



ARTÍCULO ORIGINAL / *Original*

## ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD DE MATRICES POLIMÉRICAS COMBINADAS, RESPONSIVAS AL PH, CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Ángel G. Hurtado Cuba<sup>1</sup>, Mariana Borgeaud<sup>2</sup>, María Soledad Belluzo<sup>2</sup>, Tamara G. Oberti<sup>2</sup>, Juan M. Fernández<sup>1\*</sup>

1. Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) - Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC). 2. Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - CONICET CCT. Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

El presente trabajo muestra la obtención de un material a partir de un polímero sintético (TerP) y otro natural, mediante entrecruzamiento físico y su caracterización fisicoquímica y biológica, con el fin de emplearlos para regeneración de tejido óseo. Las membranas fueron obtenidas por la técnica de evaporación del solvente y caracterizadas por espectroscopia FTIR, ensayos de hinchamiento, medidas de ángulo de contacto y microscopía electrónica de barrido (SEM). Se encontró que la compatibilidad entre los polímeros que la constituyen es estable a pH fisiológico y que, al incorporar mayor cantidad del TerP a la matriz, esta se vuelve más hidrofóbica y porosa. Además, teniendo en cuenta la aplicación prevista para dichos materiales, se realizaron estudios de biocompatibilidad y citotoxicidad con células progenitoras de médula ósea (CPMO) y células RAW264.7, respectivamente. Se evaluó la

proliferación celular, la producción y liberación de óxido nítrico (NO) al medio de cultivo durante 24 y 48 horas y la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de las células crecidas sobre los biomateriales variando la cantidad del polímero sintético. Se encontró mayor proliferación celular y menor producción de NO sobre las matrices que contienen menos proporción del TerP, además de poseer una mejor biocompatibilidad. Los resultados de este estudio muestran que el terpolímero obtenido y su combinación con un polímero natural es una estrategia muy interesante para obtener un biomaterial con posibles aplicaciones en medicina regenerativa y que podría extenderse a otros sistemas estructuralmente relacionados.

**Palabras clave:** biomateriales, quitosano, entrecruzamiento físico, ingeniería de tejidos, regeneración celular.

\*E-mail: [jmfernandez@biol.unlp.edu.ar](mailto:jmfernandez@biol.unlp.edu.ar)

## Abstract

In the present work, the preparation of a biomaterial from a synthetic terpolymer (TerP) and a natural polymer, physically crosslinked, is shown. In order to evaluate the new material for bone tissue regeneration, physicochemical and biological characterizations were performed. The membranes were obtained by solvent casting and characterized using FTIR spectroscopy, swelling tests, contact angle measurements, and scanning electron microscopy (SEM). It was found that the compatibility between the polymers is stable at physiological pH and the incorporation of a higher amount of TerP into the matrix increases hydrophobicity and porosity. Furthermore, considering the intended application of these materials, studies of biocompatibility and cytotoxicity were conducted with Bone Marrow Progenitor Cells (BMPCs) and RAW264.7 cells, respectively.

Cell proliferation, NO production and release into the culture medium for 24 and 48 hours, and proinflammatory cytokine expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  from cells grown on the biomaterials while varying the amount of the synthetic polymer were evaluated. Greater cell proliferation and lower NO production were found on matrices containing a lower proportion of TerP, in addition to better biocompatibility. The results of this study demonstrate that the obtained terpolymer and its combination with a natural polymer is a highly interesting strategy for biomaterial preparation with potential applications in regenerative medicine. This approach could be extended to other structurally related systems.

**Key words:** biomaterials, Chitosan, physically crosslinking, tissue engineering, cell regeneration.

## Introducción

La destrucción del tejido óseo debida a enfermedades (osteonecrosis, tumores, osteoporosis) o cicatrización ineficiente posterior a lesión traumática es un problema que afecta a la población mundial. Actualmente se utilizan distintas terapias para las diversas lesiones óseas. Entre ellas se encuentra la utilización de materiales como prótesis, placas de osteosíntesis, clavos y tornillos e injertos que, según su procedencia, se clasifican en: autoinjerto, aloinjerto (homólogos), o xenoinjerto (heterólogo).<sup>1,2</sup> El autoinjerto suele ser el más exitoso de los tres debido a que se realiza un trasplante desde otro sitio del mismo paciente; esto se considera como la técnica de oro. El segundo tipo es el aloinjerto, el cual se extrae de donantes cadavéricos, por lo que no requiere abordajes quirúrgicos extras al paciente, aunque conlleva el riesgo de transmisiones de enfermedades y el posible rechazo,

lo que ocurre en un 30-60% de los injertos implantados. Los xenogénicos son los injertos obtenidos a partir de hueso desproteinizado de otras especies, por lo cual no suelen generar reacción inflamatoria, pero carecen de propiedad osteogénica y osteoinductora. En cuanto a los tratamientos basados en metales, si bien son capaces de soportar cargas elevadas, pueden sufrir fatiga, desgastes, corrosión, y son necesarias cirugías posteriores para extraerlos del cuerpo. En el caso de las prótesis, una gran desventaja que presentan son los problemas de estabilidad en la superficie debida a la baja osteointegración, lo cual deriva en micromovimientos en la interfase hueso-implante que dañan al hueso fijado, así como también otros inconvenientes como fatiga, desgastes y corrosión.<sup>1,2</sup>

El impacto de los tratamientos en los defectos óseos desde el punto de vista clínico y económico es sumamente grande.<sup>3,4</sup>



A nivel mundial, en el año 2013 hubo más de 50 millones de fracturas con más de 8 millones de procedimientos quirúrgicos. En ese mismo año, se superaron los USD 2,5 mil millones asociados a gastos médicos utilizando distintos tipos de injertos en reparaciones óseas, alrededor del mundo y se prevé un crecimiento anual del 8%.<sup>4</sup> En el año 2003, en Estados Unidos, se estimaron gastos médicos en más de 20.000.000 de dólares relacionados con la fractura, re inserción y el reemplazo de la articulación de caderas y rodillas, previéndose para el año 2015 más de 74.000.000 de dólares. En cuanto a fracturas traumáticas, en el año 2005 se realizaron 8.500.000 visitas médicas de las cuales se requirieron hospitalización en casi 1.000.000 de casos. A pesar de la falta de estadísticas, la Argentina no está exenta de estos problemas. Solo en la Clínica Güemes, Luján,<sup>5</sup> se efectuaron entre los años 2005 y 2007 un total de 35 artroplastias cervicales en 27 pacientes, mientras que 35 pacientes recibieron artroplastia total de tobillo entre los años 2007 y 2014 en el Hospital Italiano de Buenos Aires.<sup>6</sup> Por otro lado, Loures y cols. estimaron gastos médicos por USD 40.000.000 en el año 2015 en tratamientos de fractura femoral en Brasil.<sup>7</sup>

Una disminución en la calidad y/o densidad mineral ósea (DMO) puede incrementar la incidencia de fracturas óseas debido a la osteoporosis, la enfermedad ósea metabólica más frecuente.<sup>8,9</sup> La osteoporosis puede ser clasificada como primaria, cuando se produce por falta de estrógenos, o secundaria, cuando se asocia a otras causas o enfermedades.<sup>10</sup> La reparación de dichas fracturas puede verse comprometida cuando coexisten patologías que afectan el metabolismo óseo como la diabetes mellitus.<sup>11-13</sup> A nivel mundial, la osteoporosis afecta a más de 200.000.000 personas, estimándose que 30-50% de las mujeres posmenopáusicas la desarrollarán con un consecuente aumento en la incidencia de fracturas óseas. Si bien en nuestro país existen pocos estudios epidemiológicos, uno

de ellos se basó en estudios densitométricos sobre columna lumbar y cuello femoral, donde se encontró que en mujeres mayores de 50 años solo un 25% poseen DMO normal, mientras que un 50% presentan osteopenia y 25% osteoporosis, con una mortalidad intrahospitalaria en pacientes posfracturados de cadera entre 5-10% para varones y entre 7 a 33% en mujeres.<sup>13,14</sup> Las fracturas osteoporóticas de mayor prevalencia son las fracturas de cadera, columna vertebral y radio distal. La incidencia se triplica cuando la edad es de 65 en lugar de 50 años, lo que llevaría a una elevación de los costos de tratamientos y gastos médicos. Varios trabajos en la bibliografía científica pronostican un aumento de casos de fractura ósea debido a osteoporosis; por ejemplo, se estima que la incidencia de fractura de cadera se incrementará en un 100% hacia el año 2050,<sup>13</sup> mientras que Lu y cols. informan que el número de casos aumentaría 2,7 veces entre 2015 y 2035.<sup>15</sup> Debido a la mayor expectativa de vida que existe en la actualidad y al crecimiento de la población global, es de esperar que los problemas que surgen por el deterioro de la calidad ósea se incrementen en los próximos años y con ellos los costos socioeconómicos de los tratamientos.

En vista de problemas como la falta de donantes homólogos, rechazo o transmisión de enfermedades virales y otras (en caso de aloinjerto y xenoinjerto), la necesidad de disminución de la morbilidad del sitio de extracción (en caso de autoinjertos) y la incapacidad de los metales para remodelarse, nace la Ingeniería de Tejido, la cual fue definida en 1993 como “un campo interdisciplinario de investigación que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida hacia la tarea de desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función del tejido”.<sup>16</sup> La Ingeniería de Tejidos se basa en el uso de tres componentes: *matrices*, que sirvan como andamiaje (*scaffolds*) para guiar la regeneración del tejido; células, las cuales

producirán la regeneración del tejido y factores de crecimiento, los cuales funcionarán como quimioattractantes y mensajeros para modular la respuesta celular. Actualmente, se encuentra en estudio un gran número de materiales, que según su naturaleza se clasifican en tres grandes grupos: 1) polímeros naturales, 2) polímeros sintéticos y cerámicos, 3) biovidrios y materiales inorgánicos compuestos, para ser aplicados en Ingeniería de Tejidos.<sup>4,17-31</sup> Los primeros se extraen de fuentes naturales (animales y vegetales), y como características más relevantes se pueden mencionar su alta biocompatibilidad, accesibilidad, estabilidad, biodegradabilidad y poca toxicidad, aunque suelen poseer propiedades mecánicas pobres. Los polímeros naturales más conocidos incluyen proteínas, polipéptidos y polisacáridos tales como el quitosano, el ácido hialurónico y el alginato. Por otro lado, los polímeros sintéticos tienen la capacidad de generar una amplia variedad de materiales gracias a sus propiedades químicas y a las diferentes formas en que pueden ser procesados. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos polímeros suelen tener una baja capacidad de biodegradación y, en ciertos casos, pueden resultar tóxicos para las células. Los más comúnmente utilizados son el poliláctico, poli(etilenglicol) y poli ( $\epsilon$ -caprolactona), entre otros. Finalmente, el tercer grupo se trata de compuestos inorgánicos no metálicos los cuales se caracterizan por favorecer la mineralización de los tejidos y su buena resistencia a la compresión. Como desventaja se pueden mencionar su baja biodegradabilidad y fragilidad; dentro del presente grupo se encuentra la hidroxiapatita, la alúmina y el Bioglass® 45S5.

El objetivo principal es obtener materiales inteligentes, que puedan satisfacer de manera eficiente las necesidades del tejido afectado a partir de señales física y/o químicas con el fin de guiar la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Cabe señalar que, en nuestro país, los materiales (monómeros, polímeros)

que se utilizan para tales aplicaciones son normalmente importados, lo cual encarece la producción de los biomateriales. Por este motivo se propone el uso de quitosano (Q-polímero natural) y un polímero sintético utilizando los monómeros fumáricos de diisopropilo (FIP) (proveniente de la industria petrolera), benzoato de vinilo (BzV) y N, N-dimetilaminoetil metacrilato (DMAEMA), denominado TerP, con el fin de obtener biomateriales que puedan ser usados como *scaffolds* y, una vez implantado en el sitio dañado, promueva la reparación ósea.

## Materiales y métodos

### Síntesis de los biomateriales

Los polímeros y monómeros utilizados, quitosano de bajo peso molecular, BzV y DMAEMA fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El monómero FIP fue obtenido según una técnica previamente descrita.<sup>32</sup> En todos los casos, los monómeros fueron purificados empleando columnas de óxido de aluminio neutro para remover los inhibidores (Aldrich). El iniciador utilizado (2,2-Azobisisobutironitrilo-AIBN), adquirido de Merk (Alemania), fue recristalizado desde metanol a 40 °C antes de su uso. Finalmente, se utilizó ácido succínico como entrecruzante para las matrices (Anedra).

Sobre la base de conocimientos previos en nuestra línea de trabajo, se seleccionaron los monómeros para utilizar con el fin de obtener un terpolímero compatible con quitosano y cuyas propiedades (pesos moleculares, polidispersidad y conversión de reacción) fueran las adecuadas para tal fin. Para ello, se reemplazaron los monómeros acrílicos normalmente empleados por un monómero fumárico (FIP) proveniente de los desechos de la industria petrolera local, el cual tiene un menor costo de obtención. Sumado a esto, se seleccionó el BzV para facilitar la copolimerización de FIP;<sup>33</sup> mientras que DMAEMA fue seleccionado para contribuir con unidades catiónicas.

En cuanto a las condiciones de síntesis del terpolímero, se utilizó una relación de



monómeros 60:20:20 de FIP: BzV:DMAEMA.<sup>32</sup> Brevemente, los monómeros se colocaron por pesada en el tubo de reacción (Schenk) junto con 40 mM de AIBN y 4 mL de tetrahidrofurano (THF). Esta solución se desgasificó y se hizo reaccionar durante 16 horas a 60 °C. Posteriormente se llevó a cabo la purificación del terpolímero obtenido mediante disolución/precipitación en THF/hexano, respectivamente. Por último, el producto obtenido se secó en vacío hasta peso constante.

#### Caracterización del terpolímero

A fin de conocer la estructura del terpolímero sintetizado, se llevó a cabo su caracterización mediante resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El análisis por <sup>1</sup>H RMN se realizó con un equipo Bruker Avance Neo 500®, y la muestra se preparó disolviendo 10 mg de terpolímero en 1,5 mL CDCl<sub>3</sub>, empleando tetrametilsilano como estándar interno. Esta técnica permitió identificar tanto la estructura del copolímero como la relación de comonómeros presentes en él. Por otro lado, se realizó un estudio mediante espectroscopia FTIR utilizando un equipo Nicolet iS50 FT-IR®, abarcando un rango de frecuencias desde 4000 hasta 400 cm<sup>-1</sup>. Los espectros fueron analizados utilizando el *software* EZ-OMNIC 7.4.127® de Thermo Fisher Scientific Inc. (Madison, WI, USA), a fin de identificar los grupos funcionales presentes en el terpolímero.

Finalmente, se determinaron los pesos moleculares promedio en peso ( $\bar{M}_w$ ) y en número ( $\bar{M}_n$ ) del terpolímero, así como el índice de polidispersidad ( $IP = \bar{M}_w/\bar{M}_n$ ), utilizando cromatografía de exclusión molecular. Para ello, se empleó un equipo Waters 600® con detector de índice de refracción y una columna HR4E (50-100,000). La fase móvil utilizada fue THF, y se emplearon estándares de poliestireno como calibradores.

#### Preparación de los biomateriales

Los biomateriales se obtuvieron a partir de

quitosano, un polímero natural que presenta grupos -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> a pH < 6,5,<sup>34</sup> y del terpolímero previamente sintetizado, el cual contiene grupos -NR<sub>3</sub>H<sup>+</sup> del DMAEMA a pH > 6,5-7.<sup>35</sup> La unión de estos polímeros se logró por entrecruzamiento físico utilizando ácido succínico, un ácido dicarboxílico que interactúa electrostáticamente con ambos polímeros (-OOC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>, pKa = 4,2 y 5,6). La preparación de las matrices se llevó a cabo mediante la adición gota a gota de una solución del terpolímero preparado al 2% p/v en ácido acético, sobre una solución de quitosano al 1,5% p/v, disuelto en una solución 3% v/v de ácido acético. Tras homogeneizar los polímeros, se añadió el ácido succínico, previamente disuelto en agua, y se mantuvo la agitación durante 40 minutos hasta lograr una homogeneidad adecuada. Esta solución se vertió en moldes de teflón y se permitió su evaporación hasta alcanzar sequedad, empleando el método de *solvent casting*. De esta manera, se obtuvieron biomateriales en forma de membranas (o películas) con dos variantes en su composición: 2:1 y 1:1 de terpolímero (TerP)/quitosano (Q), respectivamente. En ambos casos, el porcentaje de entrecruzante utilizado fue del 2% de ácido succínico con respecto a la masa total de los polímeros.

#### *Caracterización fisicoquímica de los biomateriales*

Se realizaron medidas utilizando la técnica de FTIR, descrita en el inciso 2.1.1, a fin de caracterizar las interacciones intermoleculares entre los componentes en el biomaterial. Para comprender el proceso de absorción de agua en los biomateriales se llevaron a cabo estudios de hinchamiento. Para ello, una muestra de estos materiales se pesó ( $w_0$ ) y se sumergió en un *buffer* fosfato a pH 7,4 a 37 °C durante distintos intervalos de tiempo. Este análisis permite estudiar la incorporación de agua de los materiales en condiciones que simulan un entorno de cultivo celular *in vitro*.<sup>32</sup> Tras el período de incubación, las muestras se

retiraron, se pesaron nuevamente ( $w_t$ ) y se calculó el porcentaje de hinchamiento para cada tiempo (ecuación 1). Este estudio se repitió para examinar el proceso de incorporación de agua a pH 5, con el propósito de comparar el comportamiento de los materiales en un entorno similar al de los lisosomas de degradación.

$$\text{Ecuación (1). } \%Sw = 100 (w_t - w_0) / w_0$$

Por otro lado, se midió el ángulo de contacto según descripción previa.<sup>31</sup> Para cada muestra se realizaron cinco mediciones en diferentes puntos del material a fin de calcular el ángulo de contacto promedio. La superficie de los biomateriales fue recubierta por oro y se examinó su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) (Phillips 505®, Holanda), con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las imágenes fueron analizadas por Soft Imaging System ADDAll® y mediante el software libre ImageJ®.

#### Caracterización biológica de los biomateriales Cultivo celular

Para los estudios de biocompatibilidad y citotoxicidad se utilizaron células progenitoras de médula ósea (CPMO) y células RAW264.7, respectivamente. Las CPMO fueron obtenidas a partir de aspirados de médula ósea (tibia y/o fémur) de ratas Sprague Dowley según la técnica descrita previamente.<sup>36,37</sup> El protocolo de obtención de las CPMO a partir de las ratas se lleva a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio publicada por los Institutos Nacionales de Salud, y fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo CICUAL N.º 019-06-15) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Argentina. Las células fueron cultivadas en medio DMEM-10% FBS penicilina/estreptomina (medio basal) a 37 °C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, hasta alcanzar la confluencia (10 días de cultivo). Al cabo de este período,

fueron tripsinadas y sembradas sobre los biomateriales.

#### Estudios de diferenciación osteogénica

Debido a que el objetivo de estos biomateriales es ser aplicados en el futuro como implante en el sitio de fracturas óseas para que ayuden a la reparación del hueso, es importante conocer como las CPMO se diferencian a células del linaje osteoblástico sobre ellos. Para inducir la diferenciación a osteoblasto, las CPMO fueron cultivadas sobre los biomateriales en presencia de DMEM-10% FBS suplementado con ácido ascórbico y β-glicerolfosfato. Este medio osteogénico fue cambiado cada 3 días durante 14 días. Al final del cultivo, la diferenciación osteoblástica fue evaluada midiendo la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (FAL), la cual es un marcador del fenotipo osteoblástico asociado a la capacidad de formación ósea. Su actividad fue evaluada en extractos de las células crecidas sobre los diferentes biomateriales. Al final del período de cultivo, las células se lisaron con Triton X-100® (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) y, sobre este extracto, se midió la actividad enzimática de FAL y la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford.<sup>31</sup> La actividad de FAL de los extractos se determinó utilizando p-nitrofenilfosfato de sodio (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina) como sustrato en *buffer* glicina [pH 10,5] a 37 °C durante un período de tiempo adecuado, según la técnica previamente descrita.<sup>24</sup> Además, se evaluó la expresión génica de colágeno tipo 1, la enzima fosfatasa alcalina y el factor de transcripción osteogénico RUNX2 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), utilizando β-actina como proteína constitutiva (*housekeeping*). En la tabla 1 se encuentran las secuencias de los *primers* utilizados.

#### Estudio de toxicidad

Los macrófagos fueron incubados durante 24 y 48 horas sobre los biomateriales y se evaluó la proliferación celular, la producción



de NO, y la expresión de expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La proliferación celular se realizó mediante la técnica de MTT. Este en células viables, el MTT (bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio) se reduce metabólicamente por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa a formazán azul-violeta insoluble. La actividad mitocondrial de las células tratadas se correlaciona con la intensidad de color determinada por mediciones espectrofotométricas después de disolver el formazán en dimetilsulfóxido (DMSO) y es directamente proporcional al número de células viables crecidas sobre los biomateriales.<sup>30</sup> Se utilizó el método de Griess<sup>19</sup> para medir la liberación de NO en el medio de cultivo por parte de los macrófagos RAW-264.7. La evaluación de la expresión de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , fue realizada mediante PCR. Se utilizó LPS (lipopolisacárido) agregado al medio de cultivo como control positivo de toxicidad. En la Tabla 1 se encuentran las secuencias de los *primers* utilizados.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados ha sido realizado mediante el t-test de Student para dos muestras asumiendo varianzas iguales, o mediante ensayos de ANOVA usando un único factor para comparar las muestras, según corresponda. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando la probabilidad ( $p$ ) < 0,05.

#### **Resultados y discusión**

##### *Caracterización fisicoquímica del terpolímero y de los biomateriales*

Con el propósito de obtener un biomaterial que consista en la combinación de un polímero natural y otro sintético, se sintetizó un terpolímero mediante copolimerización de tres monómeros distintos. Este terpolímero presenta una carga positiva variable en su estructura (dependiente del pH), lo que da lugar a la formación de un policatión. Dado que el quitosano también se encuentra cargado positivamente al pH de trabajo, el entrecruzamiento entre

**Tabla 1.** Secuencia de *primers* de la expresión de genes evaluados.

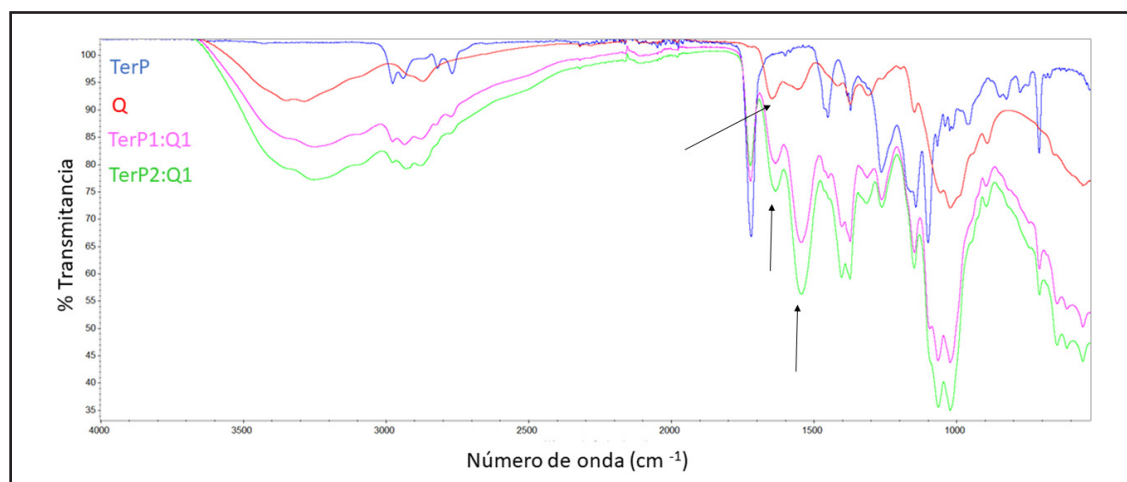
Marcador fenotípico	Gene bank code	Tamaño de producto(bp)		Secuencia
<b>Gen constitutivo</b>				
$\beta$ -actin	NM_031144.3	345	Fw	CCTTCAACACCCCAGCCAT
			rv	CATAGCTCTTCTCCAGGGA
<b>Marcador del fenotipo osteoblástico</b>				
ALP	J03572.1	737	Fw	GACAGCAAGCCCAAGAGA
			Rv	CAGTTCAGTGCGGTTCCA
Col1a1	NM_053304.1	651	Fw	GCATACACAATGGCCTAA
			Rv	CTGTTCCAGGCAATCCAC
RUNX2	XM_006244554.2	598/424	Fw	GCCGGGAATGATGAGAACTA
			Rv	TGAGAGAGGAAGGCCAGA
<b>Marcadores de toxicidad</b>				
TNF- $\alpha$	NM_012675.3	298	Fw	CACGCTCTTCTGTCTACTG
			Rv	CTTGAAGAGAACCTGGGA
IL-1 $\beta$	NM_031512.2	264	Fw	AAGCTCTCCACCTCAATG
			Rv	CAGACTCAAACCTCCACTTT

ambos polímeros se logra mediante la interacción de los grupos positivos de ambos con las cargas negativas del ácido succínico, el que actúa como agente entrecruzante. El polímero obtenido en el laboratorio fue sintetizado, aislado y purificado tal como se describió en la parte experimental (2.1). Posteriormente se caracterizó tanto macromolecularmente (determinación del peso molecular y conversión de reacción) como espectroscópicamente. La conversión de reacción, que indica la cantidad de monómero que se convirtió en polímero, fue de 28%, mientras que el peso molecular promedio en peso y la polidispersidad fueron  $\bar{M}_w = 7400$  g/mol e IP = 1,4, respectivamente. Finalmente se realizó la identificación y caracterización estructural, encontrando en  $^1\text{H-RMN}$  las señales características para cada tipo de hidrógeno de las respectivas unidades repetitivas provenientes de los monómeros empleados.  $^1\text{H-RMN}$  (ppm): H-aromáticos 7,3-8,1-CHO- (unidad repetitiva de VBz); 5,1-5,6-OCH- (unidad repetitiva de DIPF); 4,7-5,1-OCH<sub>2</sub>- (unidad repetitiva de DMAEMA); 3,9-4,2-CH<sub>2</sub>N-; 2, 4-2,7-NCH<sub>3</sub>; 2,1-2,3-CH- y -CH<sub>2</sub>- cadena principal; 1,7-2,1-CH<sub>3</sub> (unidad

repetitiva de DIPF); 1,0-1,3-CH<sub>3</sub> (unidad repetitiva de DMAEMA); 0,8-0,9.

A fin de evaluar el efecto del polímero sintético sobre las propiedades fisicoquímicas y cómo afecta a los procesos biológicos de las células crecidas sobre el material, se prepararon matrices utilizando ácido succínico como entrecruzante iónico, variando la cantidad de polímero sintético empleada en cada caso. Las interacciones de los componentes del material se analizaron mediante espectros de FTIR de cada componente por separado y de las matrices obtenidas (Figura 1).

En el espectro del polímero sintético (Azul) se observan las señales características ( $\text{cm}^{-1}$ ): 2978-2769(C-H, alifático), 1720 (C=O), 1454 (N-C, deformación), 1143 (N-C, estiramiento), 1106 (CO-OR) y 710 (aromático monosustituido). Las señales encontradas coinciden con las reportadas en la bibliografía y confirman la estructura del copolímero.<sup>30</sup> En cuanto al espectro FTIR de las membranas, estas muestran algunos picos característicos tanto del polímero natural como del copolímero sintético. Por ejemplo, una banda ancha entre 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$  se corresponde con la presencia



**Figura 1.** Espectros FTIR de: polímero sintético (Azul, TerP), polímero natural (Rojo, Q) y membranas con distinto contenido de TerP; menor cantidad (Rosa, TerP1:Q1), mayor cantidad (Verde, TerP2:Q1).





del grupo N-H y O-H del quitosano. De manera similar, la señal cercana a  $1720\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento C=O del copolímero TerP. Al analizar en detalle la zona del espectro entre  $1700$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$ , se encuentran las señales del Q denominadas amida I y amida II a  $1640$  y  $1556\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>31</sup> Es posible observar que, en el caso de las membranas (espectros Rosa y Verde), dichas señales presentan un corrimiento (indicado con flechas negras en la Figura 1), lo cual es un indicio de la interacción de los componentes.

Por otro lado, se llevaron a cabo los estudios de hinchamiento a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , tanto en *buffer* fosfato a pH 7.4 (simulando las condiciones del cultivo *in vitro*, óptimas para el crecimiento celular) como en *buffer* acético/acetato pH 5 (pH similar al medio lisosomal). Estos ensayos demostraron una cinética rápida de incorporación de agua, alcanzando los valores máximos de hinchamiento entre 10 y 15 minutos para ambas matrices. En cuanto a los porcentajes máximos de hinchamiento alcanzados ( $S_{\text{max}}\%$ ), se encontró que, en medio ácido, estos valores fueron siempre superiores respecto del *buffer* pH 7.4, independientemente de la membrana ensayada (Tabla 2). Esto muestra que la red física formada entre el entrecruzante y los polímeros es más estable a pH fisiológico, lo cual concuerda con los pKa del ácido succínico (4,2 y 5,6). Por otro lado, el aumento en la relación del polímero sintético sobre el natural no produjo cambios en

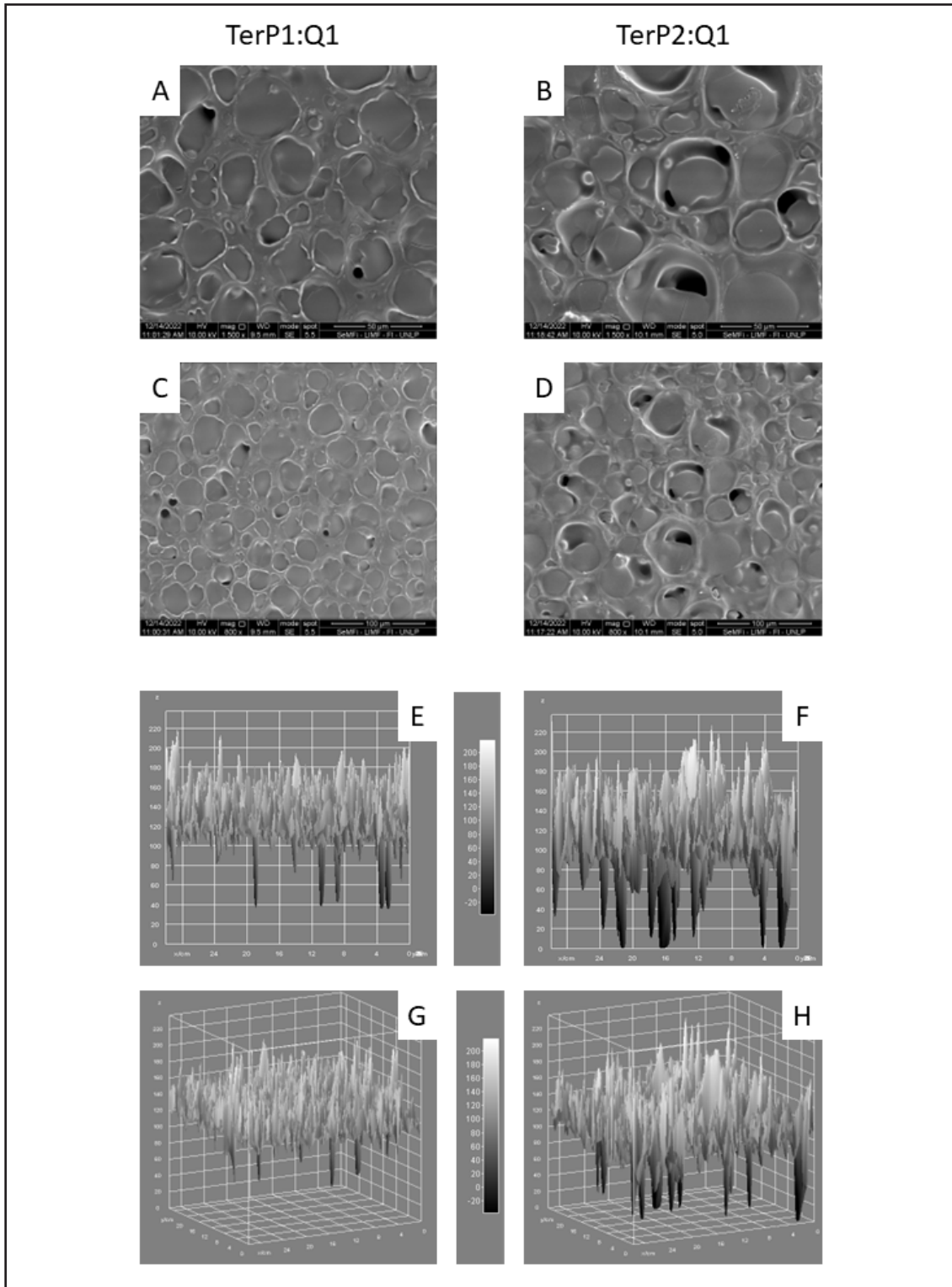
el hinchamiento máximo alcanzado. Otra de las caracterizaciones realizadas a los materiales obtenidos fue mediante la determinación del ángulo de contacto de una gota de agua sobre su superficie para determinar su hidrofiliidad/hidrofobicidad. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 2 y se encontró un mayor ángulo para el caso del material con más contenido del polímero sintético, lo cual da cuenta de que dicho polímero disminuye la hidrofiliidad del material ya que posee en su estructura unidades repetitivas hidrofóbicas tales como fumarato de diisopropilo y benzoato de vinilo.

Además, en la Figura 2, se pueden observar las microscopías electrónicas de barrido de las membranas con diferente composición (TerP1:Q1 y TerP2:Q1). La Figura 2A y 2C corresponden a fotografías tomadas a aumento de  $1500\times$  y  $800\times$ , respectivamente, de TerP1:Q1, mientras que las figuras 2B y 2D corresponden a fotografías tomadas con aumento de  $1500\times$  y  $800\times$ , respectivamente, de TerP2:Q1. Se puede observar que ambos materiales presentan estructuras similares y con poros presentes en su superficie, aunque el mayor contenido de polímero sintético parecería favorecer la porosidad del material. A partir del análisis de las imágenes se evaluó el tamaño de poros promedio y el % de porosidad (véase Tabla 2). Se encontró que ambos parámetros son significativamente mayores en la superficie de TerP2:Q1, lo cual corrobora

Tabla 2.

	TerP1:Q1	TerP2:Q1
Ángulo de contacto	$50 \pm 8$	$66 \pm 5 \#$
$S_{\text{ma}}\%$ pH 5	$410 \pm 34$	$305 \pm 17$
$S_{\text{max}}\%$ pH 7.4	$169 \pm 11\&$	$149 \pm 7\&$
Tamaño de poro ( $\mu\text{m}^2$ )	$39.417 \pm 8095$	$107.865 \pm 27.216 \#$
% de porosidad	$0,40 \pm 0,04$	$1,45\% \pm 0,05 \#$

#:  $p < 0,05$  vs. TerP1:Q1; &:  $p < 0,05$  vs.  $S_{\text{max}}\%$  a pH 5 para cada uno de los materiales



**Figura 2.** Fotografías representativas de microscopía electrónica de barrido de la superficie de los biomateriales TerP1:Q1 y TerP2:Q1 a (1500× A y B) y 800× (C y D). Las Figuras E y F corresponden a los gráficos de altura observados desde el eje Y de las imágenes C y D, mientras que las Figuras G y H son los gráficos de altura en perspectiva de las imágenes C y D.

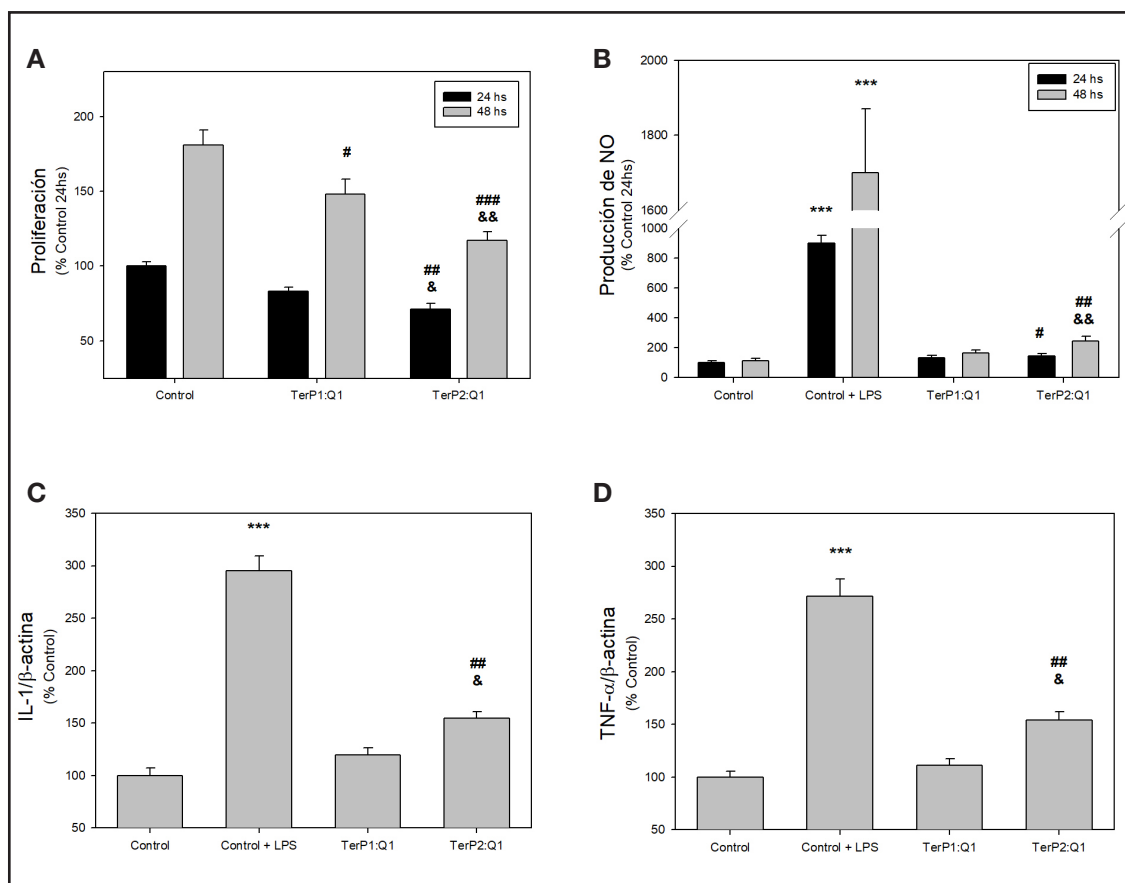


cuantitativamente la primera observación cualitativa realizada. Para una mejor interpretación de las imágenes se utilizó el *plugin* "interactive 3D surfaceplot" del *software* ImageJ, el cual construye gráficos tridimensionales a partir de la luminancia de los distintos píxeles en comparación con los píxeles vecinos. En las Figuras 2E y 2G se pueden ver tanto los gráficos de altura desde el eje Y como en perspectiva, respectivamente, de la imagen 2C (TerP1:Q1, 800x), mientras que las Figuras 2F y 2H corresponden al análisis de la imagen 2D (TerP2:Q1, 800x). Los resultados encontrados mediante dicho análisis van en el sentido de lo interpretado hasta el momento: el aumento de la fracción TerPen; el biomaterial produjo un aumento en la rugosidad e irregularidades en la superficie de este, además de diferencias en la porosidad, ya que la variación de altura entre ambos sistemas es notable; estas varían entre 40 y 210 de la escala arbitraria para TerP1:Q1 y entre 0 y 220 de la escala arbitraria para TerP2:Q1. Estas observaciones concuerdan con el análisis superficial realizado anteriormente, es decir, la mayor hidrofobicidad que el polímero sintético le imprime al material podría inducir una mayor porosidad ya que "es menos afín" a las moléculas del solvente acuoso con que se prepararon las membranas.

#### Caracterización biológica de los biomateriales

Un requisito de gran importancia en el diseño de *scaffolds* o biomateriales es que estos no generen reacciones citotóxicas ni inmunológicas en el organismo una vez que sean implantados. Por ello, estudiamos la posible toxicidad que los *scaffolds* inducirían utilizando macrófagos RAW264.7. Estas células expresan distintos marcadores de actividad celular, tales como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) frente a sustancias tóxicas.<sup>18,30</sup> El estudio de estos marcadores constituye un excelente modelo para estudios

de citotoxicidad de distintas sustancias sobre sistemas biológicos. En este trabajo se evaluó la proliferación celular, la producción y liberación de NO al medio de cultivo durante 24 y 48 horas y la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de las células crecidas sobre ambos biomateriales. En la Figura 3 podemos observar la proliferación de las células (Figura 3A) expresadas en % con respecto al control a 24 horas y la producción de NO (Figura 3B) crecida sobre los biomateriales, siendo la condición control las células crecidas sobre el plato de cultivo sin biomaterial. Los resultados demuestran que las células proliferan de igual manera en el biomaterial con igual relación terpolímero y quitosano (TerP1:Q1) con respecto al control durante las primeras 24 horas, mientras estas proliferan menos que el control cuando se las cultiva sobre el biomaterial con doble composición del polímero sintético respecto del quitosano (TerP2:Q1). Luego de 48 horas, la proliferación de las células sobre ambos biomateriales fue significativamente menor con respecto al control, lo cual es esperable ya que las células tienden a proliferar menos sobre los nuevos biomateriales con respecto a los pocillos de los platos de cultivos celulares.<sup>27</sup> Además, la proliferación celular fue significativamente menor en TerP2:Q1 respecto de TerP1:Q1 para ambos tiempos de ensayo. En la Figura 3B se puede observar la concentración de NO en el medio de cultivo producido por las células. Encontramos que la producción de NO por parte de las células crecidas sobre TerP1:Q1 es similar al control para ambos tiempos, no así cuando se hicieron crecer sobre TerP2:Q1, donde la producción de NO fue mayor que el control tanto para 24 como para 48 horas. Además, a 48 horas, la producción de NO fue mayor en las células crecidas sobre TerP2:Q1 respecto de TerP1:Q1. En la Figura 3C y 3D se muestran los resultados de la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de las células RAW264.7, respectivamente, ambos marcadores normalizados contra  $\beta$ -actina luego de 48 horas.



**Figura 3.** Evaluación de citotoxicidad de los biomateriales TerP1:Q1 y TerP2:Q1 utilizando células RAW264.7. **A**, proliferación celular. **B**, producción de NO. **C**, expresión de IL1β. **D**, expresión de TNFα. LPS: lipopolisacárido. #: p<0,05 vs. Control del mismo tiempo; ##: p<0,01 vs. Control del mismo tiempo; ###: p<0,001 vs. Control del mismo tiempo; &: p<0,05 vs. F1:Q1 del mismo tiempo; &&: p<0,01 vs. F1:Q1 del mismo tiempo; \*\*\*: p<0,001 vs. resto de condiciones del mismo tiempo.

Observamos que no hay diferencia significativa en la expresión de IL-1β de las células crecidas sobre el biomaterial con igual relación TerPy Q con respecto al control; en cambio, las células crecidas sobre TerP2:Q1 poseen una mayor expresión de esta citoquina tanto respecto del control como de TerP1:Q1. No obstante, a pesar de este incremento en la expresión, este es significativamente menor que el control positivo de citotoxicidad. Un efecto similar se encontró al evaluar la expresión de TNF-α. La menor proliferación celular y el aumento de la producción

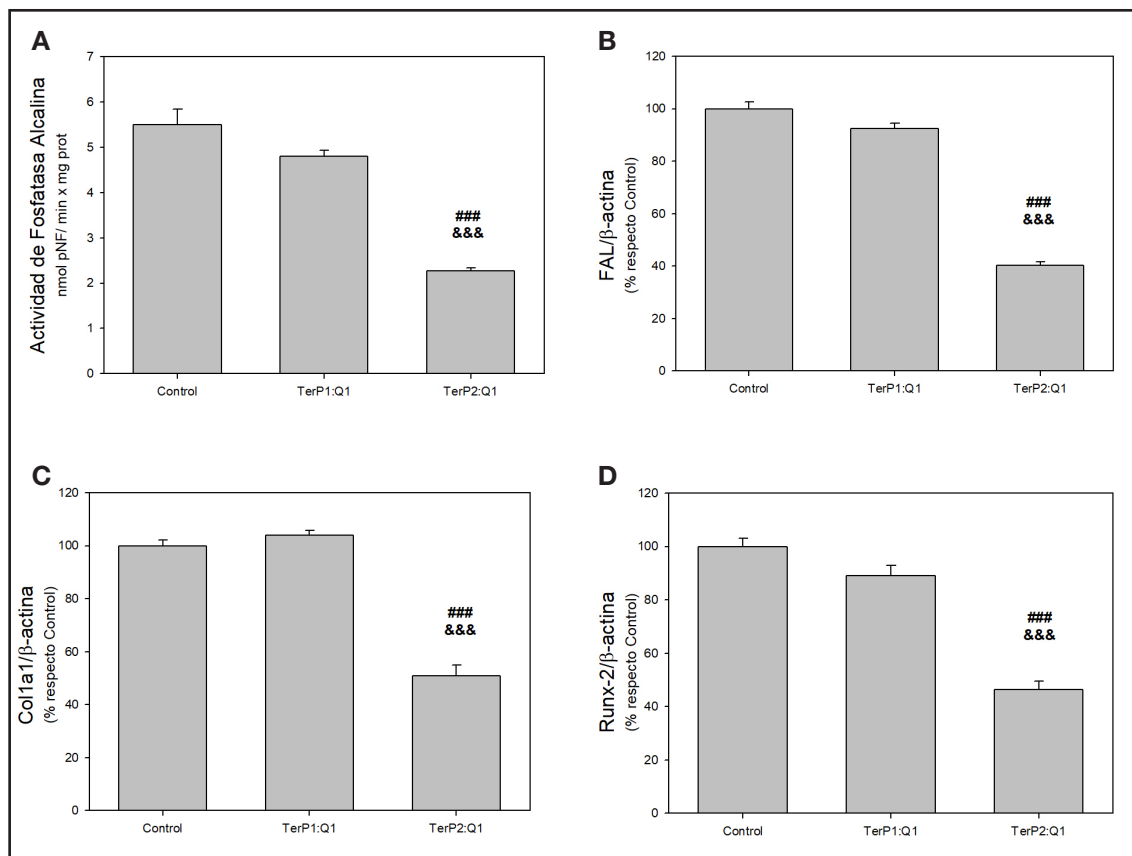
de NO y de citoquinas no solo pudo estar influenciado por el aumento de la cantidad de TerP en el biomaterial; una proporción de dicho efecto sobre el comportamiento celular puede estar causado por los cambios topográficos en la superficie, pues se ha demostrado que dichos cambios pueden producir alteraciones en las células que podrían ser beneficiosos o perjudiciales para las células.<sup>18,38-40</sup>

Otra característica importante es conocer la biocompatibilidad de los biomateriales. Para evaluar esta propiedad se utilizaron CPMO de



ratas, las cuales se hicieron crecer sobre los biomateriales y en medio osteogénico durante 14 días para conocer la capacidad de diferenciarse hacia un fenotipo osteoblástico. Luego de ese tiempo se evaluó la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual es un marcador de actividad osteoblástica. En la Figura 4A se observa la actividad de la enzima fosfatasa alcalina presente en los extractos de las células crecidas sobre los biomateriales expresados como nmol de pNF formado por minuto por mg de proteína del extracto. Encontramos que la actividad de la enzima se mantiene del extracto proveniente de las células crecidas sobre TerP1:Q1 con respecto

a control, pero no cuando crecen sobre TerP2:Q1, existiendo una menor actividad de esta. Tal efecto podría deberse a una disminución en la actividad de la enzima o a una disminución en la expresión génica de esta debida al material. A partir de estos resultados se analizó la expresión del gen de la fosfatasa alcalina (Figura 4B) y se encontró una disminución de este cuando las CPMO se cultivan y diferencian sobre el biomaterial con mayor composición de TerP. Para conocer si este efecto se produce en otros marcadores, se evaluó la expresión de colágeno tipo 1 (Figura 4C) y del factor de transcripción Runx-2 (Figura 4D) y se encontró



**Figura 4.** Evaluación de biocompatibilidad utilizando CPMO en medio osteogénico durante 14 días sobre los biomateriales TerP:1Q1 y TerP2:Q1. **A**, actividad de fosfatasa alcalina. **B**, expresión de fosfatasa alcalina. **C**, expresión de colágeno tipo 1. **D**, expresión de Runx-2. ###:  $p < 0,001$  vs. Control. &&&:  $p < 0,001$  vs. F1:Q1.

que ambos marcadores también se encuentran disminuidos en las células cuando se ensayan sobre la membrana con mayor contenido del polímero sintético. De esta manera, el aumento de la incorporación de TerP produce un entorno desfavorable para la diferenciación osteoblástica de las CPMO crecidas sobre el biomaterial y al igual que el comportamiento de las células RAW264.7. Este efecto podría deberse, en parte, a los cambios topográficos pues, como se ha demostrado en otros trabajos, se puede modular la actividad osteogénica de las CPMO a través de la rugosidad de la superficie.<sup>18, 38-42</sup>

En conclusión, hemos sintetizado un material a base de un polímero sintético y otro natural con potencialidad para ser empleado en aplicaciones biomédicas. Se ha demostrado que el terpolímero sintetizado es adecuado para generar interacciones con el polímero natural, confiriendo a los materiales obtenidos un comportamiento pH responsivo. Particularmente, la matriz denominada TerP1:Q1 posee una excelente biocompatibilidad, demostrada en la evaluación del perfil osteogénico de las CPMO

cultivadas sobre él, pues tuvieron una nula toxicidad durante el período de tiempo estudiado, resultando un buen candidato para realizar estudios en animales. Contrariamente, el aumento de la incorporación del TerP a la mezcla produjo un material citotóxico y no biocompatible.

**Agradecimientos:** este trabajo fue subsidiado por Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral, la ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2019-1007), por la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la Provincia de Buenos Aires. MSB, TGO y JMF son miembros de la Carrera de Investigador del CONICET; AGHC es alumno de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

**Conflicto de intereses:** los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Recibido: agosto 2023  
Aceptado: noviembre 2023

## Referencias

1. Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri M, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskeletal Disord* 2016;17:465.
2. Fernández JM. Importancia de la angiogénesis en el diseño de scaffolds para ingeniería de tejido óseo. *Actual Osteol* 2020;16:211-31.
3. Shichman I, Roof M, Askew N, et al. Projections and Epidemiology of Primary Hip and Knee Arthroplasty in Medicare Patients to 2040-2060. *JB JS Open Access* 2023;8:e22.00112.
4. Rather HA, Jhala D, Vasita R. Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Material Sci Eng C* 2019;103:109761.
5. Prina R, Rubino P, Gutiérrez R, Cassini F. Resultados tempranos de la artroplastia cervical utilizando Prodisc-C. *Rev Argent Neurocir* 2009;23:59-64.
6. Villena DS, Sotelano P, Conti L y cols. Comparación de los resultados de la artroplastia total de tobillo en pacientes ≤55 y >55 años. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol* 2020;85:305-16.
7. Loures FB, Chaoubah A, Oliveira VM de, Almeida AM, Campos EM de S, Paiva E P de. Economic analysis of surgical treatment



- of hip fracture in older adults. *Revista de Saúde Pública* 2015;49:12-9.
8. Sánchez A. El caballero y la dama con osteoporosis. *Actual Osteol* 2010;6:81-9.
  9. LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL et al. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int* 2022;33:2049-102.
  10. Sobh MM, Abdalbary M, Elnagar S, et al. Secondary Osteoporosis and Metabolic Bone Disease. *Journal of Clinical Medical* 2022;11(9):2382.
  11. McCarthy AD, Molinuevo MS, Cortizo AM. AGEs and Bone ageing in Diabetes mellitus. *J Diabetes Metab* 2013;4:276.
  12. Chen Y, Zhou Y, Lin J, Zhang S. Challenges to Improve Bone Healing Under Diabetic Conditions. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:861878.
  13. Schurman L, Bagur A, Claus-Hermberg H y cols. Guías 2012 para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. *Actual Osteol* 2013;9:123-53.
  14. Schurman L, Galich A, González C y cols. Guías argentinas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis 2015. *Actual Osteol* 2017;13:136-56.
  15. Lu YC, Lin YC, Lin YK, et al. Prevalence of osteoporosis and low bone mass in older chinese population based on bone mineral density at multiple skeletal sites. *Scie Rep-UK* 2016;6:25206.
  16. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* 1993;260:920-6.
  17. Benmassaoud MM, Gultian KA, DiCerbo M, Vega SL. Hydrogel screening approaches for bone and cartilage tissue regeneration. *Ann NY Acad Sci* 2020;1460:25-42.
  18. Alfano AL, Fernández JM. Induction of Topographical Changes in Poly-ε-Caprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Biocompatibility and Cytotoxicity Evaluations. *J Biomater Tissue Eng* 2015;5:142-9.
  19. Belluzo MS, Medina LF, Cortizo AM, Cortizo MS. Ultrasonic compatibilization of polyelectrolyte complex based on polysaccharides for biomedical applications. *Ultrason Sonochem* 2016;30:1-8.
  20. Belluzo MS, Medina LF, Molinuevo MS, Cortizo MS, Cortizo AM. Nanobiocomposite based on natural polyelectrolytes for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2020;108:1467-78.
  21. BraviCostantino ML, Oberti TG, Cortizo AM, Cortizo MS. Matrices based on lineal and star fumarate-metha/acrylate copolymers for bone tissue engineering: Characterization and biocompatibility studies. *J Biomed Mater Res Part A* 2019;107A:195-203.
  22. BraviCostantino ML, Cortizo MS, Cortizo AM, Oberti TG. Osteogenic scaffolds based on fumaric/N-isopropylacrylamide copolymers: Designed, properties and biocompatibility studies. *Eur Polym J.* 2020;122:109348.
  23. Cortizo MS, Molinuevo MS, Cortizo AM. Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:33-42.
  24. Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo AM, McCarthy AD, Cortizo MS. Characterization of poly(epsilon-caprolactone)/polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomater Sci Polymer* 2010;21:1297-312.
  25. Fernández JM, Cortizo MS, Cortizo AM. Fumarate/Ceramic Composite Based Scaffolds for Tissue Engineering: Evaluation of Hydrophilicity, Degradability, Toxicity and Biocompatibility. *J Biomater Tissue Eng* 2014;4:227-34.
  26. Fernández JM, Oberti TG, Vikingsson L, Gómez Ribelles JL, Cortizo AM. Biodegradable polyester networks including hydrophilic groups favor BMSCs differentiation and can be eroded by macrophage action. *Polym Degrad Stabil* 2016; 130:38-46.
  27. Lastra ML, Molinuevo MS, Cortizo AM, Cortizo MS. Fumarate Copolymer-Chitosan Cross-Linked Scaffold Directed

- to Osteochondrogenic Tissue Engineering. *Macromol Biosci* 2017;17.
28. Lastra ML, Molinuevo MS, Blaszczyk-Lezak I, Mijangos C, Cortizo MS. Nanostructured fumarate copolymer-chitosan crosslinked scaffold: An in vitro osteochondrogenesis regeneration study. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:570-9.
29. Lino AB, McCarthy AD, Fernández JM. Evaluation of Strontium-Containing PCL-PDIPF Scaffolds for Bone Tissue Engineering: In Vitro and In Vivo Studies. *Ann Biomed Eng* 2019;47:902-12.
30. Torres ML, Fernández JM, Dellatorre FG, Cortizo AM, Oberti TG. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering. *Algal Res* 2019;40:101499.
31. Torres ML, Oberti TG, Fernández JM. HEMA and alginate-based chondrogenic semi-interpenetrated hydrogels: synthesis and biological characterization. *Biomater Sci Polym Ed* 2021;32:504-23.
32. BraviCostantino ML, Belluzo MS, Oberti TG, Cortizo AM, Cortizo MS. Terpolymer-Chitosan membranes as biomaterial. *J Biomed Mater Res Part A* 2022;110:2383-93.
33. Oberti TG, Cortizo MS, Alessandrini JL. Novel copolymer of diisopropyl fumarate and benzyl acrylate synthesized under microwave energy and quasielastic light scattering measurements. *J Macromol Sci: Part A* 2010;47:725- 31.
34. Demirci S, Alaslan A, Caykara T. Preparation, characterization and surface pKa values of poly (N-vinyl-2-pyrrolidone)/chitosan blend films. *Appl Surf Sci* 2009;255:5979-83.
35. Bondaz L, Cousin F, Muller F, et al. pH sensitive behavior of the PS-b-PDMAEMA copolymer at the air-water interface. *Polymer* 2021;221:123619.
36. Molinuevo MS, Schurman L, McCarthy AD, et al. Effect of metformin on bone marrow progenitor cell differentiation: in vivo and in vitro studies. *J Bone Miner Res* 2010;25: 211-21.
37. Lino AB, Fernández JM, Molinuevo MS, Cortizo AM, McCarthy AD. Efectos in vivo del ranelato de estroncio sobre células progenitoras de médula ósea de ratas diabéticas. *Actual Osteol* 2016;12:78-86.
38. Cortizo AM, Ruderman G, Correa G, Mogilner IG, Tolosa EJ. Effect of Surface Topography of Collagen Scaffolds on Cytotoxicity and Osteoblast Differentiation. *J Biomater Tissue Eng.* 2012;2:125-32.
39. Nagud A, Alghfeli L, Elmasry M, El-Serafi I, El-Serafi A. Biomaterials as a Vital Frontier for Stem Cell-Based Tissue Regeneration. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10: article 713934.
40. Zaveri TD, Dolgova NV, Chu BH, et al. Contributions of surface topography and cytotoxicity to the macrophage response to zinc oxide nanorods. *Biomaterials* 2010; 31:2999-3007.
41. Cun X, Hosta-Rigau L. Topography: A Biophysical Approach to Direct the Fate of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials (Basel)* 2020;10:207.
42. Lastra ML, Molinuevo MS, Giussi JM, et al. Tautomerizable  $\beta$ -ketonitrile copolymers for bone tissue engineering: Studies of biocompatibility and cytotoxicity. *Mat Scie Eng C.* 2015;51:256-62.