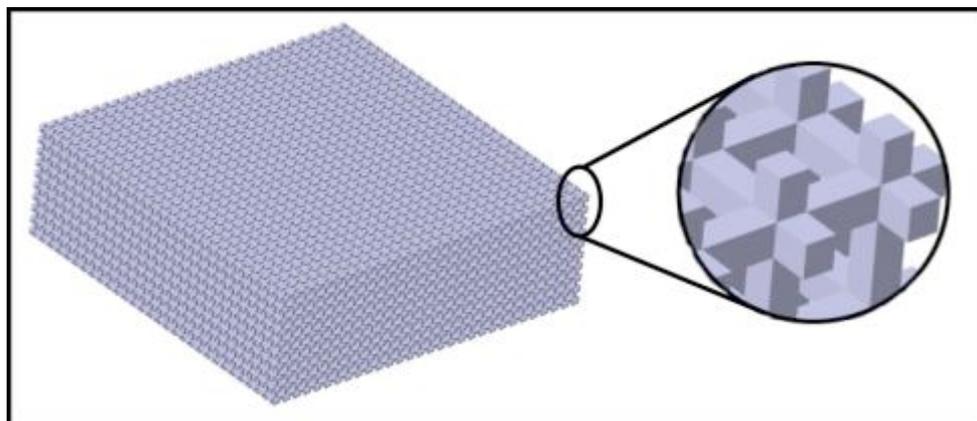


Figura 2.46: Estructura generada por CAD, donde el detalle de la malla se reduce en gran medida, para facilitar la fabricación del modelo.

En esta segunda malla se consideró una estructura de *biorubber* final que diera una interconectividad entre poros y que fuese de forma ordenada, con lo que se conseguiría estructurar las células en su interior en forma de fibras.

Para ello, se quiso hacer una malla estructurada que fuese soluble en disolventes con diferente polaridad a los del polímero que se utilizaron, en concreto disolvente apolares. Para ello, se mezcló poliestireno en polvo con acetona para conseguir una fusión entre todas las partículas y, a su vez, lograr una fluidez en el polímero sin llegar a estar disuelto. Esta mezcla se introdujo en una jeringuilla, con la que se realizo la estructura, como se indica en la Figura 2.47. Una vez concluido el proceso, la muestra se dejó secar lentamente para que la acetona se liberase y así se endureciese el polímero. Una vez concluido el proceso se añadió el polímero en caliente, fluido, y precurado, para que se introdujese entre los poros de la malla,. Posteriormente, se incubó durante dos días a 150°C para completar el curado del polímero. Cuando este proceso finaliza se introduce en tolueno para proceder a la extracción del poliestireno y se deja toda la noche.

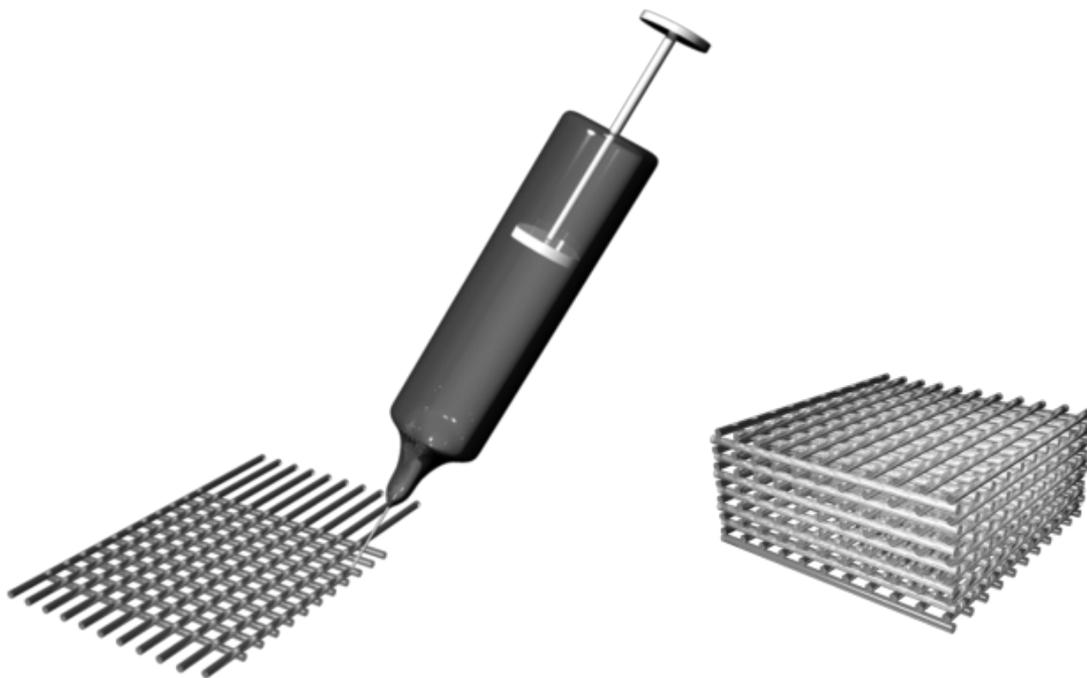


Figura 2.47 Esquema de la construcción de la malla de poliestireno.

2.5.3 Resultados y discusión.

Tras realizar las estructuras de cera (Figura 2.48), se procedió a realizar la estructura de *biorubber*. En primer lugar se hizo el prepolímero de la forma

habitual, para posteriormente añadirlo sobre la estructura de cera, con el objeto de curarlo. El problema surgió cuando se vertió el *biorubber* curado sobre la estructura de cera, ya que esta se disolvió con el polímero. En un principio, si la estructura estaba fabricada con cera, no debería ocurrir nada, debido a que la parafina es una sustancia apolar y ambos materiales deberían ser compatibles. Por ello se tuvo que desestimar este proceso debido a que era complicado la estructura de cera con compuestos compatibles a nuestro material, debido al punto de fusión de estas sustancias. Lo que se dedujo fue que se añadieron a la composición de la cera sustancias inorgánicas para que el punto de fusión de la cera fuera mayor y así fuese estable a mayores temperaturas.

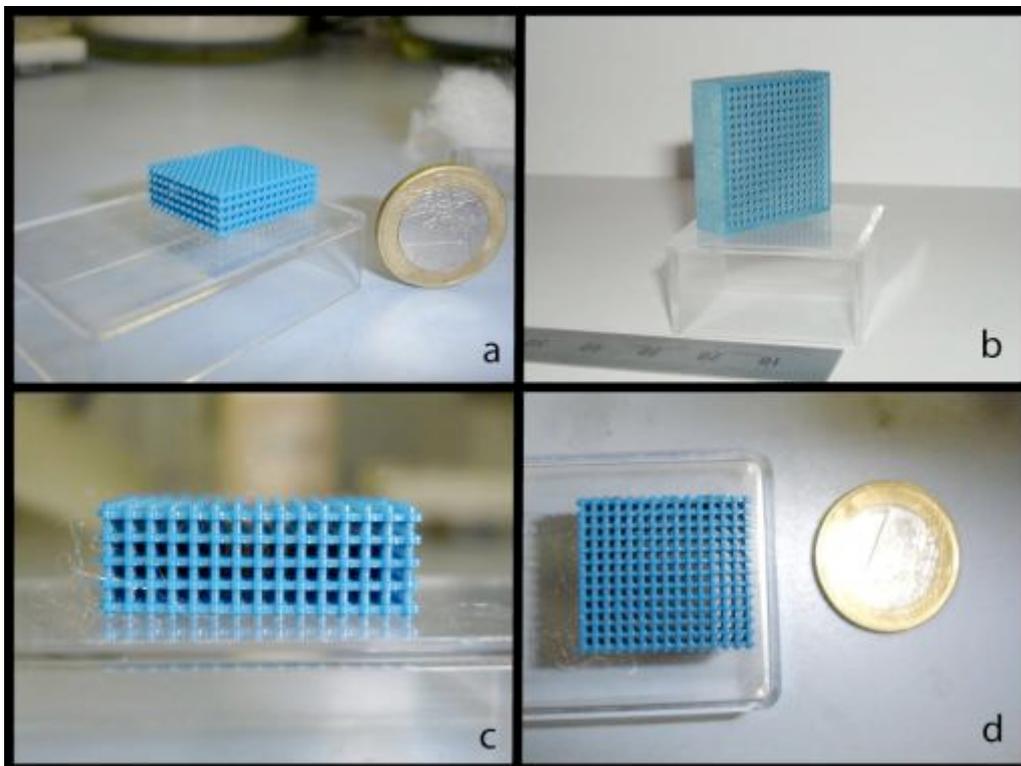


Figura 2.48 Estructura final de cera, fabricada mediante la técnica de cera perdida.

A la hora de realizar la estructura de poliestireno, ésta se realizó de forma manual debido a que no se encontró ninguna máquina que fuera capaz de hacerlo de forma mecánica. Todas las técnicas que se barajaron para realizar esta figura trabajaban

con materiales que no podrían ser extraídos con facilidad. La mayoría de materiales eran resinas epoxi que una vez reticuladas son prácticamente insolubles en cualquier sustancia. Por ello, se optó por la utilización de poliestireno como material para conformar la malla. Es un material fácilmente manipulable y con gran capacidad para ser inyectable, ya que al contacto con acetona, se hincha permitiendo una alta moldeabilidad lo que le confiere capacidad para ser inyectado. Esto permitió introducirlo en un jeringuilla y de forma manual realizar la estructura de poliestireno.

Una vez conformado el polímero, se realizó una microscopia electrónica de barrido (Figura 2.49), en la cual se puede ver la estructura interna del material y la interconexión entre los diferentes poros. Es importante ver el tamaño que tiene cada uno de los poros, lo cual le confiere una estructura que permitiría la ordenación celular. El gran problema que presenta esta estructura es la separación que hay entre cada uno de los puntos, y la irregularidad de esta separación, dado que se hizo de forma manual.

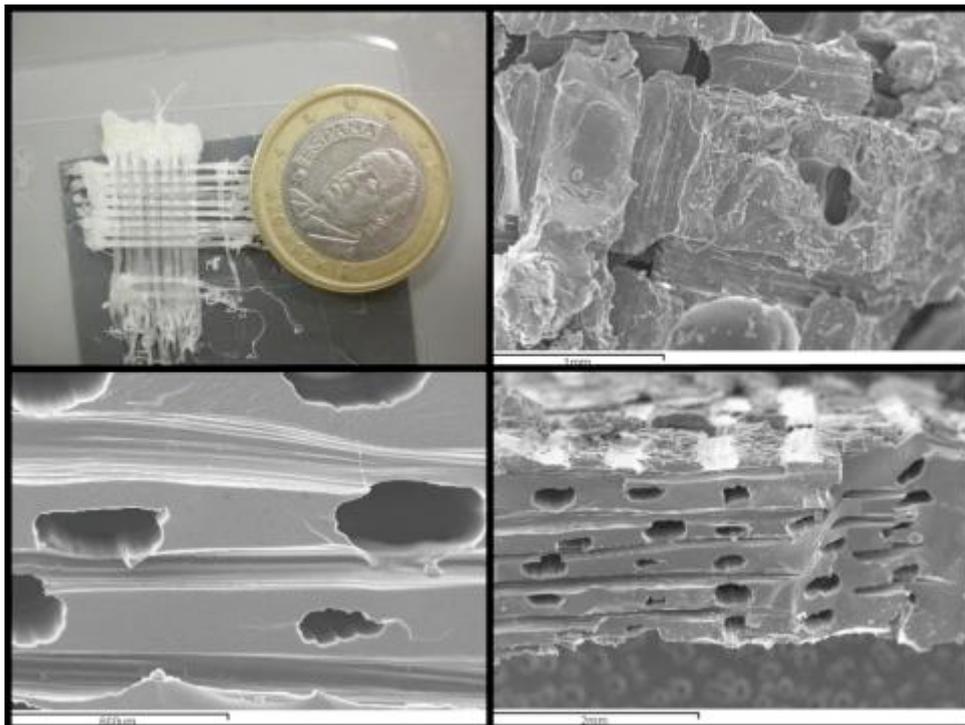


Figura 2.49: a) Estructura final de poliestireno. b,c,d) Imágenes de microscopia electrónica, donde se ve el detalle de la interconexión entre poros, en todas las direcciones

Como en las anteriores estructuras, se han realizado pruebas *in vitro* (Figura 2.50) del material para ver la capacidad de adhesión de las células y su interpenetración, pero al igual que con el resto fue difícil obtener células en el interior, debido a la escasa capacidad de adhesión del *biorubber*. Se introdujeron fibroblastos de ratón procedentes de diafragma y peritoneo, los cuales tienen una gran adhesión a todo tipo de superficies. Al realizar los cortes de histología sólo se pudo observar el biomaterial y no había evidencias claras de células en el interior. Únicamente se veían células puntuales en la pared del *biorubber*.

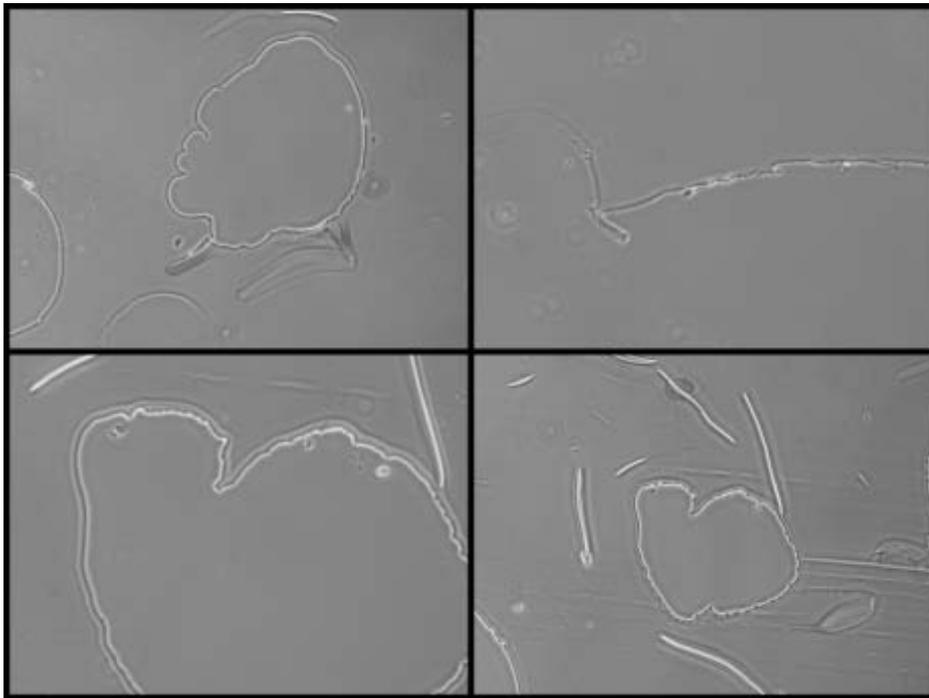


Figura 2.50: Cortes histológicos del *biorubber* estructurado trascurridos 3 días de cultivo *in vitro*.

2.5.4 Resumen

Se ha obtenido un material con las características deseadas mediante un método de fabricación que sería de fácil mecanización. Por el contrario, no se ha conseguido que las células se adhieran a la superficie debido a la baja interacción de la misma.

En trabajos posteriores estas superficies deberán ser modificadas con las técnicas oportunas, como el plasma. De esta forma podrán introducirse una serie de péptidos marcadores, capaces de señalar el crecimiento celular en el orden deseado.

2.6 Bibliografía

1. Ma, P.X., *Scaffolds for tissue fabrication*. Materials Today, 2004.
2. Webb, A., *Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**: p. 511-6.
3. Stevens, M.M., *Biomaterials for bone tissue engineering* Materials Today, 2008. **11**(5): p. 18-25.
4. Xue, L. and H.P. Greisler, *Biomaterials in the development and future of vascular grafts*. J Vasc Surg, 2003. **37**(2): p. 472-80.
5. Vunjak-Novakovic, G. and M. Radisic, *Cell seeding of polymer scaffolds*. Methods Mol Biol, 2004. **238**: p. 131-46.
6. Obradovic, B., et al., *Integration of engineered cartilage*. J Orthop Res, 2001. **19**(6): p. 1089-97.
7. Boublik, J., et al., *Mechanical properties and remodeling of hybrid cardiac constructs made from heart cells, fibrin, and biodegradable, elastomeric knitted fabric*. Tissue Eng, 2005. **11**(7-8): p. 1122-32.
8. Degano, I.R., et al., *The effect of self-assembling peptide nanofiber scaffolds on mouse embryonic fibroblast implantation and proliferation*. Biomaterials, 2009. **30**(6): p. 1156-65.
9. Ameer, G.A., T.A. Mahmood, and R. Langer, *A biodegradable composite scaffold for cell transplantation*. J Orthop Res, 2002. **20**(1): p. 16-9.
10. Wang, Y., et al., *A tough biodegradable elastomer*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 602-6.
11. Kang, Y., et al., *A new biodegradable polyester elastomer for cartilage tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2006. **77**(2): p. 331-9.
12. Gerecht, S., et al., *A porous photocurable elastomer for cell encapsulation and culture*. Biomaterials, 2007. **28**(32): p. 4826-35.
13. Engelmayr, G.C., Jr., et al., *Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy*. Nat Mater, 2008. **7**(12): p. 1003-10.
14. David Horna, C.E.S., Núria Agulló, Salvador Borrós., *Biodegradable elastomers for applications in tissue engineering and regenerative medicine*. Afinidad, 2007. **64**(529): p. 404-414.
15. Kibbe, M.R., et al., *Citric acid-based elastomers provide a biocompatible interface for vascular grafts*. J Biomed Mater Res A, 2009.
16. Yang, j., *Novel citric acid-based biodegradable elastomers for tissue engineering*. Adv Materials, 2004. **16**: p. 511-6.
17. Yang, J., et al., *Novel biphasic elastomeric scaffold for small-diameter blood vessel tissue engineering*. Tissue Eng, 2005. **11**(11-12): p. 1876-86.
18. Yang, J., et al., *Synthesis and evaluation of poly(diols citrate) biodegradable elastomers*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1889-98.
19. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.

20. Landers, R., et al., *Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering*. *Biomaterials*, 2002. **23**(23): p. 4437-47.
21. Lu, Y. and S.C. Chen, *Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. **56**(11): p. 1621-33.
22. Yang, S., et al., *The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques*. *Tissue Eng*, 2002. **8**(1): p. 1-11.
23. Wiesbrock, F., R. Hoogenboom, and U.S. Schubert, *Microwave-Assisted Polymer Synthesis: State-of-the-Art and Future Perspectives*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004. **25**(20): p. 1739-1764.
24. Gedye, R.N., F.E. Smith, and K.C. Westaway, *The rapid synthesis of organic compounds in microwave ovens*. *Canadian Journal of Chemistry*, 1988. **66**(1): p. 17-26.
25. Giguere, R.J., et al., *Application of commercial microwave ovens to organic synthesis*. *Tetrahedron Letters*, 1986. **27**(41): p. 4945-4948.
26. Metaxas, A.C., Meredith, R.J., *Industrial Microwave Heating*. Peter Perigrinus. London, 1983.
27. Laszlo, P., *Preparative chemistry using supported reagents*. academmis press, 1987.
28. Thuery, J., *Microwaves: Industrial, Scientific, and Medical Applications*. Artech House. Boston/London., 1992.
29. Hayes, B.L., *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. CEM Publishing: Matthews, 2002.
30. Loupy, A., *Microwaves in Organic Synthesis*. Wiley-VCH Publishing, 2002.
31. Velmathi, S., et al., *A Rapid Eco-Friendly Synthesis of Poly(butylene succinate) by a Direct Polyesterification under Microwave Irradiation*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2005. **26**(14): p. 1163-1167.
32. Burgeson RE, N.M., *Collagen types. Molecular structure and tissue distribution*. *Clin Orthop Relat Res*, 1992. **282**: p. 250-72.
33. Semino, C.E., et al., *Entrapment of migrating hippocampal neural cells in three-dimensional peptide nanofiber scaffold*. *Tissue Eng*, 2004. **10**(3-4): p. 643-55.
34. Garreta, E., et al., *Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells and mouse embryonic fibroblasts in a three-dimensional self-assembling peptide scaffold*. *Tissue Eng*, 2006. **12**(8): p. 2215-27.
35. Genove, E., et al., *The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function*. *Biomaterials*, 2005. **26**(16): p. 3341-51.
36. Kisiday, J., et al., *Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 9996-10001.
37. Narmoneva, D.A., et al., *Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis*. *Biomaterials*, 2005. **26**(23): p. 4837-46.
38. Semino, C.E., et al., *Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds*. *Differentiation*, 2003. **71**(4-5): p. 262-70.
39. Holmes, T.C., et al., *Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(12): p. 6728-33.

40. Misawa, H., et al., *PuraMatrix facilitates bone regeneration in bone defects of calvaria in mice*. Cell Transplant, 2006. **15**(10): p. 903-10.
41. Sodian, R., et al., *Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering*. Tissue Eng, 2000. **6**(2): p. 183-8.
42. Degano, I.R., et al., *Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2008. **29**(4): p. 427-37.
43. Polak, J. and L. Hench, *Gene therapy progress and prospects: in tissue engineering*. Gene Ther, 2005. **12**(24): p. 1725-33.
44. Yoon, S.J., et al., *Reduction of inflammatory reaction of poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) using demineralized bone particles*. Tissue Eng Part A, 2008. **14**(4): p. 539-47.
45. Fellah, B.H., et al., *Inflammatory reaction in rats muscle after implantation of biphasic calcium phosphate micro particles*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(2): p. 287-94.
46. Santerre, J.P., et al., *Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials*. Biomaterials, 2005. **26**(35): p. 7457-70.
47. Petrini, P., et al., *Design, synthesis and properties of polyurethane hydrogels for tissue engineering*. J Mater Sci Mater Med, 2003. **14**(8): p. 683-6.
48. Douglas, T. and H.J. Haugen, *Coating of polyurethane scaffolds with collagen: comparison of coating and cross-linking techniques*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(7): p. 2713-9.
49. Asplund, J.O., et al., *Synthesis of highly elastic biodegradable poly(urethane urea)*. Biomacromolecules, 2007. **8**(3): p. 905-11.
50. Ji, J., et al., *A novel urethane containing copolymer as a surface modification additive for blood contact materials*. J Mater Sci Mater Med, 2002. **13**(7): p. 677-84.
51. Alperin, C., P.W. Zandstra, and K.A. Woodhouse, *Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications*. Biomaterials, 2005. **26**(35): p. 7377-86.
52. Boretos, J.W. and W.S. Pierce, *Segmented polyurethane: a new elastomer for biomedical applications*. Science, 1967. **158**(807): p. 1481-2.
53. Kim, T.K., et al., *Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres*. Biomaterials, 2006. **27**(2): p. 152-9.
54. H. Haugen, V.R., M. Brunner, J. Will, E. Wintermantel, *Water as foaming agent for open cell polyurethane structures*. J Mater Sci Mater Med, 2004. **15**: p. 343-346.
55. Saunders, J.H., R. H. Hansen, *Plastic Foams*. 1972. **1**(Chapter 2).
56. deVires, A.J., *Rubber Chem and technol.*, 1965. **31**.
57. Gibbs, J.W., *Collected Works*. Longmans, Green and Co., 1928. **I**.
58. Gibbs, J.W., *Trans. Coneecticut Acad*, 1876. **3**.
59. C., M., *Nuovo Cimento*. 1871. **2**.
60. Hansen, R.H.a.M.W.M., *J. Polym. Sci*, 1965. **3B**: p. 325.
61. Brownlow, H.C. and A.H. Simpson, *Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits*. J Orthop Res, 2000. **18**(3): p. 438-42.

62. Eckardt, H., et al., *Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model*. J Bone Joint Surg Br, 2005. **87**(10): p. 1434-8.
63. T. Boinowitz, R.B., W. Gower,, *Impact of Silicone Surfactants on the Flammability of Flexible Slabstock Foam – Comparison of California TB 117/draft 2002 with established Flammability Tests*. polyurethanes Expo 2003, 2003: p. 324-330.
64. R. Landers, H.J., R. Mülhaupt, *Scaffolds for tissue engineering applications fabricated by 3D plotting*.
65. R. Landers, W.K., T. Boinowitz, *New Cell Opening Strategies for TDI 80 Viscoelastic Foams by Additive Means*. Degussa AG; p. 77-83.
66. Francesch, L., et al., *Fabrication of Bioactive Surfaces by Plasma Polymerization Techniques Using a Novel Acrylate-Derived Monomer*. Plasma Processes and Polymers, 2005. **2**(8): p. 605-611.
67. Au, A., et al., *Formation of osteogenic colonies on well-defined adhesion peptides by freshly isolated human marrow cells*. Biomaterials, 2007. **28**(10): p. 1847-61.
68. Verrier, S., et al., *Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process*. Biomaterials, 2002. **23**(2): p. 585-96.
69. Núria Marí-Buyé, S.O.S., Carles Colominas, Carlos E. Semino, Karen K. Gleason, and Salvador Borró, *Functionalized, Swellable Hydrogel Layers as a Platform for Cell Studies* Advanced Functional Materials, 2009. **19**: p. 1--11.
70. Hubbell, J.A., *Bioactive biomaterials*. Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(2): p. 123-9.
71. Moroni, L. and J.H. Elisseeff, *Biomaterials Engineered for integration*. Materials Today, 2008. **11**(5).
72. Wendy F. Liu, a.C.S.C., *Engineering biomaterials to control cell function*. Materials Today, 2005. **8**(12): p. 28-35.
73. Jian Yang, A.R.W., and Guillermo A. Ameer, *Novel Citric Acid-Based Biodegradable Elastomers for Tissue Engineering*. Adv Materials, 2004. **16**(2): p. 511-516.
74. V s Zope, D.S.M., Patil, Agrawal, *Studies of degradation of waste poly(ethylene terephthalate) using autoclave technique*. IE journal-CH, 2003. **84**.
75. Schraufstatter, I.U., et al., *Complement c3a and c5a induce different signal transduction cascades in endothelial cells*. J Immunol, 2002. **169**(4): p. 2102-10.
76. Schraufstatter, I.U., et al., *C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3827-36.
77. Kleinman, H.K. and G.R. Martin, *Matrigel: basement membrane matrix with biological activity*. Semin Cancer Biol, 2005. **15**(5): p. 378-86.
78. Fuchs, B., et al., *Intercalary segmental reconstruction after bone tumor resection*. Eur J Surg Oncol, 2008. **34**(12): p. 1271-6.
79. Finn, H.A., R.W. Nicholas, and J.E. Webb, *Skeletal reconstruction with allograft segments following bone tumor resection*. Contemp Orthop, 1990. **21**(5): p. 455-71.

80. Muscolo, D.L., M.A. Ayerza, and L.A. Aponte-Tinao, *Massive allograft use in orthopedic oncology*. Orthop Clin North Am, 2006. **37**(1): p. 65-74.
81. Pneumaticos, S.G., et al., *Segmental bone defects: from cellular and molecular pathways to the development of novel biological treatments*. Journal of cellular and molecular medicine, 2010. **14**(11): p. 2561-9.
82. McKee, M.D., *Management of segmental bony defects: the role of osteoconductive orthobiologics*. J Am Acad Orthop Surg, 2006. **14**(10 Spec No.): p. S163-7.
83. Devescovi, V., et al., *Growth factors in bone repair*. Chir Organi Mov, 2008. **92**(3): p. 161-8.
84. Gale, N.W., et al., *Complementary and coordinated roles of the VEGFs and angiopoietins during normal and pathologic vascular formation*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 267-73.
85. Beamer, B., C. Hettrich, and J. Lane, *Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing*. HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery, 2009.
86. Eckardt, H., et al., *Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis*. J Orthop Res, 2003. **21**(2): p. 335-40.
87. Radisic, M., et al., *Biomimetic approach to cardiac tissue engineering*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2007. **362**(1484): p. 1357-68.
88. Radisic, M., et al., *Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds*. Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2077-91.
89. Radisic, M., et al., *Cardiac tissue engineering using perfusion bioreactor systems*. Nat Protoc, 2008. **3**(4): p. 719-38.
90. Vunjak-Novakovic, G., et al., *Challenges in Cardiac Tissue Engineering*. Tissue Eng Part B Rev, 2009.
91. Radisic, M., et al., *High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering*. Biotechnol Bioeng, 2003. **82**(4): p. 403-14.