



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE SUSTITUTOS ÓSEOS
INYECTABLES A BASE DE FIBROÍNA Y NANOBARRAS DE
HIDROXIAPATITA**

María Alejandra Cárdenas Henao

Universidad de Antioquia
Facultad de ingeniería, Departamento de Bioingeniería
Medellín, Colombia
2020



Evaluación biológica de sustitutos óseos inyectables a base de fibroína y nanobarras de hidroxiapatita

María Alejandra Cárdenas Henao

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Bioingeniera

Asesora:
Jazmín Icelly González Ocampo
Ingeniera de Materiales, MSc, PhD.

Línea de Investigación:
Sustitutos óseos inyectables
Grupo de Investigación en Biomateriales BIOMAT

Universidad de Antioquia
Facultad de ingeniería, Departamento de Bioingeniería
Medellín, Colombia
2020

TABLA DE CONTENIDO

1	RESUMEN.....	4
2	INTRODUCCIÓN.....	5
3	OBJETIVOS.....	6
3.1	Objetivo general.....	6
3.2	Objetivos y específicos.....	6
4	MARCO TEÓRICO.....	7
4.1	Sistema óseo.....	7
4.2	Regeneración ósea:.....	8
4.3	Biomateriales:.....	9
5	METODOLOGÍA.....	12
5.1	Síntesis de las nanobarras de Hidroxiapatita:.....	12
5.2	Caracterización de las nanobarras de Hidroxiapatita:.....	13
5.2.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM):.....	14
5.2.2	Difracción de Rayos X (DRX):.....	14
5.2.3	Fluorescencia de rayos X (FRX):.....	14
5.2.4	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):.....	14
5.3	Extracción de la fibroína:.....	14
5.4	Caracterización de la fibroína:.....	15
5.4.1	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR): 16	
5.4.2	Calorimetría de barrido diferencial (DSC):.....	16
5.5	Fabricación de los sustitutos óseos inyectables:.....	16
5.6	Caracterización biológica de los sustitutos óseos inyectables:.....	17
5.6.1	Citotoxicidad:.....	17
5.6.2	Proliferación celular:.....	18
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	19
6.1	Síntesis de las nanobarras de Hidroxiapatita:.....	19
6.2	Caracterización de las nanobarras de Hidroxiapatita:.....	20
6.2.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM):.....	20
6.2.2	Difracción de Rayos X (DRX):.....	21
6.2.3	Fluorescencia de rayos X (FRX):.....	22
6.2.4	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):.....	23
6.3	Extracción de la fibroína:.....	23
6.4	Caracterización de la fibroína:.....	24
6.4.1	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR): 24	
6.4.2	Calorimetría de barrido diferencial (DSC):.....	25
6.5	Caracterización biológica de los sustitutos óseos inyectables:.....	26
6.5.1	Citotoxicidad:.....	26
6.5.2	Proliferación celular:.....	31
7	CONCLUSIONES.....	33
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

1 RESUMEN

Actualmente existe una creciente demanda de biomateriales que sean capaces de reemplazar o reparar el tejido dañado por pérdidas óseas causadas por accidentes, enfermedades y/o problemas congénitos, sin embargo, las técnicas utilizadas como los aloinjertos y autoinjertos, tienen variadas desventajas que incluyen más cirugías, infecciones, grandes tiempos de recuperación, enfermedades transmisibles y dolor, entre otras. Para ayudar a solucionar estos problemas las últimas tendencias incluyen el uso de sustitutos óseos sintéticos, que son estructuras que sirven de puente para la formación de hueso, tienen como funciones principales el relleno de cavidades o servir como soporte transitorio, están fabricados de biomateriales, los cuales deben cumplir una serie de características para ser implantados en el cuerpo humano tales como biocompatibilidad, bioabsorción, osteoconducción y osteoinducción; de ahí que, sean numerosas las investigaciones que buscan desarrollar nuevos materiales que puedan cumplir dichas funciones y requerimientos.

La combinación de polímeros biodegradables y cerámicos bioactivos da lugar a materiales compuestos con propiedades específicas que resultan de gran interés para este tipo de aplicaciones, por lo que en esta investigación se realizó la evaluación biológica de un material compuesto de nanobarras de hidroxiapatita y fibroína con potencial uso como sustituto óseo inyectable. Las nanobarras de hidroxiapatita fueron sintetizadas por el método combinado de reacción de precipitación y tratamiento hidrotermal, caracterizadas por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM), difracción de rayos X (DRX), fluorescencia de rayos X (FRX) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). Se obtuvieron partículas en tamaño nano y con geometría en barras, con fases y composición química típica de una hidroxiapatita, además de una relación Ca/P de 1.68. La fibroína fue extraída de capullos de gusano de seda *Bombyx Mori* y caracterizada a través de FTIR y calorimetría de barrido diferencial (DSC); los resultados evidenciaron que el protocolo de extracción es adecuado para la obtención de fibroína de seda con las características propias de dicha proteína.

Los sustitutos óseos inyectables fueron fabricados a partir de dos formulaciones con un 60 % (p/v) de hidroxapatita, porcentajes de fibroína de 1 y 1.5 % (v/v) y entrecruzados con glutaraldehído al 1 % (v/v) con respecto a la cantidad de polímero. Se realizó una caracterización biológica para evaluar la actividad celular que inducen *in vitro* dichos sustitutos, para esto, se utilizaron fibroblastos humanos en ensayos de citotoxicidad y proliferación celular. Los resultados mostraron que todos los tratamientos evaluados no son citotóxicos aunque no es clara la capacidad que tienen los sustitutos para inducir la proliferación de los fibroblastos.

2 INTRODUCCIÓN

Procesos naturales como la regeneración del tejido óseo, se ven afectados por diversos factores como la edad, accidentes y enfermedades degenerativas; en muchos de estos casos cuando se presentan pérdidas o defectos óseos, especialmente cuando se requiere ubicar implantes, es necesario el uso de injertos óseos que ayuden a restituir la pérdida del hueso. Actualmente existen diversas técnicas para la regeneración del tejido óseo que precisan el uso de autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos; no obstante, dificultades como la disponibilidad del tejido, compatibilidad de los mismos, infecciones y grandes períodos de recuperación, hacen necesario el uso de materiales bioactivos, biocompatibles, osteoconductivos y osteoinductivos, con las propiedades mecánicas adecuadas para interactuar con el tejido biológico [1].

Los sustitutos óseos son estructuras que sirven como relleno de cavidades y sostén transitorio para la formación del hueso; de ahí que, al estar fabricados a partir de biomateriales, sean numerosas las investigaciones en torno a ellos, como es el caso de compuestos de fosfatos de calcio y polímeros naturales con potencial aplicación en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos [2]; al combinar materiales de distinta naturaleza, se aprovechan las propiedades de cada uno para obtener las características finales deseadas. Considerando fosfatos de calcio como la hidroxapatita (HA) en combinación con polímeros naturales como la carragenina y la fibroína, se han obtenido sustitutos inyectables que presentan gran ligereza, resistencia a la corrosión y al ataque de agentes agresivos en el cuerpo,

lo que aumenta en gran magnitud la biocompatibilidad del compuesto [3].

La HA es un fosfato de calcio similar al componente mineral del hueso de los vertebrados, esto le confiere bioactividad y propiedades de reabsorción; también, la hidroxiapatita sintética posee propiedades semejantes a la natural, estabilidad físico-química, resistencia al desgaste y biocompatibilidad importantes en procesos de osteoconductividad y osteointegración [4]. Por otro lado, polímeros naturales como la fibroína permiten una buena biocompatibilidad y biodegradabilidad; además, debido a su naturaleza proteica puede comportarse como un componente natural de los tejidos corporales mejorando así las propiedades físicas y biológicas del sustituto [5].

En proyectos liderados por el grupo de investigación en Biomateriales BIOMAT, se ha desarrollado un material compuesto por fibroína y nanobarras de hidroxiapatita que tiene potencial aplicación como sustituto óseo [6]; asimismo, se ha evaluado la estabilidad química del sustituto y propiedades como mojabilidad e inyectabilidad [7]. Por lo tanto, considerando la aplicación de los sustitutos en la regeneración del tejido óseo, donde la interacción célula/material es crucial para el desempeño biológico, se desea realizar el estudio de la citotoxicidad y proliferación celular de los sustitutos, con el fin de evaluar la influencia del material fabricado en el comportamiento de las células; en primera instancia, sobre fibroblastos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad biológica de los sustitutos óseos inyectables a base de fibroína y nanobarras de hidroxiapatita.

3.2 Objetivos y específicos

- Sintetizar y caracterizar las nanobarras de hidroxiapatita obtenidas por medio de precipitación química y tratamiento hidrotérmal.
- Caracterizar la fibroína extraída de los capullos de gusano de seda.
- Evaluar la citotoxicidad y proliferación celular de los sustitutos óseos fabricados.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Sistema óseo

El tejido óseo está constituido por los huesos del esqueleto, cartílagos, ligamentos y otros tejidos conjuntivos que dan estabilidad e interconexión al sistema. El esqueleto además de ser el apoyo estructural de los músculos, cumple otras funciones vitales como almacenamiento de sales cálcicas, producción de células sanguíneas, apalancamiento de las fuerzas generadas por los músculos y protección de tejidos y órganos. Casi las dos terceras partes del peso del hueso corresponden al fosfato cálcico, que interactúa con el hidróxido de calcio para formar cristales de hidroxiapatita, los cuales son relativamente rígidos, resistentes a la compresión, pero con baja resistencia a la flexión, torsión e impactos; el tercio restante del peso del hueso procede de las fibras colágenas, que poseen flexibilidad y favorecen la resistencia ósea frente a la tensión, sin embargo, presentan problemas ante la compresión [8].

El hueso contiene una población característica de células que incluye: las células osteoprogenitoras, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Las células osteoprogenitoras, se pueden dividir para producir nuevas células hijas que se diferencian en osteoblastos, que son células de forma cúbica encargadas de segregar los componentes orgánicos de la matriz ósea y son los responsables de la producción del hueso nuevo; por otra parte, los osteoclastos son células grandes multinucleadas encargadas de segregar ácidos mediante la exocitosis de los lisosomas. Finalmente, los osteocitos son los que mantienen y controlan el contenido de proteínas y minerales que hay en la matriz a su alrededor; mantener el balance entre las actividades de los osteoblastos y osteoclastos es de vital importancia dado que, cuando la eliminación de las sales cálcicas es mayor al depósito de los osteoblastos, los huesos se debilitan, en cambio, si la actividad de los osteoblastos predomina, los huesos se vuelven más sólidos y macizos [9].

Asimismo, hay dos tipos de tejido óseo: hueso compacto y hueso esponjoso; el primero, es relativamente denso y sólido, mientras que el segundo forma una red espaciosa de espolones y láminas gruesas ramificadas denominadas trabéculas o espículas; ambos están presentes en cualquier hueso típico del esqueleto [9]. El hueso compacto forma las paredes de la cavidad medular y está rodeado

por una capa interna de hueso esponjoso como se observa en la Figura 1; también, se evidencia la cavidad medular que contiene la médula ósea, en ésta predominan los adipocitos o médula amarilla y las células progenitoras también llamadas médula roja. Se debe agregar que, en lo que respecta a las células específicas, la estructura y la composición de las laminillas del hueso compacto no difiere del esponjoso; aunque, la ligereza de este último, se debe la ramificación espaciosa de sus trabéculas, que además de aligerar el esqueleto, facilita el movimiento en conjunto de músculos y huesos [8].

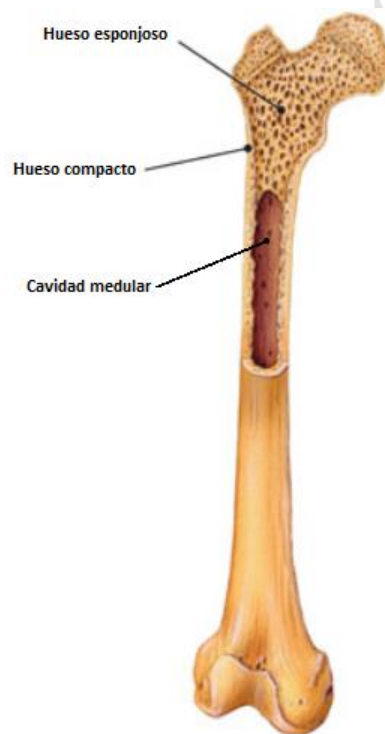


Figura 1. Estructura macroscópica del hueso humano [9].

4.2 Regeneración ósea:

El crecimiento de hueso ocurre cuando los osteoblastos generan más matriz ósea que la eliminada por los osteoclastos, ambos permanecen activos a lo largo de toda la vida; sin embargo, el equilibrio en su actividad se altera con el paso de los años, en los adultos jóvenes, el ritmo de formación ósea iguala al de la absorción y la velocidad del recambio mineral es considerablemente alta, no obstante, en los adultos mayores, los osteoblastos pierden más actividad que los osteoclastos, por tanto, la remodelación y reparación ósea puede acarrear cambios en la forma o en la arquitectura interna de los huesos y también en la cantidad total de minerales depositados en el

esqueleto [11]. Es así que, en la regeneración ósea se emplean diversos tipos de injertos para la restauración de defectos óseos y fracturas; en primer lugar, se encuentran los autoinjertos, que son trasplantes de órganos o tejidos del mismo paciente, cuando son trasplantes entre individuos de la misma especie, se conoce como aloinjertos y los xenoinjertos, que son trasplantes entre dos especies diferentes. No obstante, estas técnicas presentan desventajas relacionadas con la morbilidad en el sitio de extracción, reabsorción no controlada del injerto, disponibilidad de donantes y riesgo inminente de transmisión de enfermedades, es por esto que, la ingeniería de tejidos como combinación de diversas áreas del conocimiento busca desarrollar materiales sintéticos totalmente biocompatibles cuyo objetivo sea mejorar, reparar o sustituir la función de tejidos y órganos que han sufrido daño parcial o total [12].

4.3 Biomateriales:

La ingeniería de tejidos basa sus principios en el uso de biomateriales, que son materiales naturales o sintéticos que pueden estar en contacto con un organismo vivo de manera intra o extra corporal sin causar una reacción adversa; estos materiales son empleados tanto en la sustitución ya sea parcial o total de partes del cuerpo humano como en dispositivos médicos [13]. En los biomateriales existe una relación directa entre la estructura interna, las propiedades y las funciones, lo cual determina su aplicabilidad; el diseño de cada biomaterial está sujeto a las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas requeridas por el órgano o tejido hospedero, características superficiales del sitio de implantación, sin provocar algún daño o alteración en el organismo [15].

Los biomateriales usados en medicina pueden ser clasificados según su naturaleza química en metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos. Los materiales metálicos son usados debido a sus buenas propiedades mecánicas, son buenos conductores del calor y la electricidad, poseen alta densidad, tienen una elevada capacidad de reflexión de la luz; algunos son empleados como sustitutos de tejidos duros en el reemplazo total cadera y articulaciones de rodillas, en placas y tornillos requeridos en restauración de fracturas óseas; además de proveer soporte, aportan osteointegración, de ahí que, sean utilizados en dispositivos de fijación vertebral y en implantes dentales, no obstante, la corrosión de los metales es un limitante en la biocompatibilidad del material [15]. Los

cerámicos son materiales inorgánicos constituidos por elementos metálicos y no metálicos enlazados mediante enlaces iónicos y/o covalentes; son típicamente duros y frágiles con baja tenacidad y ductilidad, buenos aislantes eléctricos y térmicos, poseen temperaturas de fusión y estabilidad relativamente altas [10]. Si bien, el uso de los cerámicos es limitado debido a la susceptibilidad del material a fisuras y la baja resistencia tanto a la tensión como al impacto, se han desarrollado técnicas innovadoras de fabricación de cerámicas avanzadas que permite ampliar el abanico de aplicaciones, específicamente en material de ortopedia y odontología, considerando la alta resistencia a la compresión y fluidos biológicos, además de la buena apariencia en relación con los dientes naturales [4].

Por otra parte, los polímeros son macromoléculas que se forman por la unión de pequeñas moléculas a través de enlaces covalentes primarios con una estructura principal, que se repiten hasta formar una molécula más grande y compleja, estos pueden ser de origen natural o sintético [14]. La principal ventaja de estos materiales respecto a los metales y cerámicos, es la facilidad de fabricación en diversas geometrías; además, se destaca la degradación, la flexibilidad en métodos de síntesis y disponibilidad de propiedades mecánicas y físicas según sean requeridas. Por consiguiente, son innumerables las aplicaciones en la industria farmacéutica y en medicina que van desde dispositivos extracorpóreos hasta implantes [16].

Por último, se encuentran los materiales compuestos, que son combinaciones entre metales, cerámicos y polímeros. De modo que, las propiedades del material dependen en gran medida de la homogeneidad de sus fuentes, por tanto, al variar el tipo del material tanto de la matriz como del refuerzo, se obtiene una diversa gama de propiedades mecánicas y biológicas, así que, se optimiza la estructura, funcionamiento e interacción del material con los tejidos circundantes siendo ventaja en comparación a los materiales tradicionales; sin embargo, considerando un biomaterial compuesto, es fundamental que cada componente sea biocompatible y que se garantice la integridad de la interfaz del material al estar en contacto con el medio deseado [17]. Las principales aplicaciones de los biomateriales compuestos, comprenden generalmente la unión de cerámicos y polímeros para la fabricación de cementos óseos, plataformas de

crecimiento para regeneración de diferentes tejidos y agentes de relleno sobre todo para aplicaciones dentales, implantes de hueso, entre otros [14]. En particular, los sustitutos óseos están compuestos por dos o más materiales que cumplen la función de reemplazar el hueso, poseen ciertas propiedades como biocompatibilidad y bioactividad; se considera inyectable, cuando posee la viscosidad necesaria para ser pasado por un dispositivo de inyección y consiste principalmente en una fase granulosa o sólida inmersa en una matriz que permite la fácil extrusión del material. Con éstos no se requiere que el paciente pase por una cirugía invasiva puesto que la aplicación del material es *in situ*, por lo cual, se garantiza buena recuperación; entre ellos se pueden encontrar suspensiones, emulsiones y cementos óseos [18].

El material objeto de estudio en esta tesis es un compuesto de nanohidroxiapatita y fibroína de seda. El componente cerámico de dicho compuesto es la hidroxiapatita (HA), la cual hace parte de la familia de biocerámicos conocidos como apatitas, que son compuestos que tienen estructuras similares pero diferente composición química basado en las proporciones de calcio y fósforo que poseen, la relación estequiométrica de Ca/P es de 1,67 y tiene una densidad teórica de 3,16 g/cm³. La HA es un fosfato de calcio con composición similar a la parte mineral del hueso, presenta biocompatibilidad, estabilidad físico-química, alta resistencia al desgaste, biodegradabilidad lenta, osteoconducción y osteoinducción [4].

La hidroxiapatita se puede encontrar de forma natural en corales marinos o se puede obtener por medio de síntesis, empleando diversas técnicas de vía húmeda, hidrotermal, sol-gel, coprecipitación, entre otras; cada proceso da lugar a hidroxiapatita con diferentes tamaños de partícula y morfologías. Para el presente estudio, la HA se sintetiza por medio de una precipitación química con posterior tratamiento hidrotermal, proceso a alta temperatura y presión; por este método se obtienen polvos de HA que a determinadas condiciones presentan geometrías y tamaño de partículas definidos [19].

Por otro lado, como matriz del material compuesto se emplea la fibroína de seda (SF), que es un biopolímero de naturaleza proteica proveniente de la seda de diferentes insectos principalmente arácnidos y larvas de gusanos de seda y representa entre un 72 a 81% del componente

proteico de la seda [5]; consiste en una secuencia de aminoácidos, principalmente serina, alanina y glicina que conforman dos estructuras principales: láminas β y helicoidal o α helicoidal. Está constituida por dos cadenas, una liviana y una pesada unidas por enlaces disulfuro, los dominios hidrófobos de la cadena pesada se repiten para formar la estructura de láminas β , mientras que la cadena liviana es hidrofóbica por naturaleza y relativamente elástica; ambas en conjunto le confieren a la fibroína del gusano *Bombyx mori* buenas propiedades mecánicas, además es biocompatible [20].

Entre los principales usos de la fibroína se destaca la formación de películas, micro y nanofibras por electrohilado, hidrogeles, scaffolds porosos, micro y nanopartículas, con aplicaciones para regeneración de diferentes tejidos [5]. Asimismo, la aplicación de la fibroína de seda en materiales compuestos para ingeniería de tejido óseo, se ha incrementado en los últimos años debido a su buen desempeño con las células óseas y su habilidad para permitir la regeneración del tejido [20].

De manera que, en este proyecto se desea evaluar la actividad celular de fibroblastos en contacto con el material compuesto por fibroína extraída del gusano de seda *Bombyx mori* y nanohidroxiapatita sintetizada, el cual servirá como sustituto óseo inyectable, donde la fibroína será el vehículo para el transporte de las partículas cerámicas.

5 METODOLOGÍA

5.1 Síntesis de las nanobarras de Hidroxiapatita:

Para la obtención de las nanobarras, se siguió el protocolo establecido en el Grupo de investigación en Biomateriales BioMat, a partir de los resultados alcanzados por Buitrago [6].

El proceso se inició con una reacción de precipitación donde se emplearon como agentes precursores, nitrato de calcio tetrahidratado $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ grado analítico marca Panreac y fosfato diamónico $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ grado analítico marca Carlo Erba, fuentes de calcio y fósforo respectivamente; fueron preparados en soluciones separadas garantizando una relación Ca/P de 1.67 y pH a 10 que fue ajustado con amoníaco al 25%.

La solución con fuente de fósforo fue goteada sobre la solución con fuente de calcio a velocidad controlada, en agitación magnética constante y a temperatura ambiente; seguidamente, se hizo un tratamiento hidrotérmal en un recipiente hermético de teflón a 180°C durante 24 horas, luego se hicieron lavados con agua destilada y posteriormente la solución fue dispuesta para el secado a 60°C por 12 horas, transcurrido este tiempo el producto fue macerado y almacenado. El protocolo es mostrado detalladamente en la Figura 2.

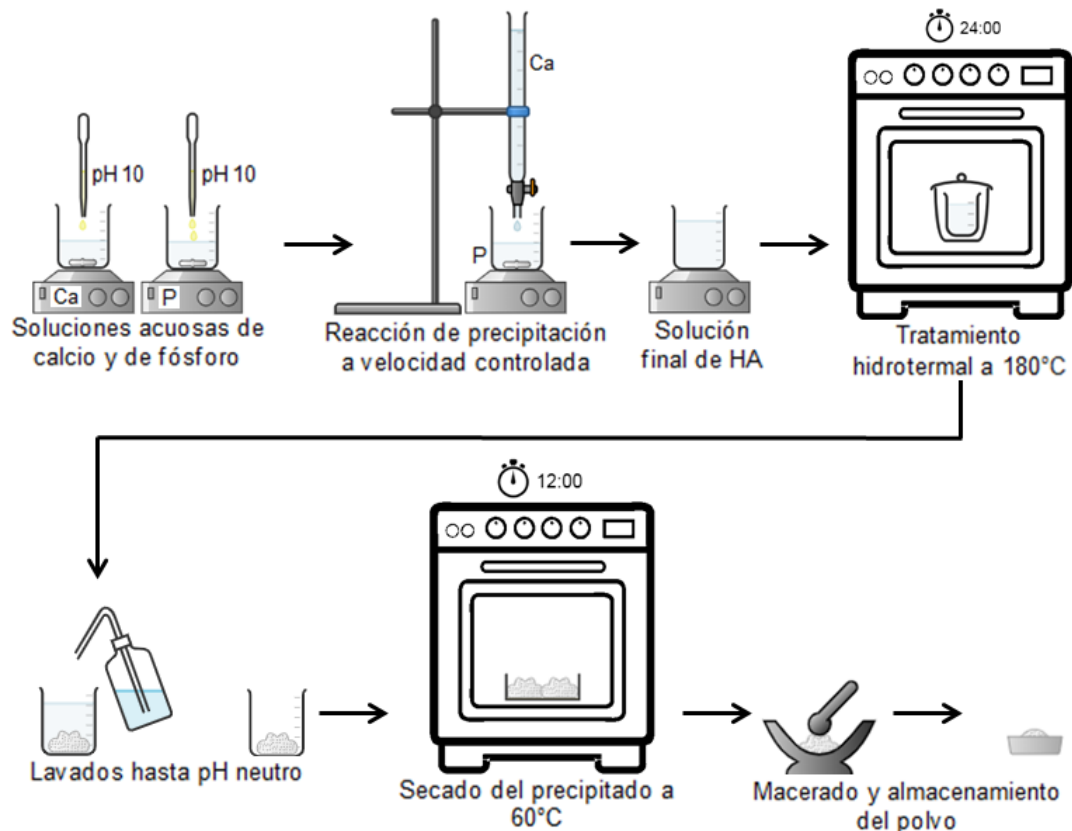


Figura 2. Esquema del protocolo establecido para la síntesis de nanobarras de hidroxiapatita.

5.2 Caracterización de las nanobarras de Hidroxiapatita:

Los polvos de HA resultantes, fueron caracterizados por medio de difracción de rayos X (DRX), fluorescencia de rayos X (FRX), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopia electrónica de barrido (SEM).

5.2.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM):

La morfología de las partículas se observó en un microscopio electrónico de barrido (termoiónico) JEOL-JSM 6490LV.

5.2.2 Difracción de Rayos X (DRX):

La identificación de las fases cristalinas del material obtenido se llevó a cabo en un difractómetro de rayos X marca Rigaku con fuente de Cu, en un ángulo entre 5° y 60°.

5.2.3 Fluorescencia de rayos X (FRX):

El análisis de la composición química de la HA obtenida, se hizo de manera semicuantitativa en el equipo Thermo ARL Optim'X WDXRF, en condiciones de humedad y temperatura de 57% y 22.2°C respectivamente.

5.2.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):

Los grupos funcionales y componentes principales del polvo obtenido, se determinaron por medio de un análisis infrarrojo mediante ATR usando un equipo Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR Spectrometer en un rango de barrido entre 400 y 4000 cm^{-1} y un número de ciclos de 24.

5.3 Extracción de la fibroína:

La extracción de la fibroína se hizo a partir de capullos de gusano de seda *Bombyx Mori*; el protocolo seguido fue planteado por Echeverri *et al.* [20] y optimizado por el Grupo de investigación en Biomateriales BioMat.

Los capullos se cortaron en trozos de 1 cm^2 , seguidamente, se preparó una solución de carbonato de sodio marca Químicos JM, (relación 2/5 respecto al peso de los capullos) y se dejó en agitación magnética a 80°C, se agregaron los capullos y se mantuvo la solución en agitación por aproximadamente 3 horas, posteriormente se retiraron y lavaron con agua destilada hasta conseguir el desgomado de la fibroína.

Luego, se preparó una solución de cloruro de calcio grado analítico marca Panreac y etanol grado analítico marca Sigma-Aldrich, cuando la temperatura estuvo entre 45° y 55°C, se adicionó la fibroína en relación 5 %(p/v) y se mantuvo en agitación hasta que se disolvió completamente. Finalmente, la solución de fibroína fue dispuesta en

membranas de acetato de celulosa, las cuales fueron sumergidas en agua destilada para promover el proceso de diálisis, se hizo cambio de agua cada 2 horas el primer día, cada 6 horas en el segundo día y finalmente 2 veces en el tercer día.

Como la concentración de la solución de fibroína obtenida al finalizar el proceso de diálisis era desconocida, se calculó a partir del peso obtenido al secar muestras de la solución; sin embargo, al ser inferior de la requerida se evaporó el agua hasta conseguir concentraciones de 1 y 1.5 % (v/v). El protocolo se sintetiza en la Figura 3.

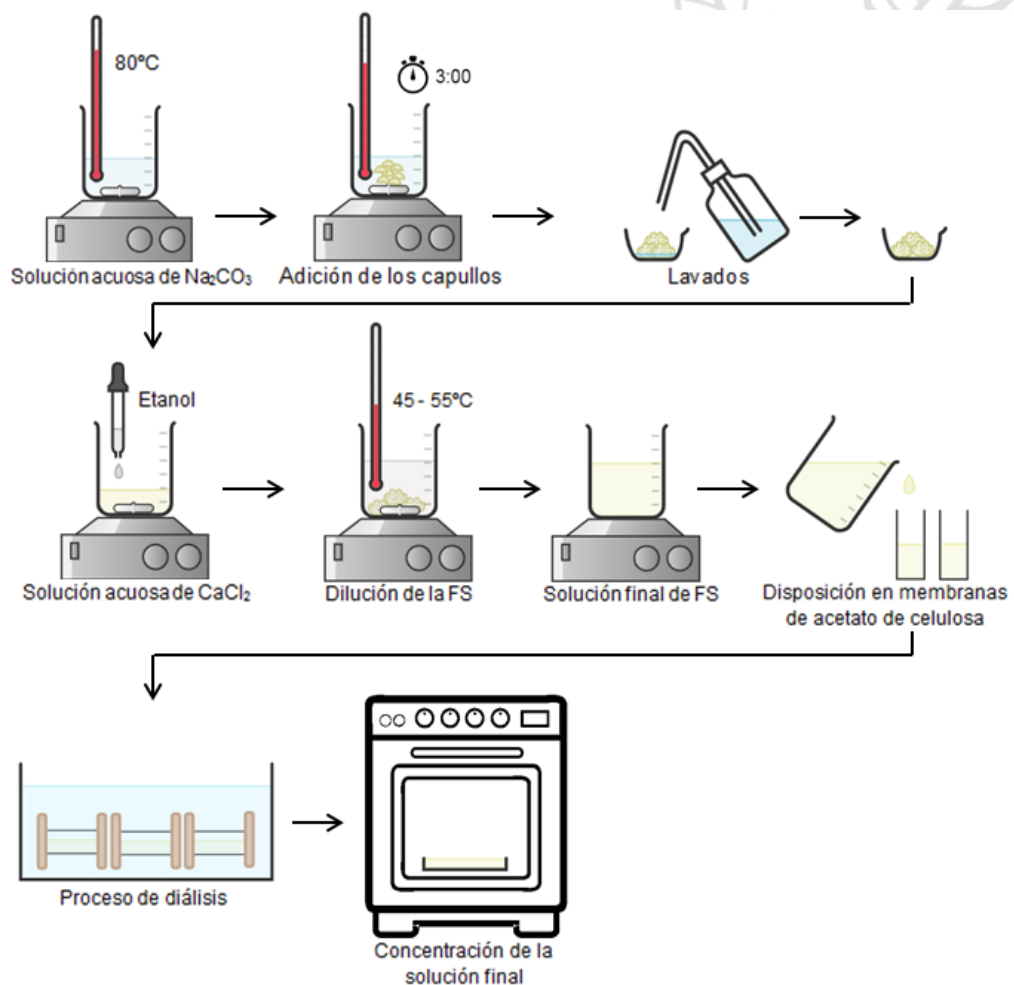


Figura 3. Esquema del protocolo para la extracción de fibroína de seda.

5.4 Caracterización de la fibroína:

La solución de fibroína fue caracterizada por medio de análisis por espectroscopia infrarroja (FTIR) y calorimetría de barrido diferencial (DSC).

5.4.1 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):

Se determinaron los grupos funcionales de la fibroína extraída, haciendo un análisis del espectro infrarrojo en un equipo Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR Spectrometer en un rango de barrido entre 4000 – 450 cm^{-1} , durante 24 ciclos.

5.4.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC):

Se determinó la estabilidad y desempeño del material al variar la temperatura de manera súbita, en un equipo DSC Q200 V24.10 build 122 de TA Instruments en atmósfera de nitrógeno y con una velocidad de calentamiento de 20°C/min.

5.5 Fabricación de los sustitutos óseos inyectables:

Los sustitutos se fabricaron con dos concentraciones de fibroína: 1 y 1.5 % (v/v); 60 % (p/v) de hidroxapatita y 1 % (v/v) de glutaraldehído, con respecto a la cantidad de fibroína empleada.

El proceso se inició con la dilución de la fibroína en agua destilada, seguidamente y en agitación magnética se adicionó el glutaraldehído como entrecruzante; después, se agregó la hidroxapatita de manera controlada; la solución final se dejó en agitación magnética constante, cuando la mezcla tomó consistencia viscosa, se mezcló manualmente.

Posteriormente, la mezcla se dispuso en jeringas de 1 ml y se almacenó durante dos horas para garantizar el entrecruzamiento; finalmente, se hizo el moldeado manual de los sustitutos en forma de cilindros de 6 mm de alto por 5 mm de diámetro. En la Figura 4 se muestra el proceso para la fabricación de los sustitutos.

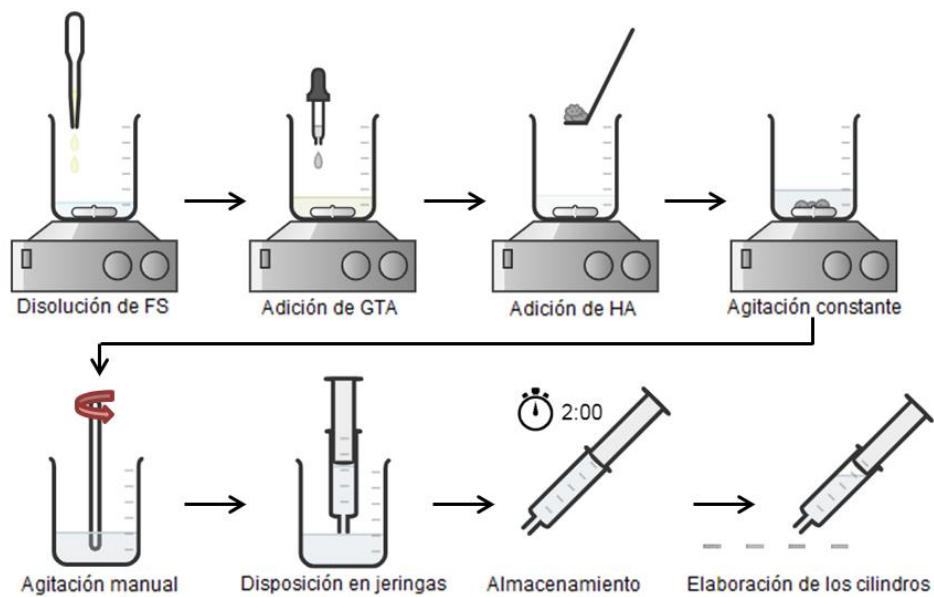


Figura 4. Esquema de la fabricación del sustituto óseo.

5.6 Caracterización biológica de los sustitutos óseos inyectables:

Para las pruebas biológicas, se usaron fibroblastos humanos primarios incubados a 37°C con 5% de CO₂ y cilindros de los sustitutos que fueron esterilizados usando óxido de etileno e irradiación UV, con el fin de evaluar si existe influencia del método de esterilización en el comportamiento del material. Las evaluaciones correspondientes para cada prueba se hicieron por triplicado y dos veces y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante las herramientas del programa Matlab versión 2017a.

5.6.1 Citotoxicidad:

La toxicidad de los sustitutos sobre los fibroblastos, se evaluó por medio del ensayo del MTT (MMT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) Cell Proliferation Assay Kit, Cayman CHEMICAL). En este ensayo, se cuantificó la viabilidad de las células midiendo la actividad metabólica de la deshidrogenasa mitocondrial.

En primer lugar, se sembraron los pozos respectivos con células (10.000 células por pozo) y los pozos de los límites del plato se dejaron vacíos (color gris), el plato se incubó por 24 horas; también, se depositaron los cilindros del material en el medio de cultivo, en relación 0.1 g/ml y se incubaron durante 24 horas. Luego, se retiró todo el medio de los pozos, se agregaron 100 µl del tratamiento respectivo en cada uno, de acuerdo a las diluciones pertinentes y se incubaron por 24 horas; como

control negativo se utilizó el medio de cultivo y dimetilsulfóxido como control positivo, este último impide el crecimiento celular. En la Tabla 1 se ilustra el diseño experimental del plato de cultivo; los 4 tratamientos utilizados fueron nombrados como T1, T2, T3, T4, las especificaciones de estos se indican en la Tabla 2.

Tabla 1. Diseño experimental del plato para el ensayo de citotoxicidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A											
B		Control negativo	T1 25%	T1 75%	T2 25%	T2 75%	T3 25%	T3 75%	T4 25%	T4 75%	
C		Control negativo	T1 25%	T1 75%	T2 25%	T2 75%	T3 25%	T3 75%	T4 25%	T4 75%	
D		Control negativo	T1 25%	T1 75%	T2 25%	T2 75%	T3 25%	T3 75%	T4 25%	T4 75%	
E		Control positivo	T1 50%	T1 100%	T2 50%	T2 100%	T3 50%	T3 100%	T4 50%	T4 100%	
F		Control positivo	T1 50%	T1 100%	T2 50%	T2 100%	T3 50%	T3 100%	T4 50%	T4 100%	
G		Control positivo	T1 50%	T1 100%	T2 50%	T2 100%	T3 50%	T3 100%	T4 50%	T4 100%	
H											

Tabla 2. Especificaciones de los tratamientos evaluados.

Tratamientos	%(v/v) FS	Método de Esterilización
T1	1.0	Óxido de etileno
T2	1.5	Óxido de etileno
T3	1.0	Radiación UV
T4	1.5	Radiación UV
Diluciones	%(v/v) Extracto	%(v/v) Medio
25%	25	75
50%	50	50
75%	75	25
100 %	100	0

Posteriormente, se removió el medio de todos los pozos y se agregaron 50 µl de la solución MTT en cada uno, se incubó durante 2 horas en agitación constante; a continuación, se retiró el MTT, se agregaron 100 µl de isopropanol y se agitó por 20 min. Finalmente, se hicieron las lecturas con un lector ELISA a 570 nm; la viabilidad celular, se determinó comparando los valores de absorbancia resultantes con los respectivos controles de la prueba.

5.6.2 Proliferación celular:

Para empezar, se sembraron los pozos respectivos con células (2.000 células por pozo) y los pozos de los límites del plato se dejaron vacíos

(color gris); a su vez, se depositaron los cilindros del material en el medio de cultivo, en relación 0.1 g/ml, el plato de cultivo y los cilindros se incubaron durante 24 horas. Luego, se retiró todo el medio de los pozos, se agregaron 100 µl del tratamiento respectivo en cada uno y se incubaron por 24 horas; como control negativo se utilizó el medio de cultivo y dimetilsulfóxido como control positivo, este último impide el crecimiento celular. En la Tabla 3 se ilustra el diseño experimental del plato de cultivo y las especificaciones de los tratamientos se indican en la Tabla 4.

Tabla 3. Diseño experimental del plato para el ensayo de proliferación.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B		Control negativo	Control positivo	T1 100%	T2 100%	T3 100%	T4 100%	
C		Control negativo	Control positivo	T1 100%	T2 100%	T3 100%	T4 100%	
D		Control negativo	Control positivo	T1 100%	T2 100%	T3 100%	T4 100%	
E								

Tabla 4. Especificaciones de los tratamientos evaluados.

Tratamientos	%(v/v) FS	Método de Esterilización
T1	1.0	Óxido de etileno
T2	1.5	Óxido de etileno
T3	1.0	Radiación UV
T4	1.5	Radiación UV

Se hicieron revisiones a las 24, 48 y 72 horas, en cada día se removió el medio de todos los pozos, se agregaron 50 µl de la solución MTT y se incubó durante 2 horas en agitación constante; seguidamente, se retiró el MTT, se agregaron 100 µl de isopropanol y se agitó por 20 min. Por último, se hicieron las lecturas con un lector ELISA a 570 nm; la viabilidad celular, se determinó comparando los valores de absorbancia resultantes con los respectivos controles de la prueba.

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Síntesis de las nanobarras de Hidroxiapatita:

Como se mencionó anteriormente, para la síntesis de nanobarras hidroxiapatita, se siguió el protocolo establecido en el Grupo de investigación en Biomateriales BioMat. Usando dicho protocolo, se realizaron 15 síntesis en total, dos de ellas presentaron irregularidades

dado que el recipiente de teflón de uno de los reactores empleados no estaba bien sellado; de manera que, durante el tratamiento hidrotérmal no se efectuaron las condiciones definidas y al momento del secado no se obtuvo una superficie uniforme, por ende no cumplía con las especificaciones del proceso. No obstante, en el resto de síntesis se logró una capa regular y posterior al macerado, se obtuvo un polvo blanquecino con las características macroscópicas requeridas.

6.2 Caracterización de las nanobarras de Hidroxiapatita:

6.2.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM):

En la Figura 5, se presentan las imágenes SEM obtenidas para los polvos resultantes de dos de las síntesis realizadas; en el polvo de hidroxiapatita se observan diferentes aglomerados y dentro de ellos partículas de varios tamaños pero con igual morfología de barras.

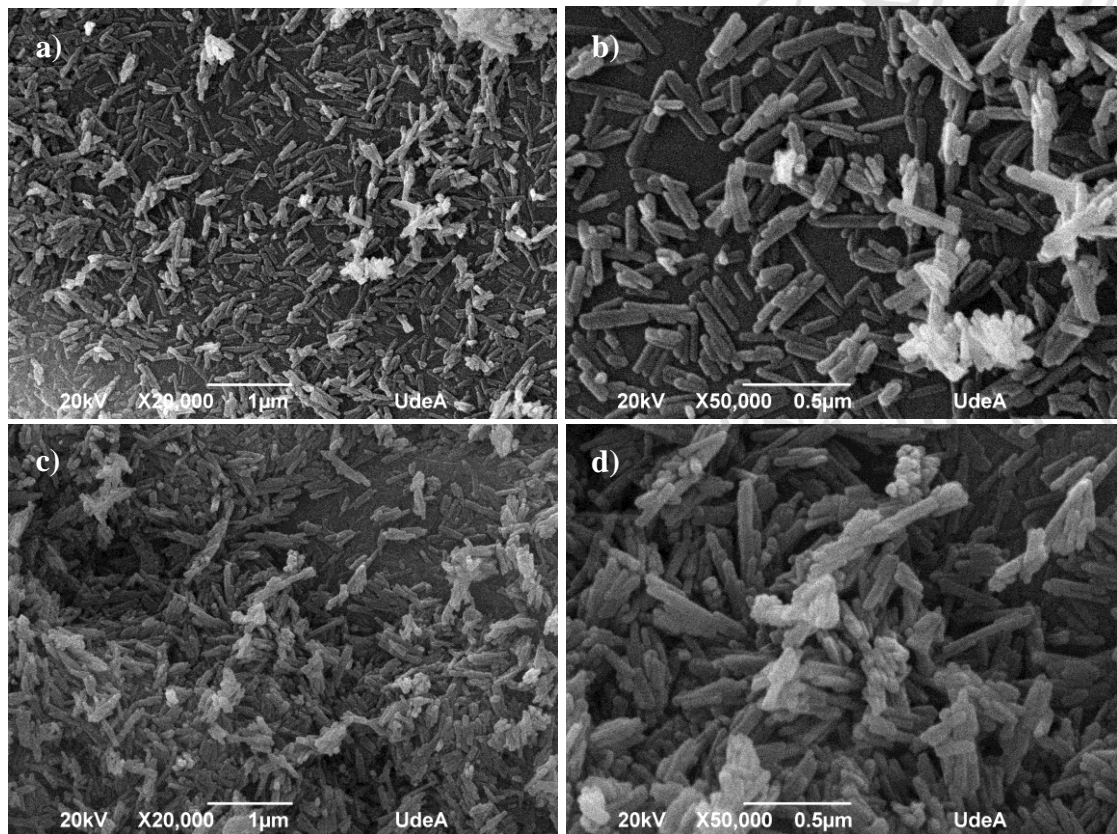


Figura 5. Micrografías SEM para los polvos de HA obtenidos.
a) Síntesis 11-20000X, b) Síntesis 11-50000X, c) Síntesis 12-20000X y d) Síntesis 12-50000X

La morfología en nanobarras, es representativa de los polvos obtenidos por el método hidrotérmal, en el cual, dependiendo de la variación de

parámetros como temperatura, tiempo y pH, se pueden conseguir desde nanopartículas hasta nanoestructuras en 3D [22]. En este caso, las nanobarras presentaron longitudes variables entre 230 y 490 nm y diámetros entre 44 y 60 nm, por ende, se puede decir que se lograron nanobarras con tamaños comparables a estudios donde emplean metodologías similares; en primer lugar, en la investigación de Zhao *et al.* (2014), sintetizaron nanobarras de HA por medio de tratamiento hidrotermal, variando la temperatura (120, 150 y 180 °C) y tiempo de reacción (3, 12 y 24 h), las nanobarras conseguidas presentaron longitudes variables y diámetros alrededor de los 40 nm, de ahí, se concluye que los tratamientos hidrotermales cortos permiten la estabilización de la morfología deseada [23]. Ahora bien, respecto al protocolo desarrollado por Buitrago *et al.* (2014) en el grupo de investigación en el que se determinaron los parámetros óptimos para la formación de nanobarras de hidroxiapatita, temperatura de 180 °C por 24 h en tratamiento hidrotermal, los resultados fueron comparables puesto que las nanobarras conseguidas tuvieron diámetros entre 25 y 200 nm, con longitudes variables [24]; además, posteriormente Buitrago *et al.* (2017) obtuvieron nanobarras con dimensiones en promedio de 240 y 40 nm para longitud y diámetro respectivamente [6].

6.2.2 Difracción de Rayos X (DRX):

En la Figura 6, se presentan tres DRX correspondientes a muestras elegidas aleatoriamente de todas las síntesis realizadas para la obtención del polvo de nanohidroxiapatita; todos los difractogramas fueron comparados con el patrón JCPDS 72-1243 de HA reportado en la literatura con el objetivo de analizar la correspondencia de los picos principales y secundarios [25].

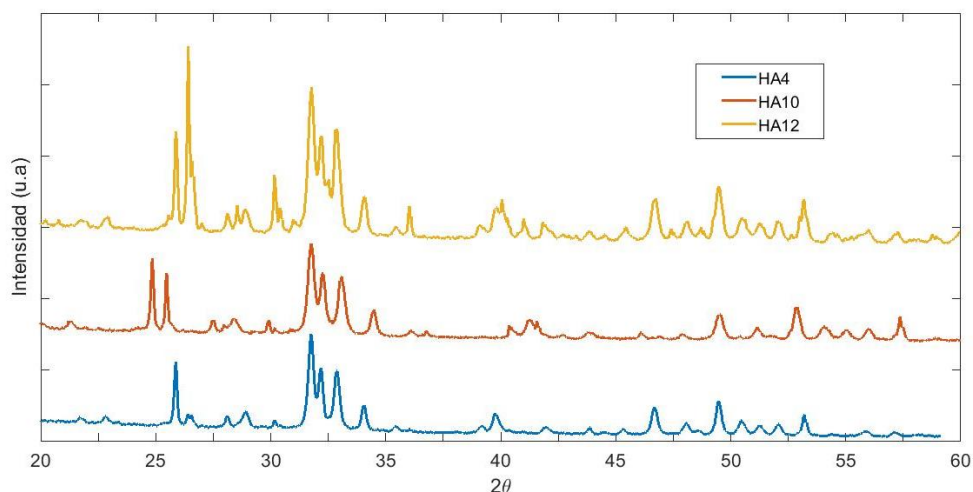


Figura 6. Difractograma de los polvos de HA obtenidos para las síntesis 4, 10 y 12.

Se observan los picos principales característicos de este material en $2\theta=31.8, 32.3$ y 33° ; además, se evidencian picos secundarios en $2\theta=26, 26.5, 30.5, 46.8, 49.5$ y 53.5° algunos otros de menor intensidad en $2\theta=28.6, 30.18, 34, 36.3, 39.8$ y 40.3° que indican la presencia aparente de otros fosfatos de calcio, específicamente, en la síntesis HA10, se observa un pico en $2\theta=25.37^\circ$ correspondiente a un pico secundario de fosfato tricálcico y en la síntesis HA12 un pico en $2\theta=30.18^\circ$ respectivo al fosfato dicálcico [22].

6.2.3 Fluorescencia de rayos X (FRX):

Por medio del análisis semicuantitativo, se determinó la composición química de la hidroxiapatita; se encontró una cantidad de 40,79 % en peso de calcio y 18,71 % en peso de fósforo, lo que da una relación molar Ca/P de 1,68, muy cercana al valor de 1,67 de la HA estequiométrica [6]. El valor de la relación Ca/P, da una idea de cómo será la solubilidad del material dentro del cuerpo, esto es, para relaciones Ca/P muy bajas, el material suele ser muy soluble, generando un medio ácido que podría afectar el funcionamiento celular; en cambio, para relaciones Ca/P muy altas, debido al alto contenido de calcio, pueden tardar mucho tiempo en reabsorberse, generando así calcificaciones [22]. Por tanto, la relación Ca/P del polvo de HA sintetizada, es adecuada para su uso como biomaterial [6].

6.2.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR):

La determinación de los grupos funcionales asociados al polvo se hizo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. En la Figura 7 se muestra el espectro correspondiente al polvo de HA.

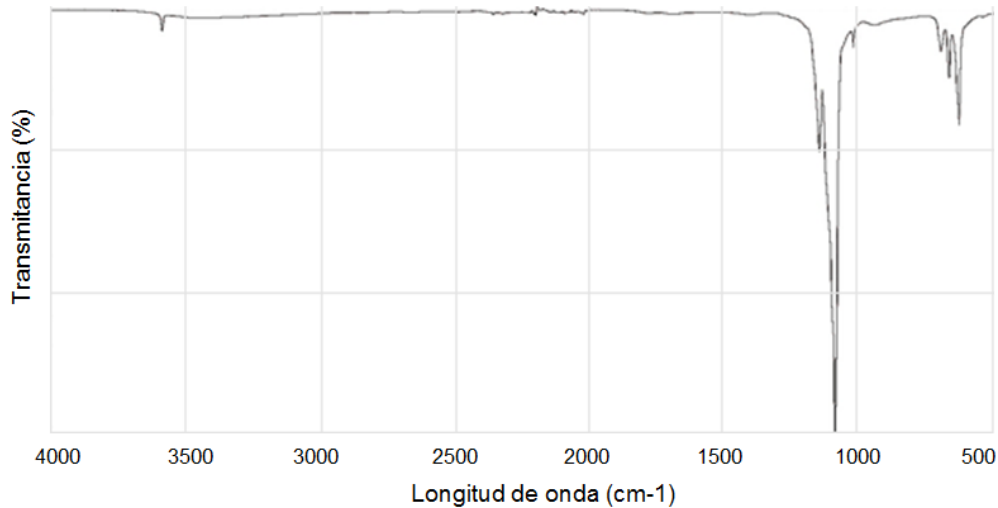


Figura 7. Espectro infrarrojo para el polvo de HA.

En el espectro se observan bandas en 3570 y 625 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales hidroxilo OH^- y bandas en 1090, 1036, 670 y 660 cm^{-1} correspondientes a grupos funcionales fosfato PO_4^{3-} . Una HA típica presenta generalmente bandas en (3578, 3571, 3448 y 633) cm^{-1} correspondientes al grupos OH^- , bandas en (472, 561, 574, 601, 692, 962, 1032, 1040, 1087 y 1094) cm^{-1} propias de los grupos PO_4^{3-} y bandas en (870, 1416, 1465, 1480 y 1638) cm^{-1} si la muestra contiene grupos CO_3^{2-} [26]. Es así que los resultados son comparables con estudios donde se emplean metodologías similares; en la investigación de Buitrago *et al.* (2017), para la HA sintetizada por el observaron bandas en 3570 y 605 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales hidroxilo OH^- y bandas en 1064, 1018, 962, 599 y 561 cm^{-1} correspondientes a grupos funcionales fosfato PO_4^{3-} [6]. Por lo que se concluye que el espectro infrarrojo de la hidroxiapatita sintetizada en este trabajo tiene las bandas características de una HA y por tanto la composición química correspondiente.

6.3 Extracción de la fibroína:

Usando el protocolo establecido para la extracción de fibroína, se obtuvo una solución acuosa de baja concentración, por tanto, fue

necesario concentrar el material de manera que fuera posible la caracterización del mismo; la solución se llevó a congelación y posteriormente fue liofilizada durante 72 horas, con lo que se consiguió un scaffold de sólo fibroína apto para las caracterizaciones planteadas.

6.4 Caracterización de la fibroína:

6.4.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR):

En la Figura 8 se presenta el espectro infrarrojo para la fibroína obtenida por el método de extracción descrito anteriormente; la región de interés para este tipo de material se encuentra generalmente entre 1000 y 1800 cm^{-1} , siendo la zona característica de las amidas principales presentes en la estructura molecular de la fibroína [27].

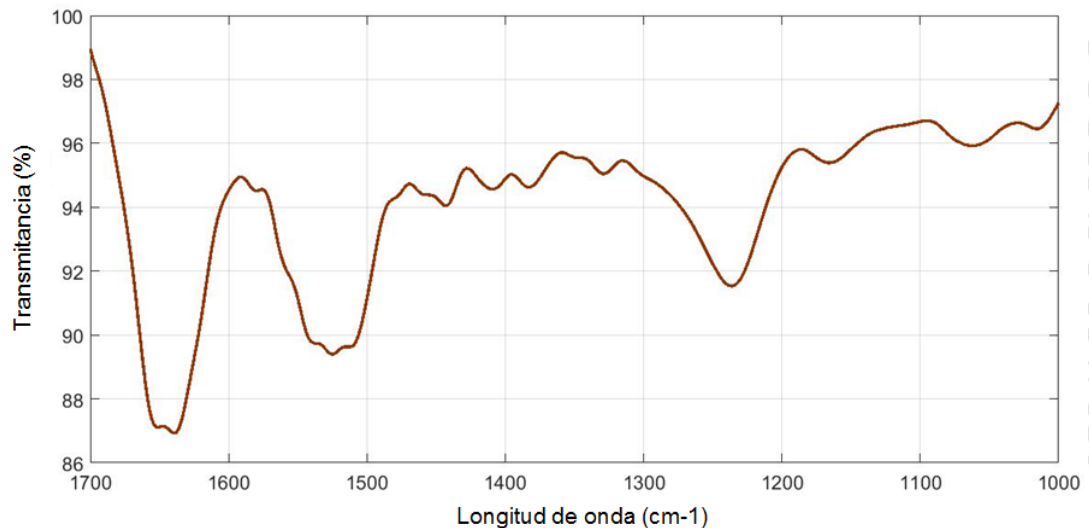


Figura 8. Espectro infrarrojo para el scaffold de fibroína.

En el espectro se observan las bandas aproximadas características de la fibroína, esto es, una banda entre 1652 y 1634 cm^{-1} correspondiente a la amida I, banda entre 1540 y 1508 cm^{-1} propia de la amida II y alrededor de 1235 cm^{-1} banda respectiva a la amida III. Es necesario indicar que dependiendo de la región donde se encuentre la banda de vibración en el espectro, se puede hablar de las estructuras de la fibroína, sea helicoidal conocida como seda I o láminas β conocida como seda II [27]; de modo que, en el espectro resultante, para la seda I, hay presencia de la amida I aproximadamente en 1652 cm^{-1} , la amida II alrededor de 1508 cm^{-1} y la amida III cerca de 1235 cm^{-1} . Ahora bien, para la seda II, hay presencia de la amida I en 1634 cm^{-1} , de la amida II en 1540 cm^{-1} y la amida III normalmente se encuentra

aproximadamente en 1265 cm^{-1} ; sin embargo, en el espectro mostrado no se diferencia, debido a que posiblemente esté solapada con la banda de vibración de la amida III de la seda I. Ahora bien, el espectro infrarrojo de la fibroína extraída, es semejante al obtenido en estudios donde emplean capullos de gusano de seda *Bombyx Mori* como fuente de fibroína; en primer lugar, en la investigación de Araújo *et al.* (2018), resaltaron las tres bandas respectivas de los grupos amida, indicaron presencia de la amida I a 1643 cm^{-1} , además la amida II a 1518 cm^{-1} y la amida III a 1234 cm^{-1} [29]. Por otro lado, en el caso de Buitrago *et al.* (2017) evidenciaron para seda I la presencia de la amida I alrededor de 1651 cm^{-1} , la amida II aproximadamente en 1514 cm^{-1} y la amida III en 1234 cm^{-1} y para la seda II la presencia de las amidas I y II aproximadamente en 1639 y 1529 cm^{-1} respectivamente, la amida III en 1265 cm^{-1} [6]. De manera que, la presencia de las amidas tanto de la seda I como la II, indican que la organización de la fibroína obtenida en este trabajo coincide con lo reportado en la literatura para estructura helicoidal y láminas β , concluyendo así que el material fue extraído de manera satisfactoria.

6.4.2 Calorimetría de barrido diferencial (DSC):

En la Figura 9 se presenta el DSC realizado al scaffold de fibroína, para el cual se hizo un barrido desde la temperatura ambiente (aproximadamente 24°C) hasta 600°C .

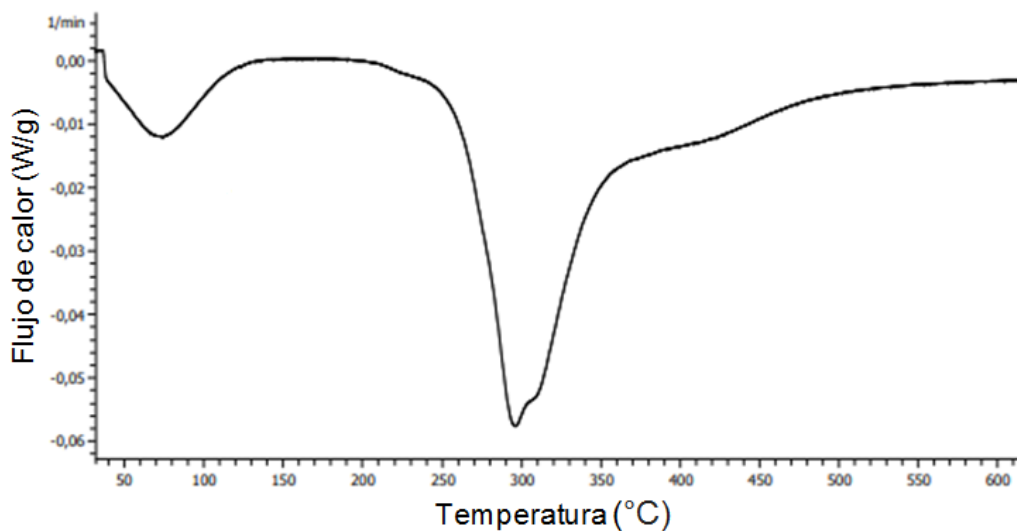


Figura 9. DSC del scaffold de fibroína.

En la curva se observa pérdida de agua hasta aproximadamente 80°C, en esta primera fase de calentamiento se consigue la degradación de las regiones amorfas de la fibroína que tienen gran cantidad de agua, generalmente se reportan para este material grandes pérdidas de agua entre 80 y 100°C [30]. El pico endotérmico se presenta antes de la temperatura de transición vítrea que se ubica aproximadamente a 200°C, posterior a la evaporación total del agua alrededor de 140°C; finalmente se evidencia un máximo de degradación en 290°C. Estos valores son comparables con los reportados en los análisis térmicos de fibroína, en primer lugar, para la fibroína extraída directamente de las glándulas del gusano de seda, la curva presenta un pico endotérmico por evaporación de agua a 100°C y un pico máximo de degradación en 300°C [31]; ahora bien, respecto al protocolo empleado por Buitrago (2017) en su investigación, reportaron valores de pérdida de agua hasta 108°C, temperatura de transición vítrea aproximadamente en 184°C y un máximo de degradación en 300°C [6].

6.5 Caracterización biológica de los sustitutos óseos inyectables:

6.5.1 Citotoxicidad:

El porcentaje de células vivas encontradas en los pozos después de realizados los ensayos de citotoxicidad se presentan en las siguientes figuras, en las cuales, se consideran los diversos tratamientos evaluados y las diluciones correspondientes del extracto; además, se observan los resultados obtenidos para los respectivos controles en cada prueba.

En la Figura 10, se presentan los porcentajes de viabilidad celular resultantes para el tratamiento 1, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.0%(v/v) y esterilizado con óxido de etileno. Se evidencia que para todas las diluciones del extracto, el porcentaje de células vivas es superior al control negativo, esto es, mayor al 100%; también, se observa que el tratamiento al 100%, es decir, sólo extracto, es el que mejor desempeño manifiesta en el ensayo.

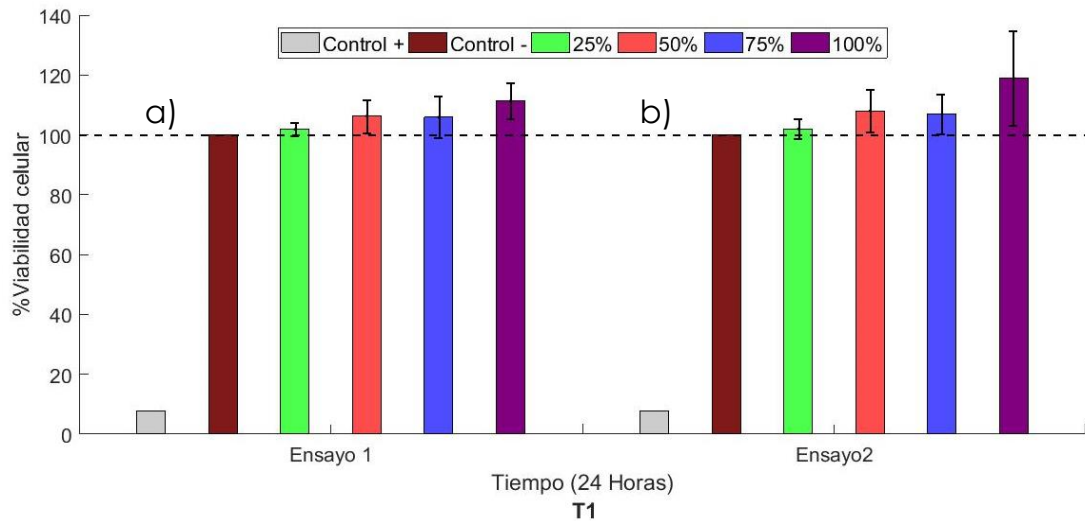


Figura 10. Ensayo de citotoxicidad para T1, a) Viabilidad 1, b) Viabilidad 2.

Por otro lado, en la Figura 11, se presentan los porcentajes para el tratamiento 2, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.5%(v/v) y esterilizado con óxido de etileno. Nuevamente se evidencia que para todas las diluciones del extracto el porcentaje de viabilidad celular es superior al control negativo; no obstante, en este caso, tanto el tratamiento al 100 como al 50%, presentan el mejor desempeño en el ensayo.

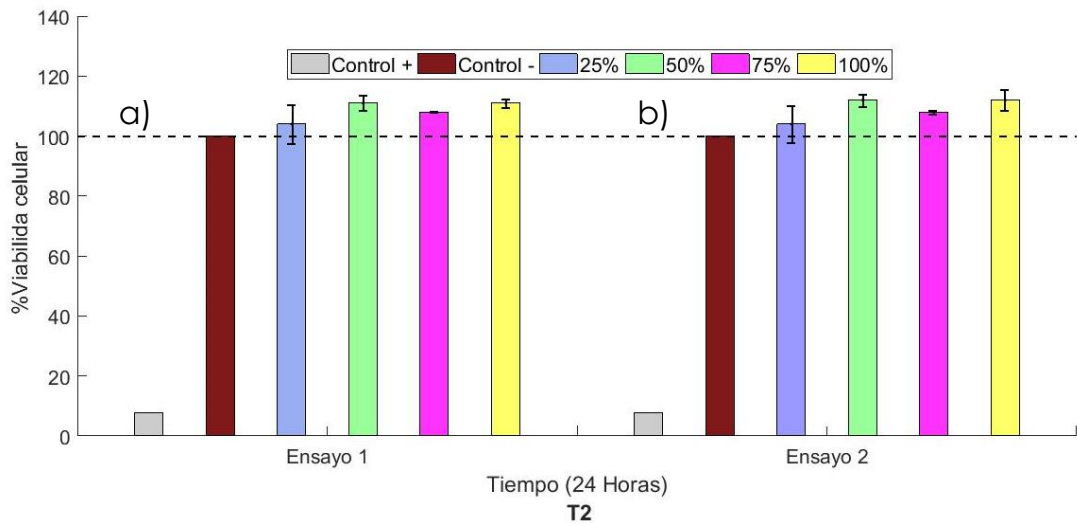


Figura 11. Ensayo de citotoxicidad para T2, a) Viabilidad 1, b) Viabilidad 2.

Ahora, se presentan los porcentajes para el tratamiento 3, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.0%(v/v) y esterilizado con radiación UV. En la Figura 12 se evidencia como en los casos anteriores, que para todas las diluciones del extracto el porcentaje de viabilidad celular es

superior al control negativo; además, el tratamiento al 100% de extracto, muestra comportamiento superior a las otras diluciones.

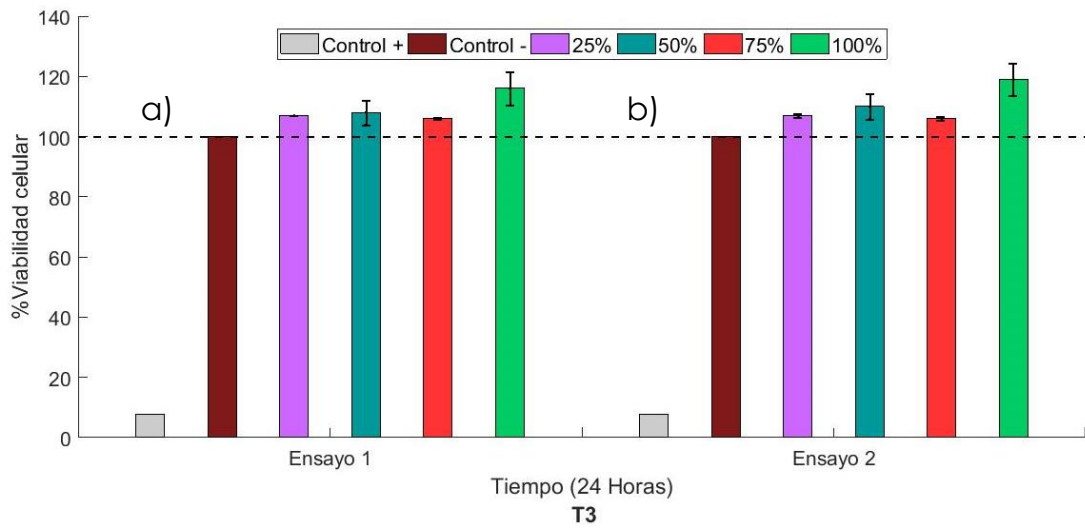


Figura 12. Ensayo de citotoxicidad para T3, a) Viabilidad 1, b) Viabilidad 2.

Finalmente, para el tratamiento 4, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.5%(v/v) y esterilizado con radiación UV, se evidencia que para todas las diluciones del extracto el porcentaje de células vivas es superior al control negativo; sin embargo, el tratamiento al 50% es el que muestra mayor porcentaje de viabilidad celular, incluso superior al tratamiento al 100%.

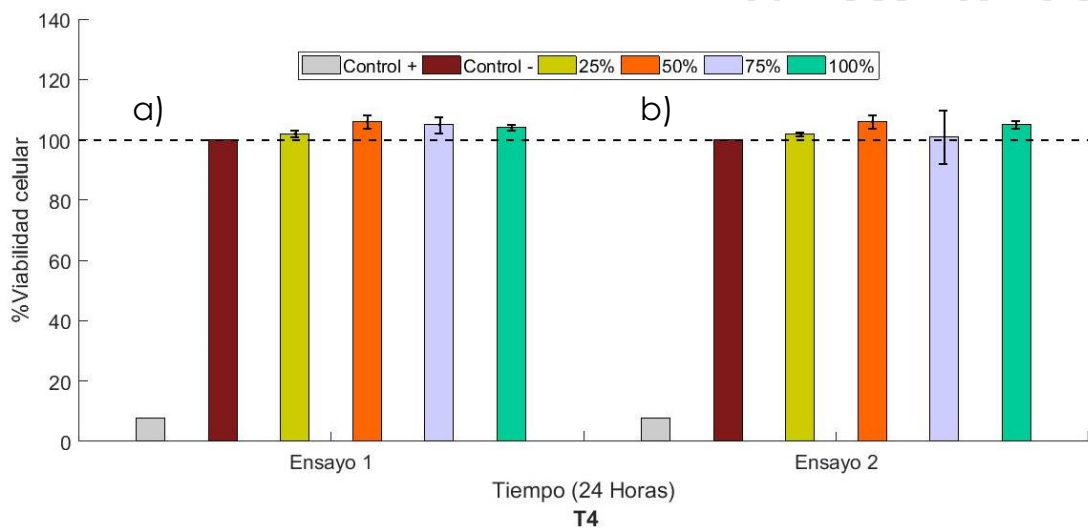


Figura 13. Ensayo de citotoxicidad para T4, a) Viabilidad 1, b) Viabilidad 2.

En la Figura 10, Figura 11, Figura 12 y Figura 13, se evidencia que el porcentaje de células vivas cambia según la dilución, pero la diferencia entre los valores respectivos no es significativa ni tiene una tendencia determinada; no obstante, en términos generales los tratamientos al 50 y 100% presentan los porcentajes más elevados, lo que suscita que a estas concentraciones el sustituto permite un mejor desarrollo del cultivo. No obstante, los materiales usados para el desarrollo de los sustitutos óseos en sus diversas formulaciones fueron los mismos, por tanto la naturaleza química y la topografía de estos favorecieron la interacción célula-extracto, puesto que, la hidroxiapatita usada es de tamaño nanométrico y tiene una superficie hidrofílica al igual que la fibroína. De modo que, dichos materiales no afectan la viabilidad celular y ayudan a la adsorción de los elementos requeridos en el crecimiento de las células [33]-[36].

Ahora bien, considerando que el material compuesto evaluado tiene posible aplicación como sustituto óseo inyectable, la presentación del mismo no será como extracto sino como pasta, por tanto, es ideal comparar los resultados de los tratamientos sin diluciones. En la Figura 14, se analiza la viabilidad de los tratamientos con una concentración de 100% del extracto.

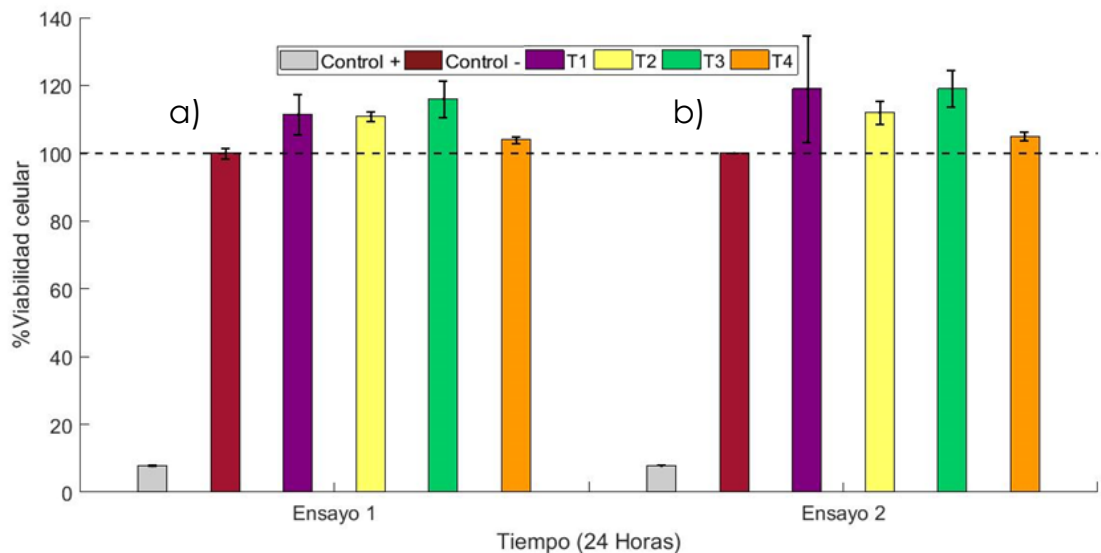


Figura 14. Ensayo de citotoxicidad, a) Viabilidad 1, b) Viabilidad 2.

En la Figura 14a, se observa que en el ensayo 1, el porcentaje de viabilidad correspondiente para T1 fue de 111.40 %, para T2 de 111.53 %, para T3 de 116.21 % y para T4 de 104.26%; asimismo, en la Figura 14b, se

evidencia que para el ensayo 2, la viabilidad para T1 fue de 118.81 %, para T2 de 112.00 %, para T3 de 118.61 % y para T4 de 105.46%. De ahí que, según el estándar internacional ISO 10993-5, considerando que todas las muestras están por encima del 100% de viabilidad, se puede considerar el material como no citotóxico; además, conforme la clasificación del grado de citotoxicidad dada por este estándar y mostrada en la Tabla 5, se clasifica a los sustitutos evaluados como materiales Grado 0, siendo estos seguros para las células en cualquiera de las concentraciones del extracto evaluadas [28]. Asimismo, considerando que la viabilidad de los tratamientos es superior al 100%, es posible sugerir que el material puede inducir el crecimiento de las células.

Tabla 5. Grado de toxicidad según el porcentaje de células vivas [28].

Grado	% de Viabilidad
0	≥ 100
1	75 – 99
2	50 – 74
3	25 – 49
4	1 – 24
5	0

De manera que, estos resultados demuestran que la composición química de los sustitutos óseos fabricados en este proyecto, no son perjudiciales para los fibroblastos; asimismo, confirma la no presencia de trazas del entrecruzante y otros agentes en los sustitutos que pudieran causar una muerte celular significativa. Por otro lado, se concluye que los sustitutos del tratamiento 3, con FS al 1.0 %(v/v) y esterilizados con radiación UV, son los que presentan mayor porcentaje de viabilidad, siendo esta, la formulación pertinente para evaluar el comportamiento del material en contacto con células del hueso.

Los resultados encontrados en esta investigación no son comparables con otros estudios, puesto que en la literatura no se encuentran reportes de la evaluación biológica del material compuesto en las condiciones de interés. No obstante, es posible encontrar una gran cantidad de estudios de la respuesta biológica de la hidroxiapatita y de ésta combinada con diversos materiales, donde se evidencia su alta biocompatibilidad [32]–[33]. En el caso de la fibroína es limitada la información que se puede hallar; sin embargo, se encuentran estudios

principalmente de scaffolds, como es el caso de Gaviria *et al.* (2018) quienes evaluaron el crecimiento de fibroblastos humanos en scaffolds de fibroína, indicaron que no hubo variación en la morfología de las células y reportaron porcentajes de viabilidad celular que oscilan entre 90-95% [34]. Asimismo, Arboleda *et al.* (2012) compararon la citocompatibilidad entre la fibroína y el polipropileno, donde mostraron las ventajas de usar fibroína obtenida del gusano de seda, la cual demostró una mejor biocompatibilidad [35].

6.5.2 Proliferación celular:

La actividad metabólica de los fibroblastos fue supervisada durante 24, 48 y 72 horas; en la Figura 15, se presenta el porcentaje de células vivas para cada uno de los tratamientos evaluados y los controles, en el respectivo día.

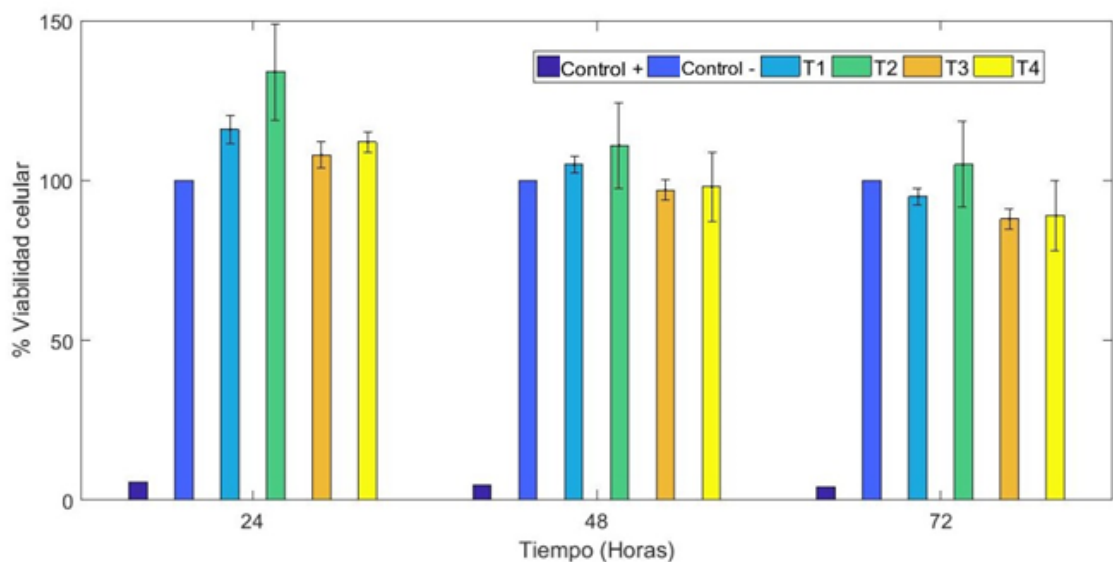


Figura 15. Proliferación celular medida a las 24, 48 y 72 horas.

Los resultados muestran que a las 24 horas del ensayo, la viabilidad celular de los fibroblastos es superior al control negativo, los porcentajes para los respectivos tratamientos fueron de 116.14% para T1, 133.68% para T2, 107.59% para T3 y 112.44% para T4. A las 48 horas, la viabilidad de los tratamientos T1 y T2, se mantiene superior al control con valores de 105.32 y 110.84% respectivamente; por el contrario, la viabilidad para T3 y T4 es inferior al control para este día, con valores de 97.13% para T3 y 98.21% para T4. Finalmente, a las 72 horas, todos los tratamientos excepto T2, muestran un porcentaje de viabilidad inferior al control.

Es importante resaltar que se evidencia incremento en el comportamiento de la proliferación celular en las primeras 24 horas; no obstante, a las 48 horas se observa disminución en los porcentajes de viabilidad y estos continúan disminuyendo a lo largo del ensayo, lo cual pudo deberse a la elevada presencia de células en el pozo durante las horas iniciales, considerando la elevada capacidad de proliferación de los fibroblastos, produciéndose la apoptosis de algunas de ellas y por consiguiente no se detecta un aumento de las células en los días posteriores. Resultados más alentadores se encuentran en estudios recientes, uno de ellos es la investigación realizada por Gaviria *et al.* (2018) indicaron que el crecimiento de los fibroblastos no presentó diferencias significativas con respecto al control y observaron una distribución homogénea del crecimiento celular en la superficie de la película de fibroína [34]. Por otro lado, Pecci *et al.* (2018) evaluaron la potencialidad de la fibroína de seda como scaffold para reparación y regeneración pulpar, observaron que aunque para las células es más difícil adherirse inicialmente a la fibroína, debido a que la superficie no está tratada, finalizado el ensayo (168 horas) la proliferación se iguala obteniendo una cantidad de células similar al control positivo, de modo que avalan al scaffold de fibroína óptimo para futuros estudios *in vivo* [36].

Por otro lado, las diferencias entre los tratamientos evaluados en este proyecto sugieren que T2, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.5%(v/v) y esterilizado con óxido de etileno, es la formulación que induce mejor respuesta biológica en las células, manteniendo un porcentaje de viabilidad celular superior al del control negativo durante todo el ensayo. Considerando que la interacción entre las células y el extracto depende de las propiedades físicas y químicas del material compuesto y que dicha formulación difiere del resto en que presenta mayor porcentaje de fibroína, propiedades intrínsecas del polímero como energía superficial e hidrofiliidad proporcionan un adecuado microambiente para apoyar el crecimiento de las células [34].

7 CONCLUSIONES

La metodología combinada de reacción de precipitación con posterior tratamiento hidrotérmal es reproducible y efectiva para sintetizar hidroxiapatita con tamaño nanométrico y morfología en barras; el protocolo y los parámetros establecidos como temperatura, tiempo y pH, fueron los adecuados para obtener el polvo con las propiedades requeridas para el material como componente cerámico del sustituto óseo.

La hidroxiapatita sintetizada tiene la morfología y tamaño esperados, su estructura en nanobarras es similar a los cristales de apatita presente en los huesos, el análisis FRX indica una relación molar Ca/P de 1.68 correspondiente a una HA estequiométrica típica de las obtenidas con el método hidrotérmal. Además, en el difractograma se observan los picos principales y secundarios característicos y en el espectro infrarrojo se exhibe la presencia de todas las bandas correspondientes a los grupos funcionales hidroxilos y fosfatos presentes en la HA, lo que confirma su adecuada composición química.

La fibroína de seda extraída a partir de los capullos del gusano *Bombyx mori*, exhibió en el espectro infrarrojo las bandas de vibración de las amidas principales correspondientes a las estructuras helicoidal y láminas β características de la fibroína; sin embargo, la amida III para láminas β no se observa, debido posiblemente a un solapamiento con la banda de vibración de la amida III para estructura helicoidal. Además, en el DSC se observan los picos térmicos representativos, con lo que se concluye que el material fue extraído de manera satisfactoria.

En la prueba de citotoxicidad, se encontró para todos los tratamientos y diluciones considerados, una viabilidad celular superior al 100 %; de ahí que, se concluye que los sustitutos óseos no son agentes tóxicos para los fibroblastos, además, son clasificados como Grado 0, lo que significa que el material en ambas formulaciones, es seguro para las células.

No es clara la capacidad que tienen los sustitutos óseos para inducir la proliferación de los fibroblastos, dado que, el porcentaje de células para las 24 horas fue mayor al respectivo para el control negativo y en las horas posteriores, los valores disminuyeron. Sin embargo, se resalta

que el tratamiento 2, extracto del sustituto óseo fabricado con FS al 1.5%(v/v) y esterilizado con óxido de etileno, provocó una mejor respuesta biológica en los fibroblastos durante las 72 horas del ensayo.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Estrada, A. Paz y L. López, "Ingeniería de Tejido Óseo: Consideraciones Básicas," Rev. EIA, no. 5, pp. 93–100, 2006.
- [2] A. Tatay, J. Pérez, J. Rivera, J. Cordero y M. Mella, "Bone substitutes," Rev. la Soc. Andaluza Traumatol. y Ortop., vol. 26, no. 1, pp. 2–13, 2008.
- [3] Z. Chen, L. Kang, Q.-Y. Meng, H. Liu, Z. Wang, Z. Guo y F.-Z. Cui, "Degradability of injectable calcium sulfate/mineralized collagen-based bone repair material and its effect on bone tissue regeneration", Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl., vol. 45, pp. 94–102, 2014.
- [4] J. Park y R. S. Lakes, "Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications". Iowa: Springer, 2008
- [5] Z. H. Li, S. C. Ji, Y. Z. Wang, X. C. Shen, and H. Liang, "Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering," Front. Mater. Sci., vol. 7, no. 3, pp. 237–247, 2013.
- [6] M. Buitrago, "Desarrollo de un material compuesto de fibroína y nanobarras de hidroxapatita para su potencial aplicación como sustituto óseo" Trabajo de investigación," Universidad de Antioquia, 2017.
- [7] G. Cuervo, "Evaluación de la estabilidad química y de mojabilidad de un sustituto óseo a base de fibroína y nanobarras de hidroxapatita" Trabajo de investigación," Universidad de Antioquia, 2017.
- [8] G. J. Tortora and B. Derrickson, "Principios de anatomía y fisiología", 11th ed. Editorial Medica Panamericana, 2009.
- [9] F. H. Martini, M. J. Timmons, R. B. Tallitsch, "Anatomía humana" Pearson educación, S. A., Madrid, 2009.
- [10] M. V. Regí, "Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos," Rev. Farm. Univ. Complut., vol. 15, no. 4, pp. 10–14, 1999.
- [11] N. Palastanga and R. Soames, "Anatomy and Human Movement, Structure and Function", 6th ed. Churchill Livingstone, 2012.
- [12] K. H. Hussein, K.M. Park, K. S. Kang, and H. M. Woo, "Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application," Mater. Sci. Eng. C, vol. 67, pp. 766–778, 2016.

- [13] J. P. Vacanti and C. A. Vacanti, "The History and Scope of Tissue Engineering," in *Principles of Tissue Engineering*, Third Edit., Eds. Boston, Massachusetts: Elsevier Inc., 2007, pp. 3–6
- [14] J. Park and R. S. Lakes, "Biomaterials: An introduction", Thirt. Springer, 2007.
- [15] J. Wong and J. Bronzino, "Biomaterials", 1st ed. New York: Taylor & Francis, 2007.
- [16] B. L. Banik and J. L. Brown, "Polymeric Biomaterials in Nanomedicine", Elsevier Inc., 2014.
- [17] S. Ramakrishna, Z. Huang, G. Kumar, A. Batchelor y J. Mayer, "An Introduction to Biocomposites". Londres: Imperial College Press, 2004.
- [18] Hu, N. M. Chen, Z. Liu, X. Liu, H. Lian, X. Wang, X. and Cui, F. Z. "Mechanical properties and in vitro bioactivity of injectable and self-setting calcium sulfate/nanoHA/collagen bone graft substitute," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 12, pp. 119–128, 2012.
- [19] X. Zhang and K. S. Vecchio, "Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite rods," *J. Cryst. Growth*, vol. 308, no. 1, pp. 133–140, Oct. 2007.
- [20] J. Melke, S. Midha, S. Ghosh, K. Ito, and S. Hofmann, "Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering" *Acta Biomater.*, vol. 31, pp. 1–16, 2015.
- [21] E. Echeverri, D. Grajales, and S. Gutiérrez, "Obtención de una solución de fibroína libre de sericina a partir de seda de *Bombyx mori*, con aplicaciones en ingeniería de tejidos". (Fase II). Proyecto Integrativo de Semestre," Universidad de Antioquia, 2013.
- [22] S. K. Swain y D. Sarkar, "A comparative study: Hydroxyapatite spherical nanopowders and elongated nanorods," *Ceram. Int.*, vol. 37, no. 7, pp. 2927–2930, 2011.
- [23] X.-Y. Zhao, Y.-J. Zhu, B.-Q. Lu, F. Chen, C. Qi, J. Zhao, and J. Wu, "Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods using pyridoxal-5'-phosphate as a phosphorus source," *Mater. Res. Bull.*, vol. 55, pp. 67–70, Jul. 2014
- [24] M. Buitrago, "Síntesis de nanofibras de fosfatos de calcio para su posible uso en sustitutos óseos. Trabajo de Grado," Universidad de Antioquia, 2014.
- [25] W. P. S. L. Wijesinghe, M. M. M. G. P. G. Mantilaka, E. V. a Premalal, H. M. T. U. Herath, S. Mahalingam, M. Edirisinghe, R. P. V. J. Rajapakse, and R. M. G. Rajapakse, "Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and

calcination on morphology, crystallite size and crystallinity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 42, pp. 83–90, 2014.

[26] J. F. Shackelford, *Advanced Ceramics. Bioceramics.*, 1st ed. Davis: Taylor & Francis., 2005.

[27] S. Xiao, Z. Wang, H. Ma, H. Yang, and W. Xu, "Effective removal of dyes from aqueous solution using ultrafine silk fibroin powder," *Adv. Powder Technol.*, vol. 25, no. 2, pp. 574–581, 2014.

[28] W. Feng, S. Feng, K. Tang, X. He, A. Jing y G. Liang, "A novel composite of collagenhydroxyapatite/kappa-carrageenan," *J. Alloys Compd.*, vol. 693, pp. 482–489, 2017.

[29] L. Araújo, J. de Oliveira Júnior, N. Aranha, "Síntese e caracterização de scaffolds de fibroína", revista *Matéria*, vol. 23, no. 04, 2018.

[30] A. Motta, L. Fambri, and C. Migliaresi, "Regenerated silk fibroin films: Thermal and dynamic mechanical analysis," *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 203, no. 10–11, pp. 1658–1665, 2002.

[31] M. Ho, H. Wang, and K. Lau, "Thermal properties and structure conformation on silkworm silk fibre," *Compos. Aust. CRC-ACS*, no. Figure 1, pp. 15–16, 2012.

[32] K. A. Bhadang, C. A. Holding, H. Thissen, K. M. McLean, J. S. Forsythe y D. R. Haynes, "Biological responses of human osteoblasts and osteoclasts to flame-sprayed coatings of hydroxyapatite and fluorapatite blends," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 4, pp. 1575–1583, 2010.

[33] B. Liu, L. Chen, C. Shao, F. Zhang, K. Zhou, J. Cao y D. Zhang, "Improved osteoblasts growth on osteomimetic hydroxyapatite/BaTiO₃ composites with aligned lamellar porous structure," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 61, pp. 8–14, 2016.

[34] D. Gaviria, A. Guevara, E. Cano, "Evaluación del crecimiento de fibroblastos humanos en andamios de fibroína de *Bombyx mori* L." *Rev. Colomb. Biotecnol.* Vol. XX No. 2, pp. 47 – 56, 2018.

[35] A. Arboleda, J. González, M. Franco, and L. Valladares, "In vitro comparison of cytocompatibility between fibroin and polypropylene biomaterials," *Rev. Fac. Ing.*, vol. 26 (44), pp. 97-107, May. 2017.

[36] M. Pecci, "Potencialidad de la fibroína de seda como scaffold para reparación y regeneración pulpar" Tesis doctoral, Universidad de Murcia, 2018.