

**ANÁLISIS MICROGRAVIMÉTRICO Y BIOQUÍMICO DE LA COMPATIBILIDAD
DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS DE PLGA
FUNCIONALIZADOS**



Ing. LEIDY MARCELA GELVES JEREZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA
2012**

**ANALISIS MICROGRAVIMÉTRICO Y BIOQUÍMICO DE LA COMPATIBILIDAD
DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS DE PLGA
FUNCIONALIZADOS**

Ing. LEIDY MARCELA GELVES JEREZ

**Trabajo de Investigación para optar al título de
Magíster en Ingeniería de Materiales**

**Director:
M.Sc. CUSTODIO VASQUEZ QUINTERO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA METALÚRGICA Y CIENCIA DE MATERIALES
MAESTRÍA EN INGENIERÍA DE MATERIALES
BUCARAMANGA**

2012

Dedicatoria

A Dios por todas las bendiciones que me da y
por la Madre tan hermosa que me dio que siempre
me apoyó y colaboró, por supuesto a ella,
Marina Jerez Rojas, a mis hermanos, Tania,
Marilyn y Pedro Gelves y mi calvo por su
paciencia.

AGRADECIMIENTOS

La autora extiende sus agradecimientos:

Al Grupo de Investigaciones en Corrosión, a la Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, al Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP de la Facultad de Salud, a la Empresa Quirúrgicos Especializados S.A., al Grupo de Óptica y Tratamiento de Señales de la Escuela de Física de la Universidad Industrial de Santander y al Grupo de Corrosión y Protección de la Universidad de Antioquia por su colaboración en los ensayos SEM.

A quienes fueron mis maestros durante toda la etapa de la investigación: a los profesores M.Sc. Custodio Vásquez Quintero, Ph.D. Darío Yesid Peña Ballesteros y Ph.D. Gustavo Neira.

En toda la experiencia de postgrado ha habido personas que merecen las gracias porque sin su valioso aporte no hubiera sido posible este trabajo y por haber dejado una huella en mí camino, una de ellas es Leidy Andrea Herandez Villamizar a la que con gusto y de todo corazón agradezco por haber sido una de esas personas.

A los que olvidé o no puse con nombres y apellidos completos pero que por ser buenas papas estuvieron conmigo en este proceso GRACIAS!!!...

Agradecimientos Especiales

A Ph.D. Patricia Escobar, por todas sus enseñanzas, por la confianza en mí desde el inicio de mis estudios de posgrado, dedicación y apoyo incondicional.

A mis colegas y consejeras Ing. Kariana Anaya, Ing. Dalgy Aldana, Ing. María Vargas Ing. M.Sc. Nerly Montañez Supelano y Qca. Laura Marcela Quiroz, Al estudiante de Doctorado Hugo Armando Estupinán, por sus valiosos aportes.

A la Bacterióloga Magda Flórez, por su invaluable colaboración y a todos los integrantes del Centro de Enfermedades Tropicales CINTROP de la Universidad Industrial de Santander.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	22
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	24
1.3 HIPÓTESIS PLANTEADA	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	27
3.1 TEJIDO ÓSEO	27
3.1.1 Identificación bioquímica y morfológica de células	29
3.2 BIOCMPATIBILIDAD Y BIOMATERIALES	30
3.3 BIOMATERIALES DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO	31
3.3.1 Colágeno.....	31
3.3.2 Quitosano.....	32
3.3.3 Hidroxiapatita	33
3.3.4 Ácido Poliláctico (PLA)	34
3.2.5 Ácido Poliglicólico (PGA).....	35
3.2.6. Ácido Poli-láctico-co-glicólico (PLGA).....	36
3.4 PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS.....	37
3.5 TÉCNICAS MICROGRAVIMÉTRICAS	41
3.5.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)	41
3.5.1 Circuito equivalente y propiedades físicas	42
3.5.3 Análisis de Impedancia	46
4. ESTADO DEL ARTE	48
4.1 BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.....	48
4.2 BIOCMPATIBILIDAD	49
4.3 Microbalanza de cristal de cuarzo	51
5. METODOLOGÍA.....	55

5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	56
5.2 PLANEAMIENTO DE PROTOCOLOS	56
5.2.1 Diseño de celda	56
5.2.2 Cultivo celular.....	57
5.2.3 Esterilidad y manipulación	58
5.3 SÍNTESIS DE PLA, PGA E HIDROXIAPATITA	59
5.3.1 Síntesis de ácido poliláctico PLA.....	59
5.3.2 Síntesis de ácido poliglicólico PGA	60
5.3.3 Síntesis de hidroxiapatita (HA)	61
5.4 CARACTERIZACIÓN DE PLA, PGA, PLGA, HA Y COLÁGENO COMERCIAL.....	61
5.5 ENSAYOS PRELIMINARES: SELECCIÓN DE PARÁMETROS.....	62
5.6 OBTENCIÓN Y ELECTRODEPOSICIÓN DEL POLÍMERO PLGA Y PLGA MODIFICADO	63
5.6.1 Preparación de las soluciones.....	64
5.6.2 Depositación electroforética	64
5.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	67
5.8 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS EN LOS RECUBRIMIENTOS EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	67
5.9 MONITOREO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS HOS SOBRE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS.....	68
5.9.1 Ensayos Microgravimétricos.....	68
5.9.2 Ensayos Bioquímicos.....	70
5.9.3 Ensayos de Microscopía.....	71
5.10 DISCUSIÓN GENERAL, ANÁLISIS DE RESULTADOS, PUBLICACIÓN Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS	73
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	74
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES.....	74
6.1.1 Caracterización de ácido poliláctico PLA	74
6.1.2 Caracterización del ácido poliglicólico.....	75
6.1.3 Caracterización del PLGA	76
6.1.4 Caracterización del colágeno comercial.....	78
6.1.5 Caracterización de la hidroxiapatita (HA).....	79
6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS: MICROSCOPIA ÓPTICA	81

6.3 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS EN LOS RECUBRIMIENTOS EN EL MEDIO DE CULTIVO.....	83
6.4 MONITOREO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS HOS SOBRE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS.....	87
6.4.1 Ensayos Microgravimétricos.....	87
6.4.2 Ensayos Bioquímicos.....	96
6.4.3 Ensayos de Microscopía.....	99
6.4.3.1 Ensayos de Microscopía Electrónica de Barrido	105
7 CONCLUSIONES	108
8 RECOMENDACIONES.....	109
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
ANEXOS	118

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Ilustración de la secuencia de eventos que siguen a la implantación [74]	23
Figura 2. Esquema de la adhesión a la MEC e imagen por inmunofluorescencia en donde se observa el citoesqueleto de actina como fibras rojas que termina en los centro de adhesión (vinculina) mostrados en verde (los núcleos celulares se encuentran de blanco) [12].....	28
Figura 3 Interacciones biológicas con los materiales de implantación [12].....	31
Figura 4 Circuito equivalente de un cuarzo en el vacío modelado por Butterworth Van-Dyke (BVD) [27].	43
Figura 5. Circuito equivalente (a) modelo con una superficie cargada (ZL); y (b) modelo para un recubrimiento viscoelástico en contacto con un líquido Newtoniano semi-infinito [32].....	44
Figura 6. Celda para pruebas microgravimétricas	57
Figura 7 Síntesis de PLA	60
Figura 8. Síntesis de PGA	60
Figura 9 Síntesis de hidroxiapatita	61
Figura 10. Esquema general del montaje para la electrodeposición de los recubrimientos.	65
Figura 11. Imágenes de recubrimientos sin y con tratamiento térmico.	66
Figura 12. Microscopía óptica de recubrimiento con colágeno (50X), a) agrietado y b) no agrietado	66
Figura 13. Protocolo para el montaje de las pruebas microgravimétricas de los blancos.	68
Figura 14. Protocolo para el montaje de las pruebas microgravimétricas con células	69
Figura 15. Protocolo de pruebas de actividad enzimática fosfatasa alcalina	70
Figura 16. Protocolo para pruebas de microscopía.	71
Figura 17. Protocolo para pruebas de microscopía de barrido electrónico SEM	72
Figura 18. Espectro FTIR de ácido poliláctico.....	74
Figura 19. Espectro FTIR ácido poliglicólico	76
Figura 20. Espectro FTIR. A) PLGA referenciado y B) PLGA obtenido	77

Figura 21. Espectros FTIR comparativos de los polímeros obtenidos.....	78
Figura 22. Espectro FTIR experimental del colágeno comercial	79
Figura 23. Diagrama de difracción de rayos X de la hidroxiapatita obtenida	80
Figura 24. Microscopía óptica del recubrimiento PLGA-HA. A. sin tratamiento térmico (10X), B. cinco minutos de tratamiento térmico (10X), C. diez minutos de tratamiento térmico (10X) y D. diez minutos de tratamiento térmico (20X)	81
Figura 25. Microscopía óptica del recubrimiento A. PLA-PGA/HAp/Col(0.05%) 20X y B. PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) 20X.	82
Figura 26. Microscopía óptica (20X) de recubrimiento PLGA-HA al quinto día de medición	84
Figura 27. Representación del diagram Δf y ΔR tomado durante el tiempo de adhesión celular de 30000 células en la QCM a tiempo cero[82].	87
Figura 28. Gráfico del ΔR vs $\Delta XL = w\Delta f * (2Lq) - f_0$ para el recubrimiento PLGA-HA-Col+10000células	88
Figura 29. Esquema de adhesión de osteoblastos sobre el sensor.	92
Figura 30. Módulo del cambio de la impedancia para los diferentes recubrimientos sobre los cuales se cultivaron HOS comparado con los recubrimientos sin células.....	95
Figura 31. Producción de fosfatasa alcalina para P1 (PLGA+HA+Col+Q) y P2 (PLGA+HA+Col) usando una densidad celular de 10000 cel/.....	97
Figura 32. Producción de fosfatasa alcalina para P1 (PLGA+HA+Col+Q) P2 (PLGA+HA+Col) y P3 (PLGA+HA) usando una densidad celular de 30000 cel.....	98
Figura 33. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Q-Col+10000cel/ml	100
Figura 34. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Q-Col+30000cel/ml	101
Figura 35. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+10000cel/ml	102
Figura 36. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+30000cel/ml	103
Figura 37. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+30000cel/ml	104

Figura 38. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del recubrimiento PLGA+HA+Q+Col al día 5 de cultivo 106

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. DIAGRAMAS DE FRECUENCIA Y RESISTENCIAS CONTRA EL TIEMPO	119
ANEXO B. DEDUCCIÓN DE IMPEDANCIAS.....	123
ANEXO C. MICROSCOPIAS UTILIZADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL LIBRO EN UN TAMAÑO MAYOR	126

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Propiedades de la HA.....	34
Tabla 2 Biomateriales para regeneración ósea.	48
Tabla 3 Resumen de los antecedentes de medición de biocompatibilidad usando QCM.	51
Tabla 4 Lista de selección de métodos para esterilización.....	59
Tabla 5. Niveles de concentración de PLGA, hidroxiapatita, colágeno tipo I y quitosano.....	62
Tabla 6. Factores y niveles para ensayos de electrodeposición de la mezcla polimérica.	63
Tabla 7. Diseño de experimentos para blancos en medio de cultivo.	67
Tabla 8. Diseño de experimentos para ensayos con células.....	67
Tabla 9. Grupos funcionales del ácido poliláctico obtenido y referenciado.....	75
Tabla 10. Grupos Funcionales del ácido poliglicólico obtenido y referenciado.....	76
Tabla 11. Grupos funcionales del PLGA obtenido y PLGA referenciado.....	77
Tabla 12. Fases de la hidroxiapatita sintetizada.	80
Tabla 13. Resultados obtenidos de la QCM.....	83
Tabla 14. Cambio del módulo elástico en función de la humedad de la fibras de colágeno[3].....	84
Tabla 15. Espectros de impedancia y tangente de pérdidas de los recubrimientos en medio de cultivo	85
Tabla 16. Resultados obtenidos de la QCM.....	90
Tabla 17. Espectros de impedancia y tangente de pérdidas de los recubrimientos de PLGA-HA-Q-Col durante el tiempo de cultivo.....	92
Tabla 18. Comparación de las propiedades viscoelásticas de los recubrimientos generadas por la presencia celular	96

LISTA DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Estratificación de los Polímeros Biodegradables usados en la reconstrucción ósea.....	49
Diagrama 2. Metodología.....	55

RESÚMEN

TÍTULO: ANÁLISIS MICROGRAVIMÉTRICO Y BIOQUÍMICO DE LA COMPATIBILIDAD DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS DE PLGA FUNCIONALIZADOS*

AUTOR: ING. LEIDY MARCELA GELVES JEREZ.**

Palabras Clave:

Poliláctico, Poliglicólico, Hidroxiapatita, Quitosano, Colágeno, Células osteoblásticas, Técnica Microgravimétrica.

Descripción

En el presente trabajo de investigación se evaluó mediante la técnica microgravimétrica de cristal de cuarzo (QCM) la interacción de un biomaterial polimérico con medio de cultivo celular y medio de cultivo-células osteoblásticas (Osesarcomas humanos, HOS). El biomaterial se obtuvo mediante electrodeposición de ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidroxiapatita, quitosano y colágeno, sobre sensores piezoeléctricos de cristal de cuarzo. Los resultados mostraron un aumento constante de la impedancia para el recubrimiento con mayor densidad celular, indicando que la propagación de la onda del sensor está relacionada con la uniformidad y topografía de la película en la superficie. En consecuencia, el cambio del módulo de la impedancia está relacionado inversamente con los puntos de adhesión celular, ya que a medida que aumenta los puntos de adhesión celular se produce una menor pérdida de energía oscilante. La adhesión y proliferación celular se analizaron mediante Microscopía de Epifluorescencia, evidenciando células no apoptóticas, es decir de núcleos redondeados y la presencia de células en mitosis representado por la condensación del núcleo. Adicionalmente se evaluó la actividad celular mediante la medición de fosfatasa alcalina (ALP), mostrando un aumento paulatino de la producción de ALP en el tiempo en la totalidad de los recubrimientos. La QCM se constituye en una técnica de monitoreo en tiempo real de biopelículas celulares que apoya los resultados obtenidos mediante las técnicas comunes de análisis celular y que además provee información de la estructura y dinámica de las propiedades viscoelásticas de material que se encuentre sobre el sensor.

* Trabajo de Grado.

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencias de los Materiales. Posgrado en Ingeniería de Materiales.

Director: M.Sc. Custodio Vasquez Quintero.

ABSTRACT

TITLE: MICROGRAVIMETRIC AND BIOCHEMICAL COMPATIBILITY ANALYSIS OF OSTEOBLAST OVER POLYMERIC MATERIALS OF PLGA FUNCIONALIZED.*

AUTHOR: ENG. LEIDY MARCELA GELVES JEREZ**

Key Words:

Polylactic Polyglycolic, Hydroxyapatite, Chitosan, Collagen, Osteoblastic cells, Microgravimetric techniques.

Description

In the present investigation was assessed the interaction of biomaterial polymeric with growth media and cells (Human Osteosarcoma, HOS) in presence of growth media using quartz crystal microgravimetric technique (QCM). The biomaterial was obtained by electrodeposition of polylactic acid, polyglycolic acid, hydroxyapatite, chitosan and collagen on piezoelectric quartz crystal sensor, with circular shape. We get a steady increase of the impedance for the coating with higher cell density, representing the relation between the topography properties with the propagation of wave on the biofilm surface. Consequently, the change in the impedance magnitude has inverse relation with cell adhesion points, since the increasing cell adhesion points occurs lower oscillating power loss. The adhesion and cell proliferation were analyzed by epifluorescence microscopy, showing apoptotic cells, therefore rounded nucleus and cells in mitosis process represented by the condensation of the nucleus. Additionally, cell activity was assessed by measuring alkaline phosphatase (ALP), showing a gradual increase in ALP production over time in all the coatings. The QCM technique constitutes a real-time monitoring of biofilm cells that supports the results obtained using standard techniques of cell analysis and also provides information on the structure and dynamics of the viscoelastic properties of material found on the sensor.

* Thesis

** Engineering Physicochemical Faculty. School of Metallurgical Engineering and Materials Science. Materials Engineering Graduate.
Tutor: M.Sc. Custodio Vasquez Quintero.

ESPECIFICACIONES DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
Título	ANÁLISIS MICROGRAVIMÉTRICO Y BIOQUÍMICO DE LA COMPATIBILIDAD DE OSTEÓBLASTOS SOBRE MATERIALES POLIMÉRICOS DE PLGA FUNCIONALIZADOS
Autor	Ing. LEIDY MARCELA GELVES JEREZ
Director	M.Sc. CUSTODIO VASQUEZ QUINTERO
Facultad	INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
Escuela	INGENIERÍA METALÚRGICA
Entidades Interesadas	UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER GRUPO DE INVESTIGACIONES EN CORROSIÓN (GIC) QUIRÚRGICOS ESPECIALIZADOS S.A.
Modalidad	INVESTIGACIÓN MAESTRÍA

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de tejidos degenerados representa un reto significativo en la medicina, en el cual múltiples disciplinas trabajan para generar tratamientos prometedores que permitan la restauración, regeneración y/o remplazo del tejido afectado. Por diversas causas los implantes óseos y dentales son comúnmente usados y por lo tanto la interacción que estos posean con el huésped tiene una importancia relevante [1].

Es primordial para el diseño de los implantes, investigar cómo las propiedades del biomaterial llegan a alterar el comportamiento de las células del huésped que lo circundan. Las interacciones clínicas y experimentales más importantes de los implantes y dispositivos médicos incluyen inflamación y reacción al cuerpo extraño, la respuesta inmune, la toxicidad sistémica, trombosis, infección relacionada con el dispositivo, y tumorigénesis [2]. Estas interacciones son las anomalías de los procesos fisiológicos que funcionan como mecanismos de defensa. Por lo tanto, para preparar nuevos materiales es fundamental que éstos materiales puedan controlar las interacciones con los componentes de los alrededores en sus interfaces [3].

De allí que el tejido artificial ideal de los implantes debe tener las siguientes características:

1. Ser una estructura tridimensional y con alta porosidad, con la red de poros interconectados para el crecimiento celular y la circulación de transporte de nutrientes y desechos metabólicos
2. Tener características biocompatibles y bioreabsorbibles con tasa controlable de degradación y resorción que coincida con el crecimiento de células/tejidos in vitro y/o en vivo
3. Poseer una superficie química adecuada para la adhesión, proliferación y diferenciación celular

4. Tener propiedades mecánicas que coincidan con las de los tejidos en el sitio de implantación

La búsqueda de materiales biocompatibles que pueden ser usados en dispositivos médicos para la reparación de defectos y enfermedades óseas ha aumentado recientemente. Estos materiales deben ser apropiados para que funcionen como soporte de las células regeneradoras de hueso para que puedan proliferar y diferenciarse. Los resultados de múltiples investigaciones concluyen que la relación entre densidad y organización de los componentes de la Matriz Extra Celular (MEC) determinan las propiedades bioquímicas y mecánicas del tejido [3].

En este trabajo se investigó la influencia de la modificación de recubrimientos poliméricos de PLGA con hidroxiapatita, colágeno y quitosano, como compuestos que simulan la MEC ósea sobre la interacción de las células osteoblasticas y sus propiedades mecánicas, desde el punto de vista viscoelástico. Para ello se usaron técnicas de análisis bioquímico, microgravimétrica, de microscopía óptica y de barrido electrónico, con las cuales se observaron las diversas etapas de adhesión, adaptación, y proliferación celular en la superficie polimérica modificada y su efecto en las propiedades viscoelásticas de la película polimérica.

1. DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los biomateriales típicos para el diseño de implantes óseos son clasificados en metales, cerámicos, polímeros y materiales compuestos. Esta investigación se llevó a cabo en materiales compuestos, en donde un copolímero biodegradable aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), el PLGA, se combinó con materiales que simulan la MEC mineralizada que posee el tejido óseo, como lo son Hidroxiapatita, colágeno y quitosano, este último, como un representante de los proteoglicanos naturales de dicha matriz.

No se conoce como la composición de cada uno de estos compuestos en la matriz polimérica de PLGA, afecta el comportamiento de los osteoblastos, debido a que la adhesión de células involucra fenómenos complejos que todavía no están plenamente determinados [5],[7]. En consecuencia, no se tienen materiales para implantación endo-ósea con un material compuesto por todos ellos, aunque es bien conocido por la medicina que dichos compuestos se encuentran en el tejido nativo óseo [8].

El estudio de la biocompatibilidad es la descripción y caracterización de una respuesta reproducible por parte del tejido biológico como producto de la interacción con los materiales del implante. Es bien conocida la presencia de una elevada interacción entre el tejido y el material implantado, tanto de aceptación como de rechazo. Por lo tanto, la necesidad del estudio de la biocompatibilidad surge del reconocimiento de la diferencia existente entre el tejido vivo y los materiales de fabricación de un implante [3].

La porosidad de la plataforma del implante, interconectividad de los poros, las propiedades químicas y superficiales, determinan si las células se pueden adherir, proliferar y finalmente diferenciar en el tejido adecuado. Es bien conocido que el funcionamiento biológico de los implantes está regulado por señales biológicas como factores de crecimiento, la MEC que interacciona con las células circundantes; un esquema de la interacción implante-cuerpo se puede observar en la Figura 1. Las moléculas de la MEC que rodean las células, proveen el soporte mecánico y regulan la actividad celular [6].

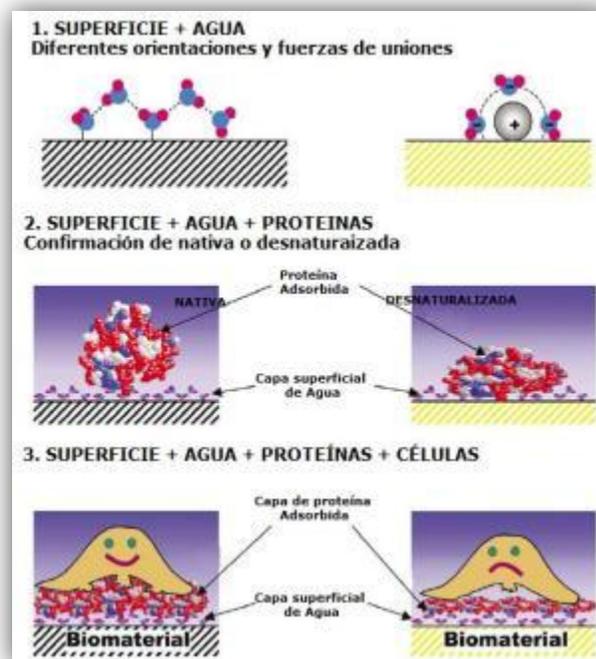


Figura 1 Ilustración de la secuencia de eventos que siguen a la implantación [75]

La biocompatibilidad puede ser determinada por adhesión celular. Los métodos disponibles para los estudios de adhesión son frecuentemente basados en el conteo de células, bien sea de las células adheridas a una superficie en particular, o de las células remanentes en el medio de cultivo sobrenadante. Además, de las técnicas de conteo celular directo, existen otras técnicas indirectas que han sido descritas como las dirigidas hacia la cuantificación total de proteína producida por célula.

Existen diversos métodos para el estudio de las interacciones célula-material entre los que se encuentran los espectroscópicos para observar los niveles de sustancias y enzimas específicas que son producidas por reacciones químicas en el cuerpo¹ (fotométricos, XPS, SIMS, FTIR-ATR), de microscopía (AFM o SPM, SEM, SPR), de transcripción de cadenas proteicas (RT-PCR, Q-PCR), y microgravimétricos (QCM, D-QCM, EQCM), siendo este último en el que se concentra la investigación y cuyos resultados fueron contrastados con otros métodos [11].

1.2 JUSTIFICACIÓN

Se han desarrollado varios materiales con el propósito de mejorar la respuesta biológica de la interacción implante-tejido biológico. Los polímeros además de reemplazar otros materiales en aplicaciones médicas, se han posicionado en nuevas aplicaciones antes consideradas difícilmente realizables.

El PLGA (ácido poliláctico - poliglicólico) es un biopolímero ampliamente usado en la fabricación de materiales quirúrgicos por sus buenas propiedades de biodegradación y biocompatibilidad, sin embargo, pese a su extenso uso, el PLGA presenta ciertos inconvenientes para encapsular y almacenar proteínas, péptidos y otros principios activos. Debido a esto, se ha buscado modificar superficialmente este tipo de materiales con polímeros de origen natural como el colágeno y quitosano y con hidroxiapatita con el fin de simular la MEC ósea y de esta forma mejorar la interacción del biomaterial con entidades biológicas y disminuir una respuesta de defensa en el organismo.

Una de las grandes dificultades que presentan los polímeros desde el punto de vista mecánico, es la gran dependencia que tienen sus propiedades con la

¹ Análisis Bioquímico

temperatura y la velocidad de deformación, lo anterior debido a su comportamiento viscoelástico, que en primera instancia, es producto de los altos tiempos de relajación de los procesos microscópicos, debido al alto peso molecular de ellos.

Es por ello que en este trabajo, se ha abordado el problema, mediante el uso de técnicas microgravimétricas de análisis de impedancias mecánicas, para determinar las propiedades mecánicas del polímero modificado y la influencia que esta modificación tiene sobre la biocompatibilidad de células osteoblasticas. De esta forma se pretende hacer un aporte importante en la caracterización de materiales mediante técnicas y equipos innovadores, como la microbalanza de cristal de cuarzo, permitiendo ampliar el campo de estudio de los biomateriales y sus interacciones con el tejido biológico.

1.3 HIPÓTESIS PLANTEADA

Con el tiempo, la viscoelasticidad del recubrimiento polimérico funcionalizado se incrementará debido a la integración de células y matriz extracelular de tejido óseo, mostrando de esta forma un aumento en la compatibilidad del material.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biocompatibilidad de osteoblastos sobre materiales poliméricos de PLGA funcionalizados, mediante impedancia piezoeléctrica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las propiedades viscoelásticas de películas delgadas de PLGA funcionalizado con hidroxiapatita, colágeno y quitosano y los cambios en estas propiedades debidos a la presencia de osteoblastos empleando la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo, QCM.
- Evaluar la biocompatibilidad de PLGA funcionalizado usando microscopía y análisis bioquímico de la actividad metabólica de los osteoblastos cultivados en su superficie.

3. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

3.1 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es clasificado según su densidad, como hueso esponjoso y hueso compacto. El compacto se compone de una MEC de tejido conectivo mineralizado y sus células son osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [3]. Más de un 90% en volumen de la matriz ósea se halla mineralizada con compuestos de fosfato de calcio, principalmente Hidroxiapatita (HA). El componente orgánico de la matriz es principalmente colágeno tipo I (85-90%). Además, de Proteoglicanos (biglicano, decorina), proteínas implicadas en la adhesión celular (trombospondina, osteonectina y sialoproteína ósea), Osteocalcina y factores de crecimiento [16]. En el tejido óseo se distinguen tres tipos celulares que son:

1. Osteoblastos, células responsables de la formación de tejido
2. Osteocitos, células principales del tejido adulto
3. Osteoclastos, células responsables de la resorción del tejido óseo

Los osteoblastos son células de forma cúbica con citoplasma basófilo y ricas en una isoenzima específica llamada fosfatasa alcalina. Tanto in vivo como in vitro pasan sucesivamente por tres estadios funcionales:

- a) Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la MEC
- b) Maduración de la matriz ósea (cambios de composición y organización que la hacen competente para ser mineralizada)
- c) Mineralización de la MEC.

Estas células pueden permanecer en la superficie ósea o pueden quedar rodeadas por la matriz que sintetizan. Los osteoblastos se aplanan y se convierten en células de revestimiento que desarrollan un importante papel en el control del remodelado óseo [5].

La adhesión celular de los osteoblastos se lleva a cabo por acoplamiento que se realiza a través de centros de contacto, donde la membrana plasmática se une a los componentes de la matriz extracelular que ha adsorbido la superficie sólida[19]. En dichos centros, las fibras se asocian indirectamente con la superficie a través de proteínas de acoplamiento, tales como vinculina, paxilina y talina. Estos centros también retransmiten las señales de la MEC al citoesqueleto de los osteoblastos, como se muestra en la Figura 2.

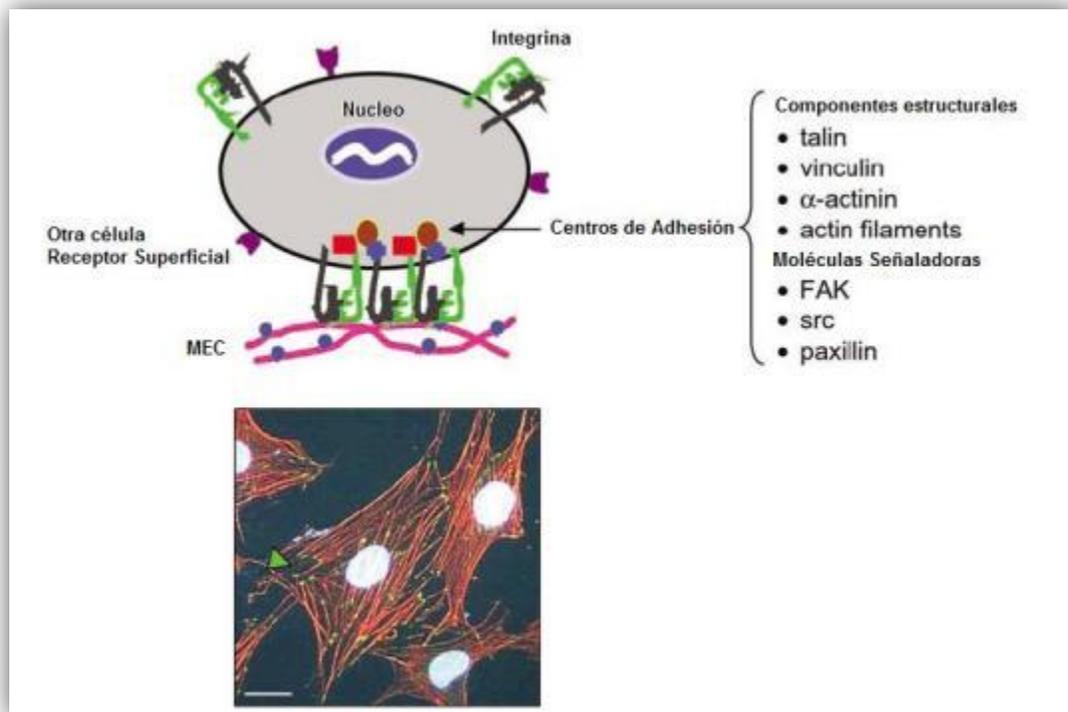


Figura 2. Esquema de la adhesión a la MEC e imagen por inmunofluorescencia en donde se observa el citoesqueleto de actina como fibras rojas que termina en los centro de adhesión (vinculina) mostrados en verde (los núcleos celulares se encuentran de blanco) [12].

Varias proteínas se localizan en los centros de contacto y hay indicios de que su actividad cambia con el tipo de sustrato. En consecuencia, la supervivencia, crecimiento, morfología, movimiento y diferenciación de las células, puede producirse en respuesta a la matriz extracelular en su entorno [19].

3.1.1 Identificación bioquímica y morfológica de células

Los estudios sobre células osteoblásticas han demostrado una serie de propiedades asociadas al fenotipo de estas células, como la secreción de osteocalcina, síntesis de colágeno tipo I, actividad de la fosfatasa alcalina y producción de matriz mineralizada, entre otros [16].

La fosfatasa alcalina (ALP), es un marcador de diferenciación temprana del hueso y es utilizada para evaluar la actividad celular de los osteoblastos. Ésta es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos e indica la formación de hueso o el inicio de la etapa de diferenciación [15]. La fosfatasa alcalina hidroliza el p-nitrophenyl phosphate disodium salt (p-NPP) o fosfato de p-nitrofenilo para formar el cromógeno amarillo p-nitrofenol. En donde el incremento en la absorbancia de la mezcla de reacción a 450 nm debido a la formación del p-nitrofenol, es proporcional a la actividad de la fosfatasa alcalina.

Los estudios morfológicos de células abarcan las microscopías ópticas y las microscopías electrónicas. La microscopía de epifluorescencia es una de las derivaciones de la microscopía óptica en donde una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente aplicado, es estimulada por un haz de luz, emitiendo parte de la energía absorbida como rayos luminosos. Uno de los métodos de marcado celular más usados es el marcaje nuclear con reactivo de *Hoechst*, que permite la visualización directa de los núcleos celulares con el microscopio de fluorescencia. Este reactivo penetra en el núcleo de una célula y se une a la adenina y la timina del ADN y el ARN, haciendo ver el núcleo celular con un color azul [17].

3.2 BIOCOMPATIBILIDAD Y BIOMATERIALES

El concepto de biocompatibilidad ha evolucionado con el desarrollo de los materiales utilizados en dispositivos médicos. Hasta ahora un material biocompatible está definido como un material que no hace daño. La definición oficial de biocompatibilidad es: "la capacidad de un material para llevar a cabo una aplicación específica, con una adecuada respuesta de acogida" [3].

Se puede definir un material *bioinerte* como un material que no es tóxico y que no es biológicamente activo; mientras que un material *bioactivo* es un material que no es tóxico y es biológicamente activo. El material bioactivo causa reacciones tisulares favorables, lo que lleva al establecimiento de enlaces químicos directos con los tejidos circundantes.

Estas propiedades de los materiales dependen en gran medida de las interacciones que ocurren entre la superficie y un ambiente biológico. Se sabe que un cuerpo vivo en contacto con una superficie de un implante induce la adsorción de proteínas, generando una interfase, a través de la cual otras proteínas y células se adsorben, como se observa en el esquema de los procesos de adhesión de la Figura 3. Del mismo modo la biocompatibilidad puede ser influenciada por la modificación de las propiedades superficiales, como lo son la química, carga y topografía de la superficie. Los implantes para hueso o dientes requieren una excelente adhesión direccionada de proteínas, que permita el crecimiento, formación y estabilización del conjunto implante-hueso, para llevar a cabo el proceso de biomineralización [4],[12].

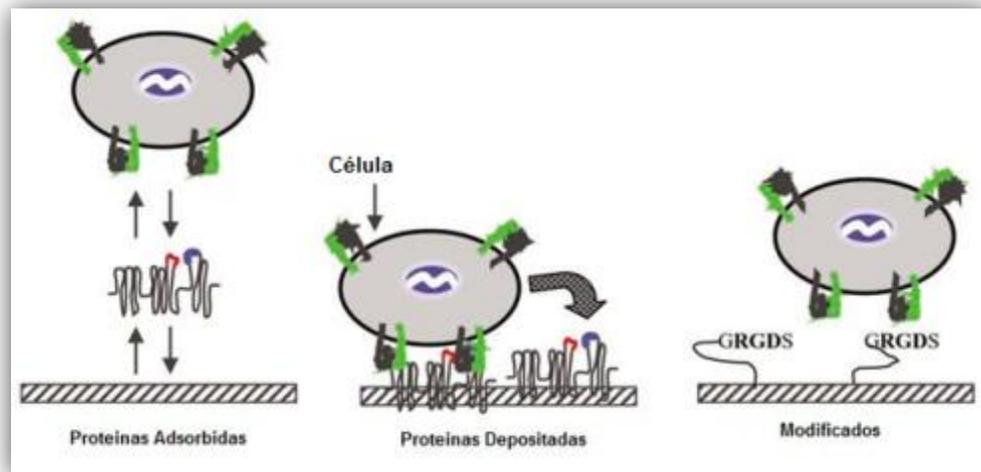


Figura 3 Interacciones biológicas con los materiales de implantación [12]

Las interacciones entre el implante o biomaterial y el medio fisiológico determinan el período de tiempo necesario para su reconocimiento y la intensidad de la reacción del organismo para rechazar o asimilar.

3.3 BIOMATERIALES DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICO

3.3.1 Colágeno

Es un polímero natural compuesto de una macromolécula proteica. Presenta una secuencia típica de repetición periódica de grupos de tres AA. El primer AA de cada grupo es Gly, y los otros dos son Pro (o hidroxiprolina) y un AA cualquiera: (G-P-X). La frecuencia periódica de la prolina condiciona el enrollamiento que caracteriza el colágeno en forma de hélice levógira. La glicina, sin cadena lateral, permite la aproximación entre distintas hélices, de forma que tres hélices levógiras se asocian para formar un helicoide dextrógiro de alrededor de 300nm de longitud y 1,4nm de ancho [25].

El colágeno es usado como biomaterial en diversas aplicaciones biomédicas, por ejemplo en aplicaciones endo-óseas ya que se encuentra presente en la

fase orgánica del hueso y sirve principalmente como proteína estructural de la matriz extracelular original. Cuando el colágeno se encuentra purificado es biocompatible, biodegradable, no tóxico y carece de antigenicidad² convirtiéndolo en una fuente primordial y segura de materiales para uso biomédico. Además, es un agente hemostático y osteoconductor [25].

Existen diversos tipos de colágenos según su secuencia molecular. Hasta ahora se han identificado 27 tipos distintos con al menos 42 cadenas polipeptídicas diferentes. A pesar de que existen muchos tipos de colágenos en un organismo vivo, la forma más abundante en tejidos conectivos es el tipo I. En general, con el colágeno extraído de tejidos naturales es posible de obtener una respuesta inmunogénica tras la implantación; por ello, el uso directo de este tipo de colágeno es limitado.

Actualmente se fabrica por métodos biomecánicos una forma purificada de colágeno conocida como colágeno reconstituido, el cual está disponible comercialmente. El colágeno reconstituido tiene una inmunogenicidad relativamente más baja que el colágeno original. La forma desmineralizada de colágeno óseo en combinación con hidroxapatita ha sido muy usada para el tratamiento de defectos óseos adquiridos y congénitos [25].

3.3.2 Quitosano

Las macromoléculas del quitosano consisten en unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina ligadas por enlaces 1-4 glicosídicos que es preparada a partir de quitina, (componente natural del tejido de camarones y de las conchas de cangrejo), por N-acetilación con álcali. Siendo un polímero lineal, el quitosano tiene muchos grupos aminos adheridos a la cadena principal polisacárida que

² La antigenicidad sería la facultad, para el antígeno, de modificar el comportamiento inmunológico del organismo en el cual se ha introducido, sin que por ello haya forzosamente producción de anticuerpos, por ejemplo, provocando un estado de tolerancia inmunitaria. http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Antigenicidad

están disponibles para reaccionar químicamente donde su estructura es muy similar a los glicosaminoglicanos presenta en el tejido humano.

El quitosano es un biopolímero de bajo costo, no tóxico, con numerosas funciones biológicas, tales como actividad antimicrobiana/antibacteriana y antimicótico, hemocompatibilidad, actividad hipocolesterolemica, habilidad de acelerar la cicatrización de heridas, capacidad de suprimir algunos de los procesos de la leucemia y la capacidad generar uniones metálicas. Por otra parte, el quitosano potencia la diferenciación de las células osteoprogenitoras y apoya la expresión de proteínas de matriz extracelular por los osteoblastos y los condrocitos humanos [26].

3.3.3 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HA), es un tipo de biocerámico basado en fosfato de calcio [2], usado frecuentemente como sustituto en injertos óseos por su parecido estructural con los minerales del hueso natural. Es un material aprobado en su forma porosa como un relleno granular para cavidades de huesos. Se usa desde hace poco más de 20 años en ortopedia, odontología y cirugía facial. La hidroxiapatita es ideal para ser usada como un recubrimiento de implantes metálicos (como el titanio por ejemplo) [24].

La HA, obtenida de fuentes naturales o bien de fuentes sintéticas, se considera una sustancia bioactiva, ya que forma fuertes enlaces químicos con el tejido óseo huésped, siendo la razón por la cual se la reconoce como un buen material para implantes óseos. La HA es osteoconductiva, no tóxica, no inmunogénica, y su estructura es cristalográficamente similar a la de los minerales óseos con el nivel adecuado de carbonos sustituidos. En la Tabla 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la HA.

Tabla 1 Propiedades de la HA.

Propiedades	Datos experimentales
Módulo de Young (GPa)	80-110
Módulo elástico (GPa)	114
Densidad (g/cm³)	3,16
Punto de fusión (°C)	1650
Punto de inestabilidad (°C)	1350

El mecanismo exacto de cómo el fosfato de calcio cerámico mejora el enlace de los huesos, no es claramente entendido pero se sabe que la bioactividad se relaciona con su velocidad de disolución. La reacción de células y tejidos en la interfase cerámica se han estudiado por medio de cultivos *in vitro* e *in vivo*. La adsorción de proteínas sobre el material de fosfato de calcio, sucede a partir de las células óseas en el hueso. Específicamente en la adsorción, el suero de glicoproteínas afecta el ataque celular y se difunde en el biomaterial. También, es afectada por la energía libre superficial del biomaterial [24].

Varios fosfatos de calcio difieren por su composición química y su disolución potencial en el cuerpo. Las hidroxiapatitas muestran una gran resistencia a la dilución y se consideran estables, esto es verdad si la composición de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ tiene una relación entre Ca y P de 1,67. Solo la HA manufactura sintética garantiza que esta condición puedan ser cumplida [2].

3.3.4 Ácido Poliláctico (PLA)

Es un polímero semicristalino, termoplástico y biodegradable basado en ácido láctico, que como biomaterial ha demostrado su capacidad de permitir el crecimiento controlado del tejido biológico durante su biodegradación. Debido a que el ácido láctico es un intermediario común en el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, el uso de este hidroxácido es generalmente visto, como la situación ideal desde el punto de vista toxicológico.

El PLA puede hidrolizarse fácilmente a ácido láctico, mediante un proceso de degradación hidrolítica. Los poliésteres alfa, como el PLA, se degradan inicialmente por hidrólisis y su degradación puede ser acelerada in vivo por la presencia de enzimas, lo cual conlleva a la liberación de sus respectivos monómeros (ácido láctico en este caso). Estos monómeros son incorporados dentro de los procesos fisiológicos a nivel celular, donde continúa su degradación y da inicio a la ruta metabólica [15].

El punto de fusión del ácido poliláctico es de aproximadamente 180°C. Si el polímero consiste solo en el isómero L, se conoce como ácido poli (L-láctico), PLLA, que se usa comúnmente en los implantes ortopédicos y es un polímero semicristalino (grado de cristalinidad del 37%), debido principalmente a su estereoregularidad. El PLA es actualmente utilizado en aplicaciones que no requieran altas prestaciones mecánicas, como clavos para la unión de ligamentos y reparación de meniscos, suturas, tornillos y clavos para la fijación de fracturas, liberación de fármacos y stents para cirugía cardiovascular [30].

3.2.5 Ácido Poliglicólico (PGA)

El ácido poliglicólico o poliglicolida es un poliéster lineal biodegradable, alifático, hidrofílico y de cristalinidad elevada (46-52%). Debido a su elevada cristalinidad es insoluble en la mayoría de solventes orgánicos. Se caracteriza por un punto de fusión elevado y una temperatura de transición vítrea relativamente baja. El ácido poliglicólico es de gran interés por su amplia gama de aplicaciones en el campo de la medicina, se utiliza principalmente como material de implantes o suturas biodegradables, como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, planchas o tornillos, como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos.

La propiedad que hace más interesante la aplicación del PGA como polímero degradable es que su producto de degradación, el ácido glicólico, es un

metabolito natural. El PGA es absorbido a los pocos meses de la implantación debido a su susceptibilidad a la hidrólisis [31].

3.2.6. Ácido Poli-láctico-co-glicólico (PLGA)

El PLGA es un poliéster sintético compuesto de diferentes proporciones de ácido láctico y glicólico. Es biodegradable por hidrólisis de su matriz y sus productos de degradación son biocompatibles. Es decir, los ácidos láctico y glicólico, pueden ser metabolizados y excretados por el cuerpo. La velocidad de la hidrólisis del PLGA puede ser controlada con su tamaño geométrico, con la proporción de ácido láctico a glicólico y además, con el peso molecular del polímero.

Las propiedades de biodegradabilidad y la habilidad para controlar la degradación, así como las propiedades mecánicas, hacen del PLGA un polímero extensamente estudiado para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Sin embargo, se conoce que las propiedades superficiales del PLGA no son ideales para el crecimiento celular. El PLGA es relativamente hidrofóbico comparado con la matriz extracelular (MEC) natural. La interacción con las células es desconocida y no posee grupos funcionales que le permitan realizar la adhesión de moléculas biológicamente activas [20]-[23].

Debido a que las propiedades mecánicas y de degradación del PLGA son aparentemente ideales, este polímero es aprobado por la Food and Drug Administration de EE.UU. (FDA) para uso como implantes o recubrimientos de implantes biomédicos. Un enfoque prometedor es la modificación, del PLGA con compuestos naturales que pertenezcan a la MEC, con el objetivo de proporcionarle características de biocompuesto polimérico y de esta forma reemplazar o reparar tejido óseo [22], [23].

3.4 PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS

Una de las características más importantes de los materiales en general, son aquellas relacionadas con su uso final. En este sentido el estudio de las propiedades mecánicas es una de las más interesantes, pues restringe la aplicación específica de un material; así, un material con poca deformación plástica, como el vidrio, difícilmente se podrá emplear como protector, como es el caso de los parachoques de autos, y en vez de eso, se preferirá un material del tipo elastómero, con una alta capacidad de absorber energía. Lo anterior es válido también para el caso de los materiales poliméricos, los cuales por sus características tales como, altos tiempos de relajación, morfología, temperatura de transición vítrea, etc. han presentado serias dificultades para su análisis en lo referente a sus propiedades mecánicas.

El estudio de las propiedades mecánicas entonces se refiere a la respuesta de un cuerpo cuando se encuentra bajo la influencia de una fuerza externa, la cual genera relaciones del tipo tensorial con la deformación que sufre este material.

Una de las grandes dificultades que presentan los polímeros desde el punto de vista mecánico, es la gran dependencia que tienen sus propiedades con la velocidad de deformación, lo anterior, debido a su comportamiento viscoelástico, que es producto de los altos tiempos de relajación de los procesos microscópicos, debido al alto peso molecular de ellos y las interacciones que generan cuando los polímeros se encuentran entrecruzados [33].

Para explicar el comportamiento viscoelástico se puede decir, que las macromoléculas se comportan como una combinación entre los materiales elásticos y viscosos, por lo que se le denominan materiales viscoelásticos.

Un material elástico lineal, se define como aquel material cuyo comportamiento de respuesta a una fuerza externa está descrito por la siguiente relación:

$$\tau_{y,x} = -G \frac{du_x}{dy} = -G \gamma_{yx} \quad t_0, t$$

Eq. (1)

Donde $\tau_{y,x}$ es el esfuerzo de corte; G es el módulo de corte; u_x es el vector relativo a la distancia entre dos puntos del sólido; y γ_{yx} es la deformación que sufre el material producto de la fuerza aplicada. La Eq. (1, tiene implícito el hecho de que una vez que se deja de aplicar la fuerza, el material vuelve a su posición original (es decir el material sólo almacena la energía, elasticidad). Otro punto interesante es que si se aplica al material una deformación del tipo sinusoidal, la *tensión estará en fase* con dicha deformación.

Por otro lado, aquellos materiales cuya respuesta a una fuerza dada no es proporcional a la deformación, como los líquidos newtonianos, sino que a la velocidad de deformación por medio de una constante que se define como la viscosidad del material. La ecuación que rige a este tipo de materiales se expresa de la siguiente forma:

$$\tau_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dy} = -\mu \gamma_{yx}(t)$$

Eq. (2)

Donde v_x es la velocidad del fluido, y μ es la viscosidad del material. Luego, uniendo las dos expresiones antes descritas, se obtiene una primera aproximación a la ecuación que rige a los materiales viscoelástico [32]:

$$\tau_{yx} + \frac{\mu}{G} \frac{d\tau_{yx}}{dt} = -\mu \gamma_{yx}$$

Eq. (3)

La cual fue propuesta por Maxwell hace años atrás, suponiendo un material elástico en serie con un líquido newtoniano. Resolviendo la ecuación anterior se llega a la expresión:

$$\tau_{ij}(t) = - \int_{-\infty}^t \frac{\eta_0}{\lambda_0} e^{-\frac{t-t'}{\lambda_0}} \gamma_{ij}(t') dt'$$

Eq. (4)

Donde $\lambda_0 = \mu / G$ y tiene unidades de tiempo, por lo que se le conoce como tiempo de relajación. Sin embargo, se ha encontrado que este tipo de modelo es muy simplificado, y se propone un modelo denominado de Maxwell generalizado, donde se supone una serie, llegando a una expresión del tipo:

$$\tau_{ij}(t) = - \int_{-\infty}^t \sum_{k=1}^{\infty} \frac{\eta_k}{\lambda_k} e^{-\frac{t-t'}{\lambda_k}} \gamma_{ij}(t') dt'$$

Eq. 5

En general, se puede demostrar que independiente del modelo que se ocupe (por ejemplo suponer que se tiene a un material elástico en paralelo con uno viscoso, o cualquier combinación de ese tipo) se cumple que la ecuación que rige a los sistemas poliméricos (materiales viscoelásticos en general) queda descrita por la siguiente expresión:

$$\tau = - \int_{-\infty}^t G(t-t') \gamma(t') dt'$$

Eq. (6)

Donde a la función G se le conoce como módulo de relajación, la “memoria” que poseen estos materiales, ya que la respuesta del material depende sobre la integral de todo tiempo transcurrido.

Esta última expresión también es posible deducirla de una manera más formal por medio del llamado principio de superposición de Boltzmann. Este principio dice que las contribuciones de las tensiones de las pequeñas deformaciones deben ser

sumadas para dar la tensión en el tiempo t , luego integrando cada una de estas contribuciones se llega a una expresión análoga a las descrita anteriormente.

Cuando a un material se encuentra bajo la influencia de una deformación sinusoidal, del tipo:

$$\gamma = \gamma_0 \sin \omega t$$

Eq. (7)

La velocidad de deformación viene descrita por:

$$\dot{\gamma} = \omega \gamma_0 \cos \omega t$$

Eq. (8)

Reemplazando esta expresión en la ecuación que rige a los materiales viscoelásticos:

$$\tau = \int_0^{\infty} G(s) \omega \gamma_0 \cos \omega(t-s) ds$$

Eq. (9)

En consecuencia, al aplicar una deformación del tipo sinusoidal la tensión necesaria posee dos componentes: una en fase con la deformación (típica de los materiales elásticos) y otra en desfase en 90° (material viscoso). Otra forma de ver lo anterior es decir que existe un desfase entre la deformación y la tensión. Así, el módulo elástico o de almacenamiento (G') y modulo viscoso o módulo de pérdida (G'') se implican en la ecuación general de la siguiente forma [29]:

$$\tau = \gamma_0 (G' \sin \omega t + G'' \cos \omega t)$$

Eq. 10

Además de las funciones: $\eta' = G'/\omega$ y $\eta'' = G''/\omega$

Si al material se le realiza una perturbación sinusoidal de frecuencia angular ω , la tangente de pérdidas $\alpha = G''/G'$, que representa la fracción de energía que se pierde como calor durante un ciclo de perturbación del material.

En un material perfectamente rígido $G'' \rightarrow 0$, y $\alpha \rightarrow 0$, de modo que no hay pérdida de energía al perturbar el material, toda la energía es recuperable y G' es mayor cuanto más duro es el "resorte" que representa al material.

Mientras que en un líquido newtoniano perfecto, $G' \rightarrow 0$, y $\alpha \rightarrow \infty$, de modo que la energía no puede recuperarse elásticamente, se pierde totalmente en la agitación viscosa del líquido de viscosidad $\eta = G''/\omega$.

Es importante notar que ambas componentes G' y G'' son dependientes de ω , de modo que un material que se comporta como un líquido newtoniano a una frecuencia determinada, puede ofrecer propiedades de sólido rígido en otra. Esto es debido a que las propiedades moleculares que se evidencian como parámetros macroscópicos al perturbar un material son fuertemente dependientes de la escala de tiempo en que se efectúa la perturbación [31].

3.5 TÉCNICAS MICROGRAVIMÉTRICAS

3.5.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)

La QCM es una potente técnica para seguir la cinética de adsorción de diferentes sistemas, como los átomos, moléculas, proteínas o incluso de células vivas. El fenómeno físico del sensor de cuarzo se basa en el efecto piezoeléctrico, cuyo descubrimiento se atribuye a Pierre y Jacques Curie. En 1880 se encontró que los cristales de sal de Rochelle podrían producir electricidad cuando se aplica presión en ciertas direcciones cristalográficas. Un año más tarde se demostró el efecto inverso, que consiste en la producción de tensión por la aplicación de la electricidad. No obstante, es sólo al final de la década de 1950 que este fenómeno fue investigado [29].

Cristales de cuarzo AT-cut son los más utilizados para aplicaciones de control de la frecuencia. Dos electrodos son evaporados en cada lado del cuarzo delgado, al cual, se le aplica un voltaje (Voltaje Alterno), que induce la oscilación del cristal. En 1959 Sauerbrey publicó un artículo mostrando que el cambio de la frecuencia del cristal de cuarzo es proporcional a la masa adsorbida en condiciones de vacío. En 1981 los campos de aplicación de la QCM se ampliaron a los entornos líquidos, abriendo paso a nuevas investigaciones en biotecnología y electroquímica.

La aplicación clásica de los resonadores de cristal de cuarzo es la microgravimetría. Los instrumentos comerciales usan la ecuación de Sauerbrey, para películas delgadas, en donde la frecuencia de resonancia es inversamente proporcional al espesor de la película. Sin embargo, cuando el espesor aumenta, efectos viscoelásticos entran en juego en las mediciones. Por lo tanto, el incluir las propiedades viscoelásticas en el modelo profundiza la comprensión de los resultados de la QCM y mejora de la información derivada de factores físicos, químicos o biológicos que suceden en el sensor de cristal de cuarzo.

Para elaborar un modelo teórico que describa el comportamiento de un cristal de cuarzo cuando una de sus caras está en contacto con un material, es conveniente utilizar la analogía mecánico-eléctrica, a través de los parámetros mecánicos y piezoeléctricos del cristal de cuarzo [36].

3.5.1 Circuito equivalente y propiedades físicas

Un cristal de cuarzo AT-cut puede ser descrito por un circuito equivalente, como se muestra en la Figura 4. Este se encuentra compuesto por un brazo con elementos dispuestos en serie, llamado brazo dinámico, en paralelo con una capacitancia C_0 , llamado brazo estático, que es la capacitancia estática del

resonador de cuarzo con los electrodos. El brazo dinámico define las características electromecánicas del resonador de cuarzo, L_1 es el componente inercial, C_1 es la compliancia³ del cuarzo y R_1 la disipación de energía durante la oscilación.

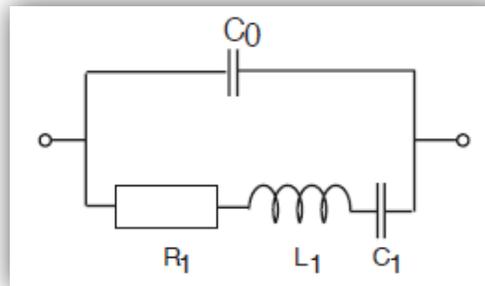


Figura 4 Circuito equivalente de un cuarzo en el vacío modelado por Butterworth Van-Dyke (BVD) [27].

Este modelo puede ser convertido a uno mecánico, donde la masa está relacionada con L_1 , la energía almacenada durante la oscilación con C_1 , y la energía perdida con R_1 . Todos estos componentes están también relacionados a parámetros medidos por la QCM, frecuencia de resonancia, f , y resistencia, R , como una función del tiempo.

Kanazawa encontró la siguiente relación para el cambio de frecuencia en líquido sin adsorción de masa comparado al vacío:

$$\Delta f = -f_0^{3/2} \frac{\rho_l \eta_l}{\pi \mu_q \rho_q}$$

Eq. 11

Donde $f_0 = \frac{1}{\mu_q \rho_q} 2h_q$ es la frecuencia de resonancia, ρ_l y η_l son la densidad y la viscosidad del líquido, y h_q , ρ_q y μ_q son el espesor, la densidad y el módulo de cizalladura del cristal de cuarzo, respectivamente [37]. La Eq. 11 muestra

³ El grado de rigidez o elasticidad de un sistema mecánico

que las mediciones de frecuencia no sólo son sensibles a los cambios de masa, sino también a los cambios en las propiedades del líquido. Del mismo modo, cambios en la viscosidad y densidad de la masa adsorbida también induce cambios de frecuencia adicionales. Además, se ha demostrado que la sensibilidad de la frecuencia, en términos de los cambios de frecuencia por densidad másica, incrementa con la deposición de películas suaves.

Para considerar la masa de la película adherida al sensor de la QCM, es necesario incorporar más elementos en el circuito equivalente de la QCM. La Figura 5(a) muestra una modificación del modelo de Butterworth Van Dyke, donde, Z_L representa los cambios causados por la masa cargada. La forma de Z_L depende de las condiciones experimentales.

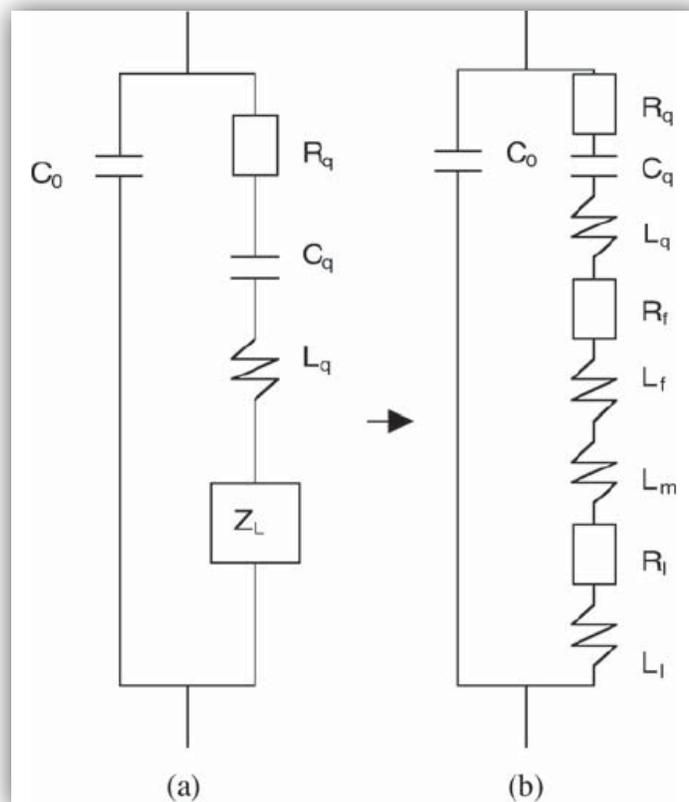


Figura 5. Circuito equivalente (a) modelo con una superficie cargada (Z_L); y (b) modelo para un recubrimiento viscoelástico en contacto con un líquido Newtoniano semi-infinito [32].

El enfoque que presentan Granstaff y Martin [41] usan el circuito equivalente para Z_L que se muestra en la figura 6 b), el cual representa una película viscoelástica (parámetros L_m , L_f , R_f) en contacto con un líquido Newtoniano (parámetros R_l y L_l). Este modelo ha probado ser apropiado para cargas viscoelásticas en muchas aplicaciones de la QCM probando que: Z_L es menor que la impedancia característica del cuarzo, $Z_q = \sqrt{\rho_q \mu_q}$, donde ρ_q es la densidad y μ_q es el módulo de cizalladura del cristal de cuarzo; y la impedancia acústica de la interfase película-líquido refleja la mayor parte de la energía de vibración. Por lo tanto la impedancia del circuito equivalente se puede describir como en la Eq. 12 [42],[43]:

$$Z_L = R_q + R_f + R_l + j\omega L_q + L_f + L_l + L_m$$

Eq. 12

La interpretación física de los elementos del circuito: la resistencia (R) representa la disipación de energía acústica, mientras la inductancia (L) es la carga de masa (L_m es la masa cargada de la película, L_f y L_l la masa inercial viscoelástica de la película y el líquido respectivamente). Experimentos relacionan R y L con las propiedades específicas de los materiales de la sobrecapa (por ejemplo la densidad, los módulos de corte, etc) que están dados en la literatura. La parte real de la impedancia se puede expresar como [38],[42]

$$R = R_q + R_f + R_l$$

Eq. 13

Donde, R_q es la resistencia del cristal no-perturbado, R_l es la debida al líquido cargado y R_f es la debida a la presencia de la película en la superficie del cristal. R_l es proporcional a la densidad y viscosidad del líquido $\sqrt{\rho_l \eta_l}$, R_f se refiere a las pérdidas viscosas que se producen en la película y están

determinadas por tres parámetros: módulo elástico G' , módulo perdido G'' y espesor h_f de la película [32].

La resistencia del cristal no-perturbado puede ser considerada constante durante la experimentación. De esta forma el cambio de las resistencias puede ser expresada como:

$$\Delta R = \Delta R_f + \Delta R_l$$

Eq. 14

Aquí ΔR_l es la contribución del cambio de η_l y ρ_l del líquido y ΔR_f será el cambio de las propiedades de la película.

El cambio de la frecuencia está dado por la siguiente ecuación [43]

$$\Delta f = -f_0 \frac{\Delta L}{2L_q}$$

Eq. 15

Donde f_0 es la frecuencia de resonancia natural o fundamental y ΔL la medida del cambio en la inductancia. En un estudio anterior se encontró que la contribución a ΔL de las masas viscoelásticas (L_f, L_l) es pequeña para películas delgadas de polímeros ($\sim < 1\mu\text{m}$) y la contribución principal es la masa cargada gravimétricamente (L_m) [42].

3.5.3 Análisis de Impedancia

La impedancia eléctrica Z_e del circuito equivalente del cristal de cuarzo puede ser expresada en función de la impedancia mecánica Z_{mq} mediante:

$$Z_e = \frac{2wL_q}{\pi \mu_q \rho_q} Z_{mq} = R + jX_L$$

Eq. 16

Con

$$L_q = \frac{h_q^3 \rho_q}{8Ae_{26}^2}$$

Eq. 17

Donde

- $\mu_q =$ El módulo de cizalladura del cristal de cuarzo (cte elástica), $2,957 \times 10^{10} \text{ Nm}^{-2}$.
- $\rho_q =$ Densidad del cuarzo, $2,650 \text{ kgm}^{-3}$.
- $h_q =$ Espesor del cuarzo, $102\text{-}1020 \text{ nm}$.
- $A =$ Área activa del electrodo depositado $\sim 0,40 \text{ cm}^2$.
- $e_{26} =$ Constante piezoeléctrica del cuarzo, $9,652 \times 10^{-2} \text{ Cm}^{-2}$.
- $w =$ Frecuencia angular.
- $j = \overline{-1}$

La expresión anterior es general y puede ser utilizada también para relacionar las impedancias mecánica y eléctrica de un cristal de cuarzo sobre el que se ha depositado un material no piezoeléctrico.

Granstaff y Martin [41],[44] han descrito la impedancia mecánica de un resonador piezoeléctrico acoplado a múltiples capas de materiales no piezoeléctricos de espesor d_i y constante de propagación de ondas $k_i = jw \overline{\rho_i/G_i}$, siendo el vector $G_i = G_i' + jG_i''$, el que describe las propiedades viscoelásticas del material indicado con el subíndice i. Un análisis detallado se presenta en el Anexo B.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1 BIOMATERIALES POLIMÉRICOS

Diversos estudios se han realizado acerca de los materiales para implantación endo-ósea, ya sean implantes permanentes o no; estos materiales se pueden listar a groso modo con sus aplicaciones comunes como muestra en la Tabla 2. Desde la aparición de los polímeros sintéticos hace aproximadamente 60 años, los profesionales de la medicina se percataron de que estos materiales podían ser de gran interés en aplicaciones terapéuticas [45].

Tabla 2 Biomateriales para regeneración ósea.

MATERIALES	APLICACIONES
Polímeros	Liberación de fármacos, ingeniería de tejidos
Metales	Placas de osteosíntesis, clavos y tornillos, implantes dentales
Cerámicas y Biovidrios	Relleno de cavidades y defectos óseos, prótesis de cadera

Desde entonces, un gran número de polímeros, bioestables y biodegradables, han sido desarrollados gracias a su variedad de composiciones y propiedades que cubren un amplio rango de aplicaciones [47], [48]. Dependiendo del tipo de polímero y la constitución del mismo, estos materiales biodegradables pueden ser creados para proveer el soporte mecánico suficiente durante las primeras etapas de la reparación del hueso, mantener este soporte durante un período determinado y luego degradarse poco a poco el Diagrama 1, se muestran algunos de los más utilizados en aplicaciones biomédicas [53], [54]. El estudio del PLGA ha recibido una atención considerable basada en su estabilidad, biocompatibilidad, adecuadas propiedades mecánicas y adhesión celular [12], [55]-[58].



Diagrama 1. Estratificación de los Polímeros Biodegradables usados en la reconstrucción ósea.

4.2 BIOCOMPATIBILIDAD

En los estudios de biocompatibilidad de los materiales para implantación endo-ósea la respuesta del tejido nativo tienen gran importancia, pero la necesidad de limitar la experimentación con animales ha conducido al uso de pruebas *in vitro* para seleccionar, de forma adecuada, el potencial de utilidad de los biomateriales apropiados para la aplicación humana. Dentro de los estudios *in vitro* las pruebas de mortalidad, proliferación, morfología y adhesión celular están directamente relacionadas con la toxicidad.

Para evaluar la morfología y la viabilidad celular generalmente se usan tintes que permiten observar el comportamiento de adhesión celular. De una u otra forma la morfología, representa la traducción eventos físico-químicos de la interacción entre las células y el material. Por otro lado, después de la adhesión celular se producen otros procesos que resultan de la actividad biológica, como la producción de la matriz extracelular y la reorganización de las proteínas del citoesqueleto.

Estos procesos producen a su vez cambios en la estructura del material como en la composición, configuración, entre otros. Y en consecuencia la medida de estos cambios se considera como un parámetro de biocompatibilidad [29]. Algunas de las influencias características de sustancias cito-tóxicas sobre la morfología celular incluyen: reducción del núcleo celular, fragmentación del citoplasma, formación de granulación, redondeo y desprendimiento de la célula.

Una evaluación cualitativa de la morfología celular es a menudo basada en el uso de microscopía óptica. Del mismo modo, la microscopía de epifluorescencia es una de las derivaciones de la microscopía óptica en donde una sustancia natural en las células o un colorante fluorescente aplicado, es estimulado por un haz de luz, emite parte de la energía absorbida como rayos luminosos. Uno de los métodos de marcado fluorescente celular más usados es el nuclear con reactivo de Hoechst, que permite la visualización directa de los núcleos celulares con el microscopio de fluorescencia. Este reactivo penetra en el núcleo de una célula y se une a la adenina y la timina del ADN y el ARN, haciendo ver el núcleo celular de color azul.

Por otra parte, una actividad biosintética reducida [55], así como la liberación de metabolitos⁴ del citoplasma, como consecuencia de la ruptura de la membrana celular, pueden ser indicadores de la muerte celular. Los osteoblastos expresan su metabolismo principalmente con la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) [54], luego una producción de ALP reducida, es considerada un parámetro de toxicidad [66]-[69]. También, existe una práctica estándar para evaluar materiales para dispositivos biomédicos en contacto con cultivos celulares llamado MTT. El ensayo se basa en la actividad metabólica de las células que reducen tetrazolio, que es la base del reactivo MTT [56], [65], [70]-[72].

⁴ Metabolito es cualquier molécula utilizada o producida durante el metabolismo. <http://www.iqb.es/diccio/m/me3.htm>

4.3 MICROBALANZA DE CRISTAL DE CUARZO

La microbalanza de cuarzo es uno de los muchos métodos experimentales discutidos por Kasemo en su amplio estudio biológico de la ciencia de las superficies [72],[73]. En palabras de Kasemo, "la ciencia de superficies biológicas (BioSS)", es el amplio campo interdisciplinar, donde las propiedades y los procesos en las interfaces entre los materiales sintéticos y los entornos biológicos son investigados y se fabrican superficies biofuncionales. Múltiples investigaciones se han realizado con la QCM para evaluar las interacciones célula-material. Las observaciones principales son de adhesión celular como parámetro de biocompatibilidad y cambios en el citoesqueleto. En la Tabla 3 se presentan algunas de las investigaciones realizadas.

Tabla 3 Resumen de los antecedentes de medición de biocompatibilidad usando QCM.

Investigadores	Publicación	Resultado
Jody Redepenning y colaboradores	Osteoblast Attachment Monitored with a Quartz Crystal Microbalance, Anal. Chem. 1993, 65, 3378-3381	Los osteoblastos presentaron un comportamiento viscoelástico. Por lo tanto la ecuación de Sauerbrey no puede ser usada para describir la relación entre el cambio de masa de osteoblastos en la superficie y el cambio de frecuencia del cristal.
Zhi-Hong Liang, y colaboradores	Formation of nano-patterned protein layers on poly (lactic acid) surface: Induced by dewetting process and self-assembly. Materials Letters 63 (2009) 927–929	En los recubrimientos de PLA fueron estudiadas las propiedades viscoelásticas de películas proteicas, usando QCM, encontrando que las películas de Colágeno tienen mayores propiedades visco-elásticas ($\Delta D/\Delta f \sim 0,26 \times 10^{-6}/\text{Hz}$) que las de BSA ($\Delta D/\Delta f \sim 0,091 \times 10^{-6}/\text{Hz}$) que se encuentran sobre recubrimientos de PLA usando la QCM.

Investigadores	Publicación	Resultado
C. Galli Marxer, y colaboradores	Cell viscosity increase during spreading induces positive frequency shifts in Quartz Crystal Microbalance measurements, Anal Bioanal Chem (2003) 377 : 578–586.	Las mediciones de la amplitud de la oscilación máxima y constante de decaimiento del tiempo revelaron cambios en las propiedades viscoelásticas durante la propagación de las células. Tales cambios pueden ser reproducidos cuando las células adhieren lo cual afecta a los filamentos de actina y los microtúbulos del citoesqueleto.
Fang Li, y colaboradores	Monitoring cell adhesion by using thickness shear mode acoustic wave sensors, Biosensors and Bioelectronics 23 (2007) 42–50	Se conectó un sensor TSM a células vivas para monitorear en tiempo real la adhesión celular, encontrando que las formación y organización de las fibras de actina afectan la viscoelasticidad celular, incrementando significativamente el módulo almacenado G' .
Charlotte Modin, y colaboradores	QCM-D studies of attachment and differential spreading of pre-osteoblastic cells on Ta and Cr surfaces, Biomaterials 27 (2006) 1346–1354	Monitoreo continuo de MCF-7 células mediante Δf y ΔR de la QCM durante los procesos de adhesión/proliferación en un electrodo de Au, exhibiendo una $\downarrow\Delta f$ y $\uparrow\Delta R$ simultáneamente, insinuando los complejos efecto de masa, la viscoelasticidad y probables cargas de estrés superficiales.
Megan Susan Lord, y colaboradores	Monitoring cell adhesion on tantalum and oxidised polystyrene using a quartz crystal microbalance with dissipation, Biomaterials 27 (2006) 4529–4537	Las respuestas pueden ser debidas al remodelamiento de la MEC así como cambios en el citoesqueleto. Los cambios de frecuencia y disipación asociados con la adhesión celular fueron menores de lo esperado de la relación de Sauerbrey debido a las propiedades viscoelásticas de las células.
Joachim Wegener y colaboradores	Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines, Eur Biophys J (1998) 28:	Demostraron que la adhesión celular mediada por proteínas integrantes induce los cambios de frecuencia, mientras que la presencia de las células en los alrededores de la superficie del cristal es apenas detectable.

Investigadores	Publicación	Resultado
Atul Saluja, y colaboradores	Measurement of Fluid Viscosity at Microliter Volumes Using Quartz Impedance Analysis AAPS PharmSciTech 2004; 5 (3) Article 47	El análisis de impedancia de la QCM proporciona una evaluación fiable de las propiedades reológicas de líquidos usando bajos volúmenes, a partir de los datos de cambio de frecuencia y resistencia.
Xueen Jia, y colaboradores	Quartz crystal microbalance and electrochemical cytosensing on a chitosan/multiwalled carbon nanotubes/Au electrode. Sensors and Actuators B 134 (2008) 273–280.	Los procesos de adhesión-proliferación de las células MCF-7 en el electrodo de Au de la QCM hace decrecer la frecuencia e incrementar la resistencia simultáneamente, lo que implica efectos bastante complicados (simultáneos de masa, viscoelasticidad y probable de carga de estrés) en la superficie del sensor.
Kenneth A. y colaboradores	Quartz crystal microbalance biosensor study of endothelial cells and their extracellular matrix following cell removal: Evidence for transient cellular stress and viscoelastic changes during detachment and the elastic behavior of the pure matrix	Siguieron el desprendimiento de las células endoteliales o células MCF-7 de sus MEC con un método de nonproteolytic, se pudo separar la disminución de la frecuencia de las contribuciones de la adhesión celular y de la MEC. Durante el proceso de desprendimiento de las células, se observó un aumento transitorio en el comportamiento viscoelástico expresado en un aumento transitorio de la resistencia.
Joachim Wegener, y colaboradores	The Quartz Crystal Microbalance as a Novel Means to Study Cell–Substrate Interactions In Situ. Cell Biochemistry and Biophysics, Volume 34, 2001	Revisión que se centra en las aplicaciones experimentales de la QCM en cultivo de tejidos, sobre todo para supervisar el establecimiento y modulación de las interacciones célula-sustrato.

Investigadores	Publicación	Resultado
Kenneth A. Marx, y colaboradores	A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations. <i>Biosensors & Bioelectronics</i> 16 (2001) 773–782.	Utilizaron la QCM como biosensor para la detección del efecto de nocodazola, observando un cambio de frecuencia negativa y de resistencia positivo indicando alteraciones en el citoesqueleto.

5. METODOLOGÍA

La metodología experimental seguida en este trabajo de investigación está enfocada en técnicas complementarias, de microgravimetría, microscopía y ensayos bioquímicos, que permitieron evaluar de las interacciones de células osteoblasticas con recubrimientos de PLGA modificados materiales que simulan la MEC ósea. Las etapas de la metodología se resumen en el esquema presentado en el Diagrama 2.

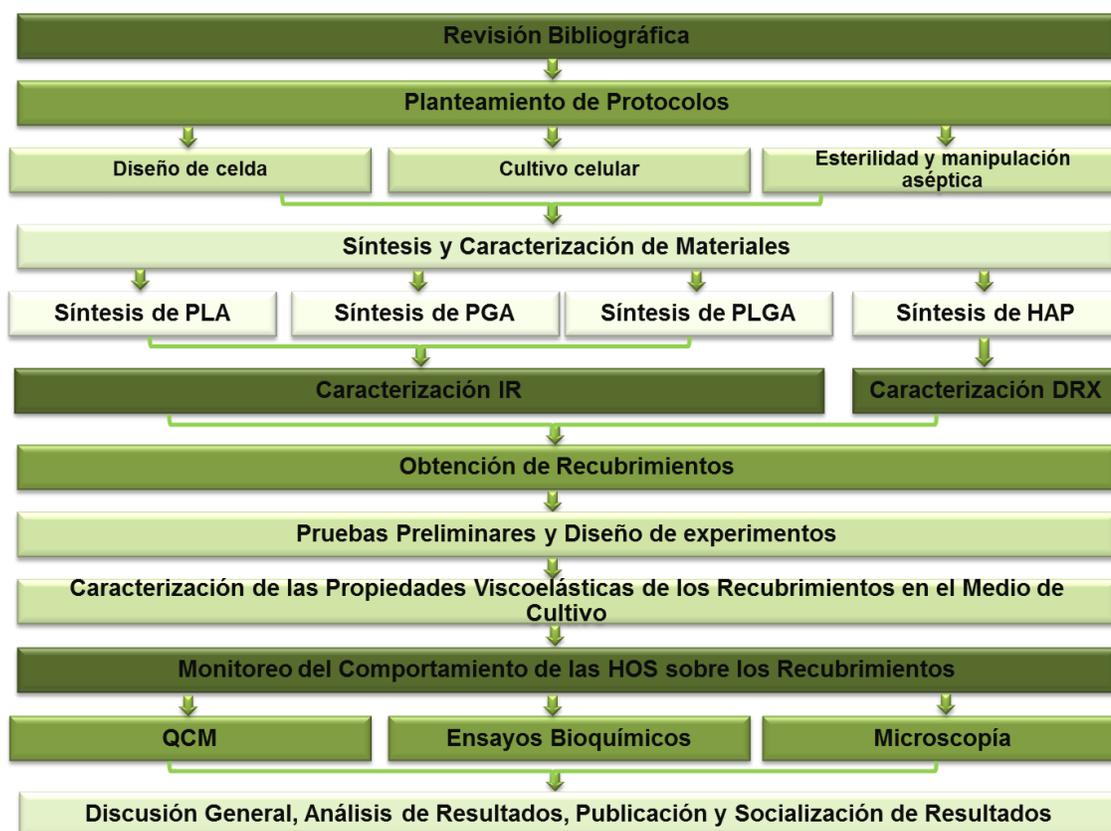


Diagrama 2. Metodología.

A continuación se describen detalladamente las etapas y actividades seguidas en la investigación:

5.1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Durante la revisión bibliográfica se tuvo en cuenta los conceptos teóricos viscoelasticidad, tejido óseo, matriz extracelular, osteoblastos, materiales biodegradables, las técnicas a utilizar, para llevar a cabo una revisión y análisis de la información de la producción científica relacionada (en tesis, patentes, memorias de congresos y normas técnicas, así como la información contenida en base de datos). Esta etapa se realizó durante toda la investigación.

5.2 PLANEAMIENTO DE PROTOCOLOS

Con la información obtenida de la revisión bibliográfica se realizó una descripción del plan de trabajo de forma detallada; se definieron las concentraciones de las soluciones poliméricas a preparar, las condiciones a evaluar del recubrimiento de matriz polimérica y colágeno, condiciones de cultivo celular y tiempo de evaluación del material polimérico sobre los sensores de cristal de cuarzo y células HOS ATCC (Human Osteoblastic Cells).

5.2.1 Diseño de celda

En esta etapa de la investigación se identificó la necesidad de modificar el sistema sensor de la QCM para el adecuado cultivo celular, por lo tanto, se diseñó una celda adaptable a la celda de flujo que incluye el equipo QCM200 (*Stanford Research Systems*), usando como material teflón capaz de soportar múltiples ciclos de esterilización en autoclave. Esta celda consta básicamente de un tubo roscado por un extremo (en su interior) y una tapa tipo caja Petri que permitiera el intercambio de gases y de calor para alcanzar la temperatura corporal.

En la Figura 6 se puede observar a la izquierda la celda de flujo original del equipo y a la derecha la celda empleada para la experimentación microgravimétrica.



Figura 6. Celda para pruebas microgravimétricas

5.2.2 Cultivo celular

Para este estudio se empleó la línea celular HOS (ATCC) obtenida de American Type Culture Collection, constituida por células osteoblásticas procedentes de un osteosarcoma humano. Se llevó a cabo el cultivo celular en frascos de cultivo Falcon® bajo condiciones estériles a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y 5% de CO_2 , en medio de cultivo RPMI 1640, con 1% de L-glutamina, 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) y suplementado con 10% de SBF (Suero Fetal Bovino), con fenol rojo, pH=7,2.

La experimentación microgravimétrica se llevó a cabo en la celda descrita en el párrafo anterior. Simultáneamente se cultivaron recubrimientos para realizar las

pruebas bioquímicas y de microscopía, estos recubrimientos se realizaron sobre laminillas de vidrio circulares cultivados en platos de 24 pozos y sensores de cristal de cuarzo cultivados en cajas Petri de 44mm de diámetro.

Durante los ensayos preliminares se estableció que el cambio del medio de cultivo fuera realizado cada dos días para garantizar suministro adecuado de nutrientes tanto para en los sensores de cristal de cuarzo como para las laminillas de las pruebas bioquímicas y de microscopía [16],[34],[35]. El Suero Fetal Bovino se adquirió de Hyclone Laboratories⁵.

5.2.3 Esterilidad y manipulación

En el cultivo celular, a pesar de la utilización de antibióticos en los medios de cultivo, la contaminación por microorganismos es uno de los mayores problemas. La introducción de microorganismos patógenos mediante diferentes vías, como el operador, la atmósfera, la superficie de trabajo, las soluciones, etc. es un riesgo controlable en gran medida si se realiza una correcta y rigurosa técnica aséptica por parte del operador, conjuntamente con la utilización de soluciones y materiales probadamente estériles que son imprescindibles para el mantenimiento de los cultivos libres de contaminantes biológicos.

La principal herramienta de control del riesgo biológico usada durante el trabajo experimental fue la cabina de flujo laminar. Los procesos de esterilización con luz UV, la electrodeposición de recubrimientos, el montaje de la celda de medición microgravimétrica, la preparación de las muestras para microscopía se llevaron a cabo en la cabina de flujo laminar del Grupo de Investigaciones en Corrosión.

Se realizó un análisis de los métodos para esterilización basados en la integridad de los materiales y disponibilidad de recursos en la sede *UIS Guatiguará*, donde

⁵www.hyclone.com

básicamente se encontró, que mediante el uso de autoclave e irradiación por ultravioleta se lograba una asepsia suficiente para mantener el cultivo libre de bacterias, mico plasmas, levaduras y esporas de los hongos.

Tabla 4 Lista de selección de métodos para esterilización

Materiales a Esterilizar Usando Autoclave	Materiales a Esterilizar Usando Luz UV
Celda de QCM	Soluciones poliméricas
Celdas para Recubrimientos	Recubrimientos sobre cristales
Ánodos y cátodos para electrodeposición	Cables para electrodeposición
PBS	Fuente de poder
Pinzas	Sensores de Cristal de cuarzo
Agua destilada	
Material consumible en general de vidrio y metal	

5.3 SÍNTESIS DE PLA, PGA E HIDROXIAPATITA

5.3.1 Síntesis de ácido poliláctico PLA

El ácido poliláctico se obtuvo a partir de ácido L-láctico Carlo Erba al 98%, actuando como catalizador cloruro de cinc en una concentración de 1.5% en peso. El procedimiento se llevó a cabo en un rotoevaporador, con control de temperatura y presión de vacío. Se le suministró al sistema entrada de gas nitrógeno para mantener la reacción a atmosfera inerte. El tiempo total de síntesis fue de 57 horas aproximadamente.

La obtención del PLA constó de cuatro etapas de síntesis [34], como se esquematiza en la Figura 7.



Figura 7 Síntesis de PLA

5.3.2 Síntesis de ácido poliglicólico PGA

El PGA se obtuvo mediante policondensación a partir de ácido glicólico Carlo Erba al 70%, con un 0,5% de ZnCl₂ como catalizador, y un tiempo total de síntesis de 25 horas. La obtención de PGA constó de cuatro etapas como se muestra en la Figura 8 [35].



Figura 8. Síntesis de PGA

5.3.3 Síntesis de hidroxiapatita (HA)

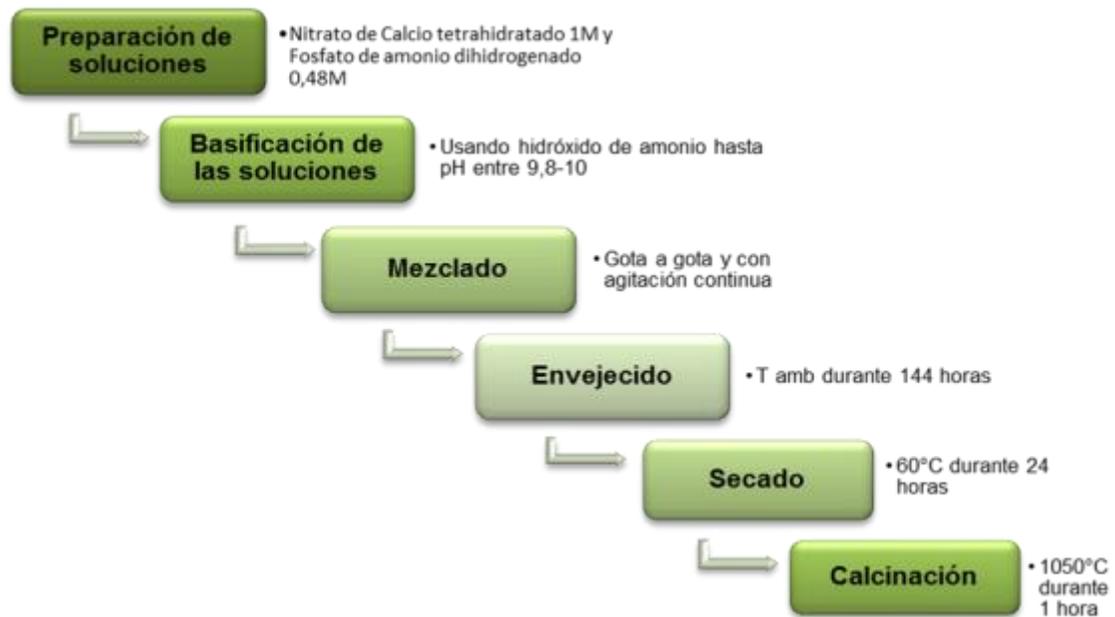


Figura 9 Síntesis de hidroxiapatita

Se usó el método de precipitación acuosa para obtener los cristales de hidroxiapatita, como se muestra en la Figura 9 [36]. El precipitado de hidroxiapatita se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:



Eq. 18

5.4 CARACTERIZACIÓN DE PLA, PGA, PLGA, HA Y COLÁGENO COMERCIAL

La caracterización de los polímeros PLA y PGA se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR). Los espectros de FTIR se hicieron usando un Espectrofotómetro 8400 Shimadzu, en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , con 1.5 gramos de muestra pulverizada.

Ambos polímeros pulverizados se mezclaron en seco en una proporción de 70% en peso de ácido poliláctico y 30% en peso de ácido poliglicólico, fundiendo luego

la mezcla a 220°C durante 20 minutos en un horno WTB-BLINDER, teniendo en cuenta que las temperaturas de descomposición de ambos polímeros se encuentran por encima de 250°C [37]. La mezcla (PLGA) se dejó secar y se pulverizó de nuevo para preparación de las soluciones. El PLGA se caracterizó por FTIR en un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , así como el colágeno comercial usado para los recubrimientos.

La hidroxiapatita se caracterizó cualitativa y cuantitativamente mediante difracción de rayos X en un difractómetro de polvo marca RIGAKU modelo D/MAX IIIB a un voltaje de 40kV, corriente de 30 mA y muestreo de 0,02° (2θ). Los espectros se muestran y se analizan en el siguiente capítulo.

5.5 ENSAYOS PRELIMINARES: SELECCIÓN DE PARÁMETROS

Los ensayos preliminares se llevaron a cabo con medio de cultivo y células osteoblásticas con los respectivos protocolos de manipulación, esterilización y cultivo celular. En esta etapa se establecieron y validaron los rangos de trabajo tanto para la deposición electroforética, como para los niveles de las variables hidroxiapatita, colágeno tipo I C9879 sigma (Bovine Achilles Tendon), quitosano y concentración celular.

Tabla 5. Niveles de concentración de PLGA, hidroxiapatita, colágeno tipo I y quitosano.

Variable	Valor alto ⁶	Valor bajo ⁶
PLGA 70/30	15% sln ⁷	15% sln ⁷
Hidroxiapatita	10%	10%
Quitosano	3%	0%
Colágeno	0,05%	0,05%
Células	30000 cel/ml	10000 cel/ml

⁶ El % es en peso de soluto/volumen de solución de PLGA.

⁷ La solución en acetona grado analítico

En la Tabla 5 se observan los parámetros empleados para encontrar las mejores condiciones en la electrodeposición de la mezcla polimérica. Los recubrimientos se evaluaron usando microscopía óptica según su homogeneidad y transparencia.

Tabla 6. Factores y niveles para ensayos de electrodeposición de la mezcla polimérica.

Factor	Niveles	
Voltaje (V)	3	9
Tiempo (min)	10	15
Agitación(rpm)	0	100

De acuerdo a los parámetros de la Tabla 6, las mejores condiciones de la electrodeposición sobre los cristales de cuarzo fueron 9V, 15 minutos y sin agitación. Una vez encontradas las mejores condiciones para los recubrimientos de PLGA, HA y quitosano, se prosiguió a definir las mejores condiciones para la electrodeposición de colágeno comercial disuelto en PBS. Se encontró las características deseadas de los recubrimientos con una aplicación de 1V, durante un minuto y con agitación de 100 rpm.

5.6 OBTENCIÓN Y ELECTRODEPOSICIÓN DEL POLÍMERO PLGA Y PLGA MODIFICADO

La composición del polímero PLGA fue constante de 70% PLA – 30% PGA, la cual es reportada por otras investigaciones como una composición que tiene buena resistencia a la degradación, comparada con otras composiciones [38], aunque en los ensayos preliminares se realizaron pruebas de recubrimientos de composición 85%PLA–15%PGA, estos fueron descartados por su alta velocidad de degradación, que generaba una disminución acelerada del pH y un consecuente cambio en la coloración del medio de cultivo.

En general, la obtención y electrodeposición del polímero y polímero modificado constó básicamente de tres etapas: la primera fue la preparación de las diferentes

soluciones, la segunda fue la deposición electroforética y la tercera, un tratamiento térmico.

5.6.1 Preparación de las soluciones

Se realizó una disolución de PLGA al 15% en acetona grado analítico (*Merck*) y sobre la cual se adicionó HA en una concentración de 10% p/v. Una solución más, se hizo con hidroxiapatita al 10% y quitosano al 3% p/v.

Se prepararon soluciones de colágeno comercial y tipo I (5% p/v), en PBS (previamente autoclaveado) para la electrodeposición y pipeteo del colágeno sobre los recubrimientos realizados en los sensores de cristal de cuarzo y las laminillas de vidrio con la mezcla polimérica.

Para la preparación de la solución de colágeno tipo I se llevó a cabo el siguiente procedimiento: Se irradiaron con luz UV las fibrillas de colágeno durante 30 minutos, seguido se mezclaron con PBS, se agitó la mezcla durante 30 minutos a 200rpm con agitador magnético y se procedió a agitar con ondas de ultrasonido en un baño ultrasónico durante 30 minutos y se congeló a -80°C en el *Freezer* durante 24 horas. En este procedimiento se solidificó el agua que se encontraba entre las fibras de colágeno y en consecuencia se generó una disminución del tamaño de las mismas, produciendo de esta forma una suspensión estable de minúsculas fibras de colágeno. La suspensión tomó una coloración blanquecina, la cual se tomó para pipetear sobre los recubrimientos.

5.6.2 Depositación electroforética

Se realizó una deposición electroforética de los recubrimientos compuestos sobre los sensores de cristal de cuarzo y las laminillas de vidrio [39], [40]. Los sensores se lavaron con acetona y se irradiaron con luz UV durante 30 minutos previa a la electrodeposición.

La electrodeposición se llevó a cabo a temperatura ambiente, utilizando una fuente de voltaje Thermo Electron Corporation EC570-90, a las condiciones de tiempo, voltaje y agitación, establecidas en las pruebas preliminares. Se usó como electrodo de referencia una lámina de acero inoxidable y como electrodo de trabajo los sensores de cristal de cuarzo o las laminillas de vidrio. En la Figura 10 se observa un esquema del montaje usado para la electrodeposición.

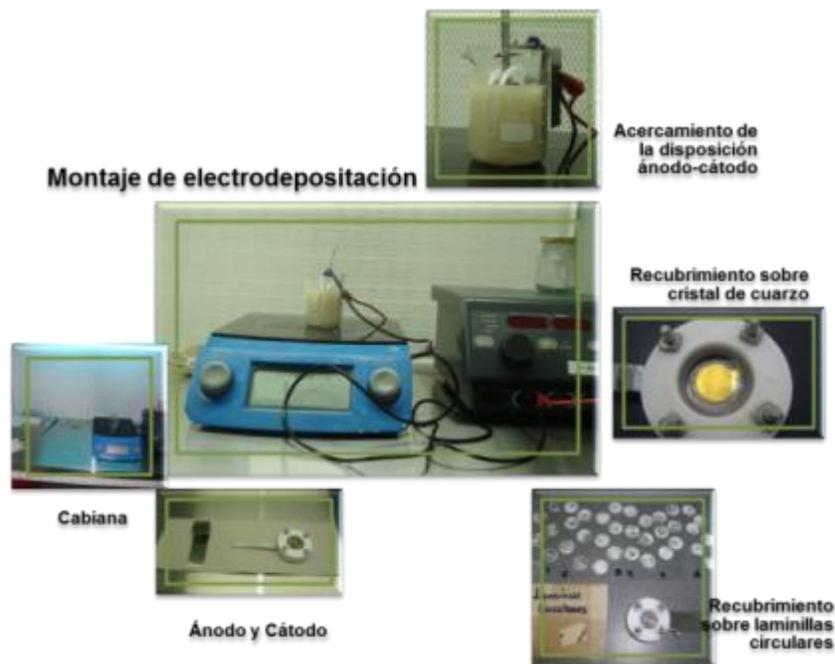


Figura 10. Esquema general del montaje para la electrodeposición de los recubrimientos.

Los recubrimientos obtenidos fueron modificados mediante un tratamiento térmico en un horno WTB-BLINDER, a 80°C durante 10 minutos. Este procedimiento se realizó sin perder la cadena de esterilidad, para ello se utilizaron cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas, las cuales no fueron abiertas fuera de cabina. El tratamiento mejora la homogeneidad y transparencia del recubrimiento ya que en este proceso se evapora el solvente remanente en el recubrimiento, en Figura 11 se puede observar un recubrimiento antes y después del tratamiento térmico.

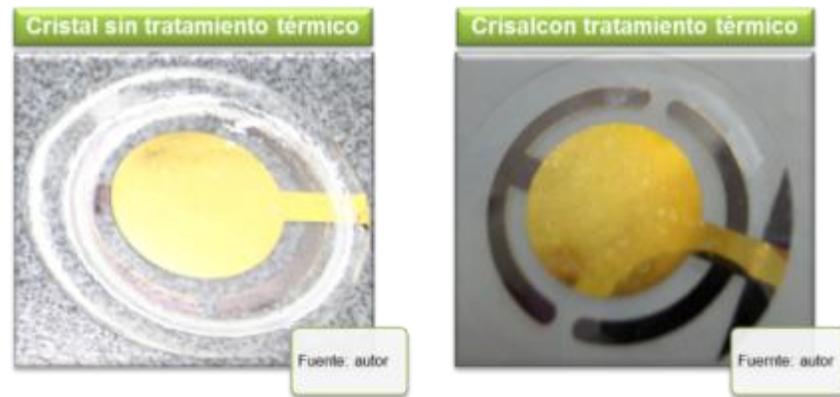


Figura 11. Imágenes de recubrimientos sin y con tratamiento térmico.

Se electrodepositó colágeno comercial sobre los recubrimientos con tratamiento térmico, luego se dejaron secar durante 30 minutos bajo cámara de flujo laminar y con luz ultravioleta para evitar que el secado por aire agrietara los recubrimientos, tal y como se muestra en los óvalos de la Figura 12. Posteriormente se pipeteó 40 μ L de colágeno tipo I sobre cada disco recubierto, igualmente se dejó secar durante 30 minutos bajo luz UV. Todas las soluciones se prepararon y usaron bajo cabina de bioseguridad para evitar contaminación. Todos los recubrimientos se hicieron por triplicado antes de cada ensayo, con el fin de obtener microscopías ópticas de los diferentes recubrimientos, ya que la esterilidad se pierde al hacer la microscopía.

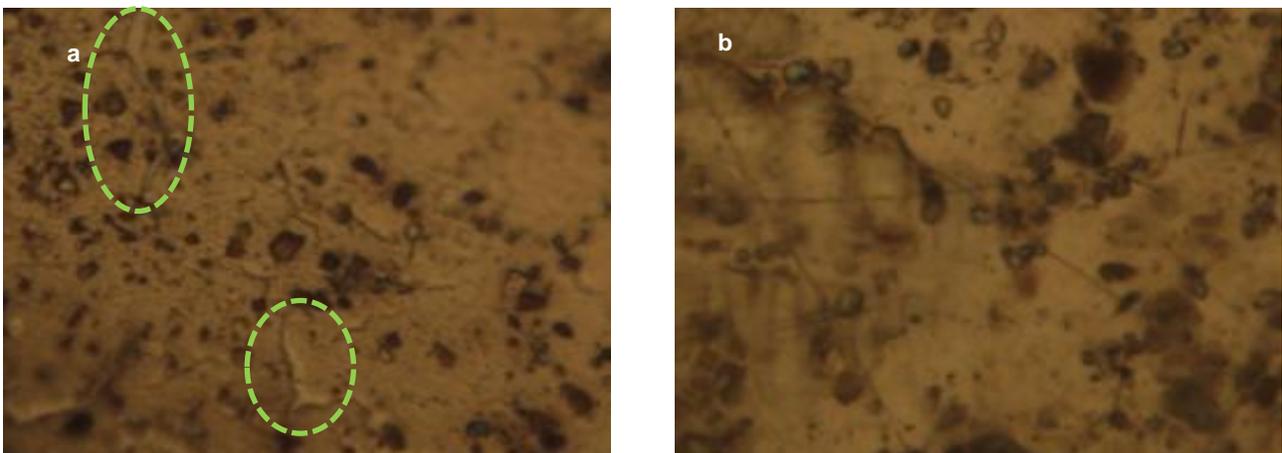


Figura 12. Microscopía óptica de recubrimiento con colágeno (50X), a) agrietado y b) no agrietado

Fuente: El autor

5.7 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

La variable de respuesta principal fue la impedancia y ángulo de desfase de la tangente de pérdida que se encontraron por simulación de un modelo de Viscoelasticidad lineal de Maxwell. Las variables dependientes fueron la concentración de colágeno, quitosano y número de células por mililitro. Las variables fijas fueron: concentración de hidroxiapatita, PLGA, temperatura, concentración de dióxido de carbono, condiciones de tiempo y voltaje en la electrodeposición, encontradas mediante ensayos preliminares. En las Tabla 7 y Tabla 8 se muestran los diseños experimentales para los blancos y para los realizados con células HOS.

Tabla 7. Diseño de experimentos para blancos en medio de cultivo.

Experimento	Quitosano (%p/v)	Colágeno (%p/v PBS)	Recubrimiento de PLGA+HA ⁸
B1	0	0	Sin
B2	0	0,05	Con
B3	3	0,05	Con

Tabla 8. Diseño de experimentos para ensayos con células.

Experimento	Quitosano (%p/v)	Colágeno (%p/v PBS)	HOS (No. cel/mL)
P1	3	0,05	10000
P2	3	0,05	30000
P3	0	0,05	10000
P4	0	0,05	30000
P5	0	0,0	30000

5.8 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS EN LOS RECUBRIMIENTOS EN EL MEDIO DE CULTIVO

Se monitorearon los cambios de frecuencia y resistencia del sensor piezoeléctrico recubierto con PLGA-HA, PLGA-HA-Colágeno y PLGA-HA-Colágeno-Quitosano, en presencia del medio de cultivo RPMI 1640, con 10% de FBS (Fetal Bovine

⁸ PLGA (70-30, 15%p/v), HAP (10% p/v)

Serum) en condiciones de incubación 37°C y 5% de CO₂. Estos cambios de frecuencia y resistencia se usaron para determinar la impedancia de la película de polímero con la cual se determinarían los cambios en los módulos de cizalladura respecto a su modificación superficial.

Para estos ensayos se llevó a cabo el siguiente protocolo de montaje de prueba:

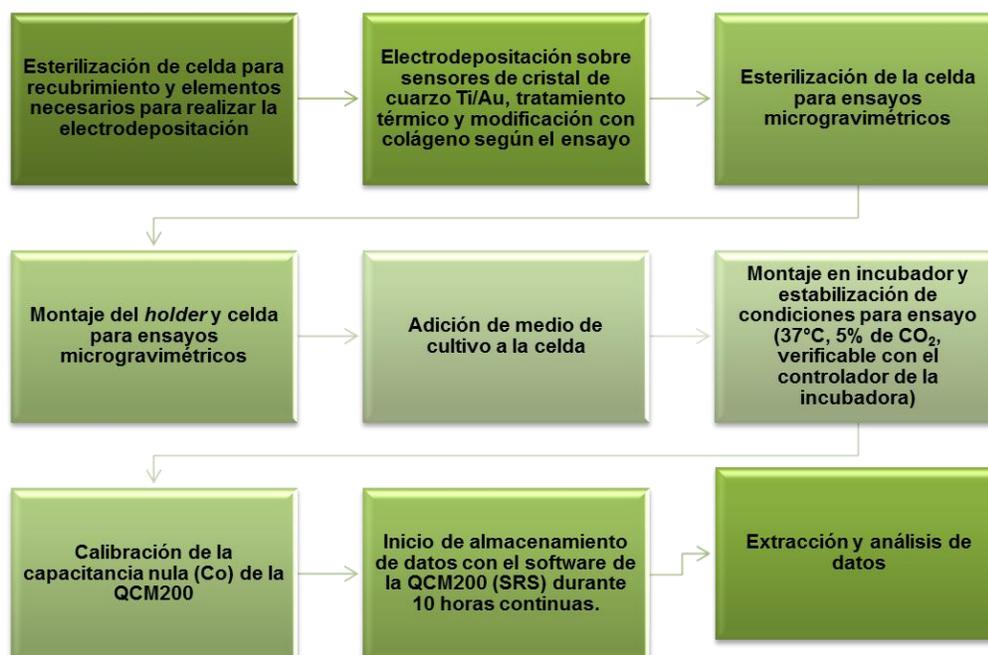


Figura 13. Protocolo para el montaje de las pruebas microgravimétricas de los blancos.

5.9 MONITOREO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS HOS SOBRE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS

El comportamiento celular se evaluó comparativamente con técnicas microgravimétricas, bioquímicas y de microscopía, para los ensayos se tomaron las células HOS en fase de crecimiento exponencial, cultivadas en el laboratorio del Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales CINTROP.

5.9.1 Ensayos Microgravimétricos

Se monitorearon los cambios de frecuencia y resistencia del sensor piezoeléctrico recubierto con PLGA-HA, PLGA-HA-Colágeno y PLGA-HA-Colágeno-Quitano,

en presencia del medio de cultivo RPMI 1640, con 10% de FBS (Fetal Bovine Serum) que contenía la concentración celular según el ensayo, a condiciones de incubación 37°C y 5% de CO₂. Estos cambios de frecuencia y resistencia se usaron para determinar la impedancia de la película de polímero con la cual se determinarían los cambios en los módulos de cizalladura respecto a su modificación superficial.

Para estos ensayos se llevó a cabo el siguiente protocolo de montaje de prueba:

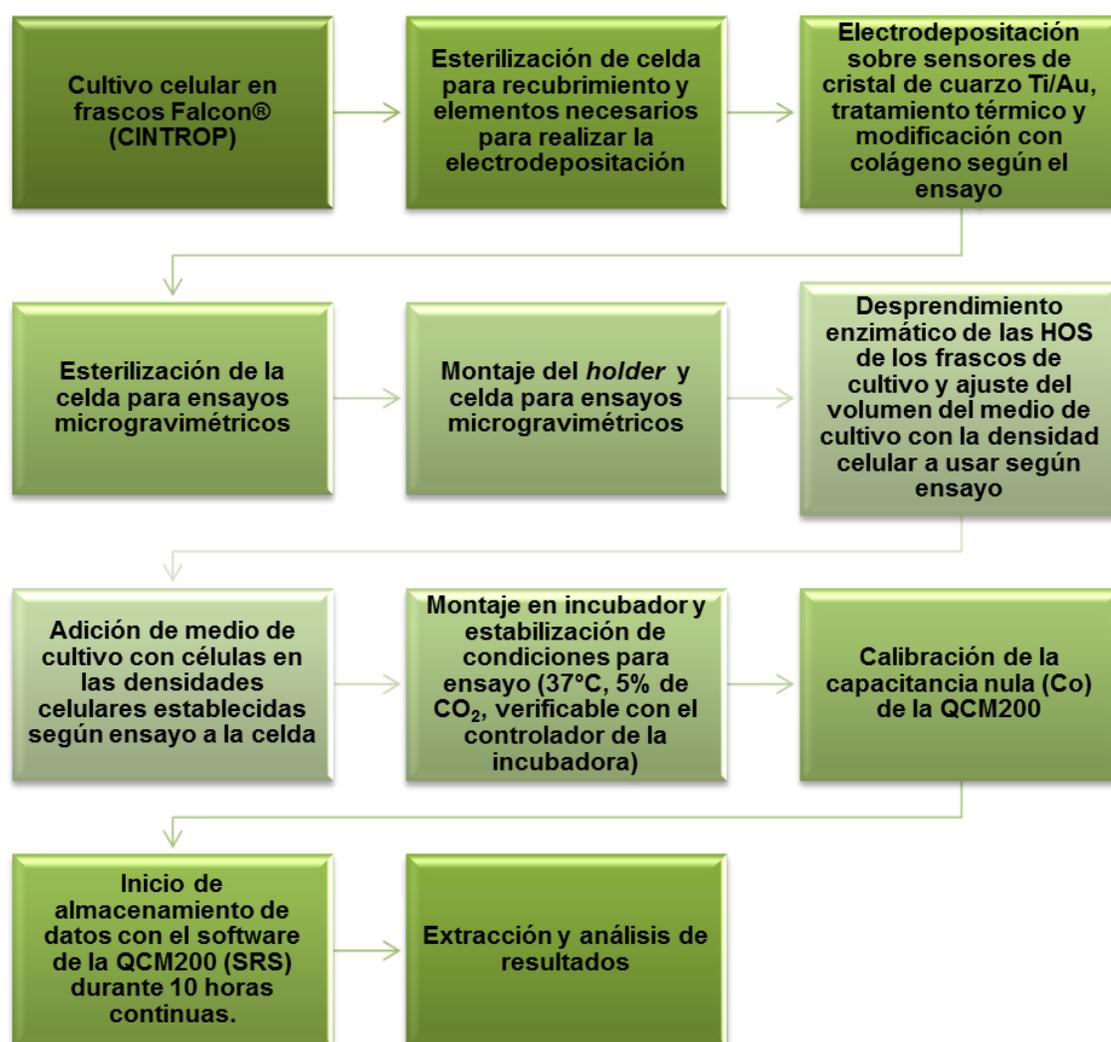


Figura 14. Protocolo para el montaje de las pruebas microgravimétricas con células

5.9.2 Ensayos Bioquímicos

Para observar la actividad de los osteoblastos, se realizó la medición de fosfatasa alcalina mediante el ensayo con sal p-nitrofenil fosfato (p-NPP por siglas en inglés) siguiendo el protocolo de la Figura 15.



Figura 15. Protocolo de pruebas de actividad enzimática fosfatasa alcalina

5.9.3 Ensayos de Microscopía

La adhesión, proliferación y morfología celular se identificaron usando microscopia óptica (Microscopio Olympus BX41,GIC) y microscopia de epifluorescencia (Microscopio Nikon Eclipse E400, utilizando el filtro UV2A' CINTROP), siguiendo el protocolo de la Figura 16.



Figura 16. Protocolo para pruebas de microscopía.

Se observaron los cambios morfológicos del recubrimiento de PLGA modificado y osteoblastos luego del procedimiento experimental bioelectroquímico, por medio de la técnica de caracterización SEM (espectroscopía electrónica de barrido). Las

muestras biológicas son por lo general, tejidos blandos que poseen un alto contenido de agua y son muy sensibles a los cambios de presión. Debido a esto, la preparación de las muestras en el caso de sistemas biológicos requiere una serie de pasos especiales como los realizados en el siguiente protocolo:

:

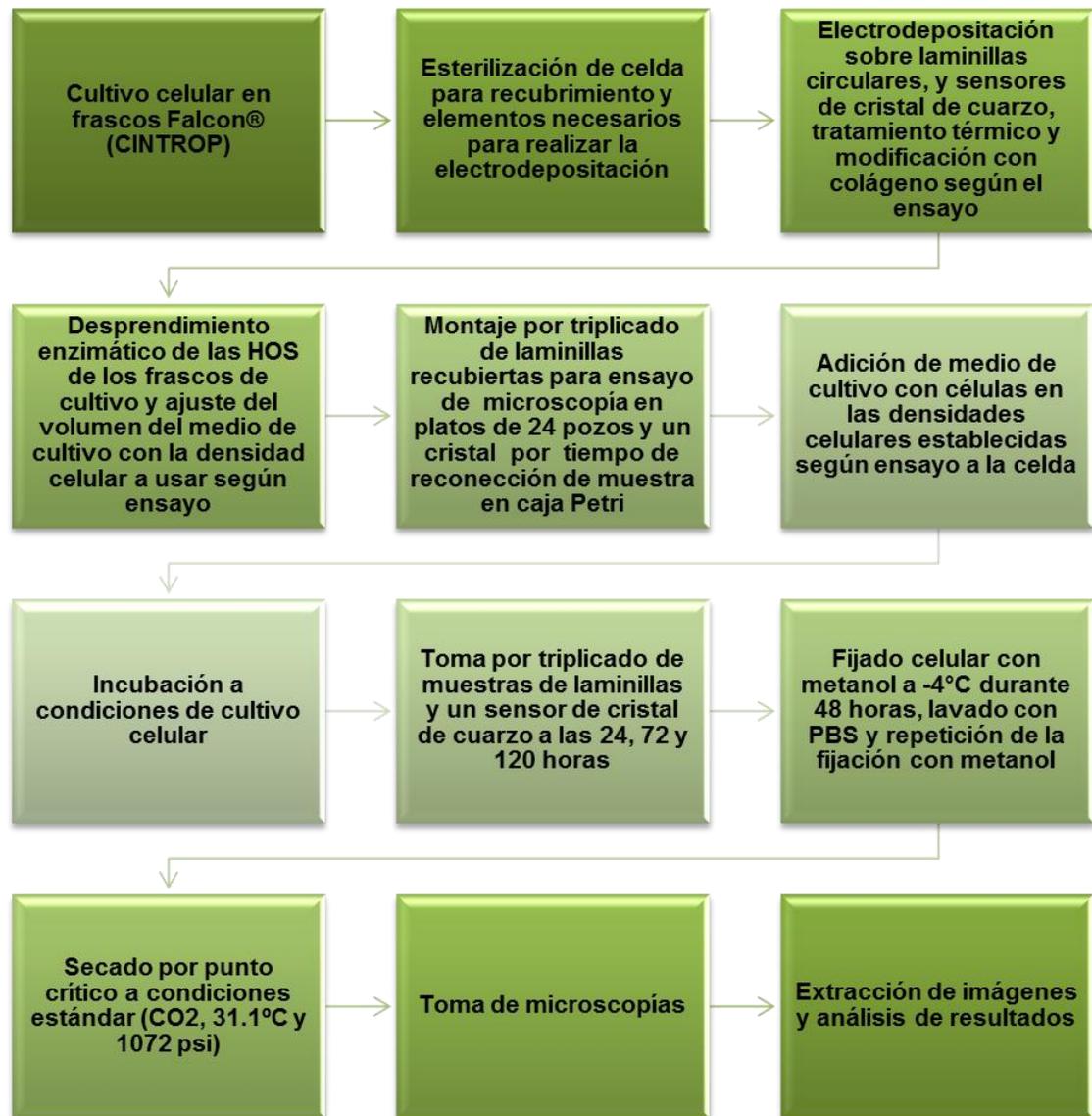


Figura 17. Protocolo para pruebas de microscopía de barrido electrónico SEM

5.10 DISCUSIÓN GENERAL, ANÁLISIS DE RESULTADOS, PUBLICACIÓN Y SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS

A partir del análisis de las diferencias en las propiedades viscoelásticas obtenidas de los cambios de frecuencia y resistencia (Δf y ΔR) de resonancia de la microbalanza de cristal de cuarzo QCM200, se obtuvieron las impedancias de las películas con y sin osteoblastos.

Se pretende realizar la divulgación de los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación a la comunidad científica nacional e internacional así como a las industrias interesadas y la comunidad académica mediante la publicación en revistas nacionales e internacionales. Es importante dar a conocer estos resultados a nivel nacional, debido a que la técnica de *Microbalanza de cristal de cuarzo* no es muy conocida en el país y abre nuevos campos de investigación en el área de biomateriales. Finalmente, se realizará la sustentación de los resultados finales del presenta trabajo de investigación ante la comunidad universitaria y la entrega del informe final.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

En la caracterización de los diferentes materiales, se pudo evidenciar que, los materiales sintetizados en el laboratorio y los usados, en el caso del colágeno comercial, corresponden con las características químicas requeridas.

6.1.1 Caracterización de ácido poliláctico PLA

En la Figura 18 se presenta el espectro FTIR que muestra el porcentaje de transmitancia vs longitud de onda del PLA sintetizado en laboratorio. Este espectro se comparó con el espectro encontrado en la literatura y se presentó similitud de los picos de absorción.

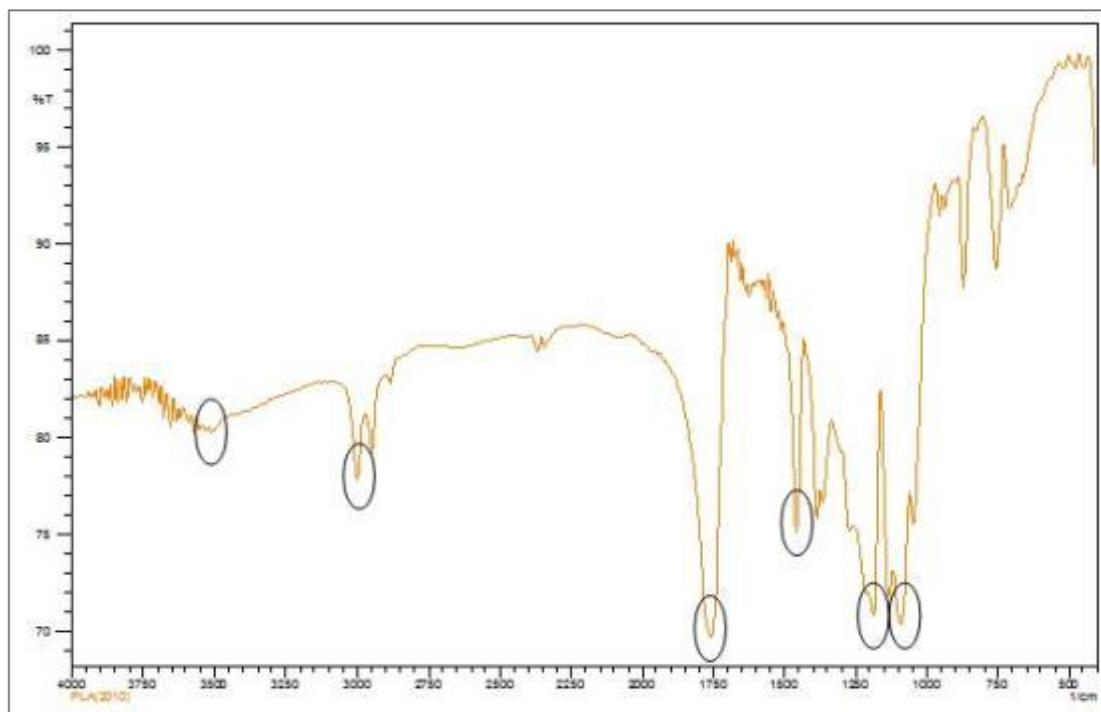


Figura 18. Espectro FTIR de ácido poliláctico

Se observa un pico característico en una banda ancha en la región de 3510 cm^{-1} , el cual está asociado a la vibración de alargamiento de un grupo -OH , un pico a

3000 cm^{-1} es debido a la vibración de alargamiento para un grupo C-H, característico de los alcanos. La señal del grupo carbonilo se encuentra bien definida (C=O), lo cual es característico del ácido poliláctico [76]. En la zona de 1300 a 1000 cm^{-1} , aparecen varias bandas, una más fuerte que las otras, asociada a la banda de estiramiento del grupo C-O. En la Tabla 9 se observan los picos que representan los diferentes grupos funcionales presentes en la estructura del ácido poliláctico obtenido y referenciado.

Tabla 9. Grupos funcionales del ácido poliláctico obtenido y referenciado.

Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm^{-1})	3510	3000	1756	1450	1190	1086
Señal (cm^{-1}) [76]	3508.2	2988.9	1738.2	1448.7	~1200	1080.7

Se evidencia la similitud de las bandas y los grupos funcionales presentes, lo que confirma que el polímero sintetizado en el laboratorio es similar al ácido poli (L-láctico) referenciado.

6.1.2 Caracterización del ácido poliglicólico.

El espectro IR para el ácido poliglicólico sintetizado, muestra bandas características principalmente debido a las bandas de los grupos funcionales metilo y carboxílico. Según Pandey y sus colaboradores [77], para el PGA, las bandas típicas se encuentran alrededor de 2960 cm^{-1} (-CH), 1430 cm^{-1} (-CH₃), 1102 cm^{-1} (-C-O). Una señal de banda fuerte alrededor de 1727 cm^{-1} es característica del grupo [C=O]. Los grupos funcionales de las bandas que comprenden la región entre 1000-800 cm^{-1} , se deben posiblemente a mezclas de modos vibracionales de unidades repetitivas [-C-C-]_n y C-H. Se confirma de esta forma que el polímero cumple las características químicas requeridas.

En la Figura 19 se presenta el espectro FTIR que muestra la absorción del PGA sintetizado en laboratorio. En la Tabla 10 se muestran las bandas que representan los grupos funcionales del PGA sintetizado y de la literatura.

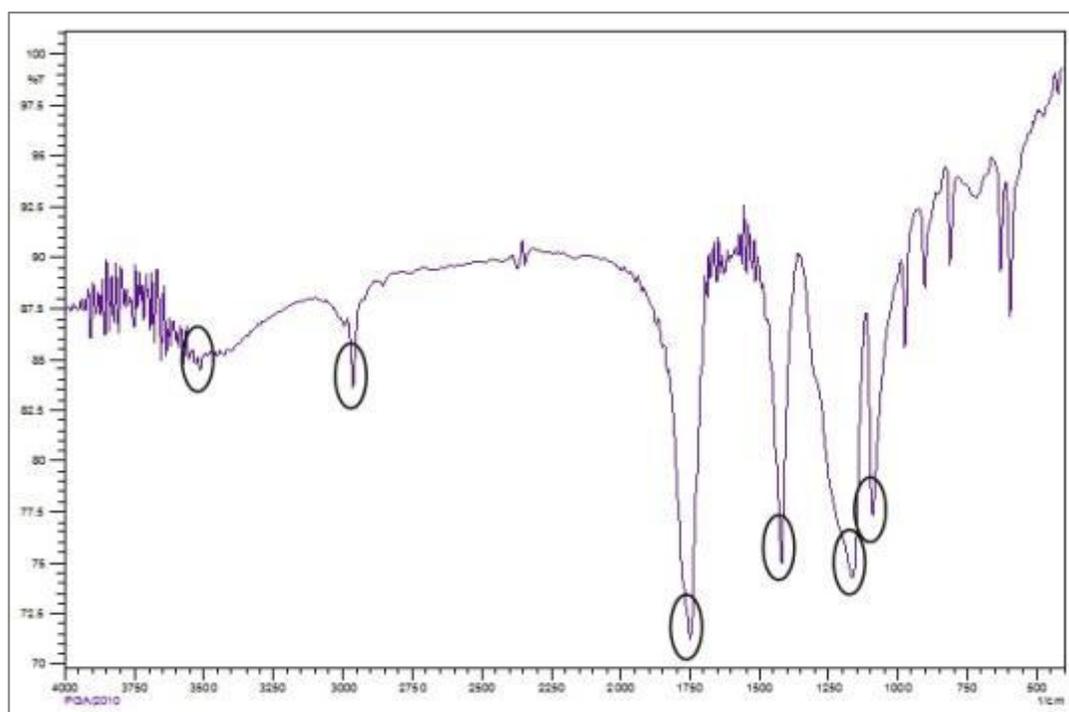


Figura 19. Espectro FTIR ácido poliglicólico

Tabla 10. Grupos Funcionales del ácido poliglicólico obtenido y referenciado.

Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm ⁻¹)	3500	2950	1750	1425	1160	1090
Señal (cm ⁻¹) [41]	3500	2850-3000	1727-1750	1430	1200	1102

6.1.3 Caracterización del PLGA

Según los autores Martel et al., [78] una banda entre 2851-3000 cm⁻¹, corresponde al enlace C-H, otra banda con alta intensidad, está localizada a 1756, que corresponde al doble enlace C=O. Las bandas a 1448 cm⁻¹, 1415 cm⁻¹ y 1376 cm⁻¹ son atribuidas a vibraciones del grupo CH₃. Las dos primeras corresponden al CH₃ asimétrico, y la última corresponde al CH₃ simétrico del copolímero PLGA, lo cual concuerda con las bandas encontradas para la mezcla PLA-PGA.

En la Tabla 11 se muestra el espectro IR realizado a la mezcla polimérica generada en la presente investigación de PLGA (70%-30%) y un espectro del mismo copolímero reportado en la literatura [78].

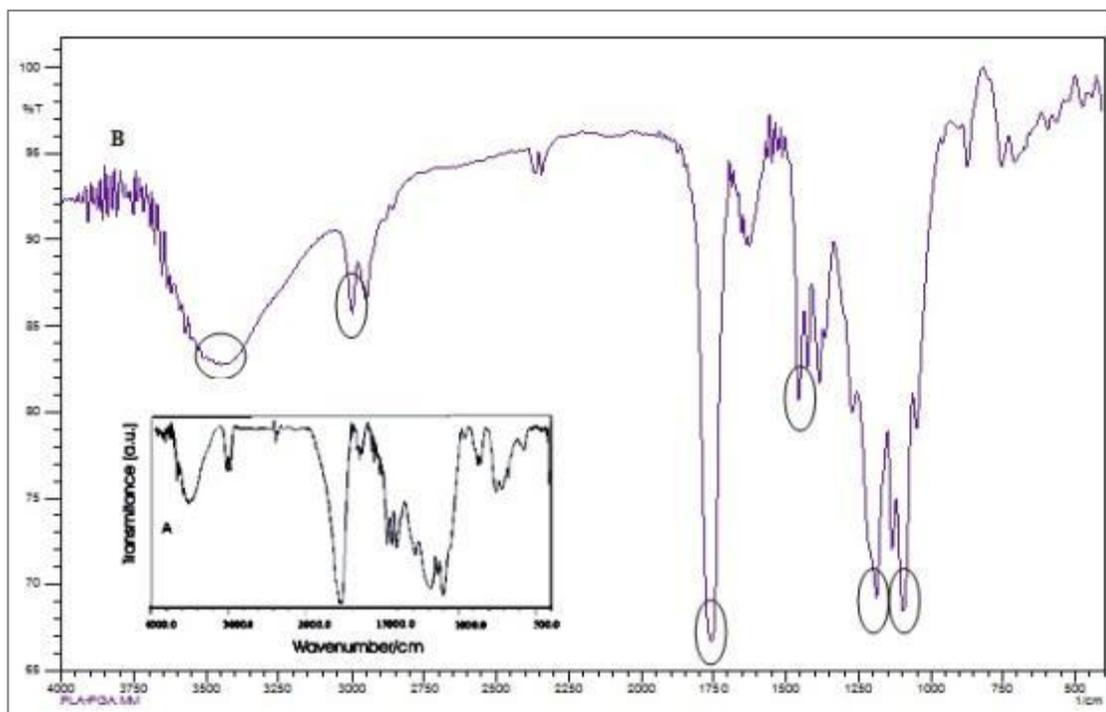


Figura 20. Espectro FTIR. A) PLGA referenciado y B) PLGA obtenido

El espectro FTIR del material PLGA presentó las siguientes bandas mostradas en la Tabla 11, en donde se comparan las bandas correspondientes a los grupos funcionales encontrados para el copolímero PLGA.

Tabla 11. Grupos funcionales del PLGA obtenido y PLGA referenciado.

Grupo	O-H	C-H	C=O	CH ₃	C-C	C-O
Señal (cm ⁻¹)	3400-3500	3000	1750	1380-1452	1190	1086
Señal (cm ⁻¹)[78]	3200-3500	2850-3000	1700-1800	1376-1448	-	1050-1250

Adicionalmente la mezcla del ácido poliláctico y poliglicólico sintetizados, muestra una amplia similitud al copolímero PLGA de Sigma Chemical CO⁹ (Poly (DL-lactide-co-glycolide), lactide:glycolide (65:35), peso molecular 40000-75000 g/mol), reportado por Mainardes et al., [78]. En la Figura 21 se muestran los espectros superpuestos de PLA, PGA y PLGA en donde se observa que no hubo cambios de los grupos funcionales que caracterizan los polímeros.

⁹www.sigmaaldrich.com

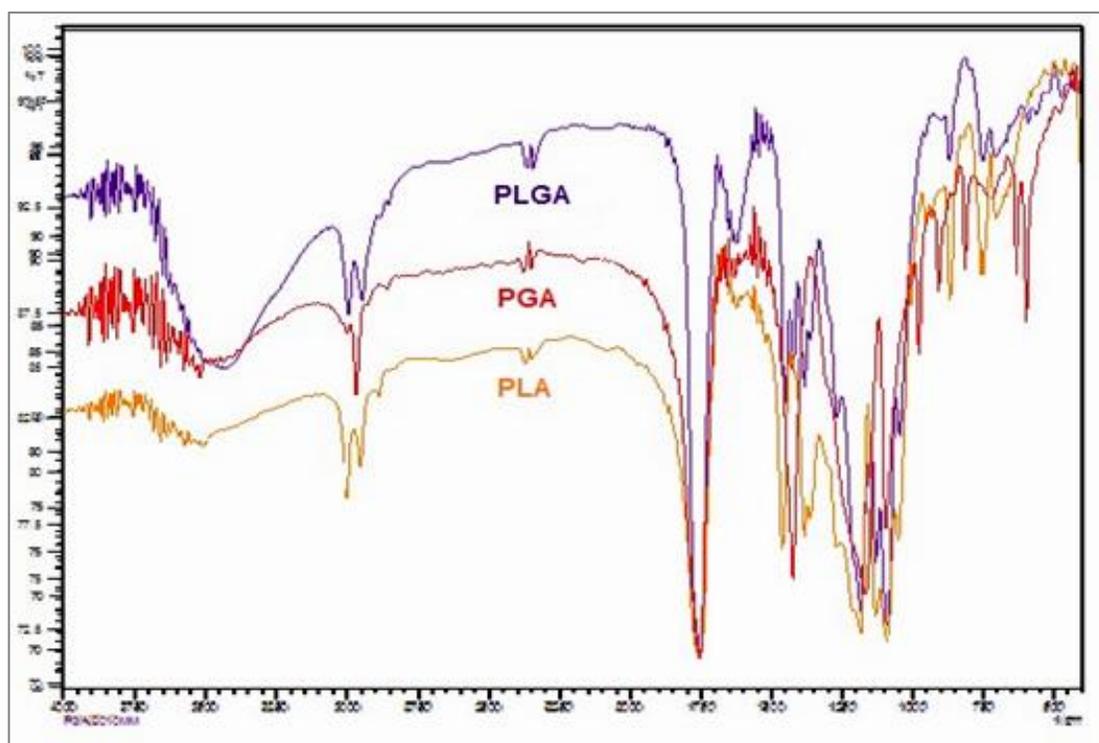


Figura 21. Espectros FTIR comparativos de los polímeros obtenidos.

Fuente: El autor (Escuela de Ingeniería Química-UIS).

6.1.4 Caracterización del colágeno comercial

En la Figura 22 se muestra el espectro FTIR del colágeno comercial usado para los recubrimientos, en donde se observan las bandas de absorción de los grupos funcionales amida I (RCONH_2) a 1637 cm^{-1} , carbonilo a 1655 cm^{-1} . También muestra una banda ancha en la zona de 3404 cm^{-1} a 3547 cm^{-1} , que se atribuye a las bandas de alargamiento del grupo amina ($-\text{NH}_2$) primaria y secundaria, reportadas dentro de la zona de 3300 a 3500 cm^{-1} , y una banda a 700 cm^{-1} atribuida a la banda de flexión del grupo amina.

De acuerdo a Vidal y Mello [79], la banda de amida I resulta de la vibración de estiramiento del grupo carbonilo del péptido o polipéptido, y muestra tres componentes, a 1633 cm^{-1} , 1643 cm^{-1} y 1660 cm^{-1} , en donde el componente 1660 es el más intenso. El pico de amida I puede estar separado dentro de tres

componentes 1651 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} y el más intenso 1632 cm^{-1} . El pico de amida II se encuentra aproximadamente a $\sim 1560\text{ cm}^{-1}$ y la vibración C-N de tensión de amida II está a $\sim 1245\text{ cm}^{-1}$, que en la Figura 22 se encuentra a 1542 cm^{-1} y 1244 cm^{-1} respectivamente.

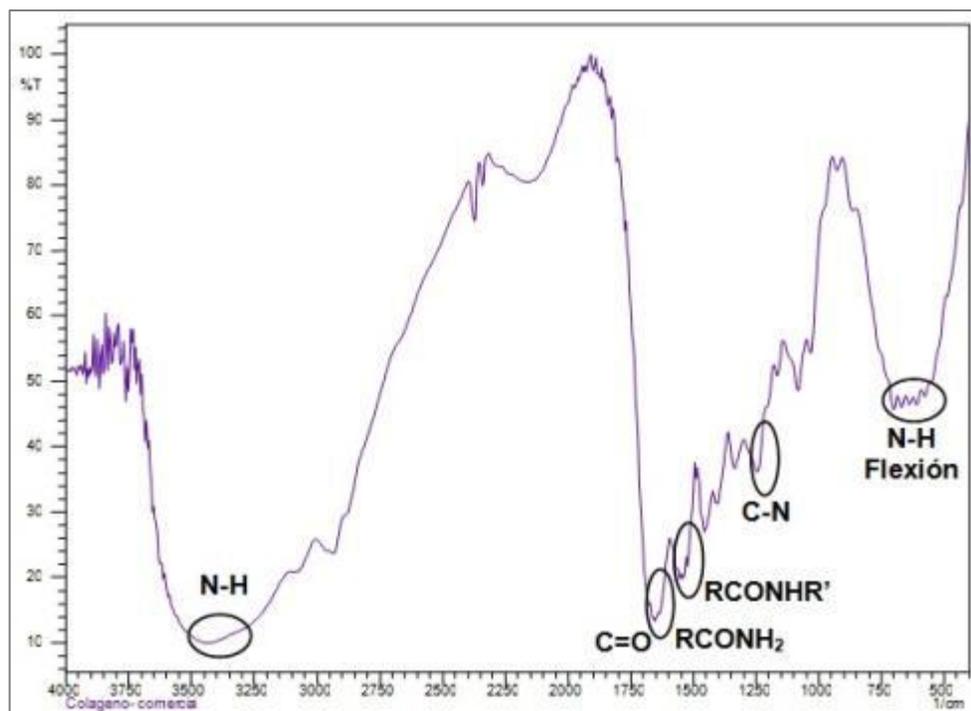


Figura 22. Espectro FTIR experimental del colágeno comercial

Fuente: El autor (Escuela de Ingeniería Química-UIS).

Con respecto a lo anterior, para el colágeno comercial, se encontraron similitudes en las bandas de los grupos funcionales reportados para el colágeno tipo I, lo cual hace que el colágeno comercial cumpla con las características requeridas.

6.1.5 Caracterización de la hidroxiapatita (HA)

En la Figura 23 se muestra el diagrama de difracción de rayos X (DRX) para la HA sintetizada. El análisis cualitativo de las fases presentes en la muestra se realizó mediante comparación del perfil observado con los perfiles de difracción reportados en la base de datos PDF-2 del *International Centre for Diffraction Data* (ICDD).

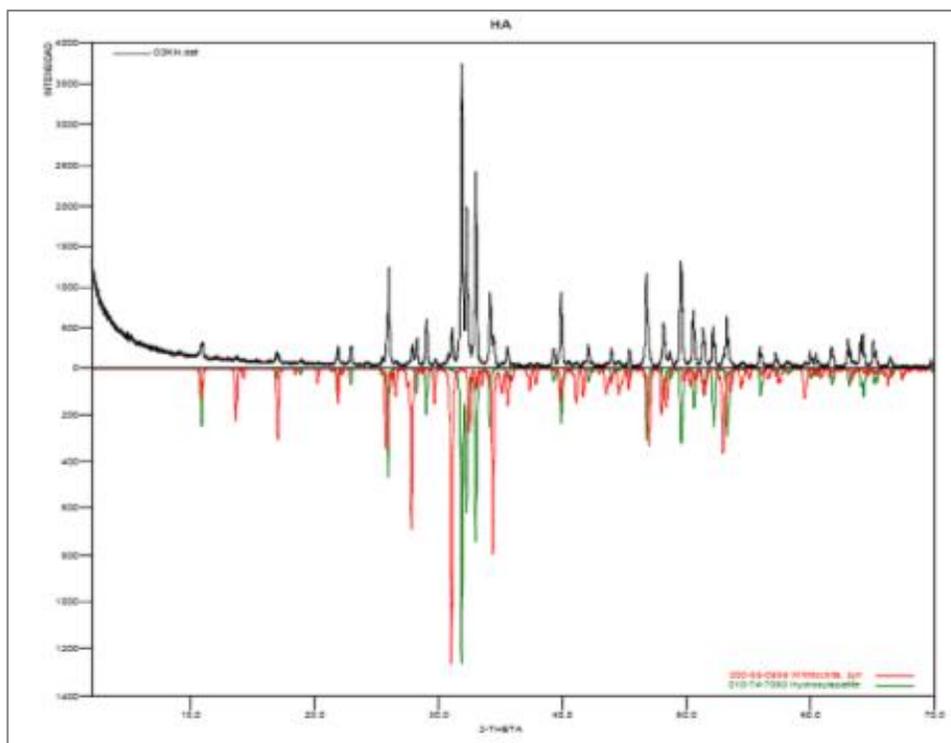


Figura 23. Diagrama de difracción de rayos X de la hidroxiapatita obtenida

La caracterización de la HA por difracción de rayos X mostró la presencia de fases cristalinas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (whitlockita). Este último se presentó en menor proporción, reportándose como un precursor de la HA [45]. En la Tabla 12 se muestra las fases encontradas en la HA, correspondientes al análisis cuantitativo por DRX en la que no se presentaron fases amorfas.

Tabla 12. Fases de la hidroxiapatita sintetizada.

FASE	No. TARJETA PDF-2	NOMBRE	CUANTITATIVO	
CRISTALINOS	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)	010-74-7080	Hidroxiapatita	84,9% (D.E. 0,5)
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	000-55-0898	Whitlockita	15,1% (D.E. 0,4)

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS: MICROSCOPIA ÓPTICA

En las Figura 24, se observan las superficies de los recubrimientos de PLGA+HA.

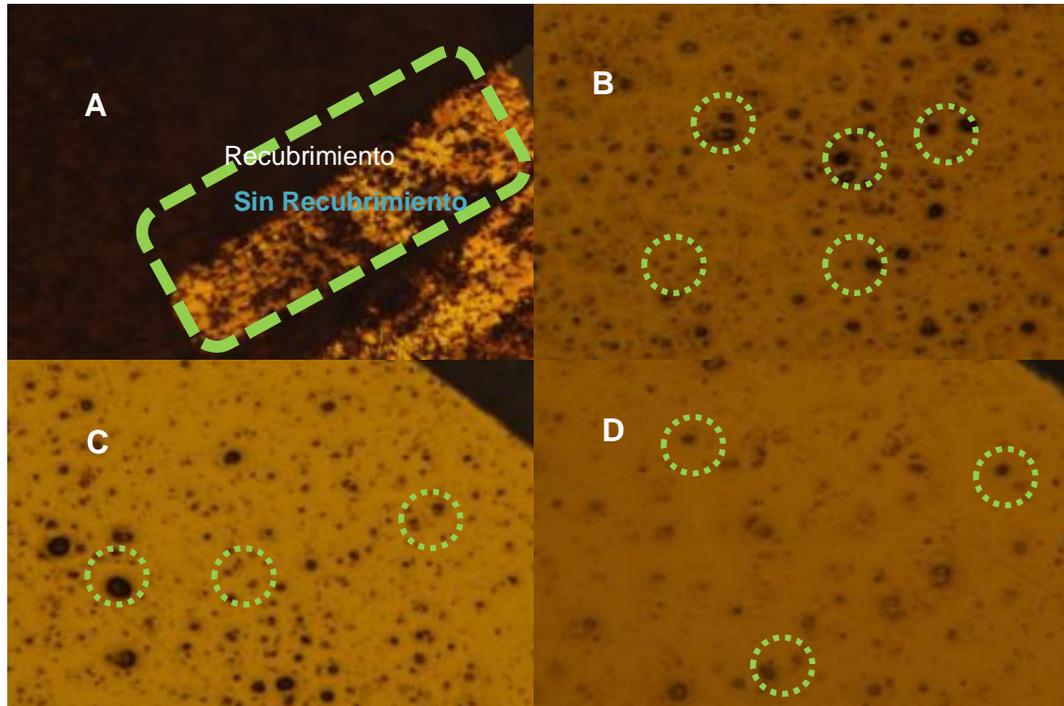


Figura 24. Microscopía óptica del recubrimiento PLGA-HA. A. sin tratamiento térmico (10X), B. cinco minutos de tratamiento térmico (10X), C. diez minutos de tratamiento térmico (10X) y D. diez minutos de tratamiento térmico (20X)

En las microscopías de la Figura 24 se observa que el tratamiento térmico mejora la apariencia superficial del recubrimiento, mejorando sus propiedades ópticas al disminuir la cantidad de solvente que pudiese quedar presente de la solución base para hacer el recubrimiento. En estas microscopías se observa la presencia de cristales opacos de hidroxapatita incorporados al recubrimiento de tamaño muy pequeño distribuidos en todo el recubrimiento, característica deseable en una matriz ósea, las aglomeraciones observadas son debidas al proceso de maceración manual de hidroxapatita.

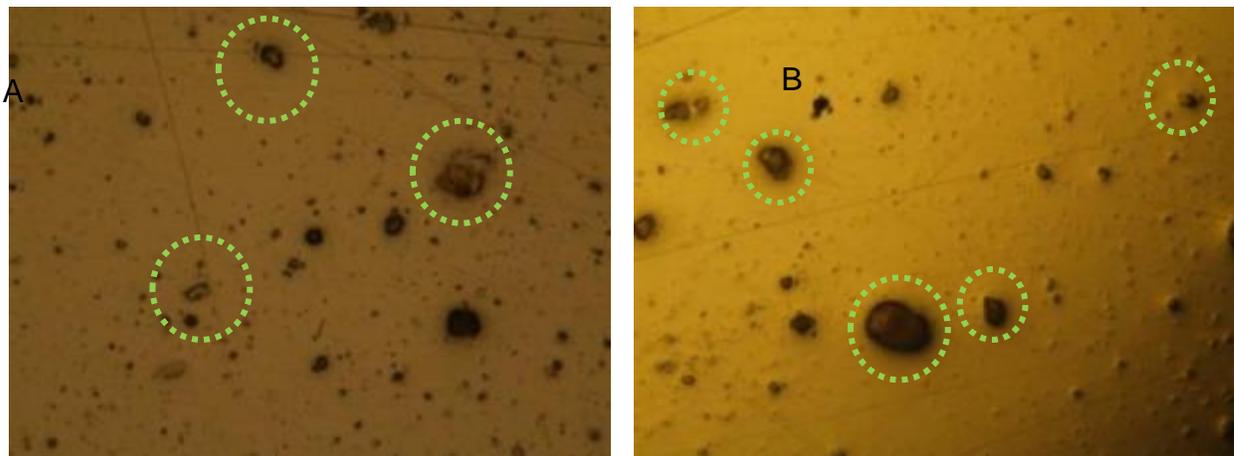


Figura 25. Microscopía óptica del recubrimiento A. PLA-PGA/HAp/Col(0.05%) 20X y B. PLA-PGA/HAp/Q(3%)/Col(0.05%) 20X.

En las microscopías de la Figura 25 se puede observar partículas de diferentes tamaños correspondientes a los componentes de cada recubrimiento. Las partículas de menor tamaño corresponden a la HA pulverizada. Las partículas de mayor tamaño y de apariencia voluminosa corresponden al colágeno comercial agregado al recubrimiento, algunas pequeñas fibrillas que se encuentran presentes corresponden al colágeno tipo I agregado a la solución.

La diferencia entre las microscopías A y B es la regularidad de la superficie, en la microscopía B es debida a la presencia del quitosano, este compuesto se electrodeposita sobre los cristales de HA, formando de esta forma una matriz vinculante de los componentes cerámicos, de esta forma también se suaviza la topografía de contacto celular, modificando la microestructura superficial disponible para la adhesión celular, este comportamiento de los recubrimientos que contienen quitosano es frecuentemente observado [46].

6.3 ESTIMACIÓN DE LAS PROPIEDADES VISCOELÁSTICAS EN LOS RECUBRIMIENTOS EN EL MEDIO DE CULTIVO

Con las mediciones realizadas de cambio de frecuencia de la QCM se calcularon los cambios de inductancia en cada instante, usando la Eq. 15, de esta forma se obtuvo el término imaginario de la impedancia. La parte real se adquirió directamente de los datos de cambio de resistencia de la QCM. Con estos datos se evaluó el módulo de la impedancia y ángulo de fase entre la parte real e imaginaria, también llamada tangente de pérdidas útil para determinar la ocurrencia de transición de la movilidad molecular, tales como la temperatura de transición vítrea (Tg) [80] y se graficaron contra el tiempo.

$$Z_f = \sqrt{\Delta R_f^2 + j\omega\Delta L_f^2}$$

Eq. 19

$$\alpha = \text{tag}^{-1} \frac{\omega\Delta L_f}{\Delta R_f}$$

Eq. 20

Tabla 13. Resultados obtenidos de la QCM

Recubrimiento	Δf (Hz)	ΔL (H)	ΔR (Ohms)	$\Delta Z $ (Ohms)	α (Rads)
B1: PLGA+HA	9520 ↑	-4,7776E-12 ↓	-2801 ↓	-2801 ↓	4,9817E-07 ↑
B2: PLGA+HA+Col	-27426 ↓	1,8508E-11 ↑	771 ↑	769 ↑	1,5711E-06 ↑
B3: PLGA+HA+Q+Col	-2459618 ↓	1,2344E-09 ↑	1587 ↑	1585 ↑	-9,4594E-06 ↓

De los cambios de frecuencia y resistencia se puede observar, que la modificación con los polímeros naturales (colágeno y quitosano) incrementan la afinidad de la matriz polimérica con los componentes biológicos del medio que durante la medición se adhirieron al recubrimiento, generando una disminución en el cambio de frecuencia y un aumento en el cambio de resistencia, indicando también que la superficie de hace menos rígida y más viscosa. Se encuentra reportado que el colágeno absorbe el agua fácilmente en el ambiente húmedo del cuerpo y se degrada rápidamente. El agua absorbida plastifica colágeno, reduciendo tanto el

módulo de elasticidad y resistencia a la fluencia. La Tabla 14 resume la dependencia del módulo elástico con el contenido de humedad reportado en la referencia [3].

Tabla 14. Cambio del módulo elástico en función de la humedad de las fibras de colágeno[3]

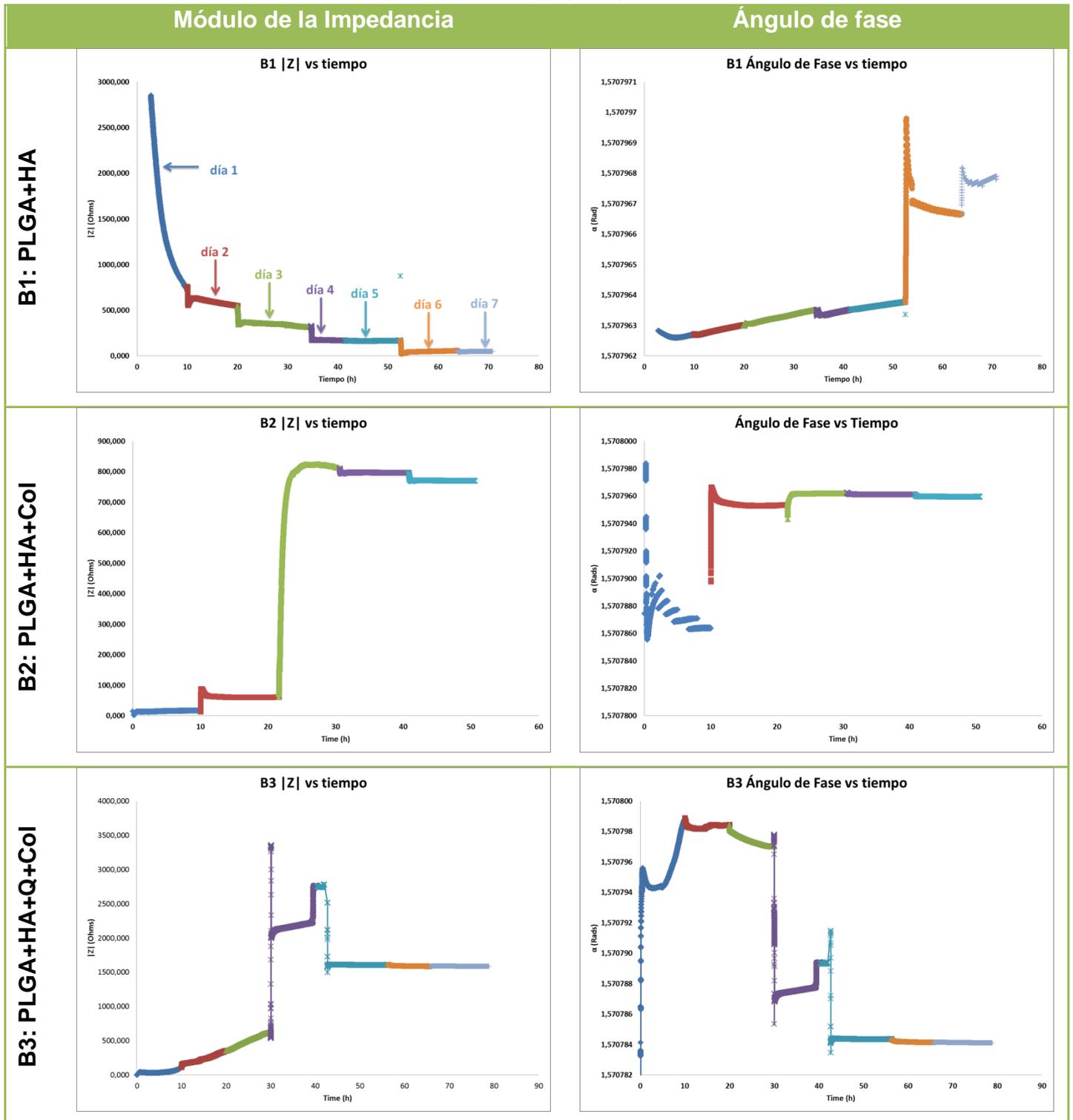
% Humedad	Módulo kpsi
100	44
90	450
75	750
8	970

Por otro lado el quitosano le confiere al recubrimiento parte de la rigidez deseada para la aplicación de osteogénesis, observable en los resultados con la disminución del ángulo de la tangente de pérdidas (α).



Figura 26. Microscopía óptica (20X) de recubrimiento PLGA-HA al quinto día de medición
 Durante las mediciones micrigravimétricas del recubrimiento de PLGA-HA se observa un aumento de la frecuencia y una disminución de la resistencia, asociados a la pérdida de masa en la superficie del sensor, en la Figura 26 se puede observar la presencia de huecos generados por la delaminación del polímero en su proceso natural de degradación hidrolítica, estos cambios generan cambios en las propiedades viscoelásticas causando un aumento en la tangente de pérdidas. La Tabla 15 contiene los espectros de impedancia y del ángulo de fase de la tangente de pérdidas contra el tiempo obtenidos para cada recubrimiento.

Tabla 15. Espectros de impedancia y tangente de pérdidas de los recubrimientos en medio de cultivo



En los espectros del recubrimiento B1:PLGA-HA se observa una disminución progresiva del módulo de la impedancia contra el tiempo y un aumento de la tangente de pérdidas, y presenta un cambio brusco en el día seis (6) de cultivo (después de las cincuenta horas de medición), muy probablemente debido a un desprendimiento del polímero con un tamaño superior al de días anteriores.

Para el espectro del recubrimiento B2:PLGA-HA-Col, el módulo de impedancia aumenta hasta el día tres (3) de cultivo, y el ángulo de fase de la tangente de pérdidas disminuye, mostrando que el colágeno influye en la viscoelasticidad del recubrimiento, aumentando el módulo elástico. Sin embargo, después del tercer día el recubrimiento pierde estabilidad mostrando un comportamiento similar al recubrimiento B1, posiblemente asociado al desprendimiento del colágeno por la degradación del PLGA integrante del recubrimiento compuesto.

En el Anexo A, se puede observar los espectros de Δf y ΔR contra el tiempo en donde se presenta una disminución de la resistencia a partir del día tres (3), ésta disminución se puede relacionar con el espesor de la película, es decir, a un menor espesor existirá una menor disipación de energía y por lo tanto una disminución en resistencia del resonador, comprobando de esta forma que la degradación polimérica sucede por delaminación.

El recubrimiento B3:PLGA-HA-Q-Col presenta un aumento paulatino y constante del módulo de la impedancia durante el tiempo de cultivo, y comportamiento inverso del ángulo de la tangente de pérdidas. Este fenómeno se puede interpretar como un aumento de la masa oscilante, debido a las propiedades hidrófilas y a la efectividad que posee el quitosano para favorecer los procesos de adsorción, pero de una forma más ordenada, generando así un aumento en la inductancia y una reducción en la resistencia a la vibración. Es decir, una mayor cantidad de moléculas interactuando con una menor entropía en su oscilación causada por la fuerte interacción entre ellas.

6.4 MONITOREO DEL COMPORTAMIENTO DE LAS HOS SOBRE LOS RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS

6.4.1 Ensayos Microgravimétricos

El más grande avance de los estudios de los procesos biológicos mediante la QCM ha sido el seguimiento de células vivas, en su mayor parte, estos estudios se han centrado en la adhesión celular. Han sido objeto de estudio células endoteliales, como los osteoblastos, las plaquetas humanas, las células MDCK I y II, las células 3T3, las células VERO, y células epiteliales entre muchas otras. Los primeros estudios han demostrado una considerable variabilidad en la frecuencia, pero en general sirven para establecer, que las células unidas a la superficie QCM producen cambios de frecuencia que fueron reversibles tras su retirada y que las células no se comportan como masas elásticas [6],[10][11][18],[28][36] [85]-[90].

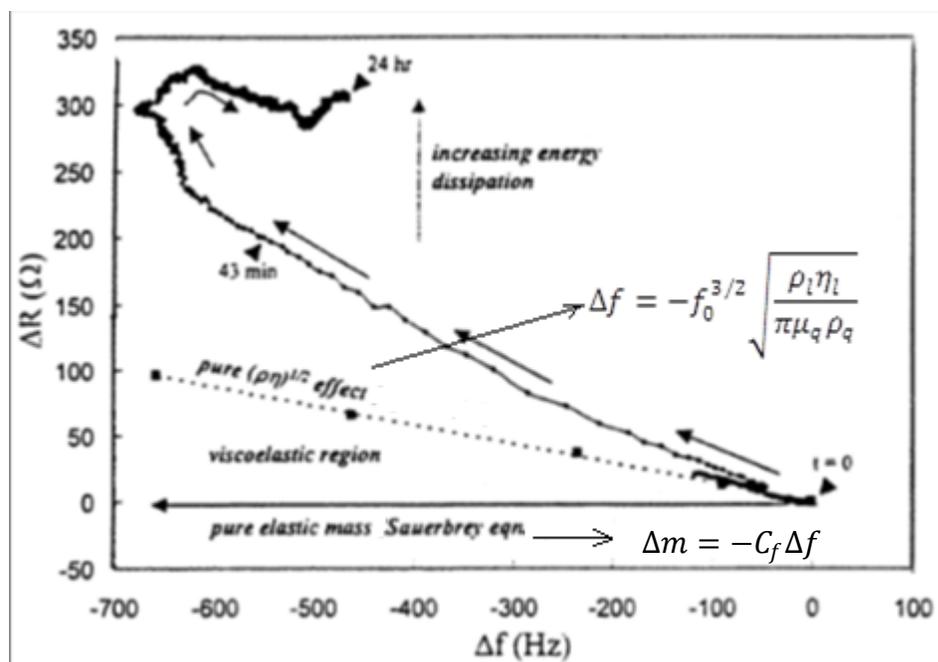


Figura 27. Representación del diagram Δf y ΔR tomado durante el tiempo de adhesión celular de 30000 células en la QCM a tiempo cero[83].

En la Figura 27, se presenta un ejemplo del comportamiento entre la resistencia y la frecuencia de una Biopelícula de celular, comparada contra un líquido newtoniano (que obedece a la ecuación de Kanasawa, Eq. 11) y una película rígida que obedece el comportamiento de Sauerbrey. En donde la biopelícula al

tiempo cero ($t=0$) presenta un comportamiento muy similar al del líquido newtoniano, es decir, que las células tienen propiedades viscoelásticas como el líquido, en donde la energía es disipada linealmente. Este efecto no dura más de 20 minutos y es seguido por una región cada vez más pendiente que lleva a valores ΔR más altos. Por lo tanto, se puede decir que el comportamiento de la tangente de pérdida es función de la morfología celular, la propagación del citoesqueleto, la relación del mismo con el medio externo y la MEC. En la Figura 28 se observa este comportamiento para el recubrimiento de PLGA-HA-Col sobre el cual se cultivaron diez mil células inicialmente.

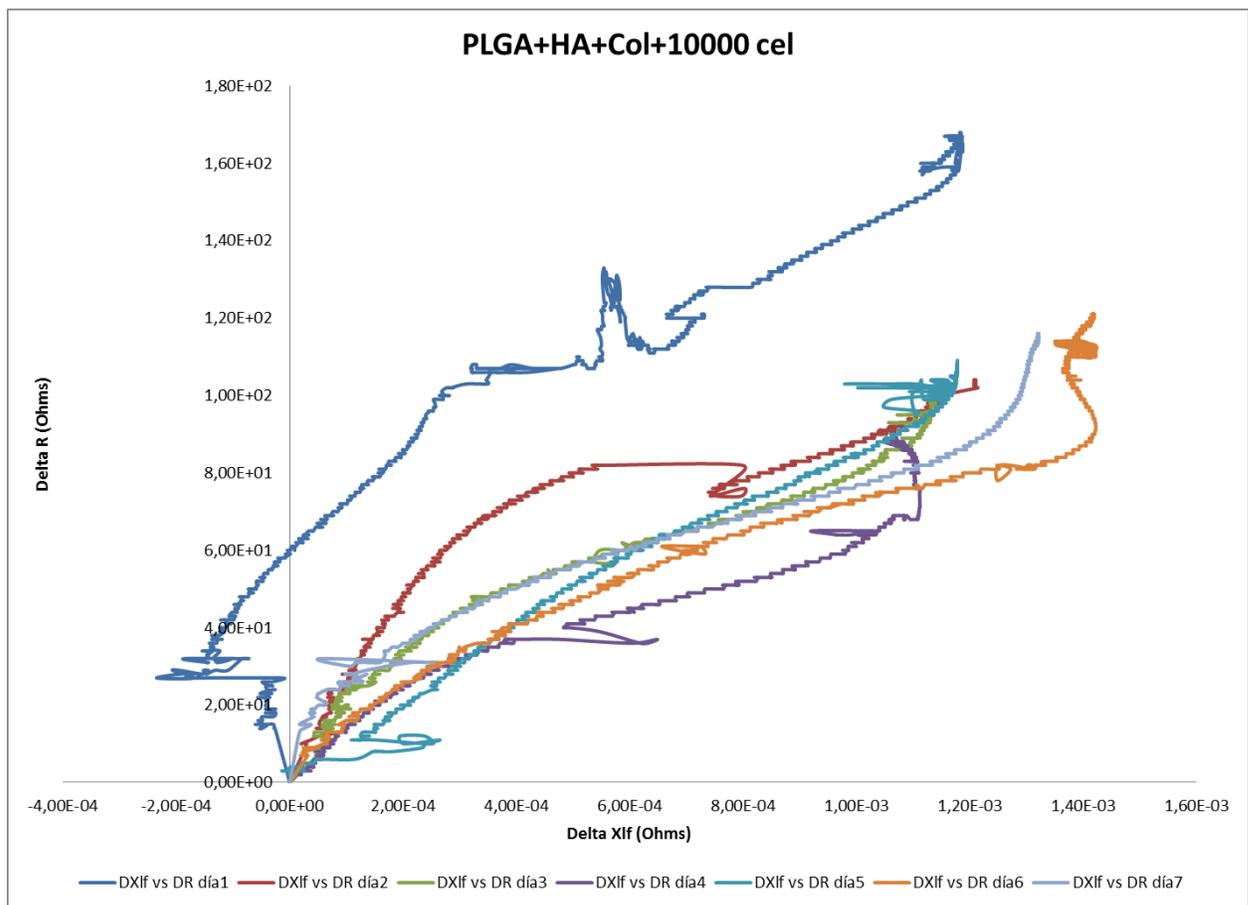


Figura 28. Gráfico del ΔR vs $\Delta X_L = \frac{w\Delta f * (2Lq)}{-f_0}$ para el recubrimiento PLGA-HA-Col+10000celulas

En general en esta investigación se presentó una disminución del Δf y un aumento de ΔR al adicionar células sobre los recubrimientos que no contenían quitosano (ver Anexo A). Este comportamiento es comúnmente esperado y reportado por diferentes autores, ya que la viscosidad superficial aumenta en presencia de células [81],[85]-[90]. Sin embargo, empezando la fase de sedimentación, adhesión y esparcimiento el cambio de Δf disminuye o se estabiliza, mientras que la resistencia continua aumentando. Cambios fuertes se pueden observar al cambio de día de medición, es decir, cuando el monitoreo es reiniciarlo se observan cambios significativos.

Al final de cada día de monitoreo las mediciones de la QCM Δf y ΔR se presentaron fluctuaciones periódicas de bajas amplitudes. Estas fluctuaciones no están asociadas a perturbaciones instrumentales, debido a que se observaron los mismos cambios al apagarse la incubadora. Por lo tanto se propone que los cambios locales observados están vinculados a la migración celular y a las diferentes actividades metabólicas de los HOS [81]-[88].

También se asocia la fluctuación de las mediciones de la QCM con la división celular, que ocurre en contacto con la superficie del recubrimiento. Es decir, que son atribuidas a las uniones y separaciones de los nódulos de adhesión celular que suceden en la superficie. Dicha división celular se puede comprobar observando el cubrimiento celular presentado día a día de medición en las microscopías óptica y de epifluorescencia. [81]-[88]

La Tabla 16 resume los resultados obtenidos de la QCM para el monitoreo celular sobre los diferentes recubrimientos, en donde se puede observar la tendencia de los recubrimientos que no contienen quitosano a disipar gran cantidad de energía durante la medición, es decir, que el recubrimiento se está haciendo más suave o viscoelástico con el tiempo. Este fenómeno se encuentra relacionado con el proceso natural de degradación polimérica, observado durante el monitoreo de los

recubrimientos sin células, en donde el valor de la tangente de pérdidas posee valores inferiores, pero con la misma tendencia al aumento para los recubrimientos sin quitosano y disminución para los recubrimientos con quitosano. El aumento de los valores de la tangente de pérdida es debido a la presencia celular.

Tabla 16. Resultados obtenidos de la QCM

Recubrimiento	Δf (H)	ΔL (H)	ΔR (Ohms)	$ Z $ (Ohms)	α (Rads)
P1: PLGA+HA+Q+Col	4815	-2,4164E-12	663	663	-3,1416
30000 cel/ml	↑	↓	↓	↑	↓
P2: PLGA+HA+Q+Col	677545	-3,4002E-10	-538	538	-1,8070E-5
10000 cel/ml	↑	↓	↓	↑	↓
P3: PLGA+HA+Col	-4155912	2,0856E-09	786	786	3,9855E-5
10000 cel/ml	↓	↑	↑	↑	↑
P4: PLGA+HA+Col	-1908736	9,5789E-10	692	692	1,6814E-5
30000 cel/ml	↓	↑	↑	↑	↑
P5: PLGA+HA	-5688154	2,8546E-09	2598	2598	3,8394E-5
30000 cel/ml	↓	↑	↑	↑	↑

Los recubrimientos que contienen quitosano presentan un aumento en el Δf durante toda la medición. Habitualmente el aumento en el Δf está relacionado con la pérdida de material en la superficie del sensor, este análisis no es completamente válido para esta investigación ya que la producción de ALP y las microscopías muestran la presencia, adhesión, proliferación y actividad celular tipo osteoblastico. Por lo tanto este aumento de Δf puede estar relacionado con una interacción directa de los HOS con el quitosano, cambiando la organización estructural del recubrimiento o generando orientación superficial y en consecuencia un cambio significativo en las propiedades viscoelásticas del recubrimiento original, relajando el material y de esta forma aumentando el Δf y disminuyendo el ΔR . [81]

Respuestas positivas de Δf han sido reportadas anteriormente en el uso de la QCM como biosensor celular, como consecuencia de la exocitosis¹⁰ de vesículas después de la estimulación de la membrana celular [84], como respuesta a los cambios de viscosidad del citoplasma mediado por alteraciones en la rigidez del citoesqueleto. En este estudio, el ensayo de microscopía de fluorescencia muestra que los cambios positivos de Δf no pueden ser atribuidos a desprendimiento celular del sensor durante los experimentos[81],[91],[92].

Es importante destacar que los cambios de frecuencia positiva también se han observado cuando la rigidez de las células unidas al cristal de cuarzo aumenta; se ha reportado que el anclaje celular a diferentes superficies se realiza principalmente por terminales integrantes (nódulos de adhesión), que son proteínas transmembranales que están conectadas al citoesqueleto intracelular, compuesto por fibrillas de actina (existentes a través del plasma membranal), que se deslocaliza y distribuye las fuerzas mecánicas del cuerpo de toda la celda y por lo tanto proporciona la estabilidad mecánica del contacto célula-sustrato.

Por lo tanto, se genera una disminución de la tangente de pérdidas, es decir, que el sistema que se encuentra sobre el sensor disipa menos energía o es más elástico. La contribución de los filamentos intermedios del citoesqueleto a la rigidez de células es bien conocida [84] y puede verse afectada por vínculos del citoesqueleto con la MEC, que afecta significativamente a los cambios geométricos en la citoesqueleto, en la se esquematiza la interacción citoesqueleto-recubrimiento-sensor [81],[91],[92].

¹⁰ La exocitosis, o secreción celular, es el proceso celular por el cual las vesículas situadas en el citoplasma se fusionan con la membrana citoplasmática y liberan su contenido. Esto sucede cuando llega una señal extracelular; además se puede explicar como el proceso en el cual se expulsa material de desecho de la célula producido por el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y posteriormente empacado en vesículas.

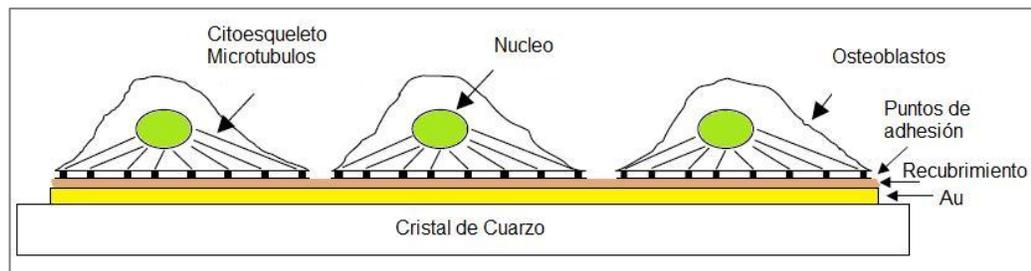
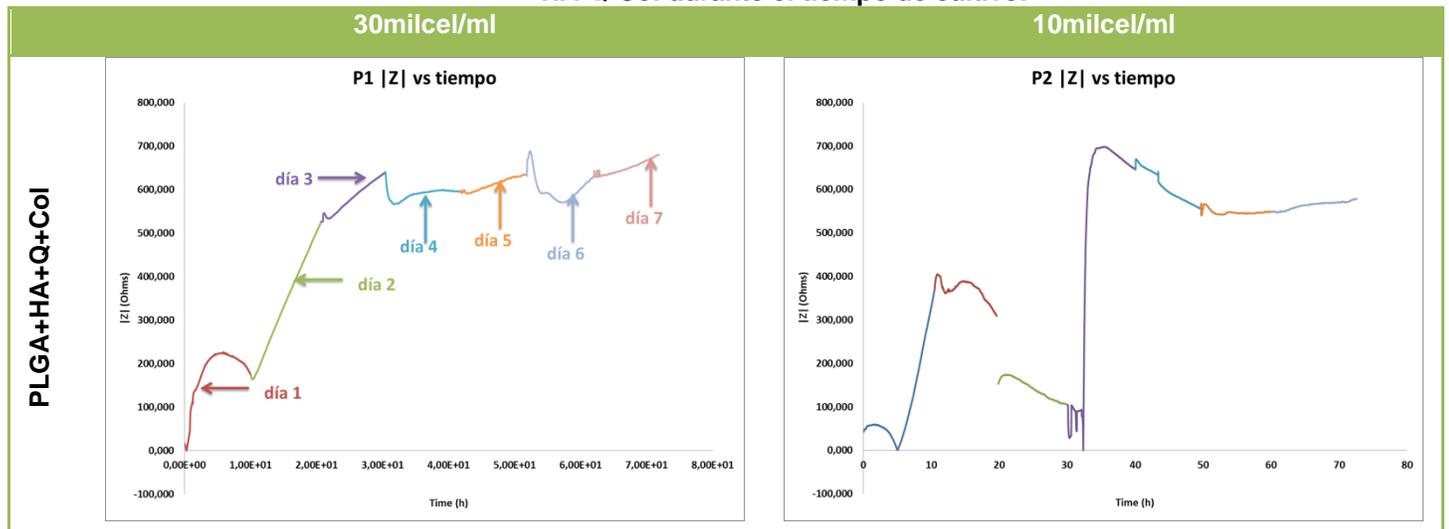


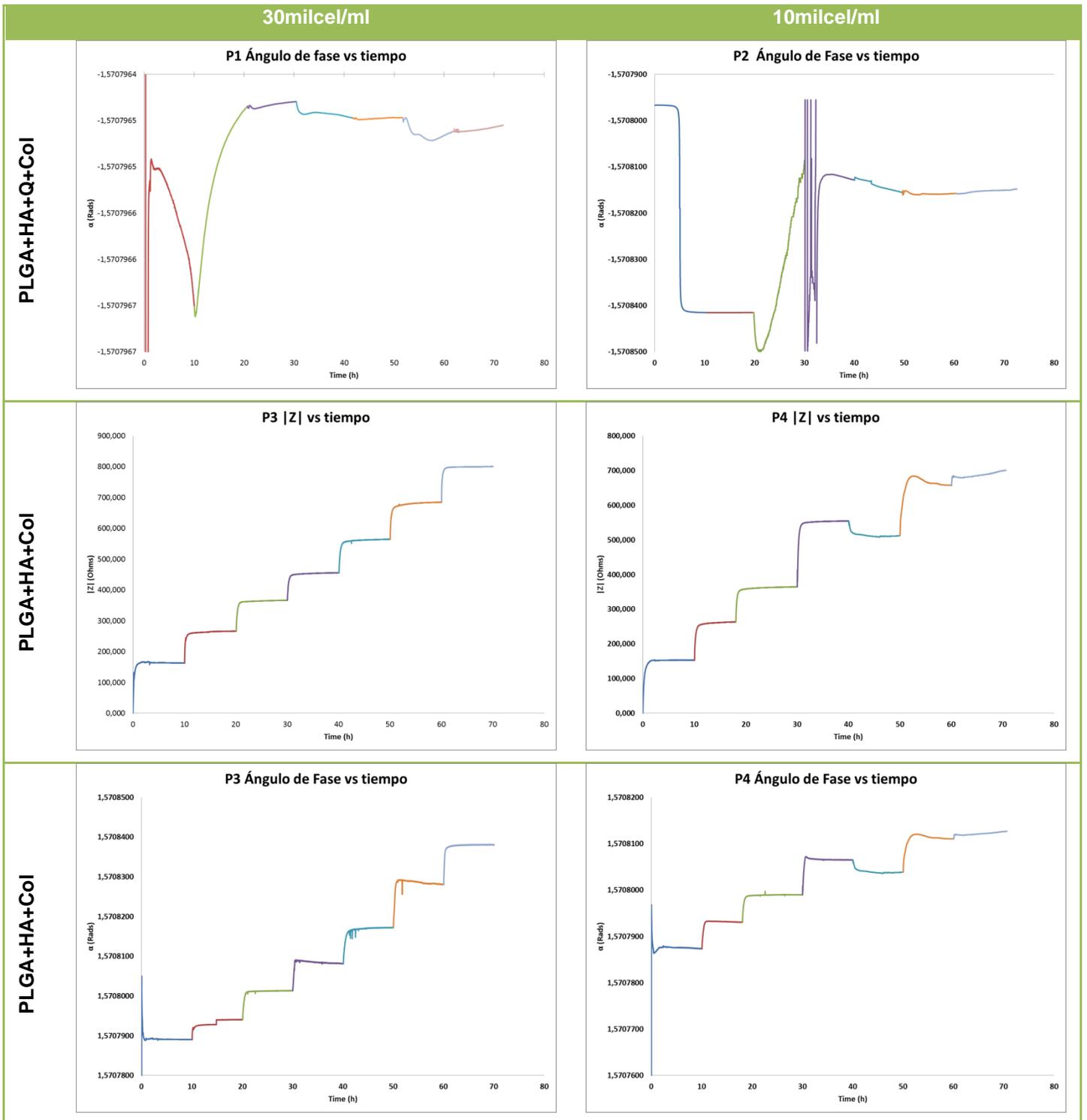
Figura 29. Esquema de adhesión de osteoblastos sobre el sensor.

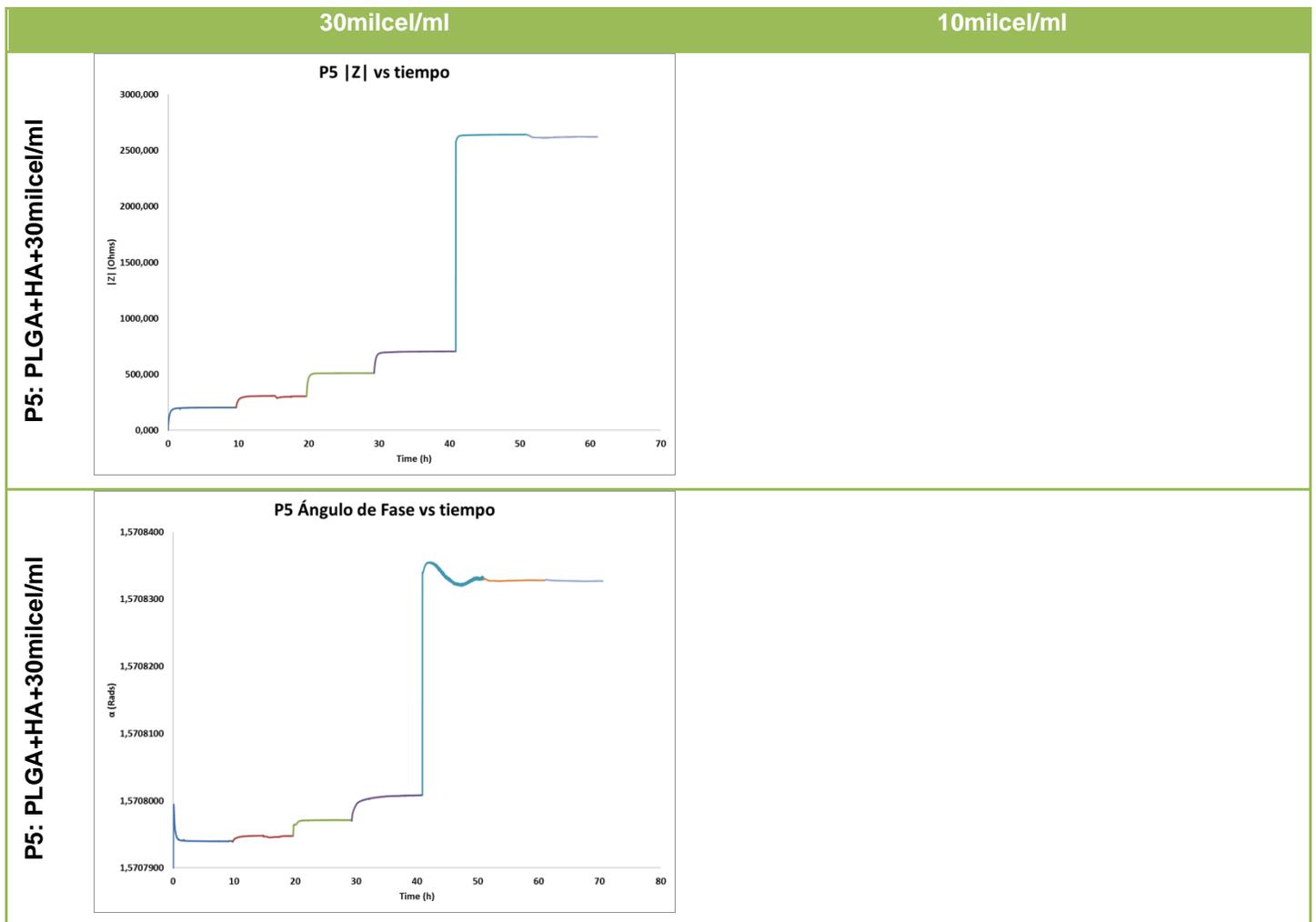
Algunos autores sugieren que una disminución en el Δf para una biopelícula celular es debida a un redondeo celular o una morfología menos extendida, producto de una interacción no deseada con el medio [85]-[90][92].

En la Tabla 17 se presentan los espectros de impedancia para los recubrimientos de PLGA-HA-Q-Col, PLGA-HA-Col y PLGA-HA, sobre los cuales se cultivaron las células HOS, en donde se puede observar un aumento aproximadamente constante del módulo de la impedancia.

Tabla 17. Espectros de impedancia y tangente de pérdidas de los recubrimientos de PLGA-HA-Q-Col durante el tiempo de cultivo.







El aumento de la impedancia se hace más uniforme para el recubrimiento con mayor densidad celular, indicando que la propagación de la onda del sensor está relacionada con la uniformidad de la película en su superficie y su completa topografía. El cambio del módulo de la impedancia está relacionado inversamente con los puntos de adhesión celular, ya que a medida que aumenta los puntos de adhesión celular se produce una menor pérdida de energía oscilante; la Figura 30 muestra que esta relación [81][91].

Al final de cada día de monitoreo las mediciones de la QCM Δf y ΔR se presentaron fluctuaciones periódicas de bajas amplitudes. Estas fluctuaciones no están asociadas a perturbaciones instrumentales, debido a que se observaron los mismos cambios al apagarse la incubadora. Por lo tanto se propone que los

cambios locales observados están vinculados a la migración celular y a las diferentes actividades metabólicas de los HOS [81]-[88].

También se asocia la fluctuación de las mediciones de la QCM con la división celular, que ocurre en contacto con la superficie del recubrimiento. Es decir, que son atribuidas a las uniones y separaciones de los nódulos de adhesión celular que suceden en la superficie. Dicha división celular se puede comprobar observando el cubrimiento celular presentado día a día de medición en las microscopías óptica y de epifluorescencia. [81]-[88]

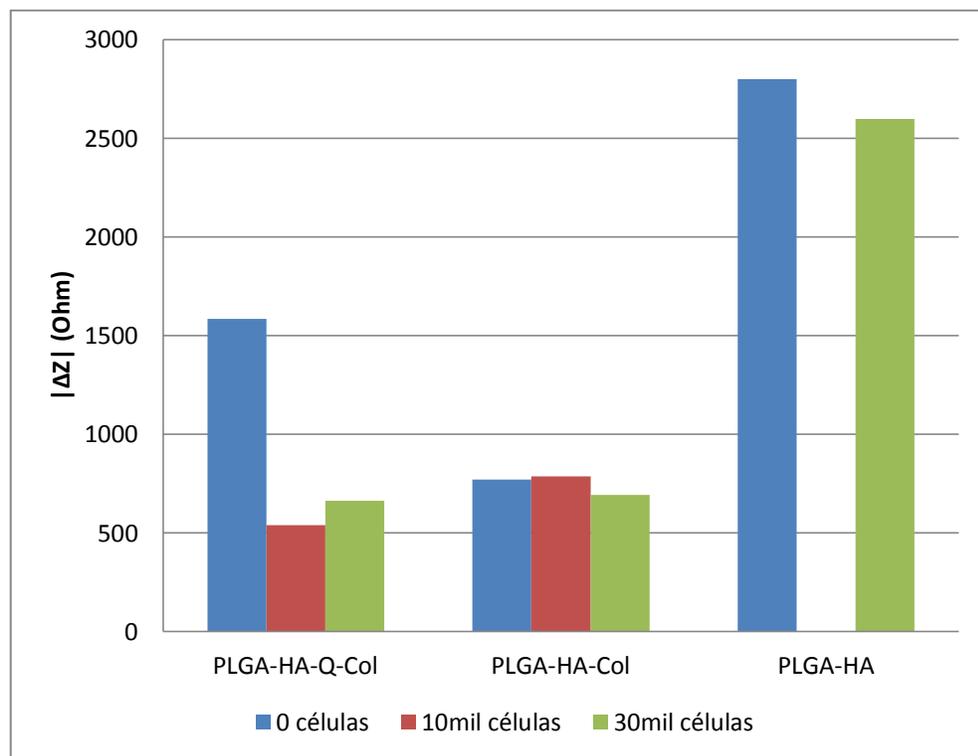


Figura 30. Módulo del cambio de la impedancia para los diferentes recubrimientos sobre los cuales se cultivaron HOS comparado con los recubrimientos sin células

Con propósitos comparativos se puede asumir que el cambio de las propiedades viscoelásticas entre el recubrimiento monitoreado sin células y con células es debido a un fenómeno puramente viscoso, es decir, tomar la biopelícula como un

medio viscoso y usar la ecuación de Kanazawa para relacionar el cambio de viscosidad entre los diferentes recubrimientos monitoreados, mostrando de esta forma el cambio debido a la interacción celular.

$$\frac{\Delta f_{p5}}{\Delta f_{b1}} = \frac{-f_0^{3/2} \frac{\rho_{p5}\eta_{p5}}{\pi\rho_q\eta_q}^{1/2}}{-f_0^{3/2} \frac{\rho_{B1}\eta_{B1}}{\pi\rho_q\eta_q}^{1/2}}$$

Eq. 21

$$\frac{\Delta f_{p5}}{\Delta f_{B1}} = \frac{\rho_{p5}\eta_{p5}^{1/2}}{\rho_{B1}\eta_{B1}^{1/2}}$$

Eq. 22

Los resultados se muestran en la Tabla 18, se puede observar que la presencia celular disminuye los efectos viscosos del recubrimiento de PLGA-HA-Q-Col ya que forman una capa continua y rígida sobre la película polimérica compuesta. Por otro lado esto no sucede para los recubrimientos que no contienen quitosano ya que en estos los efectos viscosos aumentaron en órdenes superiores a las 10 veces el valor inicial.

Tabla 18. Comparación de las propiedades viscoelásticas de los recubrimientos generadas por la presencia celular

Recubrimiento	$\frac{\Delta f_P}{\Delta f_B}$
PLGA-HA-Q-Col+30mil células	0,00196
PLGA-HA-Q-Col+10mil células	0,2755
PLGA-HA-Col+30mil células	69,5959
PLGA-HA-Col+10mil células	151,5318
PLGA-HA+30mil células	597,4952

6.4.2 Ensayos Bioquímicos

Existen dos importantes características de los osteoblastos que juegan un papel importante en la formación de hueso, la adhesión celular y la producción de

fosfatasa alcalina, es por esto que se determinó la producción de fosfatasa alcalina tanto en los sobrenadantes como en los lisados celulares en diferentes tiempos de incubación de las células sobre los recubiertos. La presencia de esta enzima manifiesta que las células HOS presentaron un comportamiento osteoblastico.

Se llevaron a cabo dos ensayos previos en los cuales después de 1 y 2 horas de incubación de las muestras con el sustrato no se evidenció ninguna formación de color en los pozos, mientras que los controles positivos utilizados (datos no mostrados) si presentaban formación de color. Se decidió aumentar el tiempo de incubación a 6 horas para aumentar la sensibilidad de la prueba.

La Figura 31 presenta los valores de absorbancia de ALP para los recubrimientos modificados con polímeros naturales sobre los cuales se sembraron diez mil células. En donde se puede observar un leve aumento de la producción de ALP en el polímero que contiene quitosano con el tiempo, a diferencia del polímero que contienen quitosano, en el cual los valores son aproximadamente constantes.

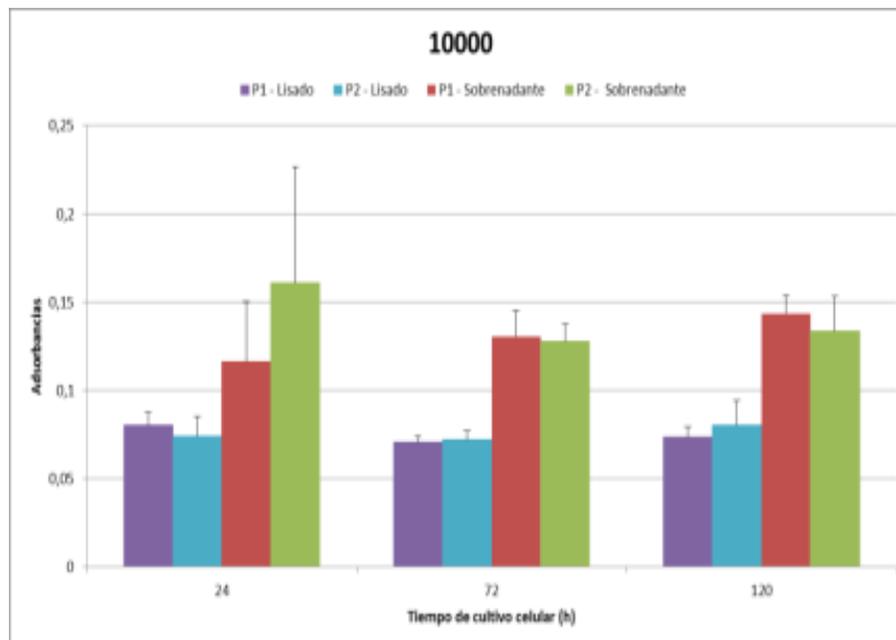


Figura 31. Producción de fosfatasa alcalina para P1 (PLGA+HA+Col+Q) y P2 (PLGA+HA+Col) usando una densidad celular de 10000 cel/

La Figura 32 presenta los valores de absorbancia de ALP para los recubrimientos sobre los cuales se sembraron treinta mil células. Este ensayo muestra un aumento paulatino de la producción de ALP con el tiempo para todos los recubrimientos.

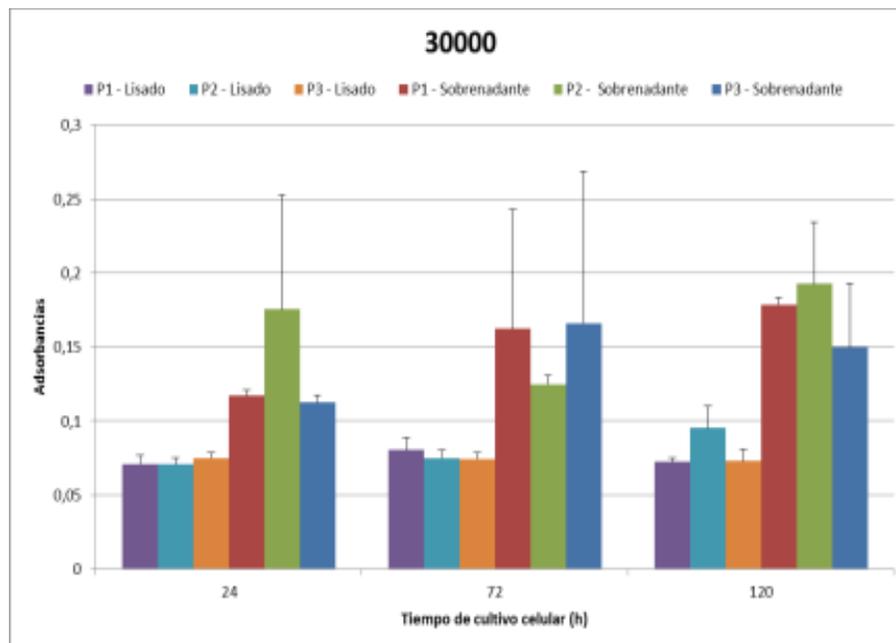


Figura 32. Producción de fosfatasa alcalina para P1 (PLGA+HA+Col+Q) P2 (PLGA+HA+Col) y P3 (PLGA+HA) usando una densidad celular de 30000 cel

Se evidenció la presencia de concentraciones de fosfatasa alcalina mayores en los sobrenadantes que en sus respectivos lisados celulares probablemente por el uso de EDTA, el cuál en ocasiones inhibe la acción de la fosfatasa alcalina por lo que debe evitarse su empleo [7][9][51]. Las mediciones ALP para los polímeros modificados, mostraron una gran variabilidad representado por desviaciones estándar amplias probablemente debido a que a los cinco días de cultivo, no es posible obtener datos lo suficientemente positivos para fosfatasa alcalina. Sin embargo como se observa en las figuras anteriores el recubrimiento PLGA-HAp-Q-Col, indujo la producción de la ALP, tanto en el sobrenadante como en el lisado de las células[93].

6.4.3 Ensayos de Microscopía

Las microscopías se realizaron a 24, 72 y 120 horas de incubación de células HOS, con aumentos microscópicos de 10 y 40X. En las cuales se puede observar puntos azules que corresponden a los núcleos celulares marcados con *Hoechst*, en las microscopías ópticas de epifluorescencia y puntos alargados en las microscopías ópticas, de color un poco más oscuro que el recubrimiento que corresponden a las células, en sus diferentes días de cultivo.

En la Figura 33 y la Figura 34 se muestran las micrografías para el recubrimiento PLGA-HA-Q-Col sobre los cuales se sembraron diez mil y treinta mil células respectivamente.

En las microscopías se puede distinguir células con morfología normal no apoptóticas¹¹ y en mitosis¹² apreciable. Durante el tiempo de cultivo se evidencia la proliferación celular y la presencia de acumulación celular alrededor de las zonas en donde se encuentra el quitosano. Se puede destacar el ordenamiento celular en este recubrimiento.

¹¹ La apoptosis: la muerte celular programada, es un mecanismo importante del organismo para eliminar las células que no quiere o no necesita.

¹² la mitosis es un proceso que ocurre en el núcleo de las células eucarióticas y que precede inmediatamente a la división celular, consistente en el reparto equitativo del material hereditario (ADN) característico.

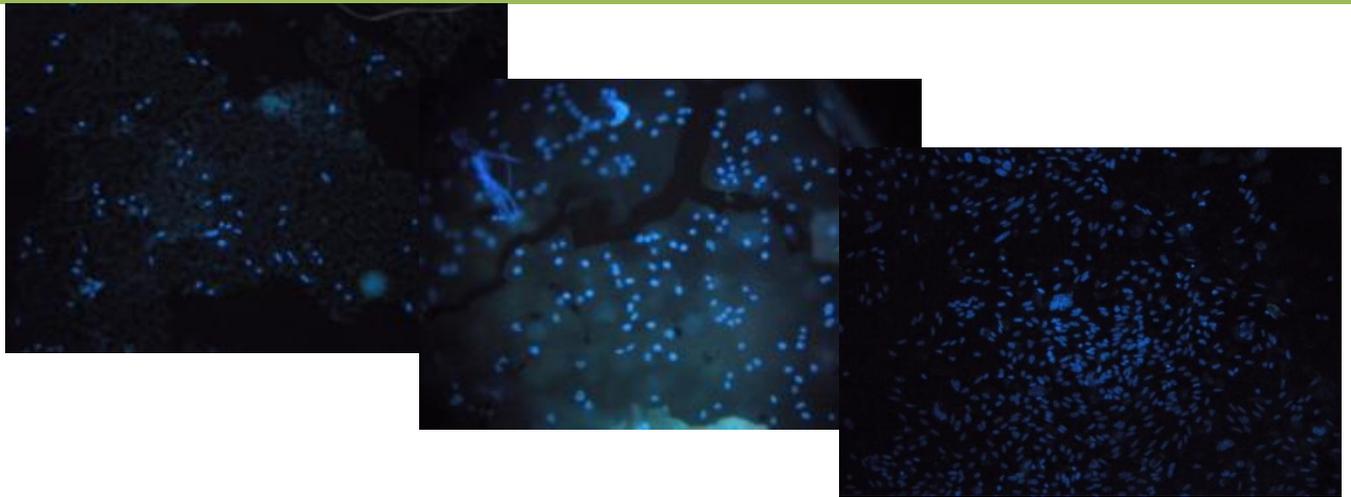


Microscopía óptica de epifluorescencia sobre laminillas a 40X

10000 cel/ml -24h

10000 cel/ml -72h

10000 cel/ml -120h



Microscopía óptica sobre cristales testigos a 10X

10000 cel/ml -24h

10000 cel/ml -72h

10000 cel/ml -120h



Figura 33. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Q-Col+10000cel/ml

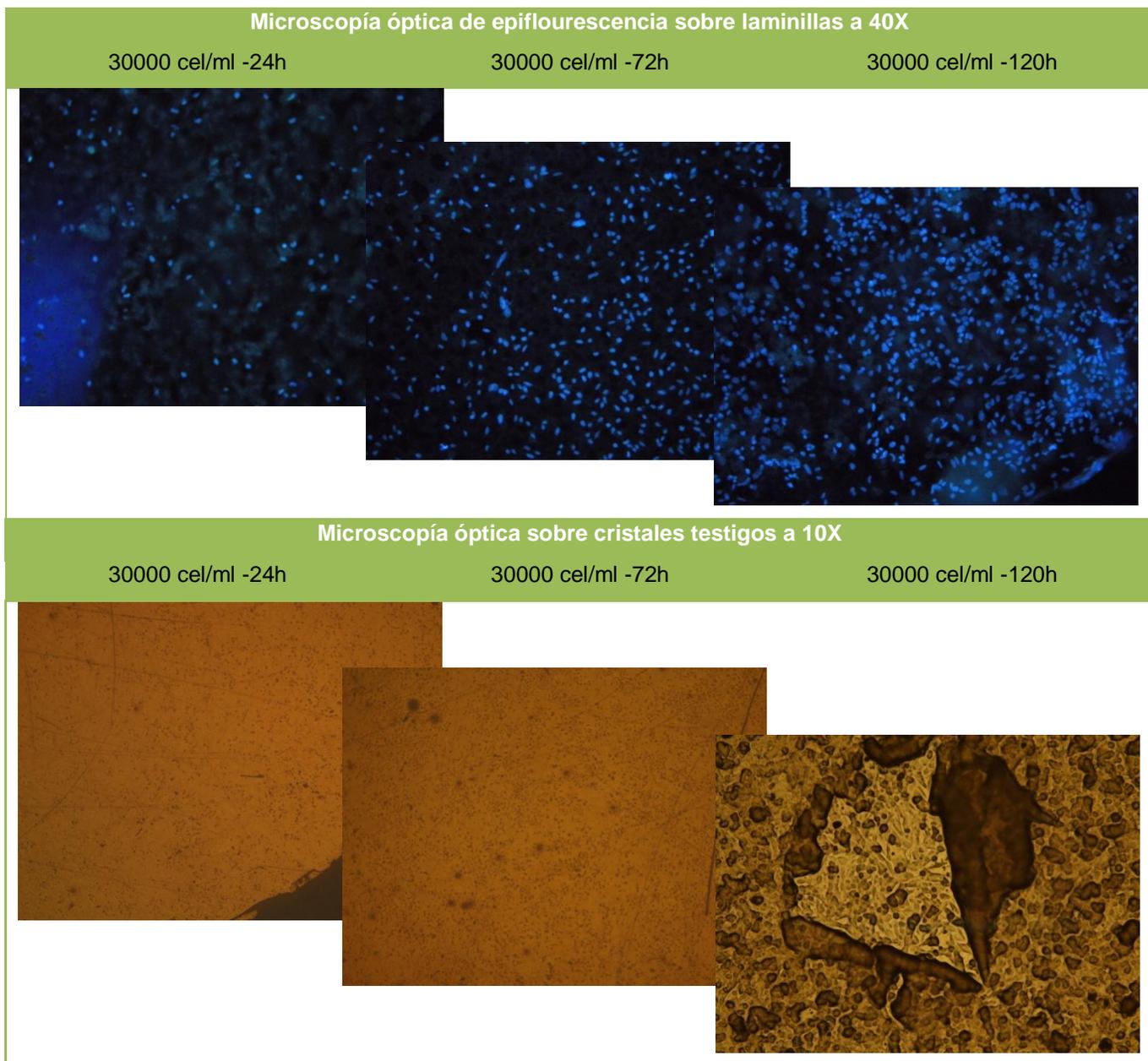


Figura 34. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Q-Col+30000cle/ml

En la Figura 33 se muestran las micrografías para los recubrimientos PLA-PGA-HA-Col sobre los cuales se sembraron diez mil y treinta mil células, en donde se puede observar que la morfología de las HOS es irregular o se encuentra en adaptación y una menor proliferación celular comparando con los recubrimientos que contiene quitosano.

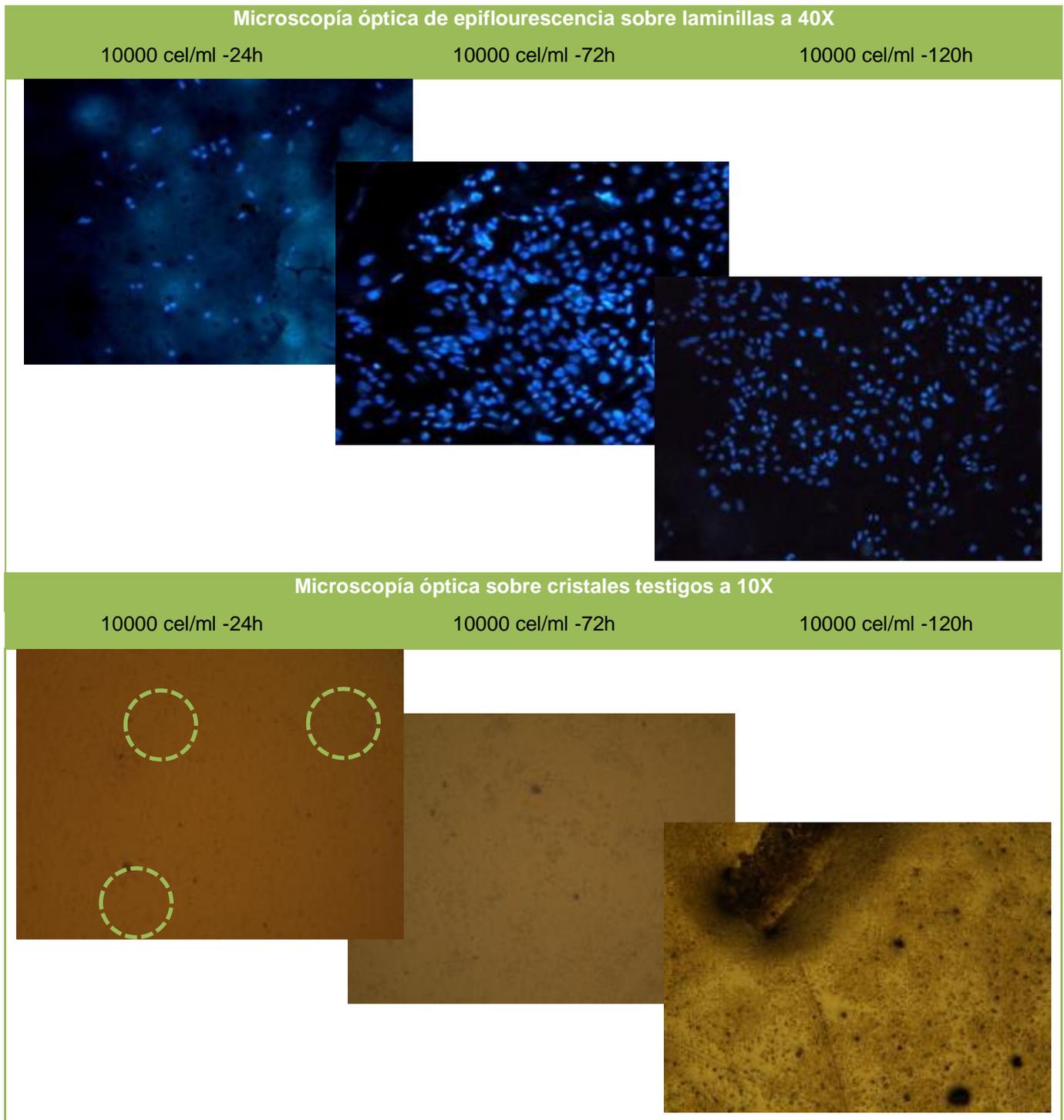


Figura 35. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+10000cel/ml

Con respecto al tamaño y forma del núcleo se observan irregularidades, mostrando de esta forma un comportamiento apoptótico, durante el tiempo de cultivo.

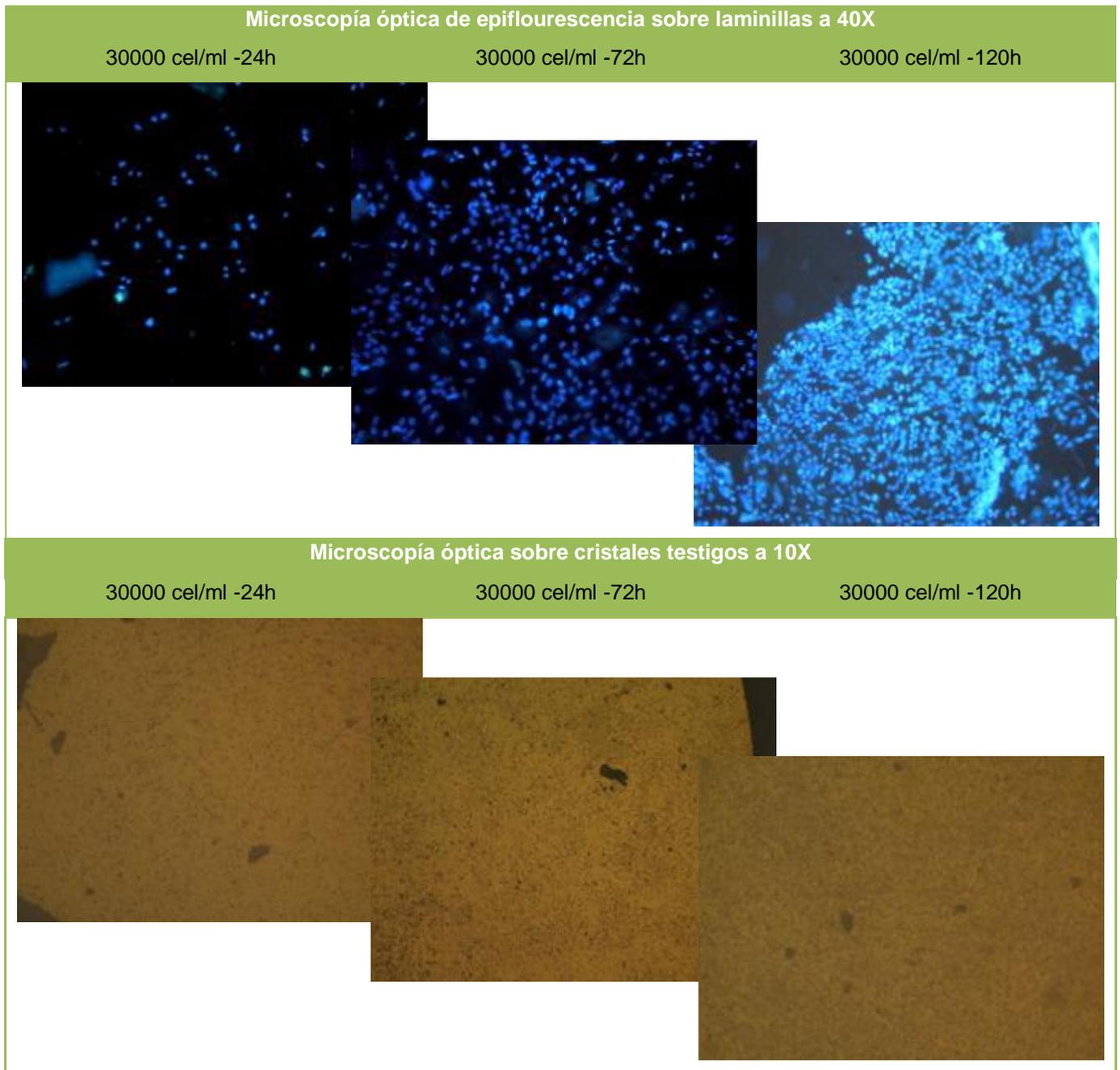


Figura 36. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+30000cel/ml

En la Figura 37 se muestran las micrografías para el recubrimiento PLGA-HA sobre el cual se sembraron treinta mil células, en donde se puede observar la una baja proliferación celular sobre la superficie. Las células HOS no alcanzaron una morfología normal en las primeras 24 horas, y en los ensayos de microscopía de epifluorescencia se presentó una fuerte delaminación del recubrimiento.

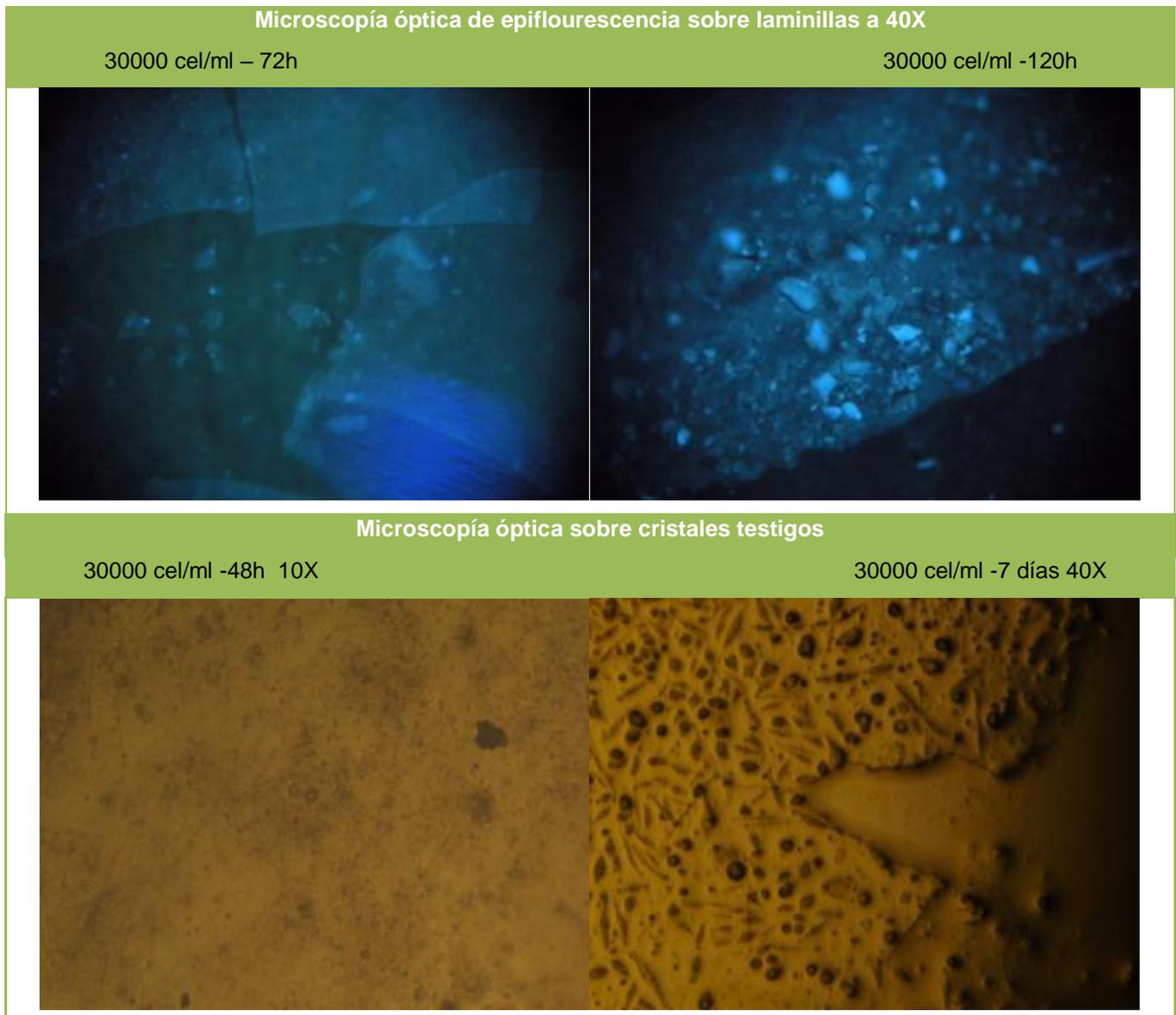


Figura 37. Microscopías ópticas de recubrimiento compuesto de PLGA-HA-Col+30000cel/ml

En general se presentan células no apoptóticas, es decir de núcleos redondeados y fue posible evidenciar la presencia de células en mitosis representado por la condensación del núcleo y la forma característica de la mitosis celular, primero duplicando el material genético (cromosomas), luego se separan los dos juegos de cromosomas, se divide el citoplasma y por último la célula duplica su tamaño. Esta etapa de la célula es visible en las fotos tomadas con el objetivo de 40X.

El desprendimiento del recubrimiento de PLGA-HA a medida que transcurre el tiempo de ensayo, sugiere que el recubrimiento sin la presencia de polímeros naturales posee menos adherencia, debido principalmente al efecto integrante que tienen estos materiales en una matriz compuesta. Sin embargo el recubrimiento no fue del todo perjudicial para las células, ya que el medio de cultivo no presentó acidificación.

Los recubrimientos PLGA-HA-Q-Col presentan mayor crecimiento comparando la confluencia celular a las 72 y 120 horas de incubación sobre las superficies cubiertas por polímero. El recubrimiento que presentó mayor confluencia celular y menor desprendimiento del recubrimiento.

En el Anexo C, se presenta una expansión de las microscopías de la Figura 34, con el fin de ampliar y mejorar la calidad de la microscopía.

6.4.3.1 Ensayos de Microscopía Electrónica de Barrido

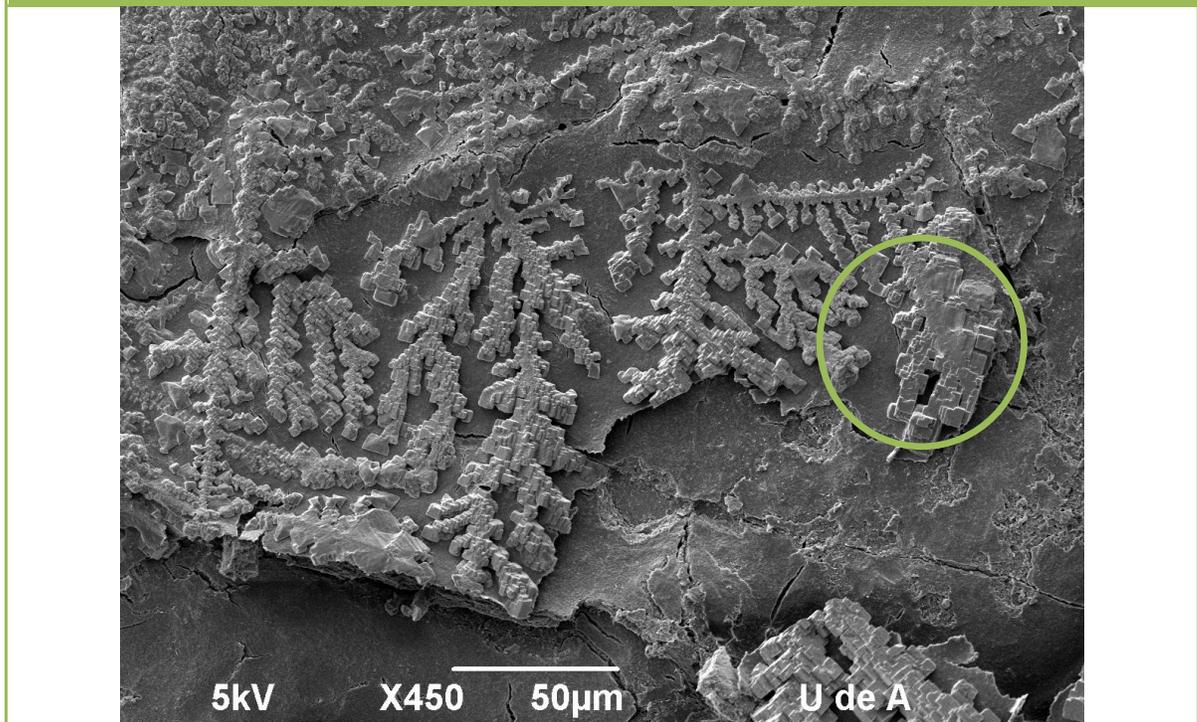
En la microscopía a 50 μ m de la Figura 38 se aprecia la formación de cristales de gran tamaño sobre la superficie, evidenciando el inicio de la maduración de la matriz ósea. Al observar la siguiente ampliación (10 μ m) se observa el cubrimiento celular y la preferencia de las células por los sitios funcionalizados, presentándose una densidad celular superior en estas áreas.

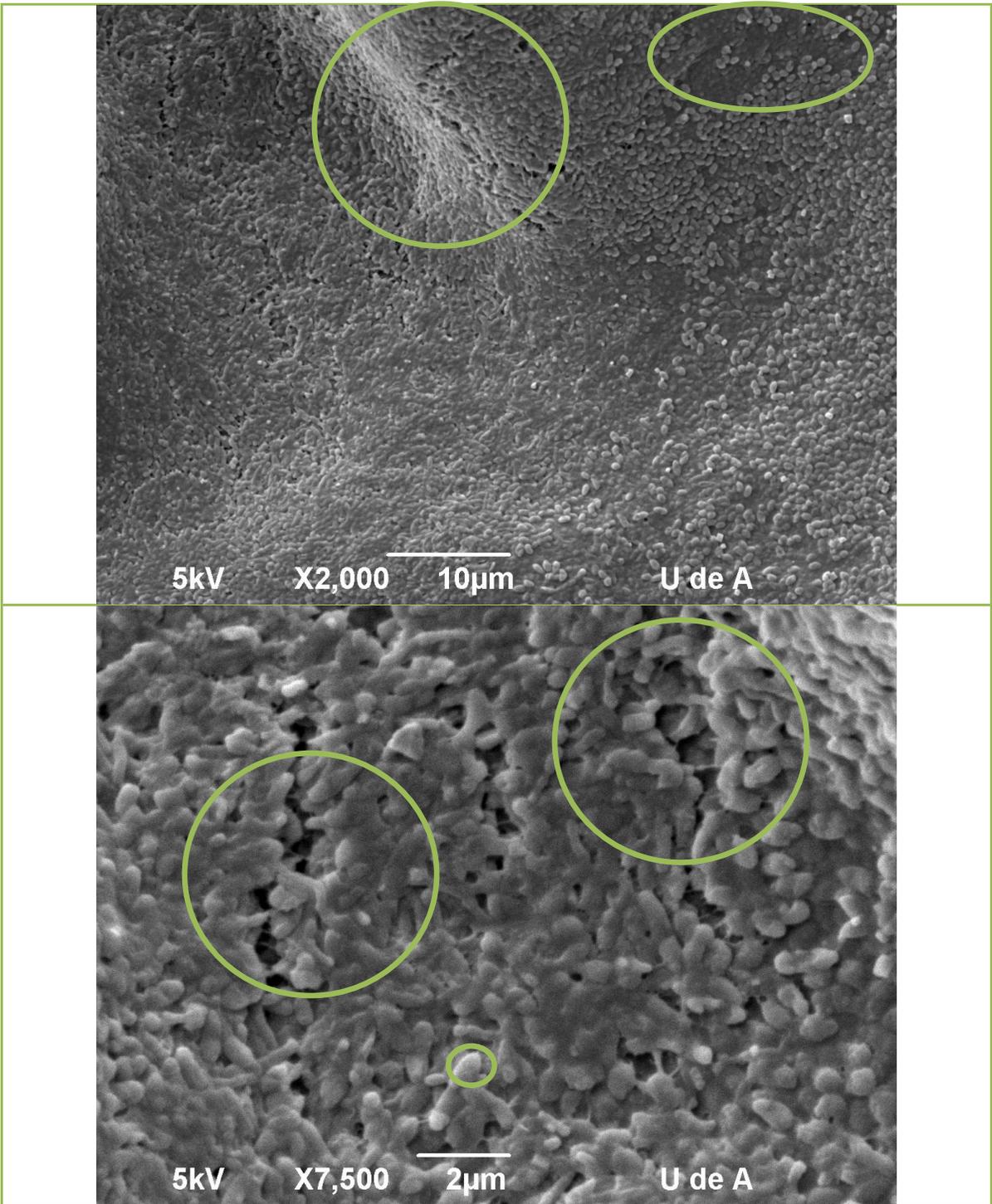
En la microscopía de mayor ampliación ($2\mu\text{m}$) se diferencia claramente cada una de las células y su interacción entre ellas, también se puede distinguir una morfología irregular, causada por el proceso de deshidratación, necesario para realizar la microscopía SEM.

Es muy importante resaltar la biocompatibilidad que tiene la superficie polimérica funcionalizada, representada por la proliferación celular, la formación de nueva matriz mineralizada y la interacción célula-célula, demostrando de esta forma que la funcionalización para imitar la matriz extracelular del tejido nativo, aumenta la capacidad de adaptación del tejido hospedero al realizarse un implante.

La presencia de fibrillas vinculantes entre célula-célula, aumenta la infirmitad de la superficie y generan una menor disipación de energía oscilatoria.

Figura 38. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del recubrimiento PLGA+HA+Q+Col al día 5 de cultivo





7 CONCLUSIONES

- La QCM resultó ser una técnica de monitoreo en tiempo real de biopelículas celulares que apoya los resultados obtenidos mediante las técnicas comunes de análisis celular y además provee información de la estructura y dinámica de las propiedades viscoelásticas de material que se encuentre sobre el sensor.
- La viabilidad de las células osteoblasticas sobre los recubrimientos poliméricos de PLGA modificados es favorable, formando capas uniformes y confluentes con el tiempo, estableciendo de ésta forma al material como compuestos útiles y aplicables en la generación de productos para implantación endo-ósea.
- La interacción de las células HOS con el quitosano, aumenta la rigidez del sistema, este fenómeno se encuentra asociado a un reordenamiento del recubrimiento, y aunque el mecanismo que controla la dinámica de los puntos de adhesión y estado del citoesqueleto no es completamente claro, se puede concluir que se encuentra fuertemente relacionado con los componentes de la matriz extracelular y afectan las propiedades viscoelásticas de los materiales en contacto con las células.
- Existe una relación entre la topografía de la película sobre el sensor de la QCM y las propiedades viscoelásticas, ya que la falta de uniformidad de la monocapa celular, aumenta la pérdida de energía de oscilación.

8 RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para futuros trabajos, el tiempo de cultivo sea mayor para observar formación de matriz extracelular, mineralización y obtener más cantidad de células positivas para fosfatasa alcalina.
- Ajustar la metodología para recubrir piezas de implante y validar el procedimiento industrialmente.
- Para futuras investigaciones implementar el uso de factores de crecimiento y otras proteínas vinculantes, con el fin de mimetizar de una forma más cercana una superficie ósea humana.
- Realizar análisis de respuesta inmune para distinguir específicamente la reacción celular, ante los diferentes componentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. HEUNGSOO SHIN, SEONGBONG JO, ANTONIOS G. MIKOS, “Biomimetic materials for tissue engineering”, *Biomaterials* (2003), 24 4353–4364.
- [2]. BERNABÉU MARTÍNEZ, “Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados”. *Patología del Aparato Locomotor*, 2006; 4 (3): 202-207
- [3]. BUDDY D. RATNER, et al. “Blomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine”, ISBN 0-12- 582460-2, ACADEMIC PRESS 1996.
- [4]. THOMAS J. WEBSTER EDWARD S. AHN, “Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineering Bone”, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* (2006) 103: 275–308
- [5]. YOSHITO IKADA, “Interface science and technology, *Tissue Engineering: Fundamentals and Applications*”, volume 8, ISBN-13: 978-0-12-370582-2, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2006.
- [6]. MEGAN SUSAN LORD, et a., “Monitoring cell adhesion on tantalum and oxidised polystyrene using a quartz crystal microbalance with dissipation”, *Biomaterials* 27 (2006) 4529–4537.
- [7]. X. B. YANG, H. I. ROACH, N. M. P. CLARKE, S. M. HOWDLE, R. QUIRK, K. M. SHAKESHEFF, AND R. O. C. OREFFO, “Human Osteoprogenitor Growth and Differentiation on Synthetic Biodegradable Structures After Surface Modification”, *Bone* Vol. 29, No. 6, December 2001:523–531.
- [8]. SARA R. CHASTAIN, ANUP K. KUNDU, SANJAY DHAR, JAY W. CALVERT, ANDREW J. PUTNAM, “Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation”, *Wiley InterScience* 2006.
- [9]. ANTHONY P. HOLLANDER, PAUL V. HATTON, “*Biopolymer Methods in Tissue Engineering*”, E-ISBN 1-59259-428-X, Humana Press 2004.
- [10]. CLAUDIA STEINEM, ANDREAS JANSHOFF, “*Chemical Sensors and Biosensors Methods and Applications*”, ISBN-10 3-540-36567-2, Springer 2007.
- [11]. LUTZ SCHEIDELER, FRANK RUPPA, HANS P. WENDEL, SHILA SATHEA, JURGEN GEIS-GERSTORFER, “Photocoupling of fibronectin to titanium surfaces influences keratinocyte adhesion, pellicle formation and thrombogenicity”, *Dental materials* 23 (2007) 469–478.

- [12]. A.J. GARCÍA AND C.D. REYES, “Bio-adhesive Surfaces to Promote Osteoblast Differentiation and Bone Formation”, *J Dent Res* 84(5):407-413, 2005.
- [13]. K. SHAH, R. K. SINHA, N. J. HICKOK, and R. S. TUAN, “High-resolution Morphometric Analysis of Human Osteoblastic Cell Adhesion on Clinically Relevant Orthopedic Alloys”, *Bone* Vol. 24, No. 5, May 1999:499–506.
- [14]. R. EL-GHANNAM, P. DUCHEYNE, M. RISBUD, C. S. ADAMS, I. M. SHAPIRO, D. CASTNER, S. GOLLEDGE, R. J. COMPOSTO, “Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity”, *J Biomed Mater Res Pt A*, VOL.68A;NO.4;PAGE.615-627(2004).
- [15]. NAVARRO TORO, Melba Eugenia. “Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea”. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. 2005.
- [16]. MARTÍNEZ, Olga. “Efectos de distintas biomoléculas de utilidad clínica sobre cultivos primarios de osteoblastos humanos”. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, 2007.
- [17]. MONTAÑEZ, Nerly. “Evaluación del direccionamiento de células osteoblasticas a partir del patronamiento con luz ultravioleta de proteínas sobre mezclas de PLA-PGA con biocerámicos”. Tesis de maestría. Universidad Industrial de Santander, 2010.
- [18]. VANESSA HEITMANN, BJÖRN REIß, JOACHIM WEGENER, “The Quartz Crystal Microbalance in Cell Biology: Basics and Applications”, *Springer Ser Chem Sens Biosens* (2007) 5: 303–338.
- [19]. K. ANSELME, “Review: Osteoblast adhesion on biomaterials”, *Biomaterials* 21 (2000) 667-681.
- [20]. QUIRK, R. A.; CHAN, W. C.; DAVIES, M. C.; TENDLER, S. J. B.; SHAKESHEFF, K. M. “Poly(L-lysine)-GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly(lactic acid)”. *Biomaterials* 2001, 22, 865-872.
- [21]. KHANG, G.; LEE, S. J.; JEON, J. H.; LEE, J. H.; LEE, H. B. “Interaction of Fibroblast Cell onto Physicochemically Treated PLGA Surfaces”, *Polym. Korea* 2000, 24 (6), 869-876.
- [22]. CAI, K. Y.; YAO, K. D.; CUI, Y. L.; YANG, Z. M.; LI, X. Q.; XIE, H. Q.; QING, T. W.; GAO, L. B. “Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro”, *Biomaterials* 2002, 23 (7), 1603- 1611.
- [23]. YANG, J.; SHI, G.; BEI, J.; WANG, S.; CAO, Y.; SHANG, Q.; YANG, G.; WANG, W. “Fabrication and surface modification of macroporous poly- (L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for

- human skin fibroblast cell culture". J. Biomed. Mater. Res. 2002, 62, 438-446.
- [24]. SOTO-BUBERT, "Introducción a los Biominales y Biomateriales", A., Vol.22, Educación, Tesis Doctorado en Ciencias de la Ingeniería Mención en Ciencia de los Materiales, Universidad de Chile, 2003.
- [25]. ALDO R. BOCCACCINI AND JULIE E. GOUGH, "Tissue engineering using ceramics and polymers", First published 2007, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC © Woodhead Publishing Limited, 2007.
- [26]. TEA INDEST, "Adsorption of Chitosan on PET Films Monitored by Quartz Crystal Microbalance", Biomacromolecules 2008, 9, 2207–2214.
- [27]. GHADA NIMERI, CLAES FREDRIKSSON, HANS ELWING, LI LIU C, MICHAEL RODAHL, BENGT KASEMO, "Neutrophil interaction with protein-coated surfaces studied by an extended quartz crystal microbalance technique". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 11 (1998) 255–264.
- [28]. M.S. JENKINS, K.C.Y. WONG, O. CHHIT, J.F. BERTRAM, R.J. YOUNG, N. SUBASCHANDAR, "Quartz Quartz Crystal Microbalance-Based Measurements of Shear-Induced Senescence in Human Embryonic Kidney Cells". Biotechnology and bioengineering, 2004, vol. 88, no3, pp. 392-398.
- [29]. CARINE GALLI MARXER, "Protein and cell adsorption: topographical dependency and adlayer viscoelastic properties determined with oscillation amplitude of quartz resonator". Presentee a la Faculte des Sciences de l'Universite de Fribourg (Suisse) pour l'obtention du grade de Doctor rerum naturalium, 2002.
- [30]. BLANCO RAMOS, M^a de Guía. "Liberación de Triclosan a partir de hilos de sutura monofilares". Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Catalunya. Departamento de Ingeniería Química. España. 2007.
- [31]. MARTÍNEZ PALAU, Meritxell. "Síntesis, estructura y aplicaciones de poliésteres secuenciales derivados de ácido glicólico y w-hidroxiácidos". Tesis Doctoral. Barcelona. 2008.
- [32]. LIKHTMAN A. E., MCLEISH T. C. B., "Quantitative Theory for Linear Dynamics of Linear Entangled Polymers". Macromolecules, 2002, 35 (16), pp 6332–6343, DOI: 10.1021/ma0200219.
- [33]. HUMBERTO PALZA CORDERO, "Propiedades Viscoelásticas de Materiales Poliméricos", <http://cabierta.uchile.cl/revista/24/articulos/pdf/edu4.pdf>, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- [34]. IZQUIERDO-BARBA, I, *et al.* "Vitreous SiO₂-CaO coatings on Ti6Al4V alloys: Reactivity in simulated body fluid versus osteoblast cell culture". Acta Biomaterialia 2, 2006, p. 445–455.

- [35]. NGIAM, Michelle, *et al.* “The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering”. *Bone*, 2009. vol. 45, p. 4–16.
- [36]. ROBERTO ETCHENIQUE, “Aplicaciones analíticas de la balanza de cristal de cuarzo: microgravimetría y microreología”, Tesis presentada para optar al título de doctor de La Universidad de Buenos Aires, 1998.
- [37]. P. KAO, *et al.*, “Characterization of viscoelastic properties of adsorbed biomolecules and biomolecular assemblies with high frequency micromachined quartz resonators”, *Sens. Actuators B: Chem.* (2009).
- [38]. J. ZHANG, X.D. SU, S.J. O’SHEA, “Antibody antigen affinity behavior in liquid environment with electrical impedance analysis of quartz crystal microbalances”. *Biophysical Chemistry* 99 (2002) 31–41
- [39]. X. Pang, T. Casagrande, I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of hydroxyapatite–CaSiO₃–chitosan composite coatings”, *Colloid and Interface Science*. 330 (2009) 323–329.
- [40]. F. Sun, X. Pang, I. Zhitomirsky, “Electrophoretic deposition of composite hydroxyapatite–chitosan–heparin coatings”, *Materials processing technology* 209 (2009) 1597–1606
- [41]. S.J. MARTIN, V.E. GRANSTAFF, G.C. FRYE, “Characterization of a quartz crystal microbalance with simultaneous mass and liquid loading”. *Anal. Chem.* 63 (1991) 2272–2281.
- [42]. R. PATEL, R. ZHOU, K. ZINSZER, F. JOSSE, R. CERNOSEK, “Real-time detection of organic compounds in liquid environments using polymer-coated thickness shear mode quartz resonators”. *Anal. Chem.* 72 (2000) 4888–4898.
- [43]. X. SU, C. DAI, J. ZHANG, S. O’SHEA, “Quartz tuning fork biosensor”. *Biosensors Bioelectron.* 17 (2002) 111–117.
- [44]. V.E. GRANSTAFF AND S.J. MARTIN, "Characterization of a thickness-shear mode quartz resonator with multiple nonpiezoelectric layers". *J. Appl. Phys.* 75: 1319. doi:10.1063/1.356410 (1994).
- [45]. JAMES D. KRETLOW, LEDA KLOUDA, ANTONIOS G. MIKOS, “Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007) 263–273.
- [46]. M. Mehdipour, A. Afshar, “A study of the electrophoretic deposition of bioactive glass–chitosan composite coating”, *Ceramics International*, artículo In-press (2011).
- [47]. DIETMAR W. HUTMACHER, "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage". *Biomaterials* 21 (2000) 2529-2543.

- [48]. JAIRO ERNESTO PERILLA, “Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico”, Ingeniería e Investigación VOL. 28 No. 1, 2008 (57-71).
- [49]. HATEFIA, B. AMSDENA, “Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems”, Journal of Controlled Release 80 (2002) 9–28.
- [50]. SPENCER, Nicholas; TEXTOR, Marcus. “Surface modification, surface analysis and biomaterials”. Laboratory for Surface Science and Technology, Department of Materials. ETH Zurich. Research.
- [51]. Diagnostic Chemicals Limited. “Determinación in vitro de Fosfatasa Alcalina en suero”. Citado en: <http://www.dclmexico.com>.
- [52]. SETZER, Bernhard, *et al.* The gene-expression and phenotypic response of hFOB 1.19 osteoblasts to surface-modified titanium and zirconia. Biomaterials, 2009. vol. 30, p. 979-990.
- [53]. NAVARRO Melba E., “Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea”, Memoria de tesis presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias-Especialidad Ingeniería Química por la Universitat Politècnica de Catalunya, Abril 2005.
- [54]. OJU Jeona, SU Jin Songa, SUN-WOONG Kanga, ANDREW J. Putnamb, BYUNG-SOO KIMC., “Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 released from a heparin-conjugated poly(L-lactico-glycolic acid) scaffold”. Biomaterials 28 (2007) 2763–2771
- [55]. NICHOLAS R. Krogman, ARLIN L. WEIKEL, KATHERINE A. KRISTHART, SYAM P. NUKAVARAPU, MENG DENG, LAKSHMI S. NAIR, CATO T. LAURENCIN, HARRY R. ALLCOCK, “The influence of side group modification in polyphosphazenes on hydrolysis and cell adhesion of blends with PLGA”. Biomaterials 30 (2009) 3035–3041.
- [56]. XUE QU, WENJIN CUI, FEI YANG, CHANGCHUN MIN, HONG SHEN, JIANZHONG BEI, SHENGUO WANG, “The effect of oxygen plasma pretreatment and incubation in modified simulated body fluids on the formation of bone-like apatite on poly(lactide-co-glycolide) (70/30)”, Biomaterials 28 (2007) 9–18 .
- [57]. HONG SHEN, XIXUE HU, JIANZHONG BEI, SHENGUO WANG, “The immobilization of basic fibroblast growth factor on plasma-treated poly(lactide-co-glycolide)”. Biomaterials 29 (2008) 2388e2399.
- [58]. ESTHER WENK, ANNE J. MEINEL, SARAH WILDY, HANS P. MERKLE, LORENZ MEINEL, “Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering”, Biomaterials 30 (2009) 2571–2581.
- [59]. JOAO M. ENCARNACAO, *et al.*, “Piezoelectric biosensors for biorecognition analysis: Application to the kinetic study of HIV-1 Vif protein binding to recombinant antibodies”. Biotechnology 132 (2007) 142–148.

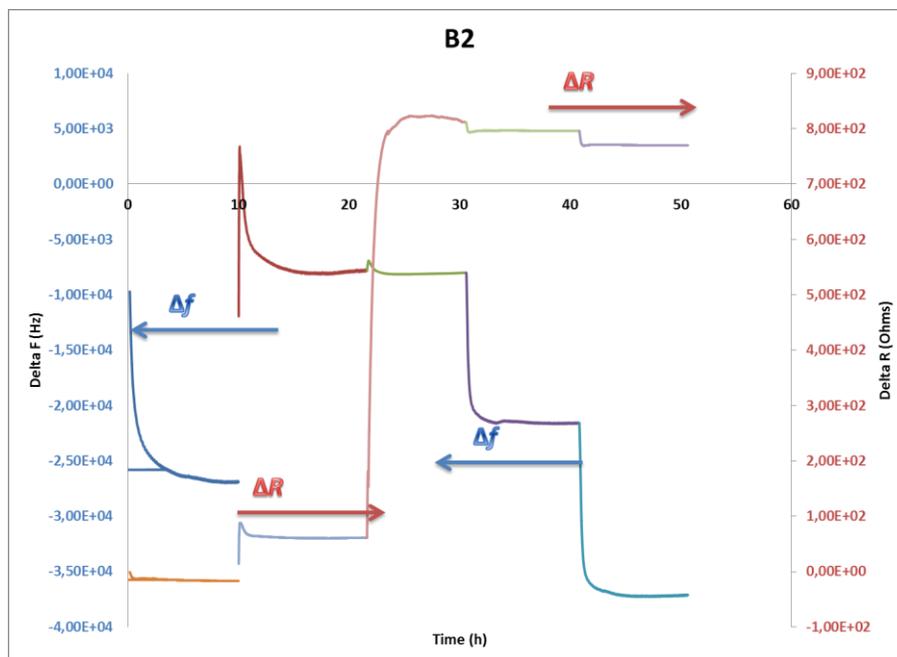
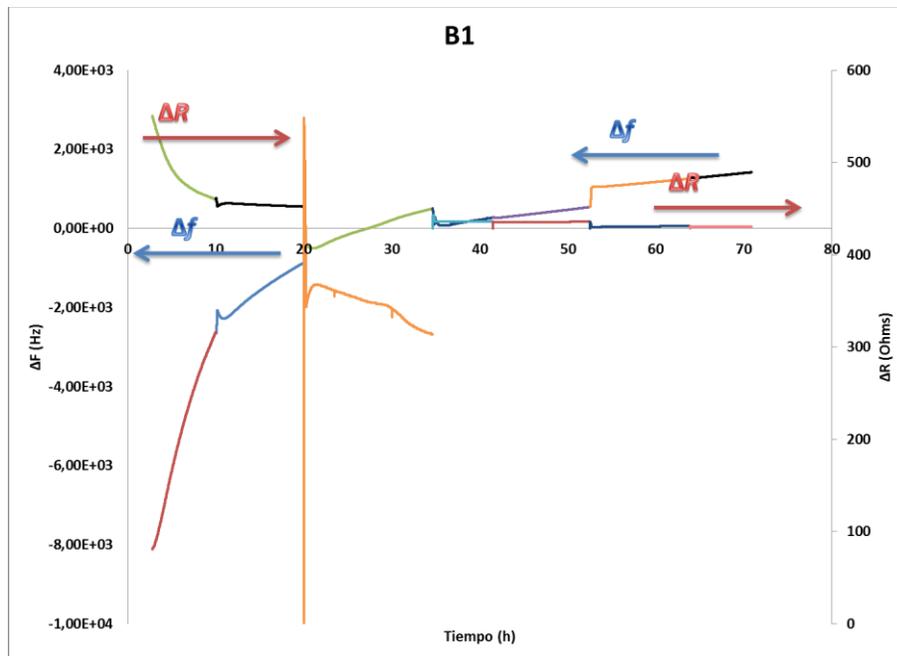
- [60]. DIANNE M. ROTHSTEIN, “Protein Mediated Attachment Mechanisms Associated with Blastocyst Implantation A Thesis Faculty of Drexel University, in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy December, 2007.
- [61]. SUSAN R. MIKKELSEN, EDUARDO CORTÓN, “BIOANALYTICAL CHEMISTRY”, ISBN 0-471-54447-7, John Wiley & Sons, Inc. 2004.
- [62]. MARTIN A. COLE, NICOLAS H. VOELCKER, HELMUT THISSEN, HANS J. GRIESSER, “Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein–surface and cell–surface interactions”. *Biomaterials* 30 (2009) 1827–1850.
- [63]. PATRICIA B. MALAFAYA, RUI L. REIS, “Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor”. *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 644–660.
- [64]. CHUNMEI LIA, CHARU VEPARIA, HYOUNG-JOON JINA, B, HYEON JOO KIMA, DAVID L. KAPLANA. “Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering”. *Biomaterials* 27 (2006) 3115–3124.
- [65]. ALEXANDRA MARGARIDA PINTO MARQUES, “BIOFUNCTIONALITY AND IMMUNOCOMPATIBILITY OF STARCH-BASED BIOMATERIALS”, Para candidatura à obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de conhecimento em Biomateriais, Julho 2004, cap 2.
- [66]. BING CHENA, HANG LINA, JIANHUA WANG, YANNAN ZHAO, BIN WANG, WENXUE ZHAO, WENJIE SUNA, JIANWU DAIA, “Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2”. *Biomaterials* 28 (2007) 1027–1035.
- [67]. HONG SHEN, XIXUE HU, FEI YANG, JIANZHONG BEI, SHENGUO WANG, “The bioactivity of rhBMP-2 immobilized poly(lactide-co-glycolide) scaffolds”, *Biomaterials* 30 (2009) 3150–3157.
- [68]. Rahul S. Tare, Jodie C. Babister, Janos Kanczler, Richard O.C. Oreffo, “Skeletal stem cells: Phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration”. *Molecular and Cellular Endocrinology* 288 (2008) 11–21.
- [69]. HONG CHEN, LIN YUAN, WEI SONG, ZHONGKUIWU, DAN LI, “Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions”, *Progress in Polymer Science* 33 (2008) 1059–1087.
- [70]. YUQING WAN, CHIFENG TU, JIAN YANG, JIANZHONG BEI, SHENGUO WANG, “Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(L-lactide) scaffolds, degradation of poly(L-lactide) scaffolds”. *Biomaterials* 27 (2006) 2699–2704.

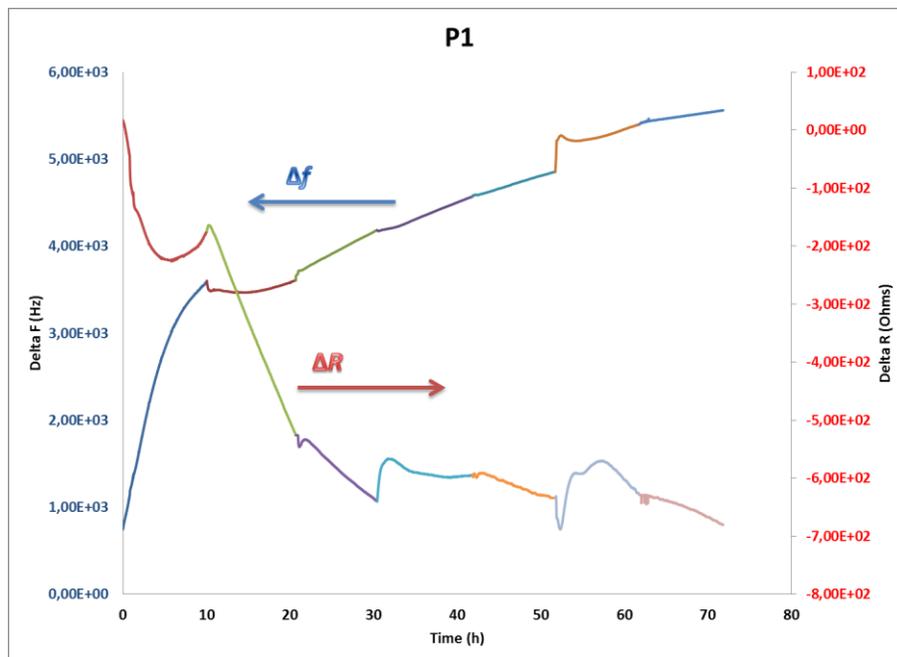
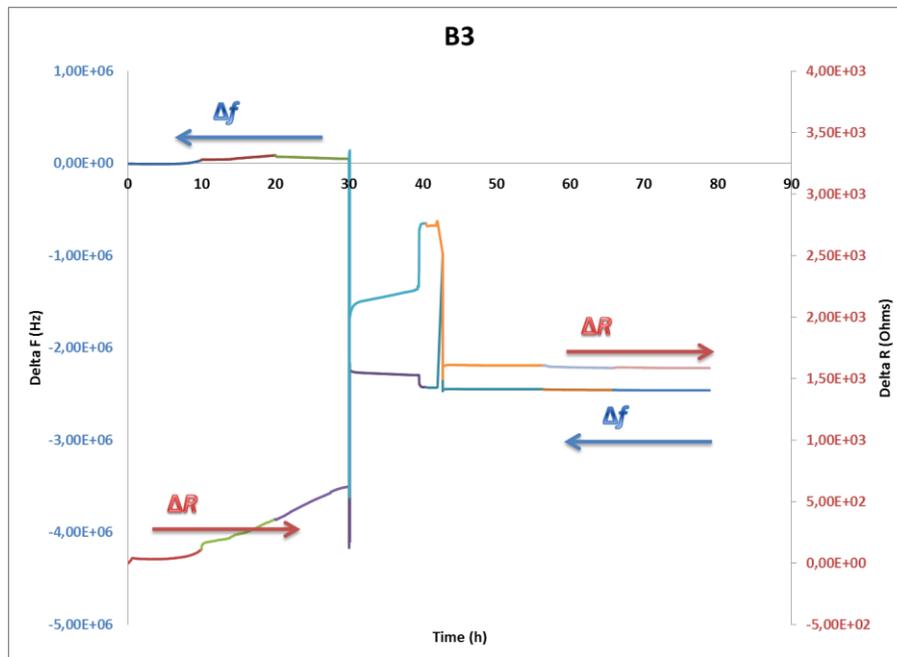
- [71]. XUEEN JIA, LIANG TAN, QINGJI XIE, YOUYU ZHANG, SHOUZHUO YAO, "Quartz crystal microbalance and electrochemical cytosensing on a chitosan/multiwalled carbon nanotubes/Au electrode", *Sensors and Actuators B* 134 (2008) 273–280.
- [72]. ASTM F 813 – 07, "Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices"
- [73]. MICHAEL RODAHL, BENGT KASEMO, "On the measurement of thin liquid overlayers with the quartz-crystal microbalance". *Sensors and Actuators A* 54 (1996) 448-56.
- [74]. J. DUBOIS, et al., "Biofouling of dextran-derivative layers investigated by quartz crystal microbalance", *Colloids Surf. B: Biointerfaces* (2009).
- [75]. BENGT KASEMO, "Biological surface science", *Surface Science* 500 (2002) 656–677.
- [76]. PERALES, M.E, *et al.* "Síntesis de polímeros: Ácido Poliláctico". X Congreso Nacional de Microscopía-Morelia. 2010.
- [77]. PANDEY, Anurag; PANDEY, Girish; ASWATH, Pranesh. "Synthesis of polylactic acid–polyglycolic acid blends using microwave radiation". *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2008. vol. 1, p. 227–233.
- [78]. MAINARDES, Rubiana; DAFLON, María; EVANGELISTA, Raul. "Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles". *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. vol. 42 no. 4, p. 523-530.
- [79]. VIDAL, Benedicto; MELLO, Maria Luisa. "Collagen type I amide I band infrared spectroscopy". *Micron*, 2011. vol. 42, p. 283-289.
- [80]. SUPRAKAS Sinha, MOSTO Bousmina. Biodegradable polymers and their layered silicate nanocomposites: In greening the 21st century materials world. *Progress in Materials Science*, 2005. Vol. 50, p. 962–1079.
- [81]. ZDENKA FOHLEROVÁ, PETR SKLÁDAL, JAROSLAV TURÁNEK, "Adhesion of eukaryotic cell lines on the gold surface modified with extracellular matrix proteins monitored by the piezoelectric sensor", *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1896–1901.
- [82]. REDEPENNING J., SCHLESINGER T. K., MECHALKE E. J., PULEO D. A., AND BIZIOS R., "Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance", *Anal. Chem.*, 1993, 65 (23), 3378-3381.
- [83]. Kenneth A. M., "Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface", *Biomacromolecules*, 2003, Vol. 4, No. 5., P:1099-1120.
- [84]. ELSOM J., LETHEM M. I., REES G. D., HUNTER C., "Novel quartz crystal microbalance based biosensor for detection of oral epithelial cell–microparticle interaction in real-time", *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, vol. 23 p:1259–1265.

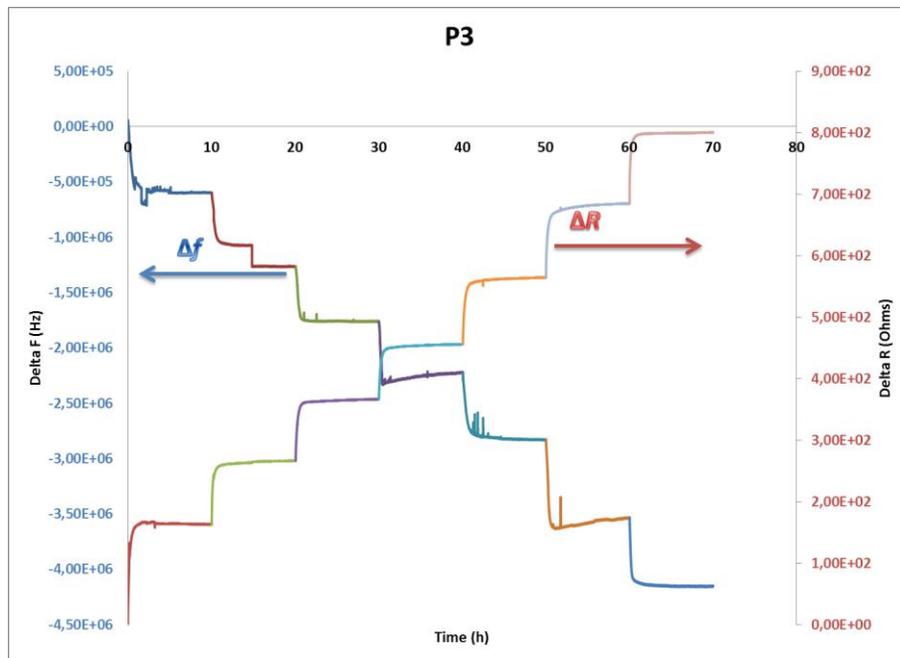
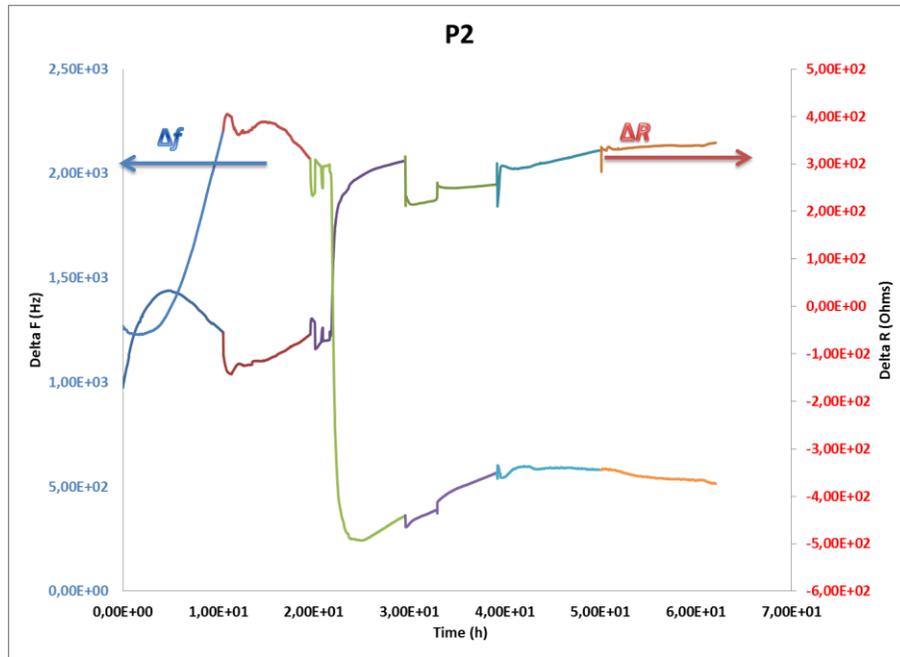
- [85]. CANS A., HOOK F., SHUPLIAKOV O., *et al.*, "Measurement of the dynamics of exocytosis and vesicle retrieval at cell populations using a quartz crystal microbalance", *Anal. Chem.*, 2001, vol. 73, p:5805-5811.
- [86]. HUANG, H., SYLVAN, J., JONAS, M., BARRESI, R., SO, P. T. C., CAMPBELL, K. P., LEE, R.T., "Cell stiffness and receptors: evidence for cytoskeletal subnetworks," *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2005, vol. 288, C72-80.
- [87]. MARX K., ZHOU T., WARREN M. AND BRAUNHUT S., "Quartz Crystal Microbalance Study of Endothelial Cell Number Dependent Differences in Initial Adhesion and Steady-State Behavior: Evidence for Cell-Cell Cooperativity in Initial Adhesion and Spreading", *Biotechnol. Prog.*, 2003, p:987–999.
- [88]. MARXER, C.G., COEN, M.C., GREBER, T., GREBER, U.F., SCHLAPBACH, L.: "Cell spreading on quartz crystal microbalance elicits positive frequency shifts indicative for viscosity changes", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol 377, p:578-586.
- [89]. Marx, K.A., Zhou, T., Montrone, A., Schulze, H., Braunhut, S.J.: A quartz crystal microbalance cell biosensor: detection of microtubule alterations in living cells at nM nocodazole concentrations, *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001), 773-782.
- [90]. Marx KA, Zhou T, Montrone A, McIntosh D, Braunhut SJ., "Quartz crystal microbalance biosensor study of endothelial cells and their extracellular matrix following cell removal: Evidence for transient cellular stress and viscoelastic changes during detachment and the elastic behavior of the pure matrix", *Anal Biochem.*, 2005, vol. 343(1), p:23-34.
- [91]. Hyen-Wook Kang*, Hiroshi Muramatsu, "Monitoring of cultured cell activity by the quartz crystal and the micro CCD camera under chemical stressors", *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 1318–1323.
- [92]. Marxer G., Collaud M., Greber T., *et al.*, "Cell viscosity increase during spreading induces positive frequency shifts in Quartz Crystal Microbalance measurements", *Analytical and Bioanalytical Journal*, 2003, vol. 377, p: 578–586.
- [93]. I. Christodoulou, L. Buttery, G. Tai, L. Hench, J. Polak, "Characterization of Human Fetal Osteoblasts by Microarray Analysis Following Stimulation with 58S Bioactive Gel-Glass Ionic Dissolution Products", *Biomed. Mater. Res B Appl Biomater*, 2006, vol. 77(2), P:431-446.

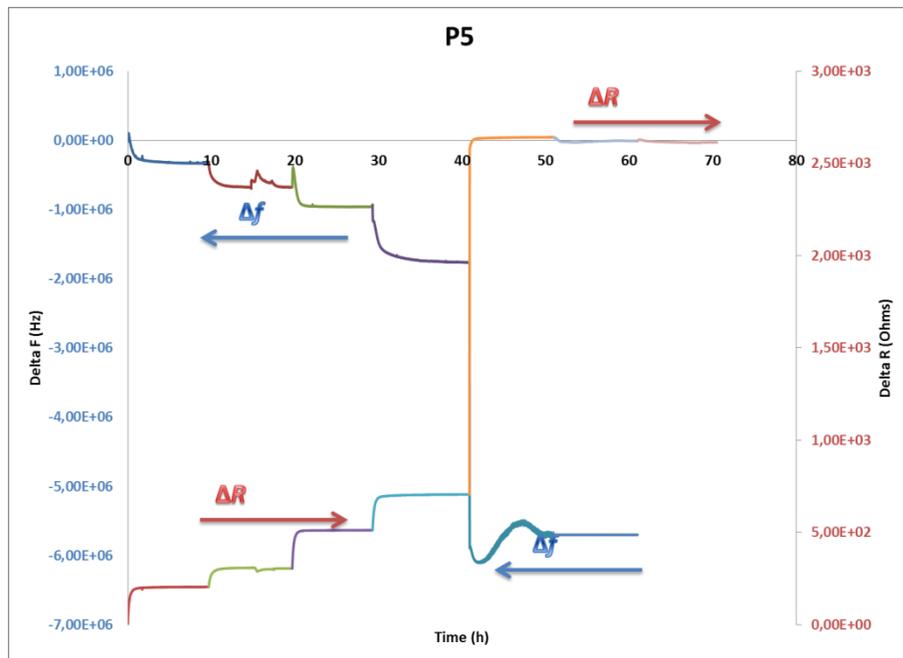
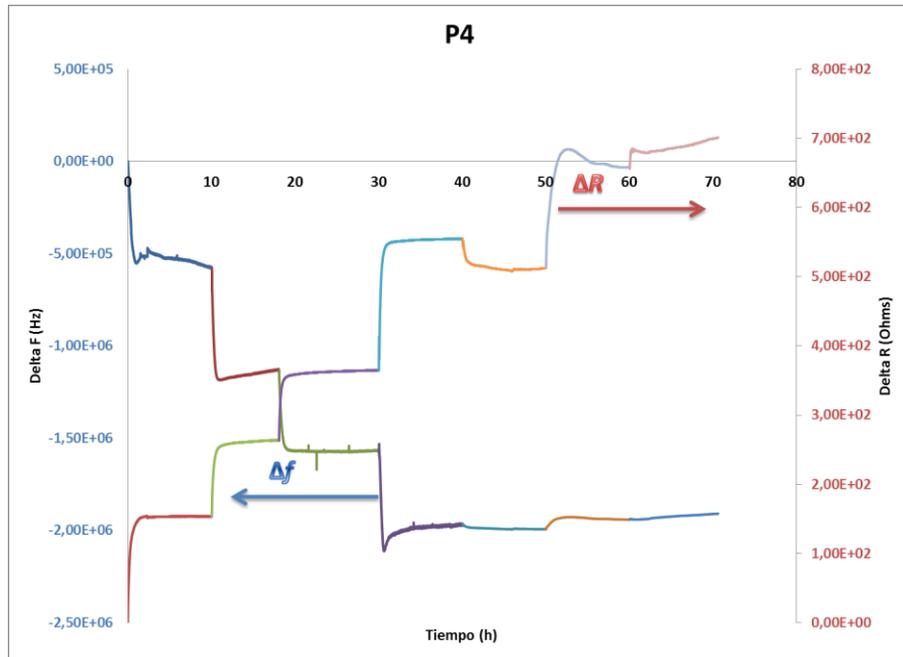
ANEXOS

ANEXO A. DIAGRAMAS DE FRECUENCIA Y RESISTENCIAS CONTRA EL TIEMPO









ANEXO B. DEDUCCIÓN DE IMPEDANCIAS

Para comenzar el análisis de impedancias, es conveniente tener en cuenta la situación en que hay una capa de material no piezoeléctrico en contacto con una cara del cristal. Si se toma la impedancia eléctrica equivalente del cristal de cuarzo limpio como Z_{eq} se puede definir la variación de la impedancia eléctrica equivalente Z_f debida al agregado de una capa de material no piezoeléctrico como:

$$Z_f = Z_{eq,M} - Z_{eq}$$

Eq. 23

Donde $Z_{eq,M}$ representa la impedancia eléctrica equivalente del cristal de cuarzo sobre el que se ha agregado el material. Granstaff y Martin han derivado una expresión general que describe Z_f en función de los parámetros del cuarzo y cuatro magnitudes que dependen del material adherido: módulo elástico G' , módulo de pérdidas G'' , densidad ρ y espesor d .

$$Z_f = R_f + j\omega L_f = \frac{2\omega L_q}{\pi \mu_q \rho_q} \left[\overline{\rho G} \operatorname{tag}h(j\omega d \overline{\rho/G}) \right]$$

Eq. 24

La notación Z_f supone aditividad entre la impedancia equivalente debida al cristal de cuarzo y la impedancia equivalente total, ya que se ha definido a partir de la Eq. 23.

En el caso de un cristal con una de sus caras en contacto con un líquido newtoniano de $G' = 0$ y $G'' = \omega\eta$ y de espesor mucho mayor que la distancia de desvanecimiento de la onda de corte, entonces, $\lim_{\gamma d \rightarrow \infty} \operatorname{tag}h(j\omega d \overline{\rho/G}) = 1$, con $G = j\omega\eta$

$$Z_m = \overline{\rho} \overline{jG''} = \overline{j\omega\rho\eta} = 1 + j(\omega\rho\eta)^{1/2}$$

Eq. 25

$$Z_f \rightarrow \frac{2\omega L_q}{\pi \mu_q \rho_q} \frac{1}{j\omega \rho \eta} = \frac{2\omega L_q}{\pi \mu_q \rho_q} (1 + j (\omega \rho \eta)^{1/2})$$

Eq. 26

En la Eq. 26 la impedancia eléctrica equivalente es un vector con la parte real (resistencia R_f) igual a la imaginaria (inductancia X_{Lf}). Incrementos en la inductancia y en la resistencia están relacionados con aumento de la densidad y/o de la viscosidad en la superficie del cristal. Por ejemplo, si se presentan incrementos en la frecuencia de resonancia caracterizados por $\Delta X_L \gg \Delta R$, indica la formación de una capa lo suficientemente rígida que se mueve en fase con la superficie resonante.

En el caso de un cristal con una de sus caras en contacto con un material viscoelástico de valores finitos de G' y G'' y de espesor mucho mayor que la distancia de desvanecimiento de la onda de corte se tiene que $\lim_{\gamma d \rightarrow \infty} \operatorname{tag}h(j\omega d \sqrt{\rho/G}) = 1$, con $G = G' + jG'' = jG''(G'/G'' + j)$

$$Z_m = \frac{\bar{\rho}}{jG''} \frac{1 - j \frac{G'}{G''}}{1 + \frac{G'}{G''}}$$

Eq. 27

Por otra parte, el módulo de la impedancia aumenta al aumentar G' según:

$$Z_f = \frac{2\omega L_q}{\pi \mu_q \rho_q} \frac{\bar{\rho}}{G''^4} \frac{1 + \frac{G'}{G''}}{1 + \frac{G'}{G''}}$$

Eq. 28

Cuando se tienen dos capas sucesivas no piezoeléctricas se puede tomar la ecuación Martin y Granstaff en su forma completa. La capa en contacto con el cristal, o inferior, lleva en subíndice 1, mientras que la capa alejada del cristal o superior lleva el subíndice 2.

$$Z_f = \frac{Z_2 \tanh k_2 d_2 + Z_1 \tanh k_1 d_1}{Z_2/Z_1 \tan k_1 d_1 \tan k_2 d_2 + 1}$$

Eq. 29

Con $k_i = j\omega \sqrt{\rho_i/G_i}$, Cuando $Z_2/Z_1 \tan k_1 d_1 \tan k_2 d_2 \ll 1$ el denominador tiende a la unidad y se puede aplicar la aproximación de aditividad entre las capas:

$$Z_f = Z_2 \tanh k_2 d_2 + Z_1 \tanh k_1 d_1$$

Eq. 30

La condición de aditividad puede ser lograda de tres formas: película de espesor pequeño $d_1 \rightarrow 0$, película rígida $k_1 \rightarrow 0$, o $|Z_2| \ll |Z_1|$. Esta última ocurre cuando la dureza relativa de la capa inferior es mucho más alta que la dureza o viscosidad de la capa superior. Esto se cumple generalmente en la deposición de metales y polímeros en soluciones acuosas, debido a la baja viscosidad relativa del agua.

Si se toma la Eq. 29 y se especifica la capa 2 (superior) para un líquido newtoniano infinito se tiene:

$$Z_f = \frac{Z_2 + Z_1 \tanh k_1 d_1}{Z_2/Z_1 \tan k_1 d_1 + 1}$$

Eq. 31

En que $Z_2 = \sqrt{\rho G} = (1/\sqrt{2})(1+j) \bar{\rho} \bar{G}''$

**ANEXO C. MICROSCOPIÁS UTILIZADAS DURANTE EL DESARROLLO DEL LIBRO EN UN
TAMAÑO MAYOR**

