



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
METALURGIA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

**“PROCESAMIENTO DE ANDAMIOS 3D DE FOSFATO TRICÁLCICO (β -
TCP)/ZrO₂-BIOVIDRIO DE FOSFATO PARA APLICACIONES DE
REGENERACIÓN ÓSEA”**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales**

Presenta:
M. C. Criseida Ruiz Aguilar

Director de Tesis:
Dra. Ena Athenea Aguilar Reyes

Morelia, Michoacán, Junio del 2017

RESUMEN

La ingeniería de tejido óseo es una excelente alternativa para reducir los trastornos y condiciones óseos, mediante la regeneración del hueso a partir de la combinación de biomateriales y terapia celular. En la presente investigación se fabricaron andamios con una relación de 80% en peso de β -TCP y 20 % en peso de biovidrio base fosfato, donde además se reforzó el biovidrio con diferentes cantidades de zirconia (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 % mol) con el objetivo de reducir su velocidad de disolución y mejorar la osteoconducción y osteogénesis del tejido óseo. Para la fabricación de los andamios se utilizó el método combinado de tecnología de polvos y espumado de polímeros a partir de una mezcla de β -TCP-biovidrio, espumante y resina fenólica. La cantidad de β -TCP-biovidrio se mantuvo fija en 55 % en peso, el espumante se varió desde 1, 1.5, 2, 2.5 hasta 3 % en peso y el resto del balance fue de resina fenólica, hasta encontrar la cantidad óptima que generó la porosidad interconectada y una distribución de tamaño de poro adecuado para que se lleve a cabo la osteoconducción y el anclaje celular. Los andamios de fosfato tricálcico reforzados con biovidrio se caracterizaron física, mecánica y morfológicamente para determinar su uso potencial en la regeneración del hueso tipo trabecular, los resultados obtenidos mostraron tamaños de poro de 1.41 hasta 303 μm , con una porosidad de 50-53% y resistencia a la compresión de 0.6 a 1 MPa, módulo de Young de 357-574 MPa y excelente interconectividad. Por otro lado, mediante ensayos con cultivos celulares con azul de alamar, se observó la multiplicación celular de preosteoblastos MC3T3-E1 hasta seis veces con relación al número de células sembradas inicialmente. Por medio de FE-SEM se observó la estructura tipo coliflor de la hidroxiapatita (HA) y por difracción de rayos X (DRX) se corroboró la presencia de la fase de la HA así como las fases cristalinas formadas en el vidrio después del tratamiento térmico. Las células se adhirieron, propagaron, proliferaron y mineralizaron en los andamios con composiciones E-V1, EVZ0.5 y E-VZ1.0. Considerando los excelentes resultados mostrados de microestructura, bioactividad, osteoconducción, osteoinducción y mineralización, los andamios tiene un gran potencial para ser utilizados para la ingeniería de tejido óseo.

Palabras clave: andamios; fosfato tricálcico; biovidrio base fosfato; hidroxiapatita; tecnología de polvos.

ABSTRACT

Bone tissue engineering is an excellent alternative to reduce bone disorders and conditions, by bone regeneration from the combination of biomaterials and cell therapy. In the research project, the scaffolds were fabricated with a ratio of 80 wt.% of β -TCP and 20 wt. % of phosphate-based bioactive glass. In addition, the phosphate-based bioactive glass was reinforced with zirconia in different amounts (0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mol%) with the purpose to reduce the dissolution rate and improve the osteoconduction and the osteogenesis of the bone tissue. The fabrication of the scaffolds were carried out by the combined method of powder technology and foaming of polymers, from the powder mixture of β -TCP-bioglass, foaming and phenolic resin. The amount of β -TCP-bioglass was set at 55 wt. %, the foaming agent from varied 1, 1.5, 2, 2.5 to 3 wt.%, and the balance was phenolic resin. All the mixture variations were made to determine the optimal amount that ensured an interconnected porosity and pore size suitable to increase the osteoconduction and cell attachment. Tricalcium phosphate scaffolds reinforced with bioglass were characterized morphologically, physically and mechanically. Promising samples for tissue engineering applications showed pore size ranging from 1.41-303 μm , total porosity of 50-53%, compressive strength values between 0.6 to 1 MPa, Young's modulus from 357-574 MPa, and excellent interconnectivity. AlamarBlue assays showed that the cell proliferation of MC3T3-E1 preosteoblasts scaffolds were sixfold increase in relation to the number of the initial cells. FE-SEM helped to observe the cauliflower structure of hydroxyapatite (HA) and X ray diffraction (DRX) showed that crystalline phases formed after heat treatment of the bioglass. The MC3T3-E1 cells were attached, propagated, proliferated and mineralized though the scaffolds E-V1, EVZ0.5 and E-VZ1.0. Considering that all scaffolds showed excellent results of microstructure, bioactivity, osteoconduction, osteoinduction and mineralization, the scaffolds have great potential to be used for bone tissue engineering.

Dedicatoria

Este proyecto esta dedicado a las personas que más han influenciado mi vida, dándome los mejores consejos, guiándome y haciéndome una persona de bien; con todo su amor y afecto, quiero dedicar a mis padres Jorge y Minerva la presente tesis.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres: Minerva y Jorge por ser los mejores papás, por depositar toda su confianza y por transmitirme su aprendizaje, valores, y sobre todo por el amor que siempre me brindaron, así como su apoyo incondicional, aunque no están en estos momentos conmigo, en mi corazón y en mi mente si lo están, cada día que pasa bendigo el haber formado parte de sus vidas, serán mi faro en medio de la noche y ni siquiera la distancia cambiara los momentos compartidos a su lado, sencillamente son irremplazables, ¡los amo papá y mamá!

A mi esposo y mejor amigo Ulises, quien es mi compañero de vida y mi complemento, gracias por todo tu amor, cariño y apoyo incondicional, te amo y eres la historia más bonita que el destino escribió en mi vida...

A mis hermanas Minerva y Briseida que siempre han estado para mí, mostrándome su cariño y echándome porras para salir adelante en la vida; hermanas nacimos del mismo árbol y aunque nuestras ramas crezcan en diferente dirección siempre nos unirán nuestras raíces...¡Las quiero mucho!

Cuando inicie este proyecto no sabía la cantidad de retos y aprendizajes que me dejarían marcada para bien, y eso es gracias a mi asesora la Dra. Ena, quién se ha convertido en mi maestra y en una excelente tutora mostrándome su apoyo durante estos 4 años, ¡muchas gracias!.

Quiero agradecer a los doctores que estuvieron apoyándome como revisores de este proyecto y a los técnicos del Instituto en Metalurgia y Materiales así como a Luis María Suárez Rodríguez por su apoyo en el laboratorio de pruebas biológicas, de esta Universidad, así como a los Dres. Martín Flores y Dra. Ana Edith quienes de forma externa apoyaron en parte importante con los resultados que se presentan en esta tesis.

Finamente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante estos cuatro años. El presente trabajo de tesis se realizó en el IIM² de la UMSNH, que participa del financiamiento institucional de recursos del PFCE 2016. El proyecto fue parcialmente financiado con recursos del proyecto CB-2013-C01-222262 "Estudio de la respuesta celular *in vitro* de andamios de biovidrio bioactivo producidos por tecnología de polvos para la Ingeniería de Tejido Óseo", aprobado por el CONACYT.

CONTENIDO

	PÁG.
Resumen	i
Abstract.....	ii
Dedicatoria y agradecimientos	iii
Contenido	iv
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	x
CAPÍTULO I. Introducción	
1.1.1 Objetivo general	5
1.1.2 Objetivos específicos.....	5
1.2 Justificación	6
1.3 Hipótesis	6
CAPÍTULO II. Revisión y discusión del estado del arte	
2.1 Tipos de Biomateriales	9
2.2 Ortofosfatos de calcio.....	11
2.2.1 Fosfato tricálcico (TCP)	14
2.2.2 Hidroxiapatita (HA).....	15
2.3 Composición química y síntesis de los ortofosfatos.....	16
2.4 Propiedades mecánicas de los ortofosfatos	18
2.5 Vidrios bioactivos.....	18
2.5.1 Biovidrios base fosfato (PBG).....	19
2.5.2 Técnicas para la fabricación de vidrios bioactivos.....	20
2.5.3 Elementos empleados para el dopaje de vidrios bioactivos	21
2.5.4 Zirconia.....	23
2.6 Andamios.....	24
2.6.1 Técnicas de fabricación de andamios porosos.....	26
2.6.2 Sinterización y porosidad de andamios porosos.....	27
2.7 Biología del Hueso	28
2.7.1 Morfología del hueso.....	29
2.7.2 Matriz ósea	31
2.7.2.1 Matriz orgánica.....	31
2.7.3 Células óseas	32
2.8 Desarrollo del hueso	33
2.8.1 La formación ósea intramembranosa (membranas).....	33
2.8.2 Formación ósea endocondral (modelo de cartílago).....	34
2.8.3 Remodelado óseo.....	35
2.9 Ensayos <i>in vitro</i>	36
2.9.1 Simulación de fluido corporal (SBF)	36
2.9.2 Cultivos celulares	41
2.9.2.1 Fases de crecimiento celular.....	44
2.9.3 Tipos de líneas celulares usadas para la regeneración <i>in vitro</i>	47
2.9.3.1 Propiedades fisicoquímicas en la superficie del biomaterial.....	47
2.9.4 Proliferación, diferenciación y mineralización.....	49

CAPÍTULO III. Metodología

3.1 Materiales y métodos.....	54
3.1.1 Fabricación del biovidrio base fosfato.....	54
3.1.2 Mecanosíntesis del fosfato tricálcico beta.....	55
3.1.3 Fabricación de las espumas	55
3.2 Caracterización física y estructural.....	56
3.2.1 Microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).....	56
3.2.2 Tamaño y distribución de partícula	56
3.2.3 Microtomografía de rayos X (μ CT)	57
3.2.4 Espectrometría de infrarrojo de la transformada de Fourier (FTIR)	57
3.2.5 Difracción de rayos X (DRX).....	57
3.2.6 Resistencia a la compresión.....	57
3.3 Estudios <i>in vitro</i>	58
3.3.1 Simulación de fluido corporal (SBF)	58
3.3.2 Mediciones de pH.....	59
3.3.3 ICP-MS.....	60
3.3.4 Microscopia Raman.....	60
3.3.5 Pérdida de peso.....	60
3.4 Cultivo celular	61
3.4.1 Modelo celular.....	61
3.4.2 Morfología y adherencia celular.....	62
3.4.3 Viabilidad celular	62
3.4.4 Proliferación celular	64
3.4.5 Actividad de alcalino fosfatasa (ALP)	64
3.4.6 Medición de colágeno.....	65
3.4.7 Análisis del grado de mineralización ósea por tinción histoquímica con rojo de alizarina S (tinción de depósitos de calcio) y cuantificación de ADN con correlación al número de células.	65
3.5 Análisis estadísticos.....	66

CAPÍTULO IV. Resultados y discusión

4.1 Vidrio bioactivo base fosfato.....	67
4.2 Evolución del fosfato tricálcico fase beta.....	70
4.3 Andamios.....	76
4.3.1 Tamaño y distribución de partícula	76
4.3.2 Formación de la estructura porosa interconectada	80
4.3.3 FE-SEM.....	81
4.3.4 DRX.....	85
4.3.5 FT-IR	88
4.3.6 Resistencia a la compresión.....	90
4.3.7 Micro-CT.....	94
4.4 Análisis <i>in vitro</i>	102
4.4.1 SBF	102
4.4.2 pH	108

4.4.3 FT-IR	109
4.4.4 Microscopía Raman	112
4.4.5 Relación Ca/P y pérdida de peso	116
4.4.6 DRX	118
4.4.7 ICP-MS	120
4.5 Análisis de cultivo celular	124
4.5.1 FE-SEM	124
4.5.2 Proliferación celular	131
4.5.3 Actividad relativa de alcalino fosfatasa (ALP)	132
4.5.4 Colágeno	134
4.5.5 Mineralización	135

CAPÍTULO V. Conclusiones

Conclusiones	138
Recomendaciones	141
Trabajo a futuro	142
Referencias	143

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁG.
Figura 1.1	Muestra los materiales nanoestructurados con aplicaciones en la medicina.....	3
Figura 1.2	Muestra los diferentes tipos de andamios (matriz porosa, nanofibra, hidrogeles y microestructuras) Los cuales se utilizan para la entrega controlada de moléculas bioactivas, combinando.....	4
Figura 2.1	Clasificación de los biomateriales.....	9
Figura 2.2	Diagrama de fases del sistema $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ ($\text{C}=\text{CaO}$, $\text{P}=\text{P}_2\text{O}_5$) a temperaturas elevadas, en donde C_7P_5 corresponde a $7 \text{Ca}_{0.5}\text{P}_2\text{O}_5$	12
Figura 2.3	Variación de la concentración del pH en equilibrio triprótico para las soluciones de ácido sulfúrico	13
Figura 2.4	Diferentes ortofosfatos de calcio obtenidos por la neutralización del ácido ortofosfórico. La solubilidad de los ortofosfatos de calcio en agua disminuye drásticamente como se puede observar de izquierda a derecha, en donde la HA es la fase más insoluble y estable.....	14
Figura 2.5	Muestra: (a) Proyección de la estructura cristalina del $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sobre el plano (001), en donde se observa las dos columnas A y B. El rombo en el inciso (a) denota la celda hexagonal del $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. (b) y (c) son configuraciones del CaO_n y de los grupos del PO_4 en las columnas A y B; a lo largo del eje c de la celda hexagonal.....	15
Figura 2.6	Estructura cristalina de la hidroxiapatita.....	16
Figura 2.7	(a) Tetraedro reticulados del vidrio base fosfato y (b) representa la estructura de los vidrios base fosfatos donde los modificadores de red son el sodio y el calcio, en cambio los formadores de red son los fosfatos	20
Figura 2.8	Principales estructuras cristalinas del dióxido de zirconio.....	24
Figura 2.9	Métodos de fabricación de andamios para ingeniería de tejido óseo.....	27
Figura 2.10	Principales tipos de tejido óseo	29
Figura 2.11	a) Diagrama esquemático del interior de la tibia el cual es un hueso largo, b) anatomía ósea del hueso humano.....	30
Figura 2.12	Osificación intramembranosa. Las células troncales mesenquimales se concentran para producir osteoblastos, los cuales se depositarán en la matriz ósea mineralizada	34
Figura 2.13	Osificación Endocondral. (A, B) Huesos largos como húmero, fémur y tibia que desarrollan la osificación endocondral donde las células troncales mesenquimales se duplican y diferencian dentro de los condroisitos para formar el modelo de cartílago del hueso. (C) en el centro de los condroisitos. (D, E) Vasos sanguíneos que permiten la llegada de los osteoblastos los cuales depositan la nueva matriz ósea sobre los restos del cartílago calcificado. (F-H) Los centros de osificación secundaria también formados como vasos sanguíneos externos del hueso.....	34
Figura 2.14	Proceso natural de remodelado óseo normal. BRU: unidad de remodelado óseo; CL: Línea del cemento; OS: osteoide.....	36
Figura 2.15	Muestra el origen de los cambios negativos sobre la superficie de la HA y los procesos de unión de la apatita en la formación del hueso en SBF.....	38
Figura 2.16	Factores para que se pueda dar un adecuado crecimiento celular.....	40

Figura 2.17	Imagen obtenida por SEM en donde se puede observar los cultivos de osteoblastos en un tiempo de incubación de 24 h (5000 X). (A) grupo de la ZS, (B) grupo de CaP, (C) grupo de la HA.....	41
Figura 2.18	Muestra células de ovario de hámster en suspensión, (a) antes de ser expuestas en dexrazoxano y (b) después de ser expuestas con un tiempo de 144 h en dexrazoxano.....	42
Figura 2.19	Factores para que se pueda dar un adecuado crecimiento celular.....	42
Figura 2.20	Fases características del crecimiento celular.....	46
Figura 2.21	Proliferación celular en los andamios de poli-ε-caprolactona (PCL) y dopados con nanopartículas magnéticas (MNPs).....	50
Figura 2.22	Actividades de ALP de las células MC3T3-E1 con respecto al tiempo de incubación.....	50
Figura 2.23	Morfologías celulares de osteoblastos en andamios después de 3 semanas de cultivo. (a-c) Secreciones extracelulares de osteoblastos. (d-f) Partículas y fibras nanométricas formadas sobre la matriz extracelular mineralizada. (g-i) Células apoptóticas en el andamio.....	52
Figura 3.1	Procedimiento experimental y caracterización de los andamios.....	53
Figura 3.2	Diagrama del tratamiento térmico para la elaboración del vidrio base fosfato.....	54
Figura 3.3	Procedimiento del AlamarBlue.....	64
Figura 4.1	Patrones de difracción de rayos X del polvo de zirconia tetragonal.....	68
Figura 4.2	Vidrio VZ1.0 antes de triturar y pulverizar.....	68
Figura 4.3	Patrones de difracción de rayos x de vidrios de fosfato donde se puede observar la estructura amorfa	69
Figura 4.4	Micrografías del vidrio: V1 (a) 100X y (b) 1500X.....	70
Figura. 4.5	Diferencias morfológicas de β-TCP, (a) Sigma Aldrich y (b) sinterizado por medio de mecanosíntesis a 350 rpm, 12 h y con T. T. a 900 °C por 3 h.....	72
Figura 4.6	Difracción de rayos X del polvo de β-TCP después del tratamiento térmico.....	73
Figura 4.7	Espectro de infrarrojo del β-TCP.....	75
Figura 4.8	EDS muestra la relación Ca/P de 1.53 del β-TCP obtenido por molienda mecánica.....	76
Figura 4.9	Curvas de distribución de tamaño de partícula de los polvos precursores para hacer los andamios	78
Figura 4.10	Distribución de tamaño de partículas para el andamio sin zirconia con la relación 80:20 % en peso de β-TCP y biovidrio, incluyendo los polvos de resina fenólica y espumante.....	79
Figura 4.11	Etapas de síntesis de la espuma con la composición E-V1, (a) espumado, (b) maquinado y (c) pirolisis y sinterización	81
Figura 4.12	Imágenes de FE-SEM donde se muestra la variación de morfología del andamio E-V1 en función del contenido de agente espumante: (a) 0.5 , (b) 1.0, (c) 1.5, (d) 2.0, (e) 2.5 y (f) 3.0 % peso	83
Figura 4.13	Micrografías de FE-SEM de los andamios del β-TCP con vidrio base fosfato y reforzados con 0.25 % mol de zirconia (a) y (b); andamios con vidrio sin zirconia (c) y (d)	85
Figura 4.14	Patrones de DRX de las espumas sin dopar (V1) y dopadas con zirconia en cantidades de 0.5 y 1.0 (E-VZ0.5 y E-VZ1.0).....	87

Figura 4.15	Espectro de FTIR que muestra los principales grupos funcionales de los andamios E-V1, E-E-VZ0.5 y E-VZ1.0	89
Figura 4.16	Prueba de resistencia a la compresión en los andamios (a) Forma de pastilla, (b) E-VZ1.0, (c) E-V1 y (d) espumas dopadas con zirconia	91
Figura 4.17	Distribución de las espumas de fosfato tricálcico y vidrio base fosfato en el equipo de microtomografía de rayos X	94
Figura 4.18	Muestra E-VZ1.0 los filtros que se usaron para analizar segmento por segmento cada una de las espumas	95
Figura 4.19	Relleno de poros y aplicación del ángulo de Feret para hacer el cálculo de tamaño de poro.....	95
Figura 4.20	Gráficas de distribución de tamaño de poro de los andamios (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75 y (e) E-VZ1.0 muestran la distribución de tamaño de poro	99
Figura 4.21	Imágenes de μ CT del andamio E-V1, (a) modelo en 3D reconstruido a partir de imágenes en 2D y (b) cubo de 8.4 mm que se obtuvo del modelo en 3D para poder llevar acabo el análisis de % de porosidad para cada uno de los andamios	100
Figura 4.22	Imágenes de μ CT de los andamios sinterizados (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75, (e) y (f) E-VZ1.0 con una amplia distribución de tamaño de poro.....	101
Figura 4.23	Micrografías del FE-SEM de los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 antes y después de la inmersión a 7 y 14 días en SBF.....	103
Figura 4.24	Muestra las espumas con 0.25 y 0.75 de zirconia en donde se observa la bioactividad en SBF partir del día 14	104
Figura 4.25	Morfología tipo flor o coliflor de la HA precipitada en la superficie del andamio VZ1.0 a 14 días de inmersión en SBF	105
Figura 4.26	Variación del pH en función del tiempo de inmersión en SBF en las diferentes composiciones.....	108
Figura 4.27	Espectro de FTIR para la muestra con composición E-VZ1.0 a diferentes tiempos de inmersión (0, 7, 14, 21 y 28 días) en SBF.....	117
Figura 4.28	Espectro de FTIR muestra las bandas características del andamio E-VZ1.0 después de 28 días de inmersión en SBF	112
Figura 4.29	Espectro Raman de los andamios de fosfato tricálcico beta reforzados con biovidrio base fosfato y dopados con zirconia	113
Figura 4.30	Espectros Raman característicos del andamio E-VZ1.0 sumergido en SBF a diferentes tiempos: 0, 7, 14, 21 y 28 días.....	115
Figura 4.31	Relación Ca/P de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 a diferentes tiempos (7, 14 Y 21 días).....	116
Figura 4.32	Pérdida de peso de las muestras E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 sumergidas en SBF por un periodo de 7 días	118
Figura 4.33	Patrones de DRX de los andamios E- V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 sumergidos en SBF por un tiempo de 7 días	119
Figura 4.34	Concentraciones de Ca, P y Zr en la solución de SBF a diferentes días de inmersión (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75 y (e) E-VZ1.0	124

Figura 4.35	Micrografías de FE-SEM de los andamios después de 3 días en medio de cultivo celular de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, EVZ0.75 y E-VZ1.0	125
Figura 4.36	Cuantificación de adherencia celular MC3T3-E1 al día 3 de los andamios E-V1, E-VZ05 y E-VZ1.0.....	126
Figura 4.37	Muestra el cultivo celular de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 a 7 días.....	127
Figura 4.38	Muestra imágenes de FE-SEM a 21 días de cultivo celular de los andamios con 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 de zirconia.....	128
Figura 4.39	Imágenes de FE-SEM donde se observa la formación e la HA a 28 días de cultivo en los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 principalmente, en cambio en E-VZ0.25 y E-VZ0.75 se observa adherencia celular	129
Figura 4.40	Imágenes de FE-SEM donde se observa el proceso de formación de la HA en los andamios: (a) adherencia celular de la célula MC3T3-E1 sobre la superficie del andamio E-VZ1.0 a partir de los 3 días en cultivo celular, (b) formación de pequeñas esferas en la superficie a los 7 días, (c) la superficie empieza a presentar estructuras aciculares típicas de la HA después de los 14 días y finalmente (d) empieza la precipitación de HA en toda la superficie del andamio a 21 días.....	130
Figura 4.41	Proliferación celular de MC3T3-E1 subclona 4 en los andamios de composición E-V1, EVZ0.5 y EVZ1.0 en función del tiempo (0, 1, 2, 3, 5 y 7 días).....	131
Figura 4.42	ALP después de 3 y 7 días de cultivo de los andamios con composiciones E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0	133
Figura 4.43	Muestra la cantidad de colágeno formado a 3 y 7 días respectivamente.....	135
Figura 4.44	Contenido de DNA en los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 a 7 días de cultivo celular	137

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁG.	
Tabla 2.1	Ortofosfatos y sus principales propiedades..... 16	
Tabla 2.2	Principales sistemas de biovidrios y elementos/óxidos empleados para el dopaje..... 22	
Tabla 2.3	Ventajas y desventajas de los diferentes métodos de fabricación de andamios porosos..... 26	
Tabla 2.4	Concentración iónica del SBF y el plasma humano..... 37	
Tabla 3.1	Composición de los diferentes vidrios base fosfato dopados con zirconia..... 55	
Tabla 3.2	Precursores empleados para hacer el SBF	59
Tabla 4.1	Relación de mecanismos para la formación de β -TCP.....	71
Tabla 4.2	Principales rangos característicos 2θ de los ortofosfatos.....	74
Tabla 4.3	Bandas de absorción de infrarrojo del β -TCP y las temperaturas a las cuales aparecen	75
Tabla 4.4	Valores obtenidos de tamaño de partícula de los polvos precursores a partir del programa Beckman Coulter.....	78

Tabla 4.5	Principales fases encontradas en las espumas E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0	88
Tabla 4.6	FT-IR donde se observa los principales grupos funcionales de las espumas.....	90
Tabla 4.7	Porosidad y resistencia a la compresión de los andamios de β -TCP y vidrio base fosfato.....	92
Tabla 4.8	Estado del arte de las propiedades mecánicas y los valores obtenidos de los materiales porosos. Altura = A, diámetro= D, L= lado, Espesor =E.....	93
Tabla 4.9	Picos característicos de frecuencias Raman observadas en β -TCP y HA asociados con los modos vibracionales de tipo PO_4^{3-}	114
Tabla 4.10	Principales fases encontradas en los andamios después de la inmersión en SBF	120

CAPÍTULO I

Introducción

Todos los tipos de sólidos se dividen en cuatro grupos principales: metales, polímeros, cerámicos y compuestos. Existe otra clasificación, llamados biomateriales que se dividen en biometales, biopolímeros, biocerámicos y biocompuestos. Todos ellos juegan un rol muy importante en el remplazo y regeneración de tejidos humanos.

Algunas aplicaciones de estos biomateriales incluyen curación de defectos óseos, tratamientos de fracturas, remplazo total o parcial de articulaciones, ortopedia, reconstrucción cráneo-maxilofacial, cirugía espinal, otorrinolaringología, etc. [1]

Los fosfatos de calcio pertenecen al grupo de los biocerámicos, y se definen como compuestos en donde sus elementos mayoritarios son el calcio con estado de oxidación +2, fósforo con estado de oxidación +5 y el oxígeno con estado de oxidación -2. Los fosfatos de calcio se clasifican de acuerdo a su grupo característico, es decir; el grupo de los ortofosfatos es el PO_4^{3-} , el cual es estructuralmente diferente al grupo meta PO_3^- , piro $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ y poli $(\text{PO}_3)_n^-$ [2], cada uno de estos grupos confieren propiedades físicas, químicas y estructurales especiales al compuesto que los contenga. Los ortofosfatos de calcio han tenido un gran avance en las últimas décadas como materiales con aplicaciones en la salud debido a su similitud con el componente mineral de los huesos de los mamíferos, además de ser bioactivos y osteoconductivos, lo que ha dado origen a ser considerados como excelentes candidatos para proveer la adhesión y proliferación celular; sin embargo, tiene limitantes que son: sus pobres propiedades mecánicas, principalmente en aquellos biocerámicos porosos que presentan un tamaño de poro mayor a $100\ \mu\text{m}$ [3], otra limitante es el

alto rango de disolución que muestran; Wang y col. [2], encontraron que el fosfato de calcio más soluble es el fosfato octacálcico (OCP), después le sigue el fosfato de calcio amorfo (ACP), fosfato tricálcico fase alfa (α -TCP), fosfato tricálcico fase beta (β -TCP) y el menos soluble es la hidroxiapatita (HA).

Por otro lado, se encuentra otro grupo muy importante dentro de los biocerámicos que es el de los biovidrios que al igual que los ortofosfatos han tenido un gran éxito en aplicaciones para regenerar tejido óseo, ya que permiten la formación de enlaces entre el biovidrio y el tejido óseo con mayor rapidez, así como estimulan el crecimiento del nuevo hueso; esto se debe a la formación de la capa de HA en la superficie del vidrio, lo que da origen a que el vidrio bioactivo empiece a disolverse [4]. De acuerdo a Mazaheri y col. [5], la perspectiva es muy alta para el fosfato tricálcico y el biovidrio, ya que de acuerdo a una extensa revisión, ellos concluyeron que estos dos materiales tienen un futuro prometedor dentro del área de la ortopedia por sus propiedades ya antes mencionadas (Figura 1.1), además cuando se presentan en forma de andamios las características son más cercanas a las del hueso humano, obteniendo mejores resultados en aplicaciones médicas, ya que se ha observado que los andamios no sólo proveen características funcionales de tipo estructural sino que ayudan a regular la proliferación, diferenciación y migración celular.

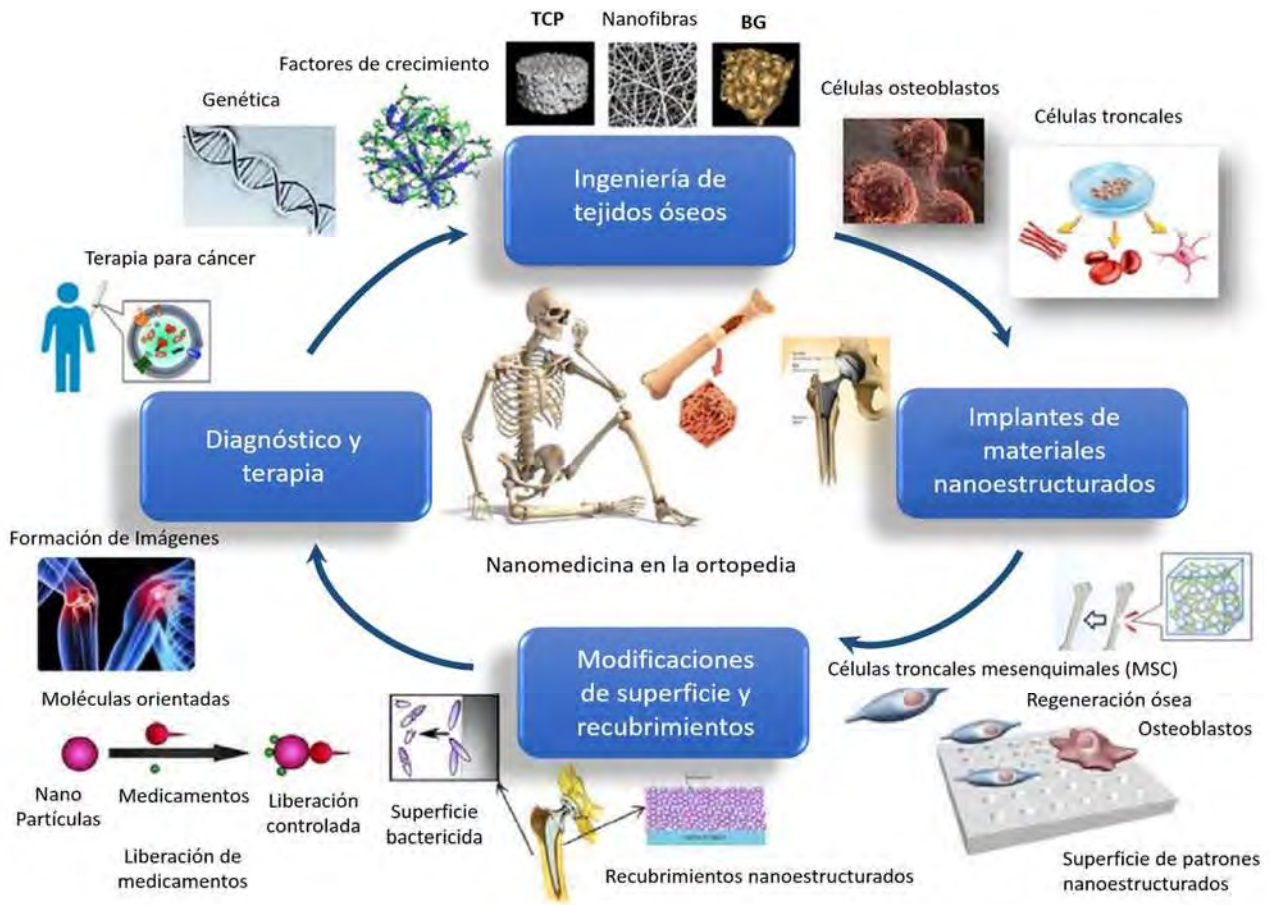


Figura 1.1 Muestra los materiales nanoestructurados con aplicaciones en la medicina [5].

Fernandez-Yague y col.[6], descubrieron que los dispositivos médicos tradicionales como son las prótesis de cadera, rodilla, marcapasos etc., carecen de la parte de la biomimética, esto hace que no tengan las propiedades químicas y mecánicas necesarias para que funcionen, lo que lleva a última instancia al fracaso del implante, sin embargo, los andamios actuales con diseños específicos ya sean permanentes o temporales han mostrado mejores resultados debido a la compatibilidad molecular, estructural y biológica similar al tejido que sustituyen; facilitando la regeneración de tejidos complejos, además se ha observado que los factores bioquímicos (factores de crecimiento, genes o proteínas) han favorecido a que sean todo un éxito. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que es necesario que un andamio cumplan con un enfoque diferente, es decir; desde el punto de vista de la medicina personal en donde se debe integrar una amplia gama de propiedades biológicas, físicas y químicas para una óptima regeneración ósea (Figura 1.2).



Figura 1.2 Muestra los diferentes tipos de andamios (matriz porosa, nanofibra, hidrogeles y microestructuras) los cuales se utilizan para la entrega controlada de moléculas bioactivas, combinando las estrategias físico-mecánicas para mejorar el tratamiento de diferentes tipos de tejido óseo y algunas enfermedades [6].

En la presente investigación se fabricaron espumas de fosfato tricálcico fase β , reforzadas con vidrio base fosfato, el cual fue dopado con diferentes cantidades de zirconia (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 % mol) con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas, físicas y estructurales; y estudiar la bioactividad, biocompatibilidad, osteoconductividad así como el comportamiento de interacción con el medio biológico.

En el Capítulo I se describe la problemática a resolver de acuerdo a los objetivos planteados en la investigación, además la justificación permitió presentar las razones que motivaron la presente

investigación y la hipótesis del problema permitió presentar andamios con una composición novedosa y con características óptimas físicas, químicas, estructurales y biológicas adecuadas para aplicaciones en el área de la ingeniería de tejidos óseos. Después se continúa con el Capítulo II, en este apartado se enfatizan varios estudios que se tomaron como referencia para sustentar la investigación y presentar una alternativa eficaz para la solución del problema planteado; el Capítulo III se refiere la metodología, éste tiene que ver con todo el proceso experimental que se llevó a cabo para la elaboración de los andamios, materiales y métodos empleados, además de los equipos utilizados para el análisis y la caracterización de los mismos. En el capítulo IV se plasma los resultados obtenidos desde la elaboración del andamio y las variables que se modificaron para llegar a obtener un andamio con características óptimas de tamaño de poro, distribución interconectada, así como el estudio de la interacción del andamio en ambientes biológicos con la incorporación de células MC3T3-E1, y finalmente el Capítulo V son las conclusiones obtenidas durante estos cuatro años de investigación de los andamios de fosfato tricálcico reforzados con vidrio base fosfato y dopados con zirconia en diferentes cantidades.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Obtener andamios de β -TCP y biovidrio base de fosfato con propiedades físicas, microestructurales, mecánicas y fisiológicas mejoradas para su uso potencial en la regeneración de tejido óseo.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Obtener el biovidrio en el sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - ZrO_2 mediante la técnica convencional de fusión y temple variando el contenido de ZrO_2 para encontrar las mejores condiciones de solubilidad del biovidrio así como la biodegradación de las espumas.
2. Elaborar andamios por tecnología de polvos y espumado de polímeros mediante la adición del biovidrio y β -TCP buscando las condiciones que permitan obtener la degradación adecuada en el cuerpo y la formación de la HA.

3. Caracterizar las espumas de forma fisicoquímica, morfológica y mecánicamente para determinar su aplicación como andamios en regeneración ósea.
4. Evaluar la bioactividad *in vitro* de los andamios, mediante inmersión en simulación de fluido corporal y cultivos celulares con preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 y analizar su respuesta biológica por la adherencia, proliferación, diferenciación, citotoxicidad, así como observar la interacción de la proteína alcalina fosfatasa.

1.2 Justificación

Entre los posibles candidatos para andamios en la ingeniería de tejido óseo, el que mayor potencial tiene en el campo de los ortofosfatos es el fosfato tricálcico (TCP), especialmente el de fase beta β -TCP, ya que presenta propiedades de biocompatibilidad y osteoconductividad. Un aspecto muy importante es que químicamente es similar al hueso humano, además de ser reabsorbible, lo cual evita la formación de tejido fibroso, sin embargo, tiene una limitante muy grande que es su alta velocidad de degradación, así como sus bajas propiedades mecánicas principalmente la resistencia a la compresión que han limitado su uso en la aplicación de implantes para hueso largos (hueso trabecular). Por otro lado, el vidrio bioactivo base fosfato ($45 \text{ P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-ZrO}_2$), ha sido un excelente candidato para regeneración ósea, mostrando un mejor control de disolución con respecto al del fosfato tricálcico, así como se ha observado que mejora la osteoconducción y la osteoinducción en tiempos más cortos. Cuando el vidrio es dopado con zirconia en cantidades variables (0.25, 0.5, 0.75, 1.0 % en mol) ha permitido un control mayor en la disolución del material, además se pretende que la zirconia ayude a incrementar las propiedades mecánicas en este caso resistencia a la compresión, ya que al interactuar como agente nucleante incrementa los enlaces de tipo puente de oxígeno y se incorpora como formador de red dándole mayor resistencia a la estructura [7].

1.3 Hipótesis

El fosfato tricálcico fase beta tiene una composición química similar a la del hueso, lo cual lo hace prometedor para ser usado como biomaterial para regeneración de tejido óseo, pero sus limitaciones como son: su alto rango de disolución y sus pobres propiedades mecánicas podrían mejorarse

mediante la combinación de biovidrio base fosfato para controlar el rango de disolución, además de promover la bioactividad, evitando la formación de detritos tóxicos en el cuerpo humano, ya que el calcio y fósforo son elementos que forman en su totalidad ambos materiales, dentro de un ambiente fisiológico ayudarán al mantenimiento óseo, y a la regeneración del sitio donde se encuentren implantados así como a la formación de la HA.

Por otro, las propiedades mecánicas del fosfato tricálcico se mejorarán con la adición de partículas de ZrO_2 en el biovidrio, ya que el Zr^{4+} forma enlaces entre la red del biovidrio base fosfato actuando como agente nucleante e incorporándose en la red en sitios que ocupa fósforo, elemento formador de la estructura del biovidrio, además la zirconia presenta propiedades de osteointegración con el hueso, debido a que no es citotóxico, aumentando la respuesta de interacción entre el biomaterial y el hueso.

CAPÍTULO II

Revisión y discusión del estado del arte

Los materiales sintéticos usados en la construcción de dispositivos médicos, cuando interactúan con el ambiente biológico o en contacto con los tejidos vivos, se les conocen como biomateriales.

El desarrollo de los biomateriales cubre un campo muy grande que va desde los materiales naturales, sintéticos, orgánicos e inorgánicos, metales, polímeros o cerámicos, como se observa en el diagrama de la Figura 2.1.

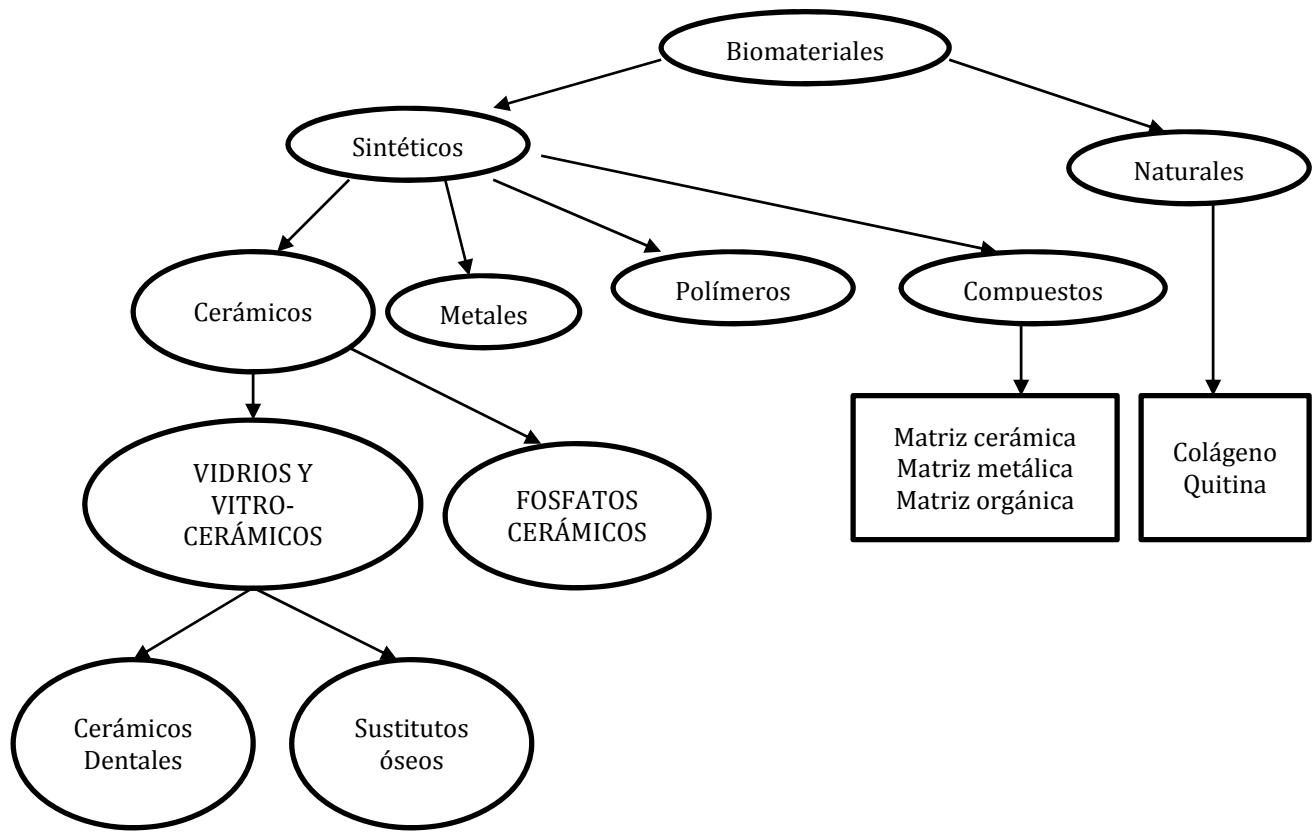


Figura 2.1 Clasificación de los biomateriales [8].

En general, los biomateriales se pueden clasificar de acuerdo a la respuesta biológica que presenten en el tejido en inertes, bioactivos o reabsorbibles.

2.1 Tipos de Biomateriales

La primera generación de biomateriales se le conoce como bioinertes, se fabricaron con la finalidad de minimizar la formación de tejido fibroso en la interface con el tejido huésped. Este tipo de materiales generan un riesgo de daño mayor en los tejidos adyacentes, debido a que el tejido fibroso encapsula al implante o al material que incluso puede provocar situaciones tóxicas y en los peores casos necrosis o la captura por completo del implante.

Para comprender mejor la diferencia entre un material bioactivo y uno biopasivo es necesario explicar los términos de osteointegración, osteoconducción y osteoinducción [8,9].

Osteointegración: es el anclaje que resulta de la formación del tejido óseo alrededor del implante sin presencia de tejido fibroso en la interfase hueso-implante.

Osteoconducción: Es el crecimiento del hueso sobre en la superficie del material o dentro de los poros, canales o hendiduras que presente el material. Se puede decir que los materiales osteoconductivos proveen una superficie interfacial que ayuda a la migración ósea a lo largo del implante/interfase ósea. Típicamente se puede observar este comportamiento debido a la presencia de la fase apatita, ya que es una respuesta inicial del proceso de osteoconducción y es dependiente de la composición química y la textura de la superficie del material.

Osteoinducción: Es el proceso por el cual se induce la osteogénesis, es decir es la capacidad de formación de hueso producto de la activación de las funciones de los osteoclastos y osteoblastos.

Por otro lado, un material bioactivo se puede definir como aquel que presenta una respuesta interfacial deseable en la formación de enlaces entre la interface tejido-implante, además de cuidar otros aspectos como son la reactividad química. Los cerámicos de fosfatos de calcio y vidrios bioactivos son capaces de formar enlaces interfaciales con los tejidos del huésped. Por último los biomateriales reabsorbibles son aquellos al ser implantados, se disuelven con el tiempo y son reemplazados gradualmente por el tejido natural, en este grupo entran los ortofosfatos de calcio como la HA y el TCP.

Yuan y Col. [10] exponen que los biomateriales de fosfato de calcio, principalmente los ortofosfatos de calcio, son los que mejores propiedades de osteoconducción presentan con respecto a otros materiales empleados para la ingeniería de tejidos, debido a que tienen propiedades fisicoquímicas peculiares (reguladores de acidez, disminuye la citotoxicidad etc.) que permiten el crecimiento de las células osteogénicas.

2.2 Ortofosfatos de calcio

Existen diversidad de estudios que han mostrado que la ciencia de materiales ha ayudado al cuidado de la salud, principalmente los fosfatos de calcio: pirofosfato, metafosfato y ortofosfato; cada uno de éstos se diferencia por el tipo de anión que lo forma, por ejemplo, para el prefijo piro lo compone el anión $P_2O_7^{4-}$, para meta es PO_3^- y orto está formado por PO_4^{3-} . Los ortofosfatos de calcio se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, sobre todo en forma de apatita (cristal formado por calcio y fósforo) y forman parte esencial de dientes y huesos. El aporte suficiente de fósforo en forma de fosfato es esencial para un buen funcionamiento del cuerpo humano, que interviene en los procesos bioquímicos más elementales. Los ortofosfatos, se encuentran en la naturaleza de forma abundante en huesos y en varias calcinaciones patológicas. Los ortofosfatos fueron descubiertos en el año de 1769 y desde entonces hasta la actualidad han tenido grandes avances con un número de 2000 publicaciones al año lo cual confirma claramente su importancia.

Algunas de las aplicaciones de estos ortofosfatos de calcio son en osteoporosis, implantes dentales, dispositivos percutáneos, tratamientos periodontales, defectos óseos, tratamientos de fracturas, remplazo total de articulaciones, ortopedia, reconstrucción cráneo-maxilofacial, otorrinolaringología y cirugías de espina dorsal solo por mencionar algunas [11].

Dorozhkiny Antoniac [11,12], han hecho un gran número de investigaciones relacionadas con los ortofosfatos en donde hace énfasis en el diagrama $CaO - P_2O_5$, que presentan los ortofosfatos de calcio no iónicos, así como las principales relaciones molares de Ca/P que se encuentran entre 0.5 a 2.0; y temperaturas que van desde 200 hasta 2200 °C (Figura 2.2), a partir de este diagrama se pueden observar las fases posibles que pueden formar los ortofosfatos.

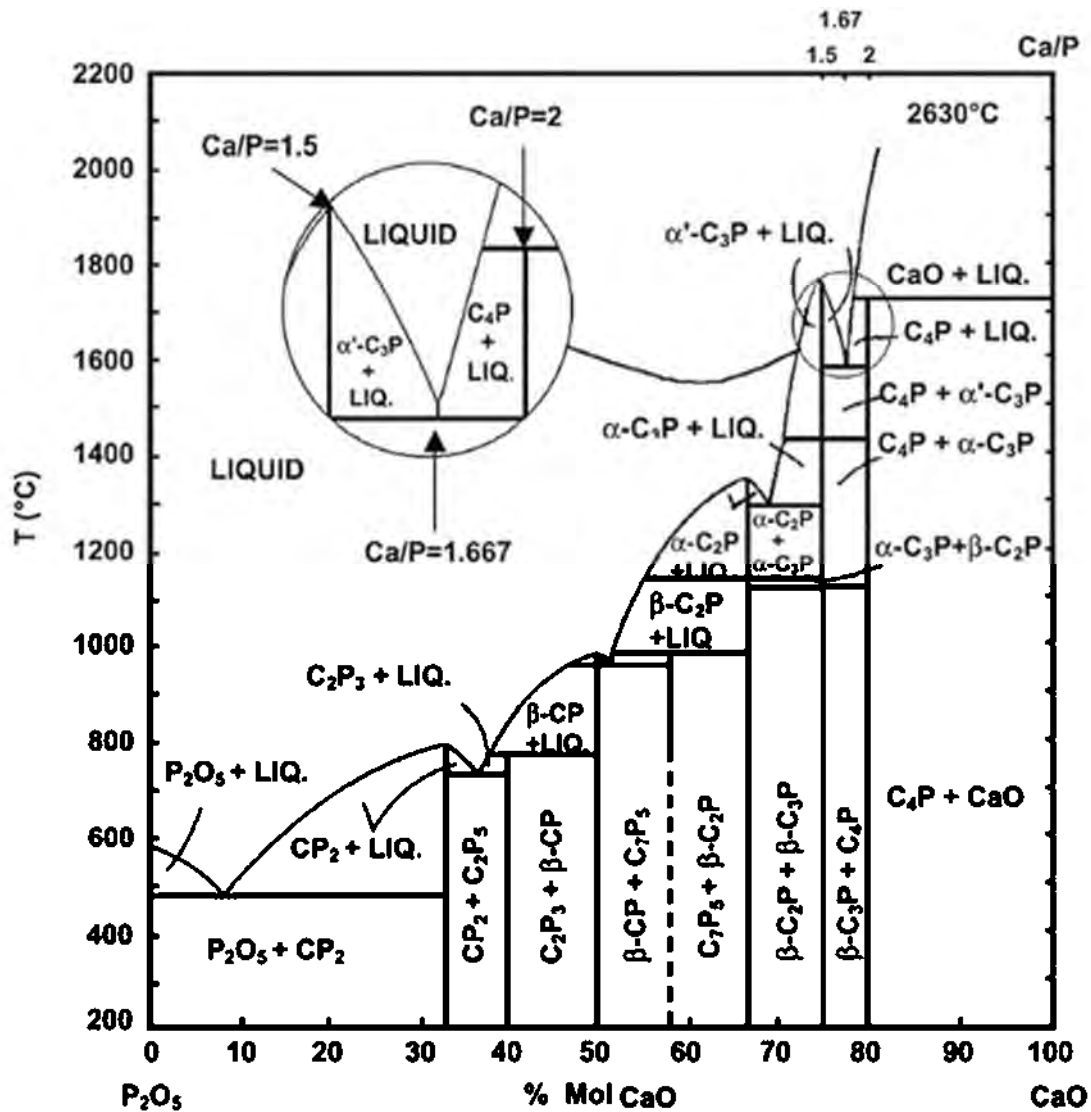


Figura 2.2. Diagrama de fases del sistema $\text{CaO} - \text{P}_2\text{O}_5$ ($\text{C}=\text{CaO}$, $\text{P}=\text{P}_2\text{O}_5$) a temperaturas elevadas, en donde C_7P_5 corresponde a $7\text{CaO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$ [12].

Dorozhkin encontró, que los parámetros más importantes de los ortofosfatos son: la relación Ca/P , basicidad/acidez y la solubilidad, estos parámetros se relacionan fuertemente con el pH, es decir; a bajas relaciones de Ca/P los ortofosfatos se comportan de forma ácida y por lo tanto, tienen mayor solubilidad en agua, además de que la solubilidad varía de valores muy ácidos como es el caso del fosfato monocálcico (MCPM) hasta valores extremadamente altos o básicos como son las apatitas.

Debido al equilibrio triprótico que existe en las soluciones de ortofosfatos, se puede observar variaciones en el pH que alteran las concentraciones de los cuatro polimorfos de los fosfatos de

calcio (H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) en ácido ortofosfórico, así como la composición química que se forma directamente por precipitación (Figuras 2.3 y 2.4).

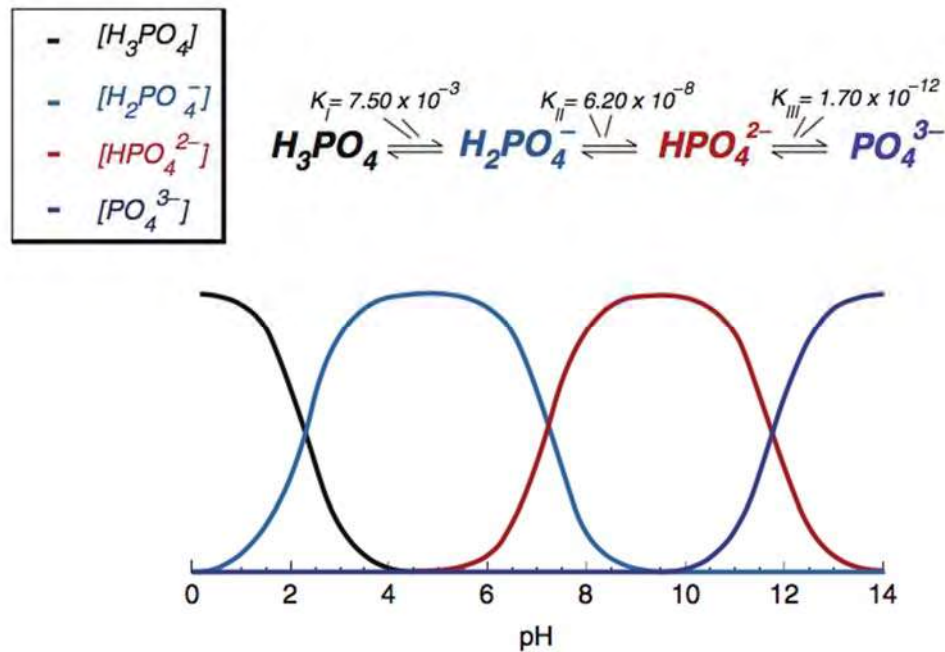


Figura 2.3 Variación de la concentración del pH en equilibrio triprotico para las soluciones de ácido fosfórico [12].

A partir de las propiedades de acides y solubilidad se puede decidir qué tipo de ortofosfato puede ser usado como material para la regeneración ósea, por ejemplo el MCPM no es encontrado en calcificaciones biológicas, incluso en su estado más puro se le considera como no compatible por su alta acidez.

Otro ejemplo es el fosfato monocálcico anhídrido (MCPA o MCP) que al igual que el MCPM no se observa de forma natural en tejidos calcificados. Así como se estudiaron el MCPM y el MCPA se realizaron una cantidad inmensa de pruebas con otros ortofosfatos como fueron el fosfato de dicálcico anhídrido (DCPA), hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico (TCP), sin embargo la HA y el TCP mostraron mejores resultados de bioactividad y osteoconductividad que el resto de los ortofosfatos mencionados [13], sin embargo la mayor limitante del TCP y la HA son sus bajas propiedades mecánicas, es decir: son frágiles y su resistencia a la compresión o fatiga es baja.

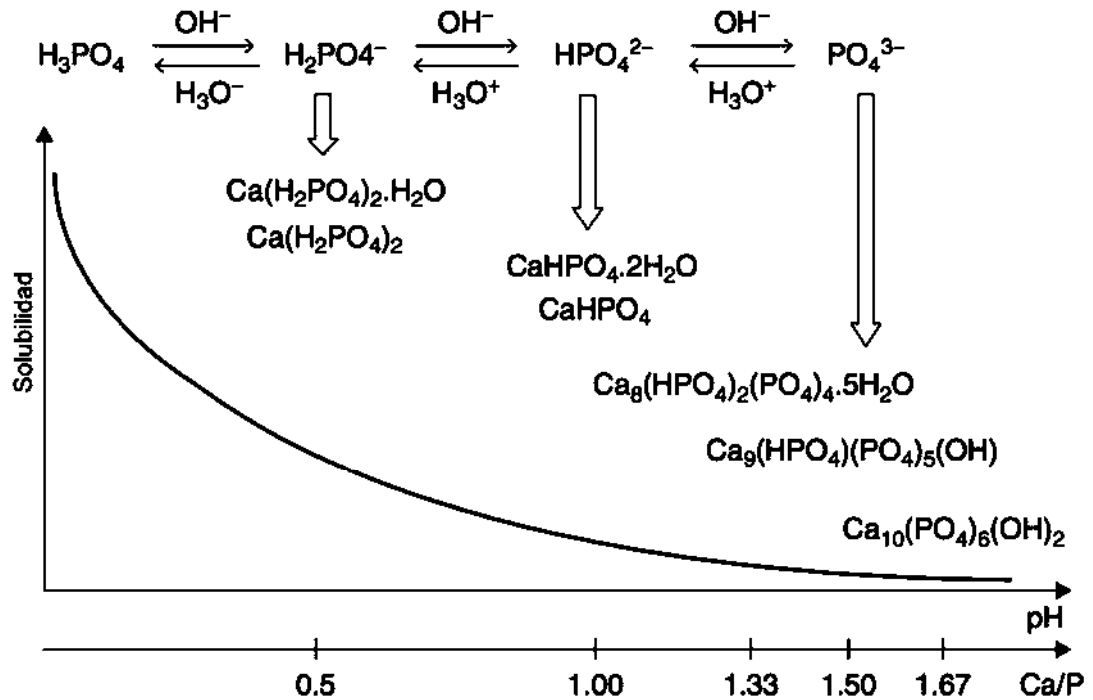


Figura 2.4 Diferentes ortofosfatos de calcio obtenidos por la neutralización del ácido ortofosfórico. La solubilidad de los ortofosfatos de calcio en agua disminuye drásticamente como se puede observar de izquierda a derecha, en donde la HA es la fase más insoluble y estable [12].

2.2.1 Fosfato tricálcico (TCP)

El fosfato tricálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCP] es una mezcla de calcio y fósforo que constituye la fase mineral de los huesos del cuerpo humano, su aspecto es el de un polvo blanco e inodoro. El TCP tiene tres polimorfos que son: β , α y α' dependiendo del rango de temperatura, sin embargo el β -TCP ha sido el de mayor importancia debido a sus características de biocompatibilidad, la relación Ca/P es de 1.5 y una relación de O/P de 4.0. El β -TCP cristaliza en estructura romboidal, con el grupo espacial $R\bar{3}c$ y parámetros de red de a y $b = 10.439(1) \text{ \AA}$, $c = 37.375(6) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$. La estructura cristalina está representada por dos columnas independientes, en donde la columna A contiene los átomos de Ca y P y la segunda columna B, es una columna distorsionada que contiene seis átomos de Ca y cuatro átomos de P. La estequiometría de estas dos columnas se muestra en la Figura 2.5 en donde los átomos de Ca son localizados en cinco sitios cristalográficos etiquetados como Ca (1)-Ca (5), la variación de números de coordinación hace que los estados de energía sean diferentes. Además, tiene limitantes como la solubilidad en agua que es dos veces

mayor que la HA [14]. Por otro lado, cuando el β -TCP es reabsorbido *in vivo* por el nuevo tejido empieza a crecer reemplazando el implante hecho de β -TCP, esta propiedad es un avance muy grande comparada con otros materiales que no son reabsorbibles y mucho menos reemplazados [15].

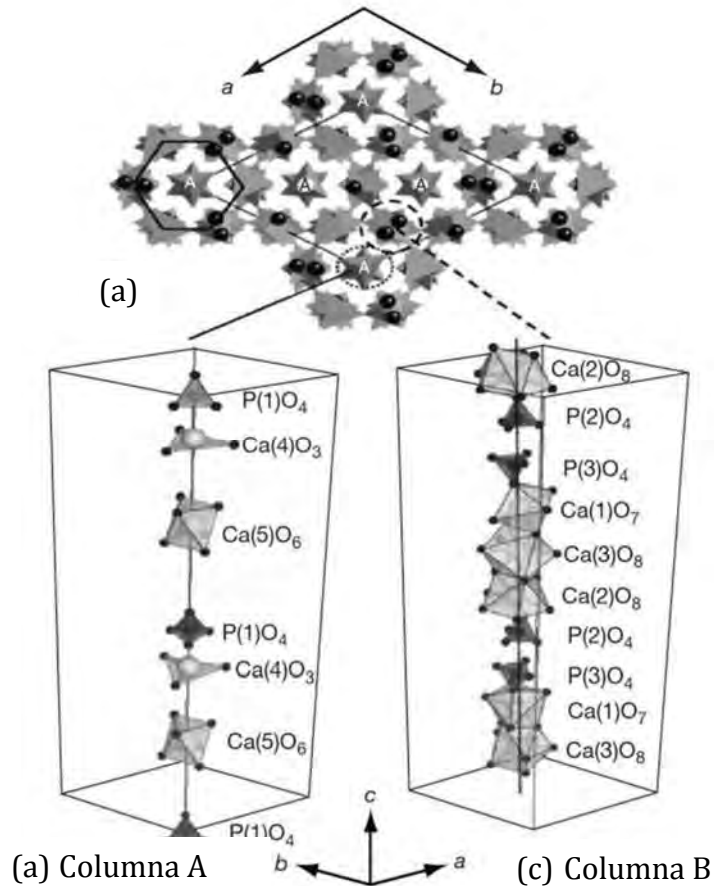


Figura 2.5 Muestra: (a) Proyección de la estructura cristalina del $\beta - Ca_3(PO_4)_2$ sobre el plano (001), en donde se observan las dos columnas A y B. El rombo en el inciso (a) denota la celda hexagonal del $\beta - Ca_3(PO_4)_2$. (b) y (c) son configuraciones del CaO_n y de los grupos del PO_4 en las columnas A y B; a lo largo del eje *c* de la celda hexagonal [16].

2.2.2 Hidroxiapatita (HA)

La hidroxiapatita es una capa superficial de fosfato de calcio que se forma o se precipita en la superficie de vidrios bioactivos u ortofosfatos cuando entra en contacto en SBF (fluido corporal simulado) a través de reacciones interfaciales y mediadas por células. La capa formada de HA limita las características químicas y cristalográficas del hueso, lo que le permite unirse

químicamente al hueso, debido a que dos tercios del hueso son hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Figura 2.6) [17].

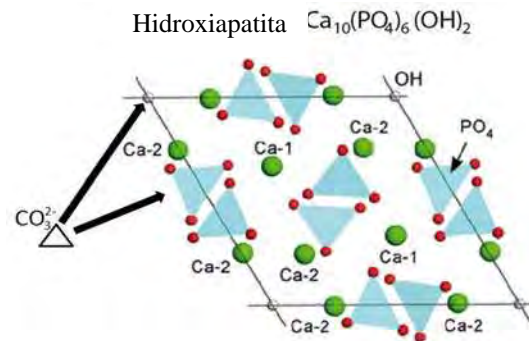


Figura 2.6 Estructura cristalina de la hidroxiapatita.

2.3 Composición química y síntesis de los ortofosfatos

La composición química de los ortofosfatos también llamados apatitas es un punto clave cuando se usa en el área clínica, el biomaterial debe mostrar tolerancia fisiológica, biocompatibilidad y una estabilidad química permitiendo un comportamiento muy cercano a las estructuras naturales.

Las apatitas como la hidroxiapatita (HA) y el fosfato tricálcico beta (β -TCP) juegan un rol prominente en la práctica médica, ya que ambos son materiales osteogénicos permitiendo que se dé un fuerte enlace entre el hueso y el huésped. Algunas de las propiedades físicas que presentan HA y el (β -TCP) se pueden observar claramente en la Tabla 2.1 comparados con otros ortofosfatos.

Tabla 2.1. Ortofosfatos y sus principales propiedades [3,11,18].

Relación Ca/P	Compuesto,	Fórmula	Solubilidad (25°C) $-\log K_s$	Solubilidad 25 °C, g/L	Estabilidad química (25°C)
0.5	Fosfato monocálcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.14	~18	0.0-2.0
0.5	Fosfato monocálcico anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.14	~17	c

a no se puede precipitar en soluciones acuosas; **b** no puede ser medido con precisión; **c** estable a temperaturas arriba de 100 °C; **d** siempre es metaestable.

1.0	Fosfato dicálcio dihidratado (DCPD) Mineral Brusita	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6.59	~0.088	2.0-6.0
1.0	Fosfato dicálcico anhidro (DCPA) Mineral Monerita	$CaHPO_4$	6.90	~0.048	c
1.33	Fosfato octacálcico (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)$	96.6	~0.0081	5.5-7.0
1.5	α -fosfato tricálcico (α -TCP)	$\alpha - Ca_3(PO_4)_2$	25.5	~0.0025	a
1.5	β -fosfato tricálcico (β -TCP)	$\beta - Ca_3(PO_4)_2$	28.9	~0.0005	a
1.2-2.2	Fosfato de calcio amorfo (ACP)	$Ca_xH_y(PO_4)_z \cdot nH_2O$ b = 3 – 4.5; 14 – 20% H_2O		B	~5-12d
1.5-1.67	Hidroxiapatita deficiente de calcio (CDHA) ^e	$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(OH)_y$	~85.1	~0.0094	6.5-9.5
1.67	Hidroxiapatita (HA o HAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)$	116.8	~0.0003	9.5-12
1.67	Fluorapatita (FA o FAp)	$Ca_{10}(PO_4)_6F_2$	120.0	~0.0002	7-12
2.0	Fosfato tetracálcico (TTCP o TetCP) Mineral hilgenstonita	$Ca_4(PO_4)_2O$	38-44	~0.0007	a

La síntesis de las apatitas en los últimos 30 años fueron motivados por el desarrollo de biomateriales que se basan principalmente en el fosfato tricálcico e HA, la razón principal para desarrollar biomateriales a partir de estos dos compuestos fue por su similitud con la composición de los minerales óseos. En la literatura existen numerosos métodos que han tenido éxito en la síntesis de apatitas, que van desde reacciones en estado sólido, precipitación o métodos de hidrólisis que posteriormente se sinterizan a altas temperaturas, usualmente a temperaturas arriba de los 1 000 °C, también se han preparado por otras rutas, por microondas y sol-gel, los cristales obtenidos de tamaños nanométricos han sido por la rutas de precipitación o hidrólisis a bajas temperaturas (25-60 °C). La síntesis de apatitas con tamaños de dimensiones cercanas al del esmalte humano han sido por rutas de precipitación o hidrólisis a temperaturas en rangos de 80 a 95 °C [19].

Los estudios en apatitas sintéticas han mostrado que su formación se lleva a cabo por la sustitución de iones de Ca, PO₄ y OH en la estructura de la patita que da como resultado cambios en los

parámetros de la red, en la cristalinidad (tamaño y tensión de cristal) y en las propiedades de disolución.

2.4 Propiedades mecánicas de los ortofosfatos

Las propiedades mecánicas de los ortofosfatos se forman a partir de materiales policristalinos frágiles, que son gobernadas por aspectos como la cristalinidad, tamaño de grano, límite de grano, porosidad y composición. Se ha observado de forma general, que las propiedades mecánicas disminuyen significativamente cuando la cantidad de fase amorfa, microporosidad y tamaño de grano aumentan, mientras que; a mayor cristalinidad y baja porosidad, el tamaño de grano tiende a dar una mayor rigidez, resistencia a la compresión y tenacidad a la fractura [20].

Los ortofosfatos de calcio presentan propiedades mecánicas bajas, por ejemplo la HA tiene valores de resistencia a la fractura menor a $1 \text{ MPa m}^{\frac{1}{2}}$ en cambio el hueso humano (cortical y trabecular) tiene valores de $2 - 12 \text{ MPa m}^{\frac{1}{2}}$. Además, se ha observado que los valores decrecen linealmente al aumentar la porosidad. Así como se ha encontrado que la resistencia incrementa con el incremento de la relación Ca/P , en donde a una relación $Ca/P \sim 1.67$ se reportó el valor máximo de resistencia. Por lo tanto, la resistencia disminuye de forma exponencial cuando se incrementa la porosidad [11].

2.5 Vidrios bioactivos

Los vidrios bioactivos con formulaciones específicas ayudan a favorecer y controlar la reacción en el ambiente biológico, ofreciendo una alternativa eficaz para los fosfatos de calcio tradicionales. La historia de los vidrios bioactivos se origina en los años 60's donde Hench y col. [21] observaron las características particulares de los vidrios base sílice con la finalidad de formar enlaces fuertes entre el hueso y el tejido óseo.

Durante varias décadas se han estudiado una gran diversidad de sistemas de compuestos, que combinan fosfatos de calcio con fase cristalina y vidrios bioactivos; representando una alternativa

innovadora, que permite superar los límites de los constituyentes individuales [22]. Como primer aspecto la bioactividad de los compuestos se gobierna por las fracciones en volumen del cerámico y de las fases del vidrio permitiendo reacciones diferentes de disolución en ambientes fisiológicos [23]. La estructura de los biovidrios está formada por óxidos que los constituyen iones de oxígeno con coordinaciones de tipo tetraédricas o triangulares unidas entre sí por iones formadores (Si, P, B, etc.). La red del biovidrio está formada por el conjunto de iones formadores que dan soporte y a su vez distorsionan la red presentando huecos en donde se sitúan los iones modificadores que pertenecen al grupo de los metales alcalinos y alcalinotérreos (Ca, Mg, Na, etc.), estos óxidos hacen roturas parciales en la red debilitando la cohesión, estabilidad y por consiguiente bajan la temperatura. Existen otro grupo que son los óxidos intermedios (Al, Zr, Ti, etc.), son óxidos que no pueden formar vidrio por si solos, sin embargo ayudan a estabilidad la red tridimensional [24].

2.5.1 Biovidrios base fosfato (PBG)

Los vidrios base fosfatos están formados por un sistema que tiene la composición química $P_2O_5 - CaO - Na_2O$, consiste en una red formada por tres vértices de tetraedros de $[PO_4]$ reticulados [25] (Figura 2.7), los cuales están unidos a un máximo de tres tetraedros vecinos formando una red tridimensional vítrea de P_2O_5 , la adición de óxidos al vidrio permite la depolimerización de la red provocando el rompimiento de enlaces de tipo P-O-P y formando oxígenos sin puente (NBO), por otro lado cuando existe modificación de los cationes (iones modificadores o intermedios) provoca una reticulación entre los NBOs y dos cadenas de fosfatos, aumentando la resistencia de unión del reticulado iónico y mejorando la resistencia mecánica y la durabilidad química del vidrio [26].

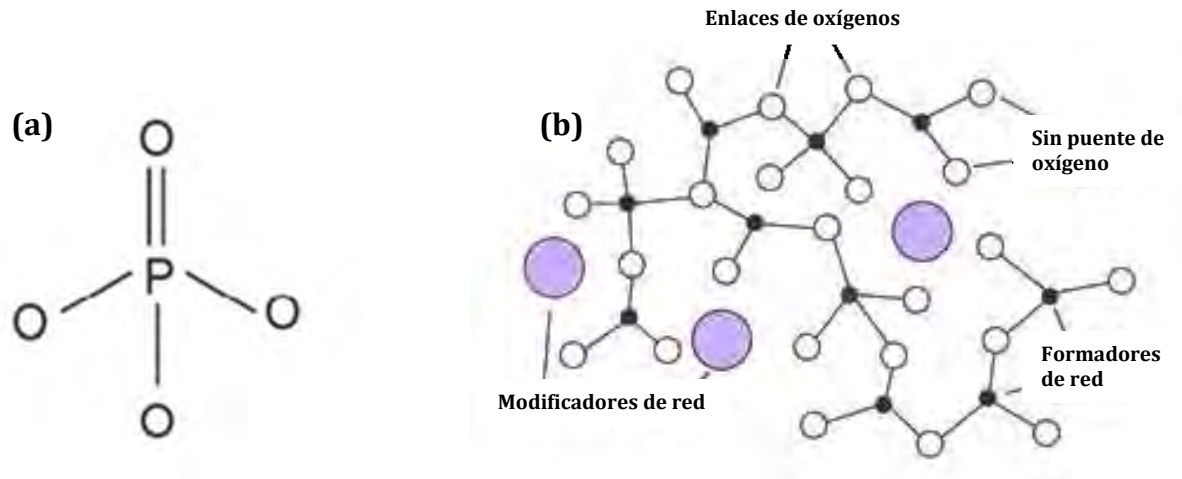


Figura. 2.7 (a) Tetraedro reticulado del vidrio base fosfato y (b) representa la estructura de los vidrios base fosfatos donde los modificadores de red son el sodio y el calcio, en cambio los formadores de red son los fosfatos [27].

Los vidrios base fosfato son materiales completamente degradables, mientras que los vidrios de base sílice son relativamente estables a la hidrólisis. Un aspecto que es importante resaltar es la cristalización de los vidrios, ya que incrementa las propiedades mecánicas como son la resistencia mecánica y de flexión del vidrio, lo que hace que se convierta en un vitro-cerámico; la cristalización puede ser controlada por las diferentes técnicas de fabricación del vidrio.

2.5.2 Técnicas para la fabricación de vidrios bioactivos

Las técnicas comúnmente empleadas para la producción de vidrios bioactivos son dos principalmente: la tradicional técnica de fusión-temple y sol-gel. La ruta de fusión y temple es preparada mediante cantidades estequiométricas de diferentes óxidos o carbonatos de alta pureza (99.9%). Los precursores son mezclados en un molino de bolas, después la mezcla de polvo obtenido es fundida a altas temperaturas en un horno de resistencia eléctrica en donde la temperatura varía de acuerdo a la composición del vidrio. La fusión de los polvos es vaciada en moldes con forma cilíndrica o cualquiera otra forma de interés, sin embargo, la forma más sencilla es sobre placas de cobre si se quiere hacer fritas. Dependiendo de la aplicación del vidrio se le puede dar un tratamiento después del temple llamado recocido que se realiza a una temperatura de 500 °C para eliminar las tensiones internas de los vidrios. Algunas veces es recomendable hacer un

calentamiento lento hasta llegar al punto de fusión para liberar el agua combinada de los precursores que se encuentren hidratados o con grupos hidroxilos.

El procedimiento del sol-gel se hace para fabricar vidrios con grandes cantidades de porosidad, debido a que el proceso implica una serie de etapas que son: hidrólisis, polimerización, gelificación, secado y deshidratación. El sol (o solución) evoluciona hasta la formación del gel (con la ayuda de un tensioactivo) que contiene tanto fase líquida como fase sólida. La morfología obtenida por este método puede ser variada desde partículas hasta redes poliméricas continuas. Los nanoporos formados en el vidrio proporcionan una superficie mayor que con el de fusión-temple, y por consecuencia provoca mayor degradación del biovidrio así como una rápida formación de HA, el método de sol-gel tiene como resultado vidrios con una alta pureza y homogeneidad. Otra ventaja del método es que las temperaturas son bajas comparadas con el de fusión-temple.

2.5.3 Elementos empleados para el dopaje de vidrios bioactivos

Los vitrocerámicos están formados por fases cristalinas (dopantes) incrustadas en una matriz vítrea. Se ha reportado que los vitrocerámicos son mecánicamente más fuerte que el vidrio, y su bioactividad se reduce considerablemente debido a los dopantes o aditivos que se encuentra en su composición, dando resultados favorables de bioactividad, biorreabsorbabilidad o biodegradabilidad [28].

Los vidrios bioactivos han sido dopados por elementos como: Cu, Zn, Ba, La, Y, Fe, Cr, Zr, etc. (Tabla 2.2). Un ejemplo típico es la adición de plata en los vidrios bioactivos con propiedades como agente bactericida que permite mantener la función bioactiva y una mejor unión entre el biomaterial y el hueso.

Tabla 2.2 principales sistemas de biovidrios y elementos/ óxidos empleados para el dopaje.

Sistema	Dopante	Resultados obtenidos	Ref.
CaO–P ₂ O ₅ –SiO ₂ –ZnO	ZnO	El sistema fue fabricado por el método de sol-gel, y los resultados observados del Zn, permitió la proliferación celular temprana y diferenciación celular.	[29]
SiO ₂ –P ₂ O ₅ –Na ₂ O– SrO	SrO	El biovidrio fue fabricado por fusión-temple, los resultados observados por el Sr en el sistema del biovidrio fueron en el aumento de la proliferación de osteoblastos y la actividad de la fosfatasa alcalina, así como en la inhibición de la actividad de la fosfatasa ácido trato resistente.	[30]
SiO ₂ –CaO–Li ₂ O–P ₂ O ₅	Li ₂ O	El proceso de fabricación del biovidrio fue por fusión-temple, la sustitución del ion Li por el Na en el sistema provocó la disminución de la transición vítrea y del punto de fusión, así como disminución en la bioactividad.	[31]
SiO ₂ –Na ₂ O–CaO–P ₂ O ₅ –MgO	MgO	El biovidrio fue fabricado por la ruta de fusión-temple, donde los resultados sugirieron que la naturaleza del MgO actúa como elemento intermedio en la estructura del biovidrio, disminuyendo la temperatura de fusión del sistema y la bioactividad.	[32]
SiO ₂ –CaO–Na ₂ O	Ag	El biovidrio fue hecho por fusión-temple y la plata se adicionó por la técnica de intercambio iónico de sales fundidas en la superficie, manteniendo la bioactividad y mostrando un potencial como bactericida.	[33], [34]
SiO ₂ –Na ₂ O–P ₂ O ₅ –CaO–CuO	Cu	El biovidrio se hizo por fusión-temple y los resultados obtenidos fueron en la reducción de la matriz extracelular, proliferación y actividad metabólica celular.	[35]
SiO ₂ –CaO–Na ₂ O–P ₂ O ₅ –B ₂ O ₃	B ₂ O ₃	El biovidrio fue obtenido por fusión-temple, y se observó que el boro generó una mayor respuesta proliferativa y migratoria celular; además de disminución en la disolución iónica del biovidrio.	[36]
SiO ₂ –CaO–Na ₂ O–P ₂ O ₅ –TiO ₂	TiO ₂	La fabricación del biovidrio fue por fusión-temple, se observó que el Ti tuvo resultados en la viabilidad celular, bioactividad y formación de apatita.	[37]
Na ₂ O–CaO–P ₂ O ₅ –V ₂ O ₅ – SiO ₂	V ₂ O ₅	Fusión-temple fue el método empleado para la formación del biovidrio, y los resultados reportados del vanadio en el sistema del biovidrio mostraron que actuó como agente de cristalización, acelerando la reactividad química en fluidos corporales.	[38]
P ₂ O ₅ –CaO–Na ₂ O–ZrO ₂	ZrO ₂	El biovidrio se fabricó por fusión-temple, se observó que el ZrO ₂ permitió reforzar la estructura del vidrio por medio de la reticulación iónica producto de los enlaces sin puente de oxígeno, además aumentó la bioactividad y la resistencia mecánica.	[7]

Existen óxidos como el CaO, K₂O, Na₂O y MgO que son usados para ajustar el pH del medio en el que se encontrará en contacto el vidrio. El zinc y el magnesio por otro lado son bien conocidos que estimulan el efecto de la proliferación, diferenciación de los osteoblastos y la mineralización del hueso. El estroncio por otro lado, estimula la osteogénesis, acelera el proceso de sanación en fracturas de huesos de ratas.

Los iones que juegan un papel importante en la formación de hueso, son: calcio, zinc, estroncio, magnesio, boro y por supuesto los aniones fosfato, así como el cobre y su papel en la angiogénesis [39].

2.5.4 Zirconia

El dióxido de zirconio mejor conocido como zirconia (ZrO₂), es un compuesto blanco que puede cristalizar en tres fases cristalinas, monoclinica < 1170 °C, tetragonal 1170-2370 °C y cúbica >2370 °C (Figura 2.8), además es reconocido como uno de los materiales cerámicos más estudiados debido a que presenta propiedades excelentes como: alta tenacidad, resistencia a la fractura, propiedades de desgaste y biocompatibilidad.

En la actualidad existen diversas rutas de fabricación y aplicaciones de la zirconia en el campo de los biomateriales, ya sea en forma de películas, como elemento dopante en estructuras densas o porosas. En la literatura se reportan importantes beneficios de utilizar la zirconia como elemento dopante en materiales porosos, donde ayudó a mejorar la bioactividad, rango de degradación, anclaje y viabilidad celular, así como a disminuir las microgrietas entre los cuellos de los poros cuando se encuentran en contacto en ambientes biológicos [40–42].

Por otro lado, otros investigadores han mostrado que dopando fosfatos de calcio con zirconia se incrementaron las propiedades mecánicas de resistencia a la flexión, compresión, microdureza y tenacidad a la fractura [43–46].

Asimismo, el dióxido de zirconio presentó mejores propiedades físicas tal y como Yang y col. [47] mostraron, donde fabricaron un compuesto innovador, hecho por tres capas porosas de HA/TCP

sobre un sustrato de ZrO_2 , en donde obtuvieron un andamio multicapa que ayudó a mejorar la unión interfacial entre el recubrimiento del andamio y el sustrato.

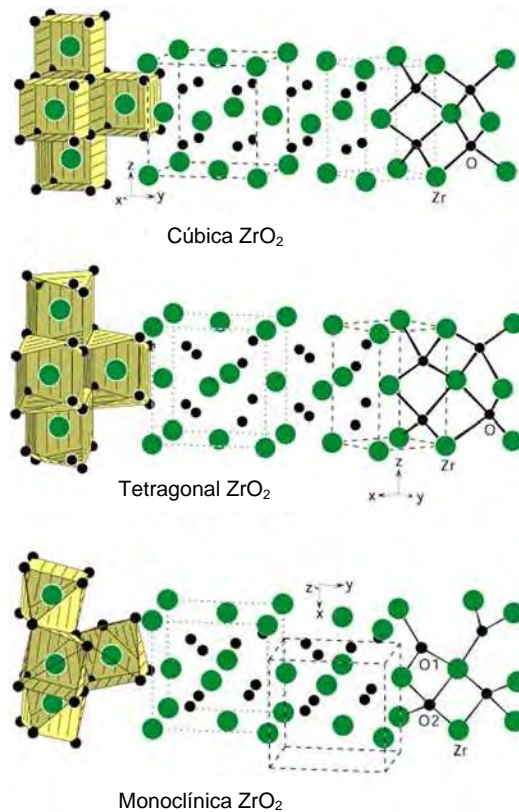


Figura 2.8 Principales estructuras cristalinas del dióxido de zirconio [48].

2.6 Andamios

Los andamios son materiales porosos y degradables, que proporcionan la estructura mecánica y el soporte durante el proceso de reparación y regeneración del hueso dañado o enfermo. El sistema biomecánico del hueso es complejo por lo que los requisitos de los andamios son diversos [49,50]:

1. *Biocompatibilidad*, es un requisito fundamental de los andamios óseos; se describe como la capacidad del andamio de mantener el anclaje celular y los sistemas de señalización moleculares sin presentar efectos tóxicos locales o sistemáticos en el tejido huésped. Un andamio óseo debe ser osteoconductor, es decir el andamio debe ser poroso, para que permita que las células óseas se adhieran, proliferen y formen la matriz extracelular en su

superficie. El andamio debe ser capaz de inducir la formación del nuevo tejido óseo, mediante la señalización biomolecular y reclutamiento de células progenitoras, a esta propiedad se le conoce como osteoinducción; conjuntamente, un andamio ideal necesita formar vasos sanguíneos dentro o alrededor del implante en las primeras semanas de implantación para ayudar al flujo de nutrientes, oxígeno y residuos.

2. *Propiedades Mecánicas*, en un andamio óseo las propiedades mecánicas deben coincidir con las propiedades del hueso huésped así como la transferencia de carga adecuada. Las propiedades mecánicas del hueso varían de forma amplia de acuerdo al tipo de hueso (trabecular o cortical). El módulo de Young del hueso cortical esta entre 15 y 20 GPa y el del hueso trabecular esta entre 0.1 y 2 GPa. La resistencia a la compresión varía entre 100 y 200 MPa para el hueso cortical y para el hueso trabecular se encuentra de 2 y 20 MPa. La gran variación de las propiedades mecánicas y la geometría del hueso hacen difícil diseñar un andamio óseo ideal.
3. *Tamaño de poro*, el andamio debe tener porosidad interconectada, con diámetro de poro de al menos 100 μm para la difusión de los nutrientes esenciales y oxígeno para la supervivencia celular. Sin embargo, los rangos de tamaño de poro se deben encontrar desde 200 hasta 350 μm , tamaños que permiten un óptimo crecimiento del tejido óseo. Los andamios que tienen micro y macro porosidades presentan mejores propiedades que los que sólo tienen macro-porosidad.
4. *Biorreabsorbible*, es otro factor crucial para los andamios empleados para la regeneración de tejidos. Un andamio ideal no sólo debe tener propiedades mecánicas del tejido huésped, sino también debe degradarse con un tiempo *in vivo*, preferiblemente a una velocidad de reabsorción controlada y eventualmente generando espacio para que se pueda formar el nuevo tejido óseo. El comportamiento de degradación de los andamios varía en tiempo de acuerdo a la aplicación, que puede ser desde 9 meses o más para aplicaciones en la espina dorsal o de 3 a 6 meses para aplicaciones maxilofaciales. La bioresorbibilidad se relaciona con el medio ambiente lo cual hace un reto muy grande para hacer un andamio ideal.

2.6.1 Técnicas de fabricación de andamios porosos

El cuerpo del andamio debe presentar una arquitectura tridimensional adecuada para la regeneración de tejido óseo, en la literatura existen varias técnicas y materiales que se han ido investigando a través del tiempo. Se resumen algunas de las tantas técnicas que se emplean en la actualidad para la fabricación de andamos con aplicaciones en la ingeniería de tejidos en la Tabla 2.3 y Figura 2.9.

Tabla 2.3 Métodos típicos para la producción de cerámicas porosas [51].		
Método	Descripción	d_{poro} (μm)
Plantilla de sacrificio	1. Se adiciona una fase de sacrificio al precursor cerámico en forma sólida o líquida, 2. Secado, pirólisis o evaporación para remover la plantilla, 3. Sinterizado.	1-700
Espumado directo	1. Incorporación de gas a la suspensión del cerámico precursor, 2. Fraguar o secar, 3. Sinterizado.	35-1200
Réplica	1. Impregnación o infiltración del andamio natural o sintético por la suspensión del cerámico precursor, 2. Secado o remoción de la plantilla, 3. Sinterizado.	10-3000
Sinterización parcial	1. Preparación de los polvos para hacer la suspensión o la compactación por prensado, 2. Quemado y sinterización o sinterización directa.	<10
Electrohilado	1. Preparación de la solución, 2. Hace pasar por una boquilla, 3. Colector	>10
Impresión 3D	2. Tinta (dispersión de partículas sólidas en un medio líquido), 2. Sinterizado.	200-1200

Algunos investigadores resumen las técnicas convencionales para el proceso de formación de cerámicos porosos que han sido: el método del sacrificio, espumado directo, la técnica de la réplica y sinterización parcial, ellos explican que estos métodos producen cerámicos macroporoso con diámetros de poro mayores a $1 \mu\text{m}$ y con un porcentaje de porosidad del 50% [51,52].

En cambio Burg y Col. [53], concluyeron que los andamios con porosidad interconectada y diámetros de poros entre $20-400 \mu\text{m}$ son los que mejores resultados *in vitro* presentan, debido a que esos tamaños de poros permiten el anclaje celular, paso principal para el proceso de regeneración celular.



Figura 2.9 Métodos de fabricación de andamios para ingeniería de tejido óseo [54].

2.6.2 Sinterización y porosidad de andamios porosos

La etapa de sinterización es de gran importancia para producir biocerámicos con propiedades mecánicas óptimas. Una de las funciones que desempeña es la eliminación de humedad, así como la descomposición de carbonatos y eliminación de componentes remanentes como: amoniacos, nitratos y componentes orgánicos además de remover productos gaseosos que puedan estar presentes.

Los factores que involucra la sinterización en los ortofosfatos son la densidad, porosidad, tamaño de grano, composición química y resistencia en los andamios [11].

El área superficial es otro aspecto crucial para andamios porosos, ya que de esto dependerá que se garantice una buena fijación mecánica además de proveer sitios superficiales que ayuden al enlace químico entre los biocerámicos y el hueso. Por tal razón, la porosidad está relacionada con la adhesión y crecimiento celular, ya que éste permite que exista una distribución y migración celular a través de andamio; haciendo que en ensayos *in vivo* se puede apreciar la formación de vasos sanguíneos y remodelación del tejido óseos [55].

La macroporosidad interconectada (tamaño de poro $> 100 \mu\text{m}$) permite la nutrición del hueso y remover de residuos.

Estudios han mostrado que el tamaño de poro adecuado se encuentra en el rango de $200\text{-}500 \mu\text{m}$ ya que el tamaño del osteón humano se encuentra en tamaños mayores de $223 \mu\text{m}$, así como se ha podido corroborar tal información por medio de estudios *in vitro* en donde además se ha observado que rangos de tamaños de poros con un rango de $150\text{-}500 \mu\text{m}$ permiten la mineralización ósea directa [15,56], sin embargo, se debe tener en cuenta que los macroporos deben estar interconectados y las interconexiones deben ser mayores que $50 \mu\text{m}$ de diámetro; ya que de estas características dependerá que el andamio tenga una acelerada vascularización y la habilidad de regeneración ósea para aplicaciones clínicas.

Por otro lado, la microporosidad (tamaño de poro $< 10 \mu\text{m}$) permite que los fluidos biológicos puedan impregnar en el andamio y este provea una adsorción e incremento de solubilidad iónico. Se ha demostrado, que al incrementar el área superficial específica y el volumen de poros de los biocerámicos incrementa la aceleración del proceso de depositación de apatita biológica y por lo tanto ayude a la formación del tejido óseo.

2.7 Biología del Hueso

El hueso es uno de los tejidos más duros del cuerpo humano, además de poseer muchas propiedades estructurales interesantes, entre las que destacan: microestructura heterogénea. Está formado por una parte orgánica con una cantidad del 30% principalmente colágeno tipo I, que provee la capacidad de tracción y una parte mineral del 60% hidroxapatita, que provee la rigidez del tejido y un 10% de agua.

El tejido óseo está conectado mediante la formación de células, vasos sanguíneos, fibras, así como con sustancias de tipo orgánico e inorgánico. Las propiedades mecánicas del material óseo son consecuencia de la combinación de las sustancias orgánicas e inorgánicas; y tales propiedades dan soporte al esqueleto, protección de los órganos internos y tejidos suaves así como ayudan a proveer movimiento en músculos, tendones, ligamentos y entre los mismos huesos. Además tiene otro tipo

de funciones metabólicas como almacén mineral (calcio y fósforo), productor de células sanguíneas y almacén de energía (células de grasa de médula amarilla). De forma natural el hueso está siempre en constante mutación, reconstruyéndose y reformulándose a lo largo de la vida [57].

2.7.1 Morfología del hueso

El esqueleto humano tiene más de 200 huesos clasificados por forma: huesos largos (fémur, tibia, cúbito y radio), huesos cortos (huesos carpianos), huesos planos (cráneo, esternón y omóplato) y huesos irregulares (vertebras y etmoides) (Figura 2.10) [58,59].

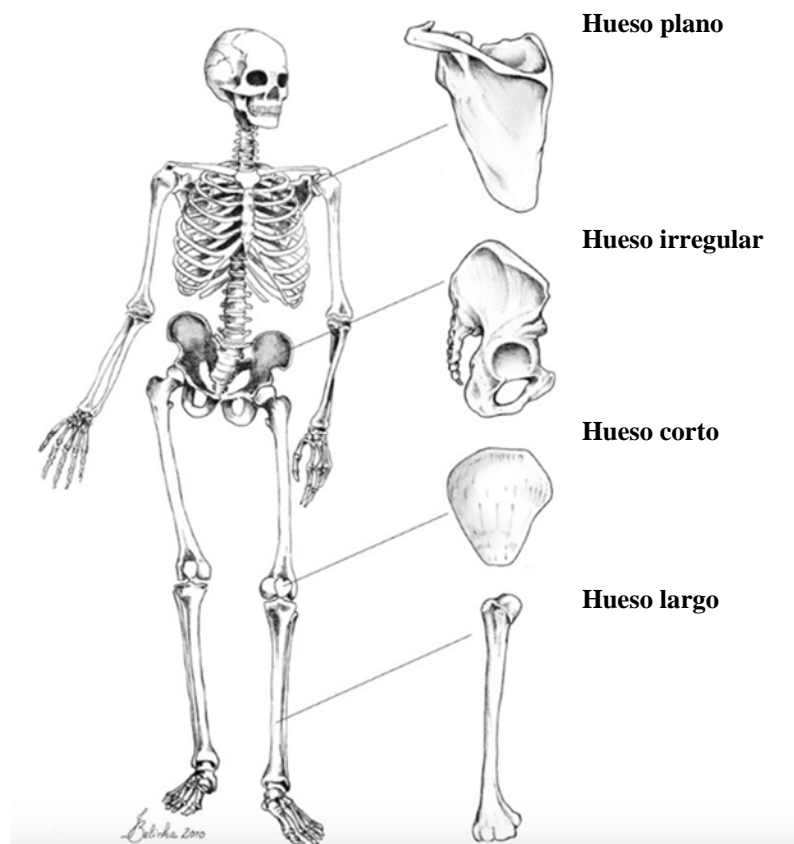


Figura 2.10 Principales tipos de tejido óseo [57].

Existe otra clasificación por morfología: hueso trabecular y cortical. El hueso trabecular se refiere a una estructura celular altamente porosa (60-95% de porosidad) que está formada lámina por lámina, de ahí proviene el nombre de crecimiento laminar o de varillas con espesores típicos de 100-300 μm en el hueso humano. Las características mecánicas pueden variar dependiendo de la

edad, sexo, sitio anatómico o entre individuos [60]. Al examinarlo de forma macroscópica se observan dos extremidades llamadas epífisis y un tubo cilíndrico en medio de ellas llamado diáfisis, además de una zona entre ellos transitiva llamada metáfisis. Cuando los huesos largos están en crecimiento la epífisis y la diáfisis se origina en los centros de osificación independientes y están separados por una capa de cartílago denominado epifisaria o placa de crecimiento (Figura 2.11).

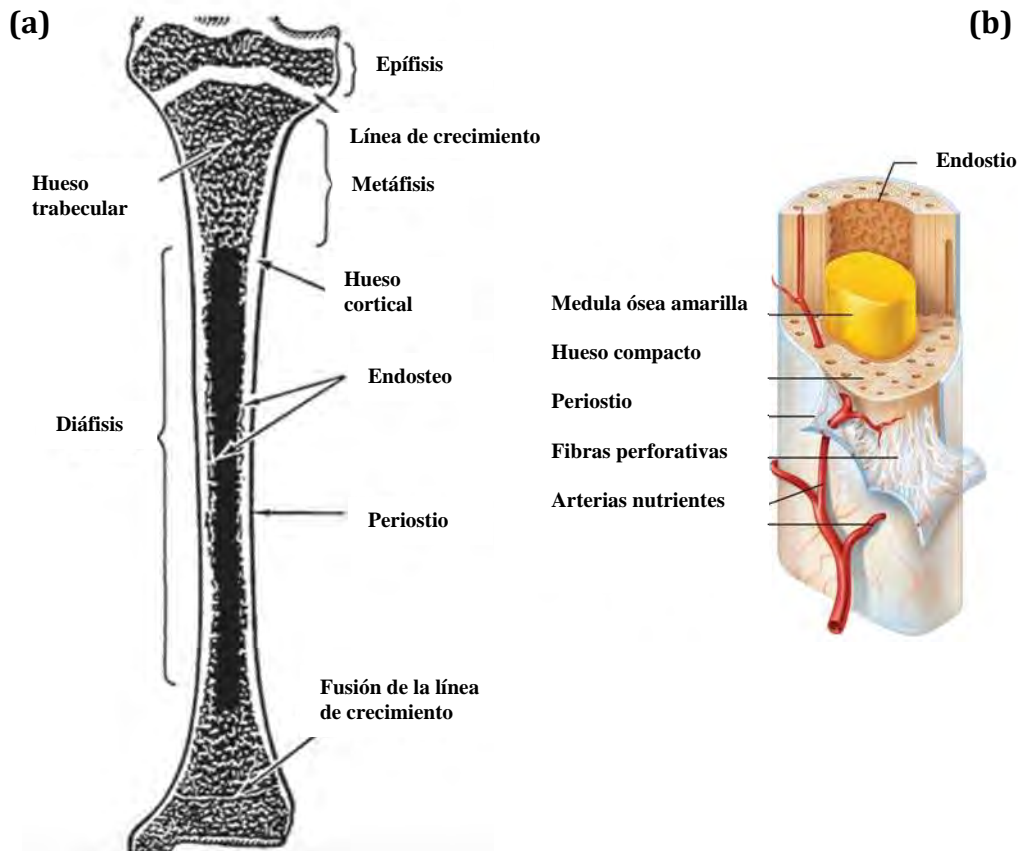


Figura 2.11 a) Diagrama esquemático del interior de la tibia el cual es un hueso largo, b) anatomía ósea del hueso humano [58].

Por otro lado el hueso cortical se refiere al tejido denso calcificado de los huesos, es decir la “cáscara” externa que rodea la cavidad ósea, está formado por un arreglo de laminillas concéntricas dentro de sistemas Havesianos (osteones). Debido a esto también es conocido como hueso lamelar.

2.7.2 Matriz ósea

El componente orgánico de los huesos lo constituyen el 40% del peso en seco y es compuesto de colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, fosfolípidos y fosfoproteínas. Los componentes inorgánicos constituyen arriba del 60% del peso en seco del hueso y esta principalmente compuesto por hidroxiapatita de calcio $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Los cristales de hidroxiapatita tienen un arreglo paralelo a las fibras de colágeno, esta orientación maximiza la resistencia de la fuerza de tensión del colágeno y de las fuerzas de compresión de la hidroxiapatita.

2.7.2.1 Matriz orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente de proteínas, entre las que destaca el colágeno (90%). La matriz orgánica juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo. Sin embargo, actualmente debe considerarse a la matriz mineralizada extracelular como algo más que un depósito de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo. Los componentes que forman parte de la matriz extracelular (MEC) son [61]:

1. Colágeno: El 90% de la matriz extracelular está constituida por colágeno, sobre todo tipo I (> 95%) y tipo V (<5%). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágeno tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado por estés mecánico. En la molécula de colágeno se halla la secuencia del ácido arginilglicilaspártido (RGD), que es reconocido por la integración en las superficies de las células óseas. Contiene característicamente, aminoácidos de hidroxilisina e hidroxiprolina, siendo este último un marcador específico de todos los fenotipos de colágeno y estando sus valores en relación directa con la tasa de absorción ósea. El colágeno no tiene afinidad por el calcio, por lo que otras proteínas son implicadas en el depósito mineral.
2. Proteínas no colágenas: ayudan a la modulación de la adherencia celular mediante la calcificación de la matriz orgánica entre las que destacan: a) proteoglicanos, b) proteínas

de ácido γ -carboxi-glutámico, y c) glicoproteínas (osteonectina, fosfatasa alcalina y proteínas con el tripéptido RGD).

Fosfatasa alcalina es una enzima que libera fosfato inorgánico a partir de ésteres fosfóricos, necesario para la mineralización, durante muchos años se ha considerado como un excelente marcador de la actividad osteoblástica, ya que permite obtener resultados de la diferenciación osteoblástica y de cartílago de la placa en crecimiento y calcificación ósea [62].

3. Factores de crecimiento, polipéptidos sintetizados en el propio hueso o procedentes de otros lugares (hígado, plaquetas, etc.), que intervienen en la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células de forma autocrina o paracrina.

2.7.3 Células óseas

Las células óseas están divididas generalmente en 5 tipos: osteoprogenitores, osteoblastos, osteocitos, células de linaje óseo y osteoclastos.

Los *osteoprogenitores* son células inmaduras no especializadas pero una vez que se diferencian dan origen a los osteoblastos; pueden encontrarse en el interior de la capa del periostio, endostio y en canales Harvesianos o de tipo Volkman.

Los *osteoblastos* son células mononucleares responsables de la formación del hueso y de la mineralización de la matriz osteoide, estas células son el origen de los osteocitos. Se producen en el periostio, endostio y en la médula ósea, son de forma cuboidal o poligonal. Es importante mencionar que el número de células de osteoblastos depende de cada individuo y de la edad.

Las *células de linaje óseo* son de inactividad alargada y osteoblastos delgados, estas células permanecen inactivadas en la superficie del hueso una vez que se ha formado el nuevo hueso o que la remodelación ha terminado.

Osteocitos son células maduras que se dividen en osteoblastos. Pueden encontrarse dentro de la matriz ósea del hueso ocupando pequeñas cámaras o espacios, llamadas lagunas.

Los *osteoclastos* son células plurinucleares (varios núcleos) responsables de la absorción y/o eliminación de la estructura ósea. Este tipo de células causan la desmineralización de la matriz ósea y destruyen la matriz orgánica del hueso. Los osteoclastos son formados por la fusión de precursores celulares de la médula ósea o de otro tipo de tejido hematopoyético.

2.8 Desarrollo del hueso

Los huesos del esqueleto axiales (lo conforma la parte central del cuerpo: tórax, columna vertebral, cráneo, pelvis, etc.) y apendiculares (está formado por las extremidades de brazos, manos, piernas y pies) son formados por dos procesos: formación de hueso intramembranoso y endocondral.

La primera diferencia entre estos dos procesos es la ausencia o presencia de cartílago intermediario. En la formación de hueso intramembranoso, el hueso es formado en la ausencia de modelación de cartílago; en cambio en la formación de hueso endocondral primero se da la formación de cartílago y después se reemplaza por tejido óseo.

2.8.1 La formación ósea intramembranosa (Membranas)

En huesos planos, como el cráneo y los de la cara son formados por este tipo de osificación. Inicia con las células osteoprogenitoras (formadoras de osteoblastos y osteocitos) las cuales están presentes dentro de la mesénquima. Las células osteoprogenitoras se agregan en sitios donde el nuevo hueso será formado y se diferencian en osteoblastos que activarán la síntesis de la nueva matriz ósea. Este tipo de crecimiento óseo ocurre por aposición (deposición sobre el hueso anterior) de osteoblastos sobre las superficies del hueso en crecimiento (Figura 2.12).

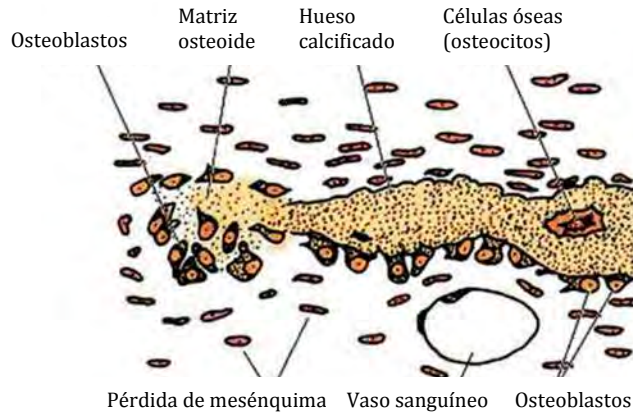


Figura 2.12 Osificación intramembranosa. Las células troncales mesenquimales se concentran para producir osteoblastos, los cuales se depositarán en la matriz ósea mineralizada [58].

2.8.2 Formación ósea endocondral (Modelo de cartílago)

Este tipo de osificación involucrará la formación de tejido de cartílago para poder agregar células mesenquimales y subsecuentemente remplazarlo por tejido óseo. Todos los componentes esqueléticos como columna vertebral, pelvis y esqueleto apendicular (extremidades) se desarrollan por vía endocondral (Figura 2.13).

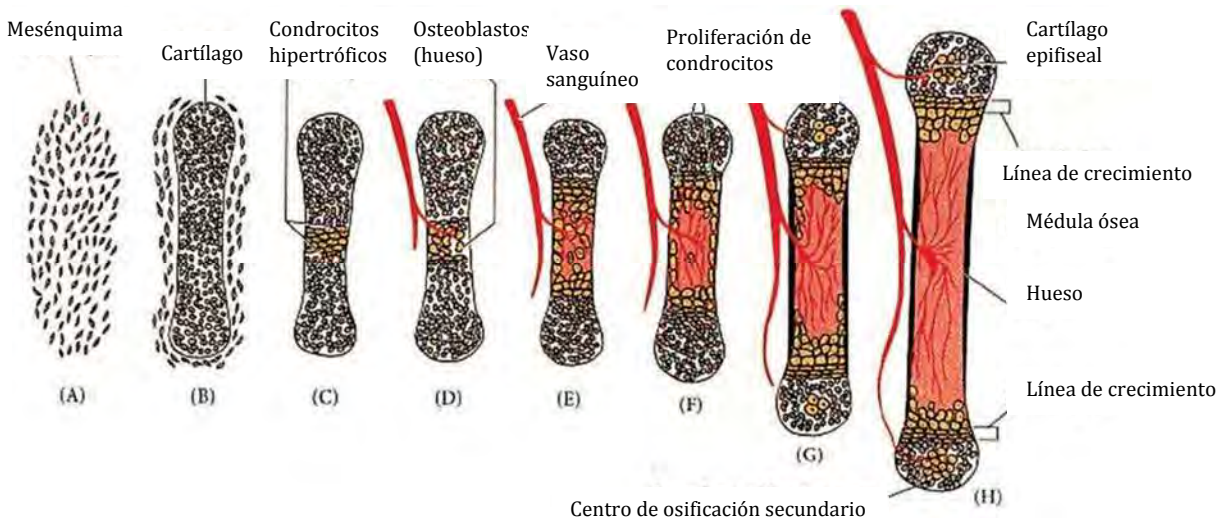


Figura 2.13 Osificación Endocondral. (A, B) Huesos largos como húmero, fémur y tibia que desarrollan la osificación endocondral donde las células troncales mesenquimales se duplican y diferencian dentro de los condrocitos para formar el modelo de cartílago del hueso. (C) en el centro de los condrocitos. (D, E) Vasos sanguíneos que permiten la llegada de los osteoblastos los cuales depositan la nueva matriz ósea sobre los restos del cartílago calcificado. (F-H) Los centros de osificación secundaria también formados como vasos sanguíneos externos del hueso [58].

2.8.3 Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso esencial en la calidad ósea, ya que condiciona la arquitectura, mineralización y la geometría ósea. En un adulto, cerca del un 8% del tejido óseo es renovado anualmente. El remodelado óseo se lleva a cabo mediante la acción sucesiva de (acoplamiento) de osteoclastos y osteoblastos sobre la misma superficie ósea. Cada ciclo de remodelado consta de tres fases: reabsorción, reposo o inversión y formación. En la fase de reabsorción, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores y erosiona la superficie ósea. Una vez finalizada la reabsorción los osteoclastos son eliminados por apoptosis (destrucción o muerte celular programada por el organismo). La fase de reposo o inversión es un periodo de inactividad. Durante la fase de formación un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y rellena con hueso la zona excavada por los osteoclastos. Los osteoblastos depositan en primer lugar matriz ósea no mineralizada que forma una capa de unas 10 μm de espesor denominada ribete de osteoide. Entre el depósito de osteoide y su mineralización existe un tiempo de demora de unos 10 días. Durante este periodo la matriz ósea sufre cambios en su composición y estructura que la hace apta para el depósito de mineral (maduración de la matriz). La mineralización se inicia en la interfase entre el osteoide y el hueso mineralizado preexistente y avanza hacia la superficie a lo largo de un plano de barrido de 2 a 3 micras de espesor. Este plano, integrado en parte por mineral amorfo, se denomina frente de mineralización. A medida que este frente se desplaza va dejando tras de sí matriz ósea mineralizada en forma de cristales de hidroxipatita. Una vez completado el depósito de hueso los osteoblastos que no se han incorporado a la matriz se aplanan y pasan a formar parte del endostio (lining cells) [63] (Figura 2.14).

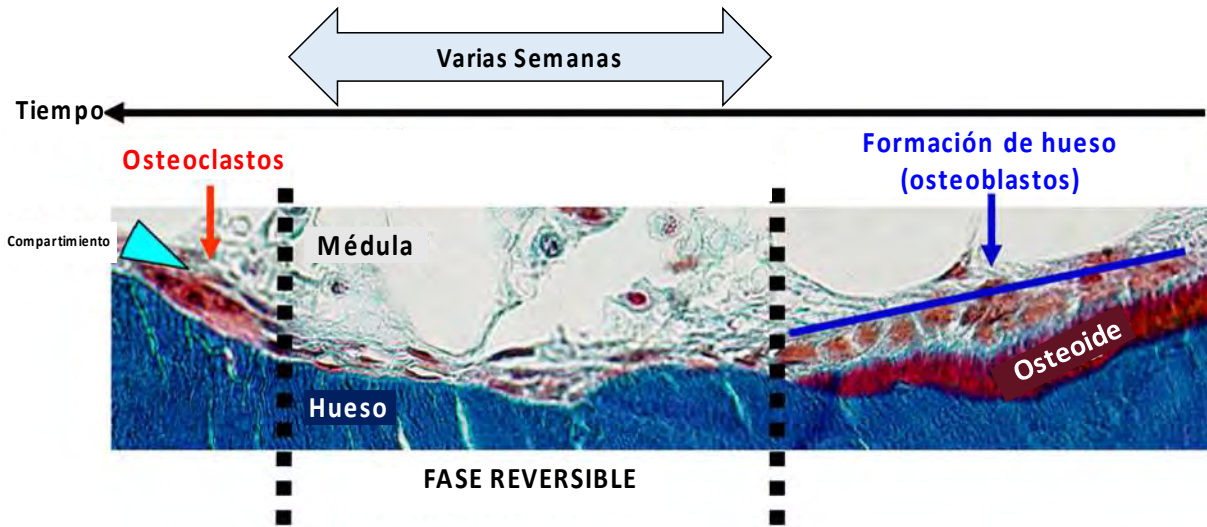


Figura 2.14 Proceso natural de remodelado óseo normal. El proceso sigue el sentido hacia el lado izquierdo de la imagen como lo indica el eje del tiempo, varias semanas de separación ocurren entre los osteoclastos de los osteoblastos (línea azul), también puede observarse la matriz mineralizada de color azul, en la parte inferior de la figura y el osteoide de color rojo. El compartimento alberga células alargadas que cubren el sitio de remodelación marcado con la fecha azul turquesa [64].

2.9 Ensayos *in vitro*

Actualmente existe un extenso número de agencias gubernamentales como la administración de alimentos y medicamentos (FDA), Organización de normas internacionales (ASTM), Organización internacional de normalización (ISO), Convención de la farmacopea de Estados Unidos (USP) que provee procedimientos, protocolos, lineamientos y normas para que puedan ser llevados a cabo los ensayos *in vitro* e *in vivo* [65].

2.9.1 Simulación de fluido corporal (SBF)

Un ensayo característico para analizar la habilidad de unión entre el hueso y el material es evaluado mediante la examinación de apatita formada sobre las superficies de los andamios mediante el uso del fluido corporal simulado (SBF), el cual tiene una concentración casi igual a la del plasma sanguíneo humano. Mediante la examinación de formación de apatita en la superficie del material por medio del SBF se predice la bioactividad del material, este estudio se remonta desde hace más de dos décadas ya que Kokubo y col. [66], realizaron estudios en condiciones *in vitro*, en donde se

propuso que de acuerdo a las especies presentes en el plasma sanguíneo se podían presentar en un suero que permitiera el enlace entre el hueso y el material, formando una capa en su superficie de calcio y fósforo (apatita). La concentración iónica del SBF comparada con el plasma humano se puede apreciar en la Tabla 2.4 [67].

Tabla 2.4 Concentración iónica del SBF y el plasma humano [67].								
Ion	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ³⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma sanguíneo humano	142	5	1.5	2.5	103	27	1	0.5
SBF	142	5	1.5	2.5	148.8	4.2	1	0

Algunos resultados han mostrado que después de 3 a 6 semanas que el material está sumergido existe un aumento en la capacidad de formación de apatita en la superficie [67].

Existen varias teorías de cristalización o de formación de apatita en los materiales que sugieren como se da la unión entre el hueso (bioactividad) y la formación de la apatita en el SBF, los cuales son dos fenómenos distintos.

Los cálculos termodinámicos muestran que el SBF es un sistema metaestable y que eventualmente puede pasar a un estado termodinámicamente estable formando cristales de apatita, esto dependerá del tiempo, al cual se le llama “tiempo de nucleación o inducción”, este tiempo dependerá de la velocidad con la que se formen los núcleos de cristales lo suficientemente grande (radio crítico) para que sea estable y poder crecer; en otras palabras cuando los cristales de apatita se precipitan en la superficie de un material sumergido en SBF significa que el tiempo de inmersión fue más largo que el tiempo de inducción.

Para que un cristal pueda ser estable debe superar la energía de activación de la cristalización, donde esta energía es el resultado del equilibrio del aumento de energía de la formación de la nueva interfaz de la solución sólida y la disminución de la formación de cristales. Por tal razón se puede decir que un compuesto “bioactivo” es un material que acelera la cristalización heterogénea de apatita en una solución sobresaturada hacia la formación de hidroxiapatita [66].

El proceso para la cristalización de apatita se puede dar mediante varios métodos o estrategias:

1. Proporcionar núcleos de apatita que eliminan la necesidad de nuclear cristales de apatita.
2. Proporcionar una superficie con una energía interfacial baja con apatita.
3. Cambio de supersaturación local hacia la precipitación de apatita.

La primera estrategia explica el fenómeno de por qué la hidroxiapatita cubre rápidamente con nuevos cristales de apatita, en donde Kim y col. [68], proponen una serie de cambios en la superficie relacionados con la relación Ca/P y sugieren la correlación entre la composición de la superficie y el potencial de ionización, en la Figura 2.15 se puede observar estos procesos.

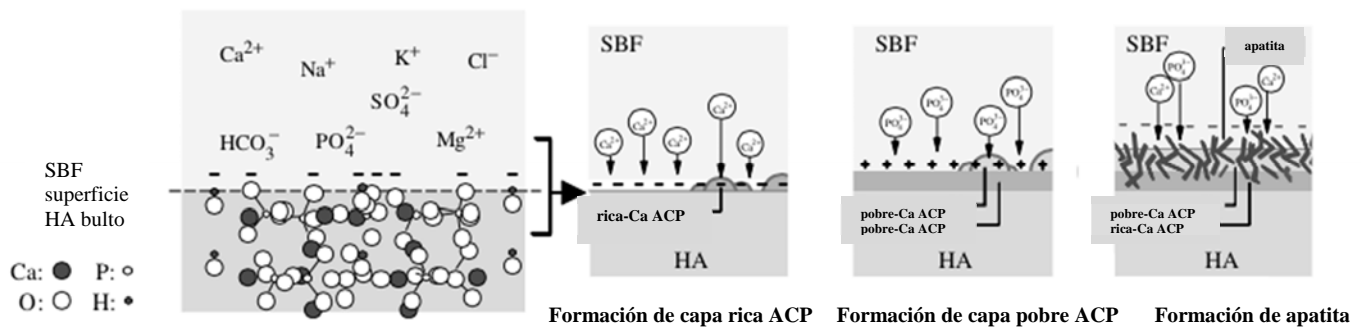


Figura 2.15 Muestra el origen de los cambios negativos sobre la superficie de la HA y los procesos de unión de la apatita en la formación del hueso en SBF [68].

Este proceso se resume en la formación consecutiva de iones calcio lo que hace que se forme una capa rica en ACP (fosfato de calcio amorfo) lo cual adquiere una carga positiva, después existe una interacción electrostática entre la HA para usar su carga positiva y reunir iones de fosfato negativos del fluido, dando como consecuencia la formación de una capa pobre en Ca de ACP, que después dará lugar a la formación de apatita. Una vez formada la apatita la solubilidad de ésta es menor con respecto a los fosfatos de calcio en agua y por lo tanto esto permite que se establezca termodinámicamente formado el cristal de apatita en medio acuoso. La segunda estrategia da una explicación para la formación de apatita en la superficie del fosfato tricálcico beta, en donde la transformación de TCP sumergido en SBF en HA fue después de 7 días. La hipótesis de este proceso se cree que es mediante la disolución parcial de iones calcio y fósforo del material que se

combinan con los iones del SBF de la solución, lo cual producirá sitios o áreas locales de sobresaturación que promueven la nucleación y precipitación de los cristales [69].

Y la tercera estrategia explica porque el biovidrio y otros materiales están cubiertos rápidamente por una capa de apatita tras la inmersión en SBF; es decir que existen factores a considerar en esta última que se resume a continuación. Cambio de sobresaturación locales, es decir que cuando hay una adición de un sólido en SBF es posible modificar la composición de la solución y por lo tanto la sobresaturación, y este cambio puede ser positivo favoreciendo la formación de apatita o negativo es decir impidiendo la formación de apatita. El vidrio por ser un material básico aumenta a dos unidades el pH produciendo una disminución de 10-100 veces la solubilidad de la HA y en consecuencia una aceleración en su nucleación, en donde no obstante este efecto se ve reforzado por la liberación de iones de calcio del vidrio[70,71].

Otra forma de modificar localmente la composición de la solución es usar un material soluble en SBF que pueda liberar grandes cantidades de iones calcio y/o fosfato; además de verse reflejado en un cambio de pH lo que provocaría que exista un cambio en la saturación local, sin embargo existen estudios que puedan sustentar este mecanismo. Se ha reportado diferentes tipos de morfologías de la HA dependiendo el método de síntesis que se use en donde las morfologías más comunes son las de tipo esfera, irregulares, microesferas, flor, etc. [72–74], presentadas en la Figura 2.16.

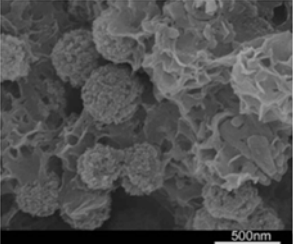
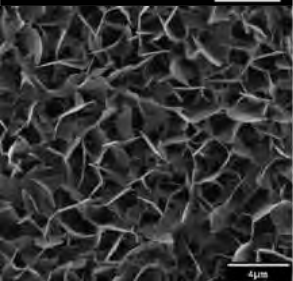
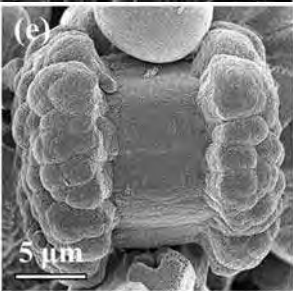
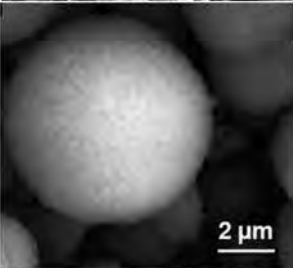

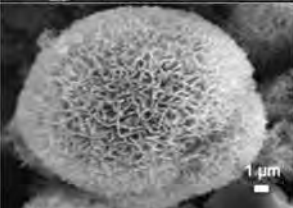
	Material	Morfología	Fabricación	Referencia
	45S5	Esférica	Sol-gel	[75]
	Ca-P	Rosa	Hidrotermal	[76]
	CaCO ₃	Mancuerna	Hidrotermal	[77]
	HA	Microesfera	Hidro-solvotermal	[78]
	HA	Flor*	Hidrotermal	[79]
	HA	Flor	Hidrotermal	[79]

Figura 2.16 muestra algunas de las principales morfologías que puede presentar la HA.
*Está formada por nanohojas.

2.9.2 Cultivos celulares

Los cultivos celulares ayudan a conocer la biocompatibilidad es el uso de sistemas celulares, se refiere al mantenimiento o crecimiento *in vitro* de células, tejidos u órganos de origen animal o vegetal. El proceso consiste básicamente en liberar las células de tejido original y llevarlas a un ambiente artificial que permita su crecimiento, multiplicación y mantenimiento del metabolismo, de una manera controlada.

Existen dos tipos de crecimiento celular dependiendo el tipo de células:

Células adherentes o cultivos fijos: Se refieren a que es necesario que la célula se una a la superficie del hueso para que pueda multiplicarse, por lo que se les conoce como dependientes de anclaje. Cuando un cultivo tiene éxito se forma una “monocapa”, y es necesario desprenderla ya sea de forma mecánica, química o enzimática, dependiendo el tipo de células [80].

La Figura 2.17 se puede observar claramente la morfología celular en tres muestras diferentes (zirconia estabilizada, ZS, fosfato de calcio, CaP e hidroxiapatita) y el patrón de crecimiento de los osteoblastos para cada grupo después de 24 en medio de cultivo respectivamente, la morfología mostrada fue de forma triangular alargada donde se extendieron los filopodios de forma irregular pero siempre unidos al sustrato, células mostraron mayor contacto entre sí y una adhesión uniforme como resultado de un incremento entre la unión de los filopodios [81].



Figura 2.17 Imagen obtenida por SEM en donde se puede observar los cultivos de osteoblastos en un tiempo de incubación de 24 h (5000 X). (A) grupo de la ZS, (B) grupo de CaP, (C) grupo de la HA [81].

Células no adherentes o cultivos en suspensión: ciertos tipos de células se multiplican suspendidas en medio líquido; en este medio se pueden sedimentar pero no se adhieren a la

superficie del recipiente. La Figura 2.18 ejemplifica las células cuando se encuentran en suspensión en este caso son células de ovario de hámster suspendidas en dexrazoxano (medicamento usado para tratar el cáncer).

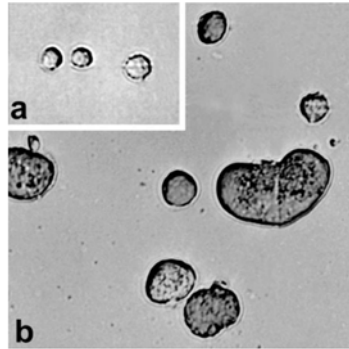


Figura 2.18 Muestra células de ovario de hámster en suspensión, (a) antes del ser expuestas en dexrazoxano y (b) después de ser expuestas con un tiempo de 144 h en dexrazoxano [81].

Existen varios aspectos que son importantes para que pueda darse la proliferación celular tal y como se observa en la Figura 2.19

Factores básicos para la supervivencia celular

- Presión osmótica.
- Concentración de Hidrogeniones (pH).
- Gases.
- Dióxido de carbono.
- Iones orgánicos.
- Agua.
- Carbohidratos.
- Solución de sales balanceadas (SSB).
- Aminoácidos.
- L-Glutamina.
- Vitaminas.
- Suero.
- Antibióticos y antimicóticos.

Figura. 2.19 Factores para que se pueda dar un adecuado crecimiento celular [82].

Presión osmótica: El NaCl es la sustancia más importante en el mantenimiento de la presión osmótica, además de los iones inorgánicos y la glucosa que tienen un papel significativo, es por tal razón que la concentración en el medio debe ser cuidadosamente controlada.

Concentración de Hidrogeniones (pH): el pH óptimo para el crecimiento celular está entre 7.2-7.4, aunque algunas células pueden tolerar un rango de 6.6 – 7.8, por ejemplo algunas líneas de fibroblastos se desarrollan mejor en un pH de 7.4 – 7.7. Para controlar el pH de los medios, comúnmente se usa el rojo de fenol, que es rojo a pH 7.4 y se torna naranja a pH 7.0 o amarillo a pH 6.5.

El pH guarda una relación directa con el CO₂, ya que en las primeras horas se produce un ambiente alcalino del medio por la pérdida de CO₂ pero el metabolismo celular lo neutraliza; por tal motivo se aprovecha este sistema para regular el pH mediante el sistema bicarbonato/CO₂.

Gases: Dentro de los gases necesarios para la supervivencia celular se encuentra el oxígeno el cual debe estar a bajas concentraciones, se recomienda mantener la profundidad o altura de la columna del medio líquido en un rango de 2-5 mm (0.2 – 0.5 ml/cm² de superficie).

Dióxido de carbono: El CO₂ está involucrado en múltiples reacciones bioquímicas, además la concentración de CO₂ libre dependerá de varios factores como son: la temperatura, pH y la concentración de HCO₃⁻ y otros iones.

Iones inorgánicos: Ayudan a la regulación de la presión osmótica, la actividad metabólica y enzimática, y para la adhesión y extensión celular. Los iones necesarios en el medio de cultivo son: sodio (osmolaridad), potasio (mantiene la tonicidad celular y cofactor enzimático); calcio y magnesio (mecanismos de adhesión celular), cloro, carbonato y fosfato (son parte del sistema amortiguador del medio y el carbonato y fosfato sirven para almacenar energía).

Agua: Participa en numerosas reacciones bioquímicas y determina las propiedades de las macromoléculas. En los sistemas de cultivo se usa agua desionizada, bidestilada o microfiltrada.

Carbohidratos: Sirven como fuente de energía para células. Es más utilizado la glucosa la cual al ser metabolizada por medio de la glicólisis forma piruvato que se convierte en lactato o acetoacetato para entrar en el ciclo del ácido cítrico y formar CO₂.

Solución de sales balanceadas (SSB): La SSB sirve para la supervivencia básica de la célula y puede usarse para cortos periodos de mantenimiento, además de ayudar a la célula a la replicación.

Aminoácidos: Necesarios para la formación de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos, transporte de iones; además puede actuar como buffer.

L-Glutamina: Es la principal fuente de carbono para la mayoría de las células en cultivo; junto con la glucosa o el piruvato de sodio actúa como fuente de energía.

Vitaminas: Forman parte integral de las coenzimas involucradas en el metabolismo celular, entre las más utilizadas están: ácido fólico, ácido pantoténico, inositol, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxal, tiamina, biotina, P-aminobenzóico y ácido ascórbico.

Suero: el suero provee a las células proteínas para que se lleve a cabo el proceso de propagación y adhesión (fironectina y fetuina), además de compuestos que favorecen al crecimiento del cultivo: polipéptidos, hormonas y lípidos. Existen varios tipos de suero desde el humano, de caballo, cabra, ratón pero el que más se usa es el suero fetal bovino (SFB).

Antibióticos y antimicóticos: Usados con discreción y combinados con técnicas de esterilidad ayudan a prevenir la contaminación microbiana del cultivo celular, los más utilizados son penicilina, estreptomycin y anfotericina B.

2.9.2.1 Fases de crecimiento celular

En la mayoría de las células se encuentran en contacto físico con otras células todo el tiempo como miembros organizados de un tejido. La naturaleza física de la conexión entre las células de un tejido en gran medida determina como es, las propiedades funcionales de un tejido depende de

manera crítica en como las células individuales se ordenan entre sí. Las uniones o la adhesión celular entre células están divididas en tres categorías, basadas en la función que cumplen:

1. **Uniones estrechas:** también llamadas uniones oclusivas, conectan las membranas plasmáticas de las células adyacentes formando una lámina, impidiendo que pequeñas moléculas se pierdan entre el espacio intercelular. Esto permite que la lámina de células actúen como una pared dentro del órgano manteniendo las moléculas separadas.
2. **Uniones de anclaje:** mecánicamente unen los citoesqueletos de una célula con el citoesqueleto de otras células o con la matriz extracelular. Este tipo de unión es más común en tejidos que se encuentran sometidos a estrés mecánico, como los músculos o la piel.
3. **Uniones comunicantes:** muchas células se comunican entre sí por medio de conexiones directas, llamadas uniones comunicantes, una señal química pasa directamente de una célula adyacente a otra; se establece un contacto físico directo que une a los citoplasmas de dos células contiguas, permitiendo que pequeñas moléculas o iones pasen de una a otra.

Una vez que se da una adecuada adhesión celular se puede llevar a cabo la proliferación celular que es el incremento del número de células por división celular. Por otro lado, el proceso de diferenciación hace que cada tipo celular exprese un perfil de genes característicos, este perfil de expresión marca la capacidad proliferativa de cada tipo celular y su forma de responder ante un estímulo.

El control de proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento de un organismo, la pérdida de esta regularización es la causa de enfermedades como el cáncer donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación ilimitada e incontrolado debido a mutaciones genéticas, por el contrario la pérdida de la capacidad de proliferación celular es uno de los factores que originan el envejecimiento.

Cuando se realiza el cultivo de células *in vitro*, las fases de crecimiento celular que se presentan son cuatro tal como se observa en la Figura 2.20 [80]:

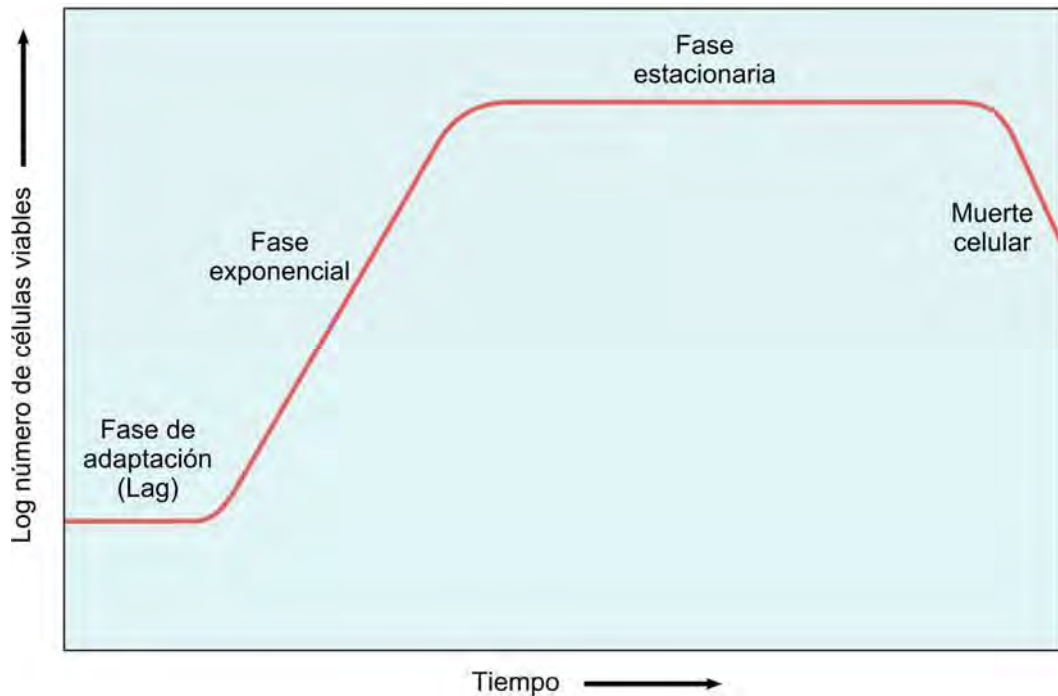


Figura. 2.20 Fases características del crecimiento celular [80].

Cuando una célula se encuentra en un nuevo ambiente con elevada concentración de nutrientes que permiten crecer necesita:

1. Un periodo de adaptación o fase lag, se presenta durante las primeras horas de sembradas las células. Las células se agrupan en dos o más unidades y se presentan cambios en la morfología asociados con la adherencia a la superficie del soporte sólido.
2. La segunda fase es de crecimiento se denomina fase exponencial o crecimiento logarítmico: en esta fase los grupos celulares se multiplican, “n” aumentado de tamaño los islotes, acelerando el crecimiento.
3. La fase estacionaria se produce cuando las células cubren la superficie de cultivo, el contacto de unas con otras (topo-inhibición) y la disminución de nutrientes hacen que disminuya el número de divisiones.

4. Por último es la muerte celular, cuando las células aparecen vacuoladas (cavidades de aire), granuladas y comienzan a desprenderse de la superficie dejando huecos en la monocapa extracelular hasta que se destruye por completo.

2.9.3 Tipos de líneas celulares usadas para la regeneración ósea *in vitro*

Existen algunos criterios para elegir el tipo de línea celular como homogeneidad, que sea bien definida, fácil de cultivar, que sea capaz de detectar de forma temprana resultados reproducibles en periodos cortos (proliferación, diferenciación o muerte celular) [83].

Las líneas celulares provenientes de animales son usadas con frecuencia en el uso de pruebas en biomateriales, las líneas osteoblásticas más usadas son, UMR-106, células de médula ósea de ratón MBA-15, G-292 y la MC3T3-E1, todas estas células son un fenotipo (conjunto de caracteres resultado de la interacción con medio de cultivo, reflejado en el ADN celular) de tipo fibroblasto (tipo de célula que sintetiza fibras y mantiene la matriz extracelular del tejido) capaz de diferenciarse en osteoblastos en condiciones de cultivo adecuadas [84,85].

Por otro lado existe otro grupo de líneas osteoblásticas celulares derivadas de los humanos y estas son las siguientes: CPC-2, TE-85, MG-63, SaOS-2, U-2OS, todas ellas fueron obtenidas a partir de un osteosarcoma (diferenciación osteoblástica en exceso), en donde retienen marcadores osteogénicos para la diferenciación celular, la actividad de la fosfatasa alcalina y la producción de osteocalcina [83].

2.9.3.1 Propiedades fisicoquímicas en la superficie del biomaterial

Cuando se fabrican materiales artificiales se debe asegurar la unión, migración, proliferación, viabilidad celular a largo plazo para un correcto funcionamiento del biomaterial.

La adhesión y función celular de forma natural en el cuerpo humano se logra a través de moléculas de la matriz extracelular (MEC) tales como la vitronectina, fibronectina, colágeno, laminina y

fibrina, ésta última es una molécula que participa en la cicatrización de heridas y se utiliza a menudo para modificar la superficie de los biomateriales.

Por otro lado, el comportamiento de adhesión celular está influenciado por las propiedades física y químicas del material, tales como su polaridad, humectabilidad, carga eléctrica y conductividad, rugosidad y topografía, etc. [83].

Las células tienden a tener dos mecanismos de adhesión en materiales artificiales, el primero es mediante enlaces químicos débiles como puente de hidrógeno, electroestáticos, polares o iónicos entre las moléculas sin la presencia de membrana celular, donde las células tienen que ser capaces de anclarse en la superficie del material para que permitan la síntesis y deposición de sus propias proteínas en la matriz extracelular en un tiempo corto generalmente de 24 a 48 h después de la siembra, de no ser así tienen a sufrir apoptosis (muerte celular programada por el organismo).

Por otro lado, está el enlace generado por las moléculas de la matriz extracelular, donde producen una relación entre el receptor y la señal transmitida de moléculas como fibrina, vitronectina, colágeno o laminina de la MEC, éstas moléculas pueden adsorberse sobre la superficie del material sintético en un ambiente favorable en cultivo celular *in vitro* o en fluidos corporales *in vivo*. En este caso el anclaje celular dependerá de la secuencia de aminoácidos de las moléculas receptoras que se integren, la adhesión mínima sobre las moléculas de la MEC debe contener al menos tres aminoácidos L-arginina, glicina, y L-ácido aspártico, que a menudo se representan por Arg-Gly-Asp (RGD) los cuales ayudan a mantener la conformación espacial apropiada entre los ligados con receptores íntegros y favoreciendo al anclaje celular [86].

Otro aspecto que es importante es el tipo de superficie que presente el material, es decir si son rugosas o nanoestructuradas ya que se ha observado que las superficies rugosas o nanoestructuradas tienden a imitar la arquitectura de los tejidos naturales debido a que presentan irregularidades en la superficie del material y permite una mayor adherencia celular por las moléculas de la MEC adsorbidas que incrementan la adhesión y diseminación (capacidad de las células de entrar en el cuerpo y esparcirse en los tejidos) de los osteoblastos, lo cual es un requisito para que se dé una buena proliferación, sin embargo si existen grandes irregulares microscópicas

pueden ser un obstáculo para la diseminación de las células lo cual pueden provocar que sea más lenta la proliferación celular [83].

Rosa y Beloti [87] realizaron un estudio donde compararon la influencia de la rugosidad submicrométrica en sustratos de titanio con crecimiento de células de médula ósea humana, y concluyeron que la adhesión celular y la proliferación disminuyó con el aumento de la rugosidad de la superficie.

2.9.4 Proliferación, diferenciación y mineralización

Smith y col. [88] estudiaron la interacción del anclaje de osteoblastos MC3T3-E1 sobre andamios de HA, en donde los resultados obtenidos de proliferación lo atribuyen al tamaño de grano, es decir a tamaños de granos menores aumenta la proliferación, además la morfología de los andamios en términos de porosidad y de interconectividad de los poros (macro y microporosidad) ayudó a que se diera una mejor adhesión celular y por lo tanto a un incremento en la proliferación observada hasta el día 5.

Danková y col. [89] realizaron el estudio de proliferación celular en andamios de poli- ϵ -caprolactona (PCL) con nanopartículas magnéticas (MNPs) donde cuantificaron la cantidad de ADN de las células MC3T3-E1, y los resultados de ADN fueron insignificantes para el primer día de cultivo, donde se le atribuyó a que no existía una buena adhesión celular, sin embargo en el periodo del día 7 se incrementó la proliferación celular y para el día 21 disminuyó de forma significativa la proliferación Figura 2.21 debido a que los nutrientes ya se habían agotado en el plato de cultivo, ellos observaron que las nanopartículas magnéticas ayudaron al aumento de la proliferación celular de forma positiva, debido a que genera un campo magnético en el material y proveyó las condiciones idóneas para que las células sigan proliferando.

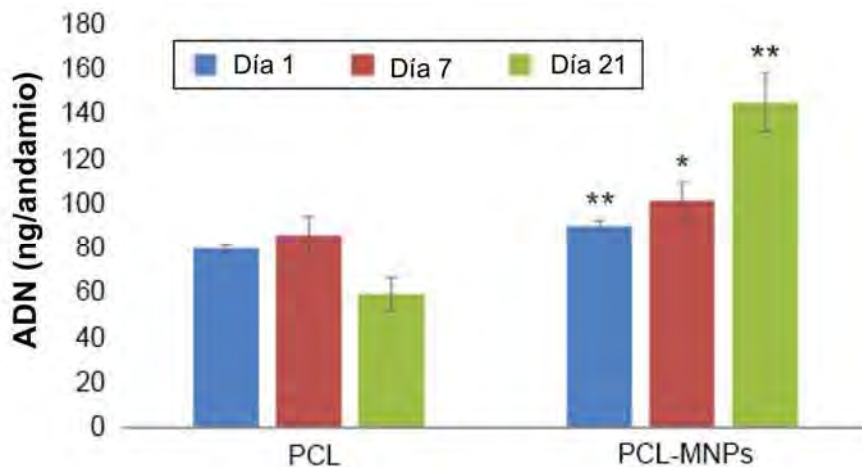


Figura 2.21 Proliferación celular en andamios de poli-ε-caprolactona (PCL) y dopados con nanopartículas magnéticas (MNPs) [89].

Por otro lado, Lee y col. [90] realizaron un estudio *in vitro* de biovidrio de fosfato de calcio donde se indujo la proliferación de células MC3T3-E1 en medio de cultivo. La medición de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina permitió analizar los resultados de proliferación y diferenciación celular, donde observaron que al día 12 se expresó el máximo valor de proliferación celular (Figura 2.22), donde atribuyeron como factor principal a la adhesión celular que permitió el incremento de la proliferación celular osteoblástica, otro aspecto que observaron Lee y col., en la reducción del rango de proliferación celular osteoblástica sobre el biovidrio, fue que las células cambiaron a una geometría esférica tal y como reportaron Hunter y col. [91], donde concluyeron que ese tipo de morfología permite tener un contacto celular más cercano.

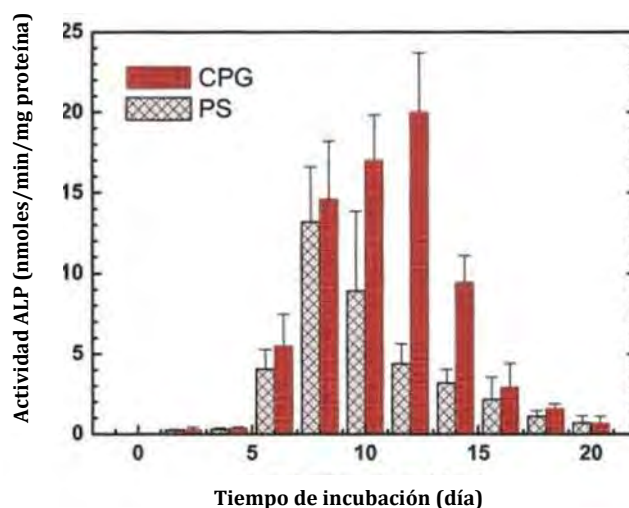


Figura. 2.22 Actividades de ALP de las celular MC3T3-E1 con respecto al tiempo de incubación [90].

En la mineralización se pueden detectar varias etapas: crecimiento (fase monocapa confluyente), etapa multicapa y formación de nódulos. La porción local de nódulo óseo mineralizado se tiñe de color marrón oscuro con la técnica de tinción usando rojo de alizarina, donde observaron estos nódulos por primera vez de forma microscópica en el día 12, el tamaño y el número de nódulos aumentan con el tiempo de cultivo, resultado de la fusión de células. Después se forma una membrana de color blanca opaca visible al ojo humano al día 17, donde la membrana es considerada la reticulación formada por fibras de colágeno a partir de la matriz extracelular de las células MC3T3-E1. Un gran número de nódulos fueron observados de forma experimental mediante la adición de colorante rojo de alizarina, el cual fue positivo en el día 17 hasta el día 21 [90].

Por otro lado, Cao y col. [92] observaron las fases de la mineralización de células MC3T3-E1 en andamios hechos de colágeno/HA representada en la Figura 2.23. Las características superficiales de las células cultivadas fueron diferentes en comparación de las células que estuvieron en contacto con el andamio, ya que en el andamio se observó múltiples capas celulares que cubrían la superficie del andamio (Figura 2.23 (a, b)), así como secreciones extracelulares de tamaño nanométrico (Figura 2.23 (c)), que fueron inducidos en las capas celulares como evidencia del efecto de mineralización. La Figura 2.23 (d) muestra otro caso diferente, en donde se que empezó a formar aberturas en la capa celular, además de una red estructurada de nanofibras con nanopartículas en la capa celular (Figura 2.23 (e)). Las morfologías de nanopartículas observadas tenían una morfología diferente a la del andamio, lo que dedujeron que fueron resultado de la interacción de la capa celular después de 3 semanas de haberse inducido la mineralización. Las imágenes con una magnificación mayor (Figura 2.23 (f)) sugieren que las nanopartículas son más pequeñas de tamaño que las nano-secreciones extracelulares (Figura 2.20 (c)) y estas nanopartículas fueron cubiertas con nanofibras de aproximadamente 200 nm de diámetro. En la Figura 2.23 (g, h) se observa la formación de una capa celular en la parte inferior del andamio, como resultado de múltiples redes de células entretejidas. Además, las células apoptóticas se observaron en diferentes áreas, las cuales se rompieron en partículas diminutas y formaron aberturas minuciosas en la capa celular, y la Figura 2.23 (i) presentaron que algunas otras células de contrajeron formando nuevas interacciones para formar una mayor adhesión.

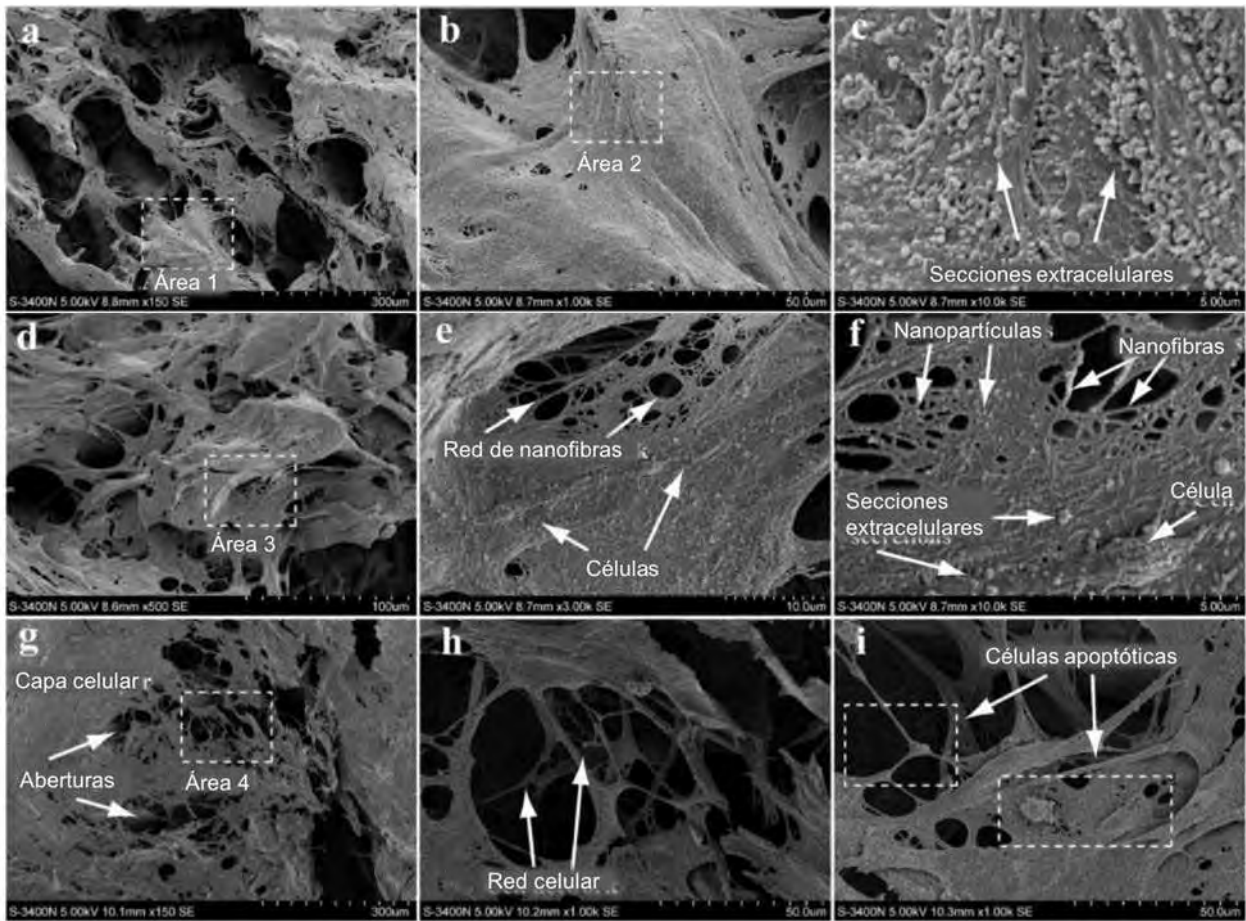


Figura 2.23 Morfologías celulares de osteoblastos en andamios después de 3 semanas de cultivo. (a-c) Secreciones extracelulares de osteoblastos. (d-f) Partículas y fibras nanométricas formadas sobre la matriz extracelular mineralizada. (g-i) Células apoptóticas en el andamio [92].

CAPÍTULO III

Metodología

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en diferentes fases que se enmarcan en el diagrama representado en la Figura 3.1.

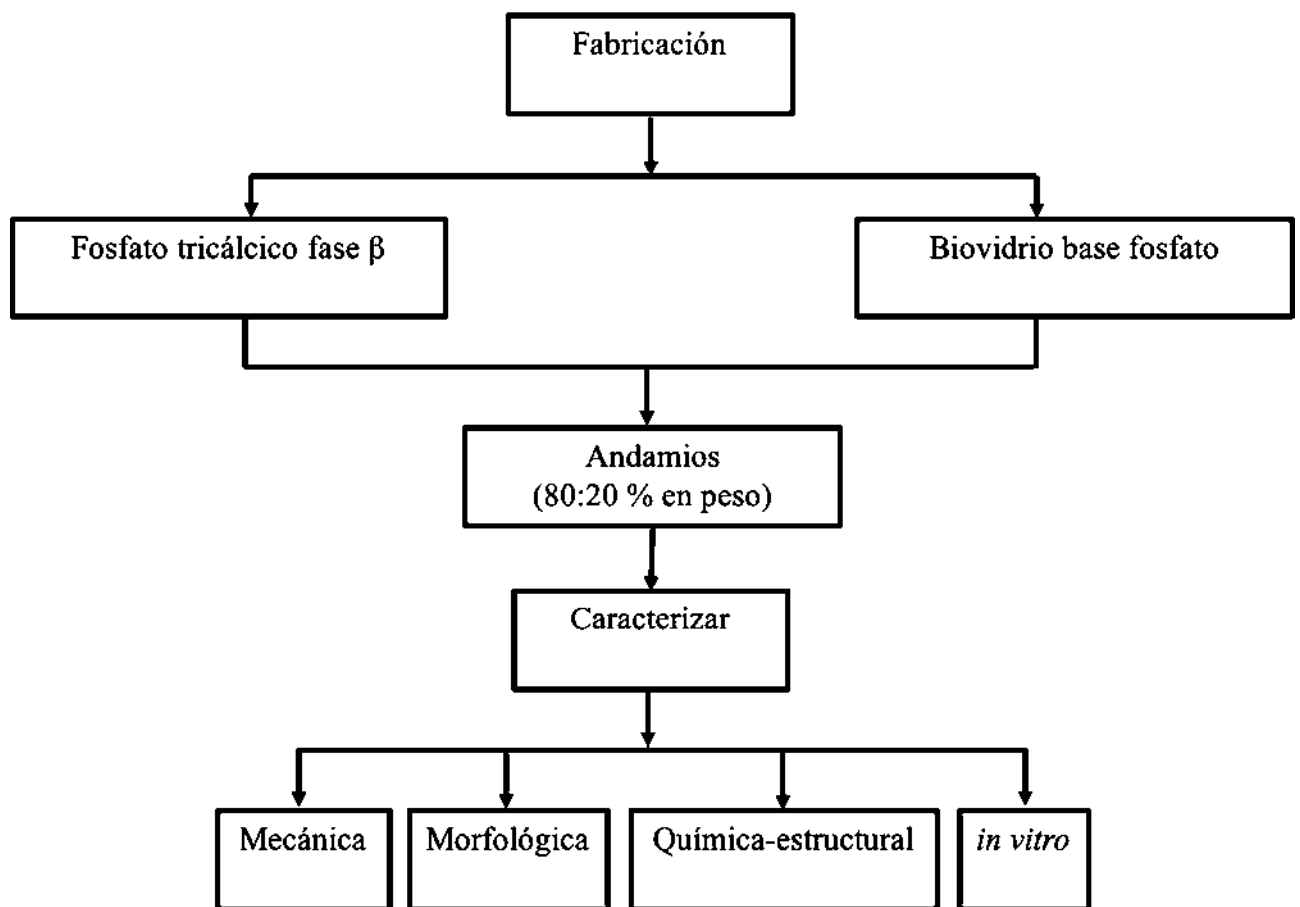


Figura 3.1 Procedimiento experimental de los andamios.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Fabricación del biovidrio base fosfato

Para la elaboración del biovidrio con composición molar $45 \text{ P}_2\text{O}_5 - 30 \text{ CaO} - (25 - x) \text{ Na}_2\text{O} - x \text{ ZrO}_2$, donde x varía de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 % mol, se usaron materiales precursores en forma de polvo con una pureza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich), pentóxido de fósforo (P_2O_5), fosfato dibásico de calcio dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) y óxido de zirconio (ZrO_2). Los polvos fueron previamente mezclados en un molino de bolas convencional por un tiempo de 30 min, después se realizó la fusión y temple convencional. El ciclo térmico se realizó en un horno Carbolite HTF 1700, a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta llegar a 400°C y con un tiempo de permanencia de 90 min, enseguida se elevó la temperatura hasta 1100°C con un tiempo de permanencia de 90 min para después vaciarlo en una placa de acero inoxidable (Figura 3.1). En la Tabla 3.1 se muestran las formulaciones de las cinco composiciones de los biovidrios base fosfatos con la nomenclatura asignada.

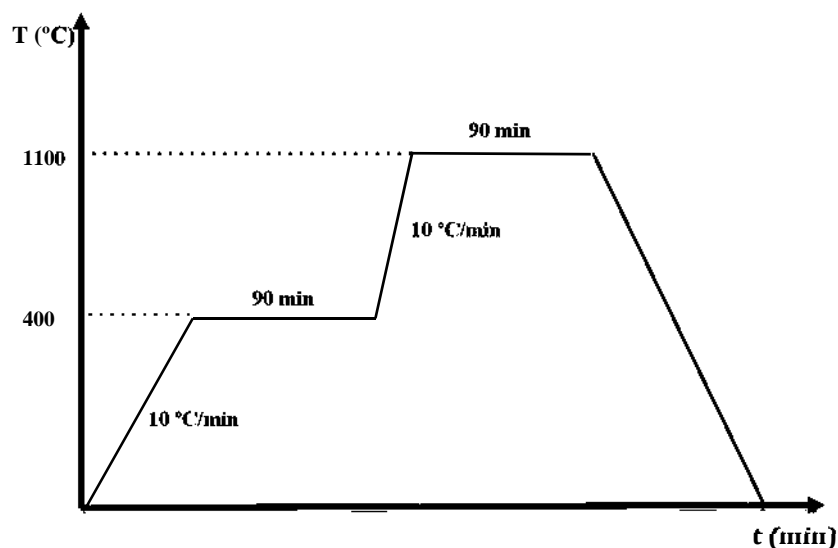


Figura 3.2 Diagrama del tratamiento térmico para la elaboración del vidrio base fosfato.

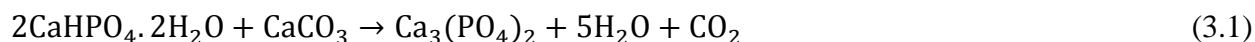
Tabla 3.1. Composición de los diferentes vidrios base fosfato dopados con zirconia.

Nomenclatura	Composición (%mol)
V1	45 P ₂ O ₅ – 30 CaO – 25 Na ₂ O
VZ0.25	45 P ₂ O ₅ – 30 CaO – 24.75 Na ₂ O – 0.25 ZrO ₂
VZ0.5	45 P ₂ O ₅ – 30 CaO – 24.5 Na ₂ O – 0.5 ZrO ₂
VZ0.75	45 P ₂ O ₅ – 30 CaO – 24.25 Na ₂ O – 0.75 ZrO ₂
VZ1.0	45 P ₂ O ₅ – 30 CaO – 24 Na ₂ O – 1.0 ZrO ₂

3.1.2 Mecanosíntesis del fosfato tricálcico beta

El β-TCP se sintetizó mediante la ruta de mecano-síntesis en un molino planetario de alta energía Restch PM400 por un tiempo de 12 h a 350 rpm, con una relación de bolas/polvo de 8:1, y utilizando viales y medios de molienda de ágata.

Los precursores empleados fueron polvos grado reactivo de carbonato de calcio (CaCO₃) y fosfato dibásico de calcio (CaHPO₄) (Sigma-Aldrich). Se realizó la mezcla de los precursores en un molino de bolas convencional manteniendo la relación calcio/fósforo de acuerdo a la reacción:



Después de la mecano-síntesis se realizó un tratamiento térmico a 900 °C por 3 h, en un horno mufla Thermolyne benchtop, modelo FB-1315M. Se analizó la formación de la fase β por medio de difracción de rayos X y tarjeta JCPDS No: 01-073-4869.

3.1.3 Fabricación de las espumas

Por medio de tecnología de polvos y espumado de polímeros, se prepararon las espumas mezclando fosfato tricálcico beta con biovidrio manteniendo el porcentaje de polvos fijo en 55 % en peso, con una relación de 80 % en peso de fosfato tricálcico y 20 % en peso de biovidrio base fosfato, como agente espumante se realizaron variaciones de 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 % en peso de p-tolueno sulfonil-

hidrazida (TSH), como ligante se empleó una resina fenólica en cantidades variables que completaron el resto del balance, la mezcla fue homogenizada en un molino de bolas convencional por 1 h. El proceso consiste en mezclar en seco los polvos cerámicos, prensarlos y tratar térmicamente. El ciclo térmico para la formación del andamio se lleva a cabo en tres etapas: espumado, pirólisis y sinterizado. En donde el espumado tiene origen con la fusión del ligante (~ 80 °C) creando una suspensión con partículas del biovidrio base fosfato y el β -TCP, en esta etapa el espumante se descompone y libera gas expandiendo la estructura, dando lugar a la porosidad interconectada en el andamio. La pirólisis por otro lado consiste en la descomposición del ligante polimérico, a una temperatura de 500 °C, y por último el sinterizado, provee resistencia mecánica a la espuma mediante la formación de cuellos entre partículas. Es importante mencionar que se utilizó nomenclatura especial para cada composición de los andamios, es decir, para el andamio sin dopar se utilizó E-V1, para las espumas dopadas con 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 % mol de zirconia se utilizó E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0, respectivamente.

3.2 Caracterización física y estructural

3.2.1 Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FE-SEM).

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FE-SEM JEOL-JSM 7600 F se utilizó para analizar la morfología y estructura porosa de los andamios, así como la formación de la capa de HA en los andamios sumergidos en SBF y la adherencia celular del MC3T3-E1 subclona 4 en el andamio.

El EDS fue usado para investigar los elementos presentes en la superficie de la muestra antes y después de la inmersión de SBF para analizar la relación Ca/P. Se realizaron 5 mediciones por cada muestra para obtener así valores estadísticos.

3.2.2 Tamaño y distribución de partícula

Para estudiar la distribución del tamaño de partícula se usó un analizador de partícula láser (Coulter LS 100Q), lo cual permitió observar la variación de tamaño de partículas de las composiciones de los biovidrios base fosfato y su relación con las propiedades físicas y morfológicas durante el proceso de sinterización de las espumas.

3.2.3 Microtomografía de rayos X (μ CT)

Cada espécimen con composición diferente fue escaneado en un microtomógrafo para investigar la estructura interna de los andamios (tamaño de poro, porosidad e interconectividad de poros) con las condiciones de 50 kv y 500 mAs. Para cada espécimen se realizaron cortes de 35 μ m donde cada muestra tenía una altura de 4 cm y presentando una resolución 255 x 255 pixeles. El uso de estas imágenes permitió reconstruir imágenes 3D por medio del programa *ImageJ* para obtener la distribución de tamaño de poro. Para la reconstrucción del modelo en 3D se aisló el interior de la muestra con respecto del exterior para evitar la interferencia de los rayos X [93].

3.2.4 Espectrometría de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

Los análisis de FTIR fueron realizados para determinar los grupos funcionales de los andamios antes y después de SBF en el equipo Bruker tensor 27, en el rango de 4000 hasta 400 cm^{-1} . Se realizaron pastillas con cantidades de 0.003 g de polvo del andamio y mezclados con 0.3 g de KBr con dimensiones de 1 mm de espesor por 1.3 cm de diámetro. Las muestras fueron secadas previamente para prevenir la humedad atmosférica así como el espectro fue normalizado del ruido que pudiera presentar.

3.2.5 Difracción de rayos X (DRX)

Los andamios se analizaron por medio de DRX con la finalidad de analizar las fases formadas antes y después de la inmersión en SBF, así como en el cultivo celular para confirmar la formación de hidroxiapatita en la superficie. El difractómetro usado fue el D5000 X-Ray Diffractometer con una fuente de radiación $\text{CuK}\alpha$ para obtener el patrón con un ángulo de barrido entre 10-80°.

3.2.6 Resistencia a la compresión

El ensayo de resistencia a la compresión de los andamios antes de la inmersión en SBF fue determinada usando una máquina universal Karl Frank modelo 81105 a temperatura ambiente. Con dimensiones de las probetas de 1 x 1 x 1 cm, así como para las probetas en forma de cilindros se utilizó dimensiones de 1 cm de diámetro y 2 cm de longitud respectivamente, con una celda de

carga de 1 kN. Las muestras fueron comprimidas entre dos platinas metálicas con una velocidad de deformación de 0.5 mm/min. Todos los resultados fueron promediados de 3 mediciones realizadas.

3.3 Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* fueron realizados para explorar la habilidad que presentan los andamios en la formación de hidroxiapatita y hueso nuevo.

3.3.1 Simulación en fluido corporal (SBF)

La solución de SBF fue preparada en el laboratorio usando el procedimiento propuesto por Kokubo y col. [67,68,94]. Se ajustó el valor del pH de la solución del SBF con la finalidad de encontrarse en rangos a los del plasma sanguíneo. El fluido corporal simulado se preparó en un contenedor de polietileno, los precursores fueron de Sigma Aldrich (99.95%) mezclados con agua desionizada en agitación continua. Las condiciones a las cuales se almacenó el SBF fueron 4° C por 24 h para explorar la presencia de precipitados. El SBF fue transferido a un contenedor de polietileno con una capacidad de 1 L para después seleccionar 15 mL de solución en viales de la misma capacidad en condiciones estériles. Se seleccionaron 3 muestras por composición con SBF a diferentes tiempos de inmersión 7, 14, 21 y 28 días, después se lavaron con agua destilada y se secaron en un horno a 100°C por 12 h. Este tipo de estudios permite observar la habilidad que presentan los andamios de formar HA y los cambios estructurales que sufren en los diferentes periodos de inmersión. Se llevaron a cabo estudios de XRD, FTIR y FE-SEM antes y después de la inmersión en SBF.

Para el cálculo del volumen de SBF, se tiene que considerar si el material es denso poroso, debido a que puede presentar una variación en el volumen calculado, ya que para un material denso se calcula a partir del área superficial por medio de la fórmula $2\pi \cdot r(r + h)$ donde r representa el radio y h la altura, el radio de los andamios fueron de 5 mm y la altura de 20 mm, por lo tanto, el área superficial fue de 157.07 mm², el volumen para cada muestra fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación en donde el denominador 10 permitió la conversión directa de las unidades de

mm² a mL, además es importante mencionar que cada vial tenía una capacidad máxima de 25 mL, (3.2) [67]:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (3.2)$$

La variable V_s corresponde al volumen en mL para el SBF, S_a es el área superficial aparente del espécimen en mm². El volumen encontrado al sustituir los valores antes mencionados en la ecuación anterior fue de 15.70 mL, sin embargo al ser una muestra porosa se multiplicó por un factor de 1.28 para que permitiera una mejor interacción del SBF con los poros de los andamios obteniendo un volumen total de 20.09 mL en cada muestra.

Tabla 3.2 Precursores empleados para hacer el SBF [94].		
Orden	Reactivo	Cantidad
#1	NaCl	7.996 g
#2	NaHCO ₃	0.350 g
#3	KCl	0.224 g
#4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.228 g
#5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.305 g
#6	1 kmol/m ³ HCl	40 cm ³
#7	CaCl ₂	0.278 g
#8	Na ₂ SO ₄	0.071 g
#9	(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6.057 g
#10	1 kmol/m ³ HCl	Cantidades apropiadas para ajustar el pH

3.3.2 Mediciones de pH

Durante los ensayos de inmersión, la variación del pH en el SBF se midió cada tercer día hasta llegar a los 28 días usando un medidor de pH (Thermo Orion, USA modelo-720A) en todas las muestras. El electrodo se calibró usando agua destilada y después sumergiéndolo en un buffer de pH = 7.00 antes de tomar las mediciones de pH.

3.3.3 ICP-MS

El espectrómetro de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación carga-masa (z/m).

El equipo usado para llevar a cabo los análisis de ICP fue el Spectro Analytical Instruments Aligent, modelo 7500c, se utilizó un micromol de muestra de SBF para analizar la cantidad en ppm del Zr, así como de los elementos Ca y P.

3.3.4 Microscopía Raman

Las mediciones de micro-Raman se llevaron a cabo en un espectrómetro de DXR Thermo Scientific. La longitud de onda del láser fue de 532 nm. Se utilizó un objetivo 50X microscopio, con una potencia de láser de aproximadamente 20 mW en la muestra. Los espectros se registraron a temperatura ambiente con un rango de 3572 - 24 cm^{-1} .

3.3.5 Pérdida de peso

Para realizar el cálculo, primero los andamios se secaron hasta una masa constante (m_{seco}). A continuación, se sumergieron en SBF a 37°C y se extrajeron a los 7 días para medir la masa húmeda. Las masas de las muestras húmedas ($m_{\text{húmedo}}$) se determinaron hasta que la masa mostrada no cambió y las muestras se habían permeado por completo. La ecuación (3.3) se utilizó para determinar la absorción de agua de andamios como sigue:

$$P = \frac{(m_{\text{húmedo}} - m_{\text{seco}}) / \rho_{\text{agua}}}{V_{\text{aparente}}} \times 100 \quad (3.3)$$

Donde ρ_{SBF} es la densidad del SBF (1 g/cm^3) y V_{aparente} es el volumen del andamio en cm^3 [95].

3.4 Cultivo celular

Preosteoblastos de ratón MC3T3-E1 subclona 4 (ATCC CRL-2593) fueron usados para los diferentes análisis de adhesión y proliferación celular. Las células fueron sub-cultivadas tres veces a la semana en un medio proliferativo sin ácido ascórbico: α MEM (GIBCO) complementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Todos los experimentos fueron desarrollados con células frescas en fase exponencial de crecimiento (número de pases 20-27), mantenida en una cabina de cultivo (NUAIRE) con las condiciones de 37 °C, 5% de CO₂, 95% de aire y condiciones de humedad saturada. Una suspensión de 0.5×10^6 células/mL, se utilizó para la incubación de cada andamio poroso con dimensiones de 13 mm de diámetro, 4 mm de espesor. Los andamios con células MC3T3-E1 fueron extraídos y colocados en platos de cultivo de 35 mm x 10 mm y se les adicionó α MEM. Posteriormente, los andamios fueron incubados por 5 h y cada tercer día se realizó el cambio de cultivo. Las muestras fueron sacadas del medio de cultivo y lavadas dos veces con PBS y sumergidas por 30 min en solución de 0.2% de glutaldehído/ 2% de formaldehído/1X PBS. Finalmente, las células se fijaron y las muestras fueron removidas para nuevamente ser lavadas dos veces con PBS. Las muestras se caracterizaron por medio de DRX, FE-SEM, ICP, FT-IR y azul de alamar a diferentes tiempos 3, 7, 14, 21 y 28 días.

Proceso de esterilizado de los andamios: En la campana de flujo laminar, cada andamio fue sumergido tres veces durante 15 minutos en etanol al 70% (etanol absoluto - agua tri-destilada estéril 70:30 % v/v). Luego se sumergió tres veces durante 15 minutos en agua tri-destilada estéril; se dejó secar bajo el flujo laminar de la campana durante 15 horas y finalmente otras 3 horas bajo luz ultravioleta. El material estéril se almacenó a temperatura ambiente, en condiciones de esterilidad hasta su uso.

3.4.1 Modelo celular

Se utilizó la línea celular MC3T3-E1 subclona 4 (ATCC® CRL-2593™) bajo condiciones de proliferación. Para la manutención de la línea celular y las pruebas biológicas de los andamios, se utilizó el medio mínimo esencial alfa (MEM-alpha, INVITROGEN) sin ácido ascórbico suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

El modelo celular se mantiene, en condiciones de proliferación exponencial, a 37 °C y en una atmósfera con 5% de CO₂, lo cual implica un máximo de 12 pases o resiembras por lote criopreservado. Las resiembras se realizan 3 veces por semana. Para criopreservar los modelos celulares en nitrógeno líquido, se expanden los cultivos celulares para luego concentrarlos en medio de cultivo suplementado con 20% SFB y 10% dimetil sulfóxido (DMSO); esto se realiza cada 6 meses para mantener el “stock” de la línea celular y para garantizar su capacidad proliferativa y minimizar el número de pases.

Esta línea exhibe altos niveles de diferenciación a osteoblastos después de su crecimiento en medios de cultivo con ácido ascórbico y fosfato inorgánico, formando una matriz extracelular a partir de los 10 días de cultivo y totalmente mineralizada después de los 28 días. El medio osteogénico se utiliza para montar controles celulares en ausencia de andamios osteoinductivos.

Todos los procedimientos se realizan en una campana de flujo laminar (THERMOFORMA Class II A2 Biological Safety Cabinet) bajo condiciones de esterilidad, incluyendo materiales y reactivos.

3.4.2 Morfología y adherencia celular

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FE-SEM JEOL-JSM 7600 F fue utilizado para analizar la adhesión y morfología de las células MC3T3-E1 subclona 4 en el andamio. Para deshidratar el material se sumergió en concentraciones crecientes de etanol (mezcla de etanol absoluto con PBS) durante 10 min cada vez: etanol al 25, 50, 75 y 98%. La del 98% se realizó dos veces. Finalmente, se sellaron con parafilm las placas con cada material y se almacenaron a – 20 °C. Se dejaron secar en la campana de flujo laminar por lo menos 12 h.

3.4.3 Viabilidad celular

El azul de alamar (AA) es un reactivo que se empleó para evaluar la viabilidad, citotoxicidad y proliferación celular, es decir indicó la salud de la célula por medio de un reductor; este reductor se conoce como resazurina que es el ingrediente activo del reactivo AlamarBlue de “é invitrogen”,

el cual es un compuesto no tóxico y colorea las células de un tono azul débilmente fluorescente pasando por el color rosa y cuando se reduce completamente toma un color rojo fluorescente llamado resorufina; así cuando las células son viables se verán de forma continua de resazurina a resorufina. El AlamarBlue es tan sensible que puede detectar cantidades tan pequeñas de células de hasta 50 células por pocillo [96].

El protocolo del ensayo de viabilidad celular AlamarBlue se realizó de la siguiente forma: una placa con 12 pocillos que contienen los andamios E-V1, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 con células MC3T3-E1 subclona 4 se sembró por un tiempo de 5 h para que se adhieran a la superficie de los andamios, después se cambió el material a un plato nuevo y se le añadió medio nuevo para cubrir las muestras; se adicionó 10% en volumen de reactivo AlamarBlue, 10 μL de AlamarBlue a 100 μL de medio que contiene los andamios con células (Figura 3.3) a una temperatura de 37°C por un tiempo de incubación de 4 h y 5 % de CO_2 , para permitir que las células pasen de resazurina a resorufina protegido de la luz directa y se midió la fluorescencia (absorbancia) de la señal. La fluorescencia resultante se leyó en un lector de placas o espectrofotómetro de fluorescencia GENESYS 20, Spectronics Instruments y a la par la absorbancia del reactivo AlamarBlue se lee en un espectrofotómetro; la longitud de onda de excitación usada de fluorescencia es de 570 (reducción o resorufina) a 600 (oxidación o resazurina) nm. Como blanco se utilizó medio de cultivo sujeto a las mismas condiciones que las muestras de cultivo sobre andamios. Para determinar el factor de corrección R_o se utilizó medio de cultivo con azul de alamar, en las condiciones antes señaladas. Para determinar el porcentaje de reducción de azul de alamar (% Red AA) se utilizaron las fórmulas 3.4 y 3.5:

$$\% \text{ Red AA} = \text{Abs de la muestra a } 570 \text{ nm} - (R_o * \text{Abs de la muestra a } 600 \text{ nm}) \quad (3.4)$$

$$R_o = \frac{(\text{Abs del medio de cultivo con AA a } 570 \text{ nm})}{\text{Abs del medio de cultivo con AA a } 600 \text{ nm}} \quad (3.5)$$

Para correlacionar % Red AA con número de células, previamente se realizó una curva estándar, es decir, se realizó el ensayo antes descrito en pozos de poliestireno con concentraciones crecientes y conocidas de células MC3T3.



Figura 3.3 Procedimiento del AlamarBlue.

3.4.4 Proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular, el biomaterial se pasó a un pozo de cultivo nuevo, después se añadió medio de cultivo nuevo y se repite la prueba con azul de alamar.

3.4.5 Actividad de alcalino fosfatasa (ALP)

Se colocaron los andamios en un plato de cultivo con suspensión celular de concentración conocida; después se llevaron a la incubadora y se inició a contabilizar el tiempo. Como control, cada andamio fue incubado en medio de cultivo y ausencia de células. Se cambió el medio de cultivo cada tres días. Los andamios se retiraron del medio y se lavaron dos veces con PBS; se lisaron las células con una solución de Igepal al 2% en PBS mediante agitación a temperatura ambiente por una hora; se retiró el sobrenadante y se centrifugó a 16, 000 rpm a 4 °C durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio que se almacenó a -70 °C hasta su análisis. El análisis de la actividad de ALP se realizó con un kit fluorométrico (Abcam's Alkaline Phosphatase Assay Kit) que se basó en la escisión de un grupo fosfato de sustrato 4-MUP, lo que generó una señal fluorescente intensa. Los resultados fueron normalizados con la concentración total de proteína, misma que se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) [97].

3.4.6 Medición de colágeno

Se colocó cada andamio en un plato de cultivo y se adicionó suspensión celular de concentración conocida (medio esencial alfa MEM-alpha, INVITROGEN) sin ácido ascórbico suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB)); se colocó en la incubadora y se contabilizó el tiempo tomando las muestras a distintos tiempos. Como control, cada tipo de andamio fue incubado en medio de cultivo y ausencia de células. Se cambió el medio de cultivo cada tres días. Cada que se tomó una muestra, el andamio fue retirado del medio y se lavó dos veces con PBS; se fijó durante una hora bajo agitación suave, cubriendo la muestra con solución de Bouin (15 mL de una solución saturada de ácido pícrico, 5 mL de formaldehído al 35% y 1 mL de ácido acético glacial); se lavó con agua destilada durante 15 minutos y se dejó secar por aireado. Una vez que estuvo seca la muestra, se cubrió la misma con una solución 0.1% de Picro-Sirius (0.1 g de Sirius Red en 100 mL de solución saturada de ácido pícrico) y se incubó a temperatura ambiente bajo agitación suave durante una hora. Finalmente, se descartó la solución y se lavó el andamio con HCl 0.1N, tantas veces como fue necesario y hasta que no se observó coloración. Se cubrió la muestra con un volumen conocido de NaOH 0.1N y se agitó suavemente durante 30 minutos. Se tomó la fase acuosa para registrar lecturas de absorbancia a 550 nm, utilizando NaOH 0.1N como blanco [98].

3.4.7 Análisis del grado de mineralización ósea por tinción histoquímica con rojo de alizarina S (tinción de depósitos de calcio) y cuantificación de ADN con correlación al número de células.

Se colocaron los andamios en un plato de cultivo y sobre cada uno se adicionó una suspensión celular de concentración conocida; se colocaron en la incubadora y se inició a contabilizar el tiempo para tomar muestras de cada andamio a distintos tiempos. Como control, cada tipo de andamio fue incubado en medio de cultivo y ausencia de células. Se cambió el medio de cultivo cada tres días. Cada que se tomó una muestra, el andamio se retiró del medio y se lavó dos veces con PBS; se fijó con etanol al 70 % durante una hora a 4 °C; se retiró el etanol, se lavó dos veces con agua destilada y se cubrió el material con solución ARS (0.2% de Rojo de Alizarina S en 2% de etanol); se incubó en obscuridad durante 15 minutos; se retiró el colorante y se lavó con agua destilada tantas veces como fue necesario y hasta que no se observó coloración; se dejó secar por aireado la muestra. Se

cubrió la muestra con un volumen conocido de HCl 0.5N en 5% SDS y se agitó suavemente durante 30 minutos en la oscuridad. Se tomó la fase acuosa para registrar lecturas de absorbancia a 415 nm, con la solución de HCl 0.5N en 5% SDS como blanco. El blanco y las muestras también fueron leídos a 260 nm para cuantificar ADN, considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 microgramos/mL de ADN doble cadena. Así mismo, 8 picogramos de ADN corresponde a una célula MC3T3 [99,100].

3.5 Análisis estadísticos

Para la cuantificación de datos obtenidos, los ensayos se realizaron por triplicado con la finalidad de obtener la desviación estándar y se llevaron a cabo las pruebas de Student's t-test para analizar la diferencia entre los grupos. La diferencia fue considerada significativa si el valor de P fue menor que 0.005.

CAPÍTULO IV

Resultados y discusión

En este capítulo se discuten los resultados encontrados de los andamios V1, VZ0.25, VZ0.5, VZ0.75 y VZ1.0, así como las variables que se tuvieron que estar modificando para llegar a obtener las condiciones óptimas de tamaño de poro, distribución, interconectividad, bioactividad y osteoconductividad de las espumas para sustentar el uso en la ingeniería de tejidos.

4.1 Vidrio bioactivo base fosfato

Previo a la fabricación de las diferentes composiciones de los vidrios bioactivos, se caracterizó el polvo de zirconia previamente por DRX (Figura 4.1), para verificar que la estructura cristalina fuera tetragonal debido a sus propiedades de biocompatibilidad y bioactividad. Una inspección visible de los vidrios demostró que tienen una base completamente transparente y al adicionarle ZrO_2 no se observó cambio aparente de color (Figura 4.2).

Figura 4.1 Patrones de difracción de rayos X del polvo de zirconia tetragonal.



Figura 4.2 Vidrio VZ1.0 antes de triturar y pulverizar.

Por otro lado, la Figura 4.3 muestra los patrones de difracción de rayos X de todos los vidrios en donde se puede observar la estructura amorfa relacionada a la correlación de la estabilidad térmica de la red que presentan los vidrios.

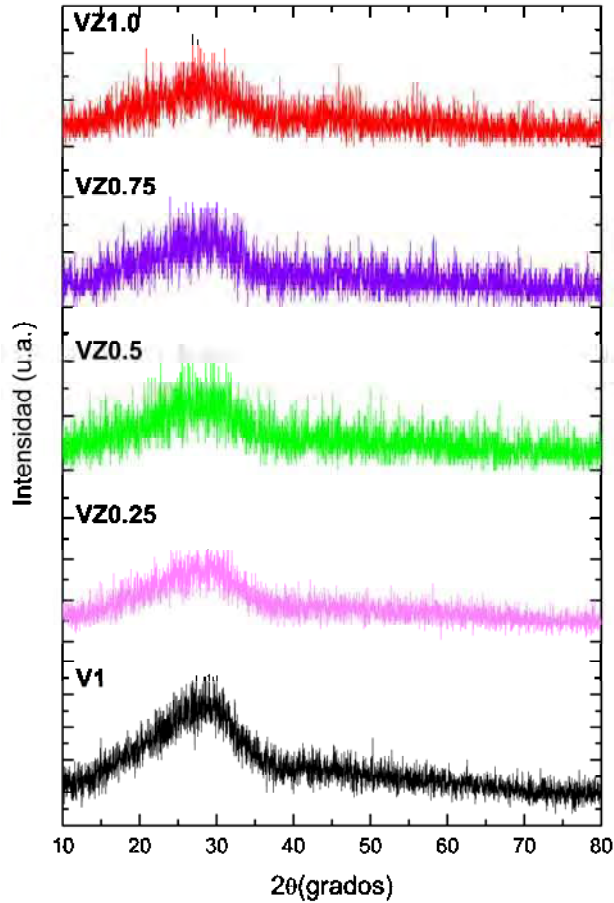


Figura 4.3 Patrones de difracción de rayos X de vidrios de fosfato donde se puede observar la estructura amorfa.

Las micrografías obtenidas por MEB muestran la morfología con facetas irregulares de los polvos de los vidrios, la cual permitió explorar la superficie y hacer mediciones para tener valores aproximados de tamaño de partícula antes de hacer las espumas (Figura. 4.4), tales valores se sustentaron con las mediciones de tamaño de partícula obtenidas por el equipo Coulter LS 100Q.

Con respecto al tamaño de partícula no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes composiciones V1, VZ0.25, VZ0.5 Y VZ1.0 ya que todas presentaron valores menores a $60 \mu\text{m}$.

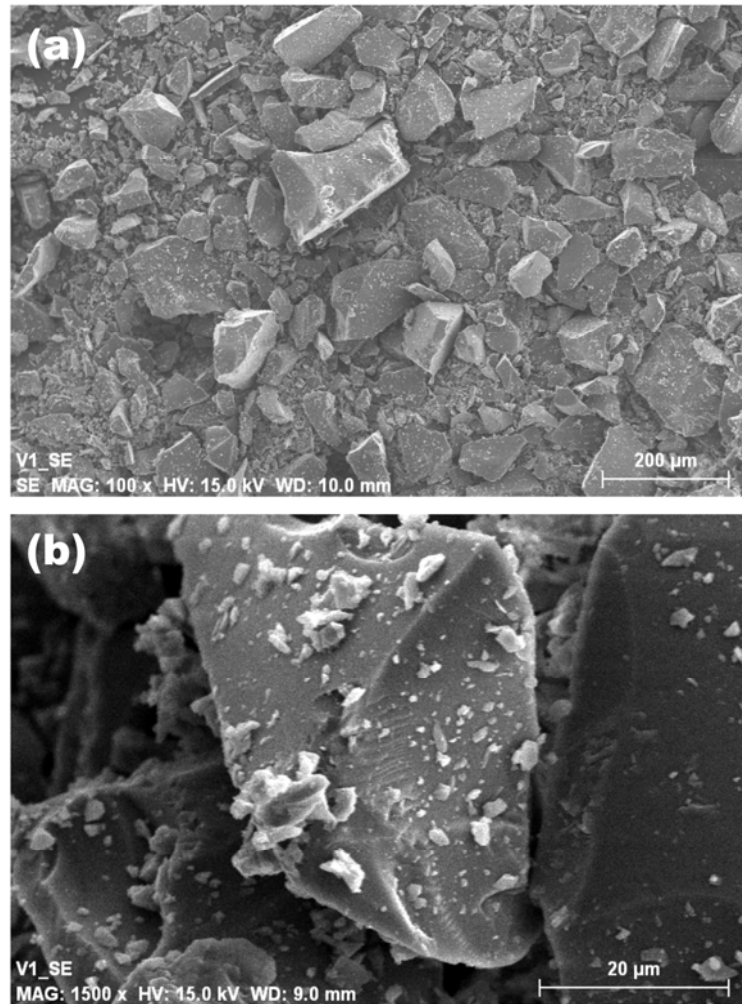


Figura 4.4 Micrográficas del vidrio: V1 (a) 100X y (b) 1500X.

4.2 Evolución del fosfato tricálcico fase beta

La formación del β -TCP se sintetizó por la ruta de mecano-síntesis de acuerdo a las condiciones mencionadas en el capítulo anterior. Durante el proceso de la molienda los precursores fosfato dibásico de calcio dihidratado (DCPD) y el carbonato de calcio (CaCO_3) presentan varias reacciones tal y como reportaron Young y col. [101], en donde encontraron que las reacciones químicas ocurridas entre estos dos precursores, las cuales se muestran en la Tabla 4.1 es debido a la alta energía producida debido al choque entre las bolas y las paredes que provocaron que aumentará el contacto entre partícula. En el análisis de las curvas de DSC se observaron tres tipos de picos a diferentes temperaturas, producto de la interacción entre las reacciones químicas de los

precursores, que da como resultado la liberación de gases de forma abrupta y generan una gran pérdida de masa. Las reacciones que ocurren en el proceso de activación de los polvos por medio de la mecano-síntesis fueron: 1), 2), 4) y 5) dando como resultado el TCP amorfo y después del tratamiento térmico a 900 °C se obtuvo la fase beta ($\beta - Ca_3(PO_4)_2$).

Tabla 4.1 Relación de mecanismos para la formación de β -TCP [101].	
Temperatura/ °C	Reacción
199	1) $CaHPO_4 \cdot 2H_2O \rightarrow CaHPO_4 + 2H_2O (g)$
465	2) $2CaHPO_4 \rightarrow \gamma - Ca_2P_2O_7 + H_2O (g)$
800	3) $\gamma - Ca_2P_2O_7 \rightarrow \beta - Ca_2P_2O_7$ 4) $CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2 (g)$ 5) $\beta - Ca_2P_2O_7 + CaO \rightarrow \beta - Ca_3(PO_4)_2$

Por otro lado, Briak-BenAdbeslam y col. [102], concluyeron que la molienda no solamente afecta el tamaño de partícula sino que cuando se usa como polvo precursor el reactivo DCPD, el tamaño del DCPD disminuyó exponencialmente con el tiempo de molienda, lo cual permitió la formación de diferentes fosfatos de calcio o apatitas, ya que la reacción química del DCPD y el CaO se ve afectada por el tiempo y la cantidad de material inicial.

Moseke y col. [103], exponen que la reacción entre los precursores del fosfato tricálcico se produce de forma directa tal y como indica la siguiente reacción: $2CaHPO_4 + 2CaCO_3 \rightarrow Ca_4(PO_4)_2O + 2CO_2 + H_2O$.

Sin embargo, una vez realizado el proceso de mecano-síntesis y sinterización, el rendimiento de producción del β -TCP fue muy bajo y se optó por comprarlo y caracterizarlo al igual que el β -TCP obtenido por la ruta de mecano-síntesis, en donde se observaron claras diferencias en la morfología, Figura. 4.5. La principal diferencia fue que el fosfato tricálcico obtenido por mecano-síntesis presentó aglomerados y no partículas como el que se compró, probablemente debido a la difusión y la sinterización ocasionada por el tratamiento térmico; por lo tanto, el tamaño de partícula o en su caso aglomerados varió significativamente en cada uno de ellos; ya que el de mecano-síntesis presentó un tamaño menor a 6 μm y para el de Sigma Aldrich fue de 6 μm .

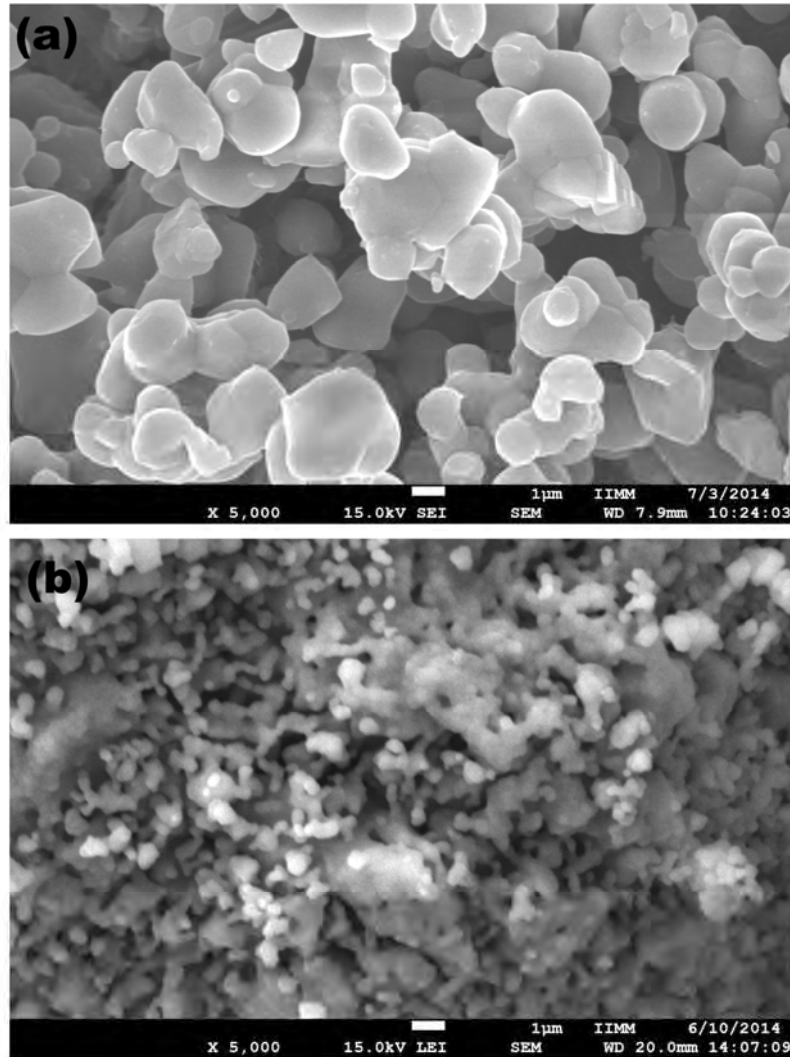


Figura. 4.5 Diferencias morfológicas de β -TCP, (a) Sigma Aldrich y (b) sinterizado por medio de mecano-síntesis a 350 rpm, 12 h y con T. T. a 900 °C por 3 h.

La Figura 4.6 muestra el patrón de difracción de los polvos sinterizados por mecano-síntesis a 900 °C, en donde se observa la fase β ; es sabido que el TCP presenta dos tipos de estructuras cristalinas α y β (tetragonal) de acuerdo a la temperatura de estabilización. Sin embargo, la estructura tetragonal presentada por el fosfato tricálcico corresponde a la fase beta, así como los ejes característicos de la misma estructura encontrados por Rangavittal y col. [104], y Prevéy [105], quienes resumieron los rangos correspondientes a 2θ que pueden presentar los compuestos más comunes de los ortofosfatos (Tabla 4.2): $a \approx 10.43 \text{ \AA}$ y $c \approx 37.40 \text{ \AA}$. Los valores para los ejes de la celda unitaria cristalina del fosfato tricálcico encontrados fueron para $a = 10.36 \text{ \AA}$ y $c = 37.25 \text{ \AA}$

valores que confirman la cristalinidad de la fase beta así como el pico más intenso encontrado $2\theta = 31.5^\circ$ característico del β -TCP el cual se puede corroborar con la tarjeta JCPDS con número 01-073-4869, por otra parte, Tavares y col. [106], obtuvieron los mismo planos que se muestran en el difractograma de rayos X del β -TCP.



Figura 4.6 Patrón de difracción de rayos X del polvo de β -TCP después del tratamiento térmico.

Tabla 4.2 Principales rangos característicos 2θ de los ortofosfatos [104,105].

Fase cristalina	Rango 2θ
Hidroxiapatita	38.5-59.0
α-TCP	23.8-24.8
	29.3-30.2
	30.5-31.6
	38.5-59.0
β-TCP	30.5-31.6
	37.0-38.5
	38.5-59.0
CaO	37.0-38.5
	38.5-59.0

En relación a los resultados por espectrometría de infrarrojo del β-TCP, se observaron los grupos de PO_4^{3-} , los cuales son característicos del fosfato tricálcico fase β (Figura 4.7). Berzina-Cimdina y Borodajenko [107] investigaron los diferentes fosfatos de calcio usando espectroscopía infrarroja donde presentan que los grupos principales son los PO_4^{3-} , y las principales bandas de absorción se encuentran en longitudes de onda de 560 y 600 cm^{-1} y en el rango de 1000-1100 cm^{-1} . Pueden presentarse bandas de absorción del agua muy amplias que van de 3600 a 2600 cm^{-1} , además se pueden resumir las principales bandas de adsorción de los grupos de vibración de los fosfatos como sigue: ν_1 se presenta a 960 cm^{-1} , ν_2 a 460 cm^{-1} , ν_3 está en rangos de 1000-1100, a 1040 y en el rango de 1020-1120 cm^{-1} y por último ν_4 está en el rango de 560-600 y en longitudes de 602 y 555 cm^{-1} . Sin embargo, las bandas características para el β-TCP pueden variar de acuerdo a la temperatura de sinterizado como se resume en la Tabla 4.3.

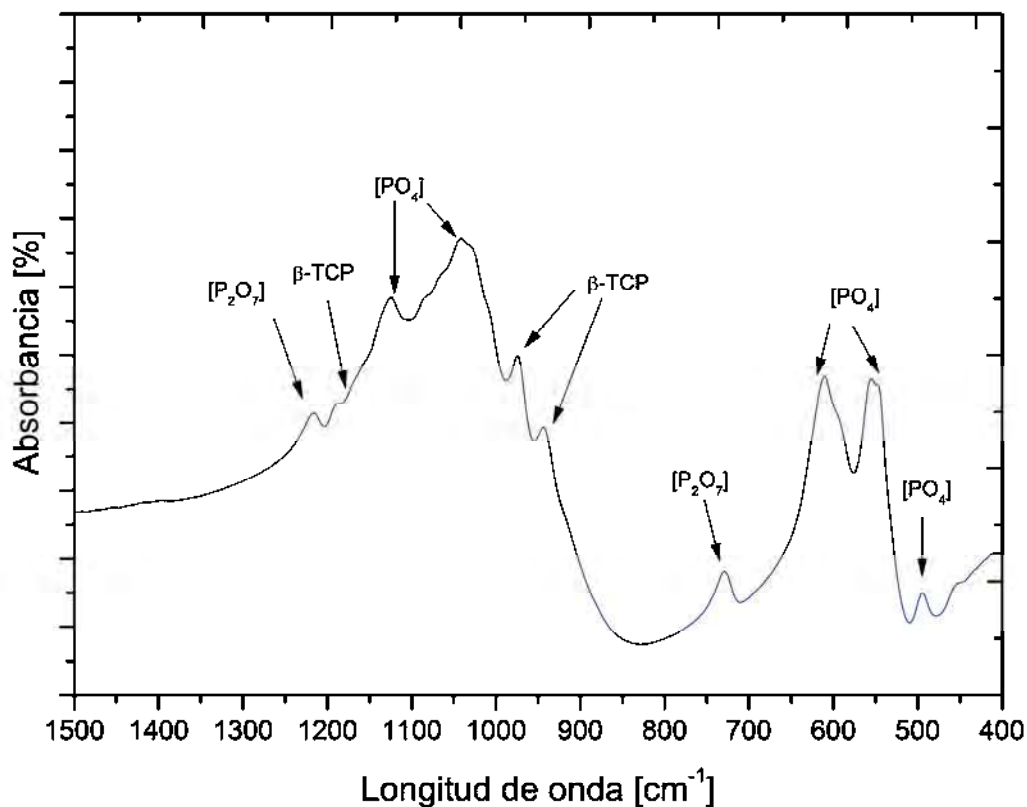


Figura 4.7 Espectro de infrarrojo del β -TCP.

Tabla 4.3 Bandas de absorción de infrarrojo del β -TCP y las temperaturas a las cuales aparecen [107]. * Son las bandas características del β -TCP.

Temperatura (° C)	Grupo químico y fases	Bandas de absorción (cm ⁻¹)
900	*PO ₄ ³⁻	947, 974 y 1120
	PO ₄ ³⁻	603 y 565
		1094 y 1032
1200	*PO ₄ ³⁻	
	PO ₄ ³⁻	601 y 571
		1090 y 1046

Po otro lado, la técnica de EDS permitió encontrar la relación atómica estequiométrica de Ca/P de forma semi-cuantitativa, corroborando la composición del polvo del β -TCP obtenido por molienda, así como el que se compró de Sigma-Aldrich en donde los valores obtenidos fueron de 1.53 el cual es un valor próximo al teórico de 1.5 (Figura 4.8).

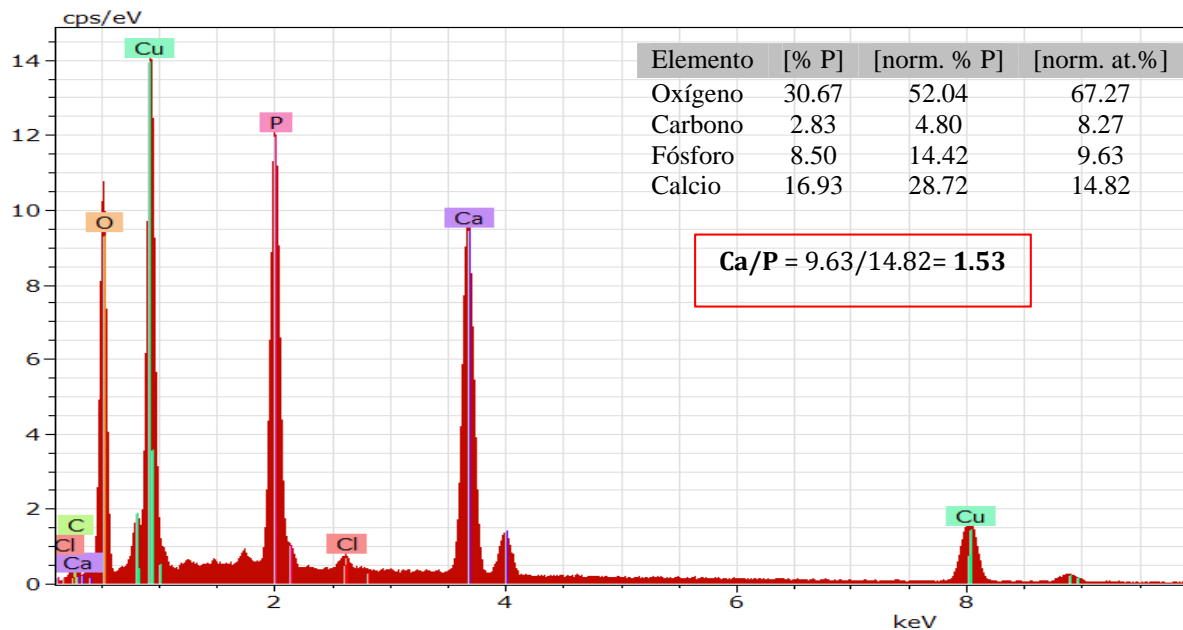


Figura 4.8 EDS muestra la relación Ca/P de 1.53 del β -TCP obtenido por molienda mecánica.

4.3 Andamios

4.3.1 Tamaño y distribución de partícula

Antes de llevar a cabo la síntesis de los andamios se realizó el análisis de tamaño y distribución de los polvos para analizar el efecto de la porosidad en las espumas.

Se han encontrado que el tamaño y la distribución de partícula afecta de forma directa al tamaño y distribución de poro de los andamios de acuerdo al tipo de proceso de fabricación (sol-gel, técnica de la réplica, partículas de sacrificio, etc.), Bocardi y col. [108] elaboraron andamios hechos de 45S5 a partir de tecnología de polvos con tamaños de partículas de 63 μm tal y como hicieron Aguilar y col. [109], ambos estudios presentaron distribuciones amplias, Bocardi presentó rangos de distribución de tamaño de poro de 100-500 μm y Aguilar y col., por otro lado presentaron rangos de 335-530 μm

Zamanian y col. [110], realizaron andamios macroporosos de HA por la técnica de colado por congelación en donde concluyeron que el procesamiento afecta a la interconectividad de la

estructura porosa además de otros parámetros como son: el tamaño de poro, forma y orientación de éstos mismos, sin embargo, pocos investigadores se han enfocado a estudiar el efecto del tamaño de partícula, así como en el proceso de nucleación y crecimiento para observar la relación que tiene con las propiedades de materiales porosos.

Las propiedades mecánicas, principalmente la resistencia a la compresión de andamios se ve fuertemente relacionado con el tamaño de partícula, es decir; a mayor tamaño de partícula la resistencia a la compresión es menor, sin embargo, la porosidad total es inversamente proporcional al tamaño de partícula, es decir a mayor tamaño de partícula menor porosidad total del material poroso y menor área superficial.

En la Figura 4.9 se puede observar la distribución de tamaño de partícula de los vidrios bioactivos en donde se ve una clara diferencia en la distribución de tamaño de partícula acumulativa. Todas las distribuciones de partícula de los vidrios presentaron que el 90 % de la población se encontraron entre 1 y 3 μm con una ligera diferencia dependiendo la cantidad de zirconia que contenían, con respecto al β -TCP presentó una distribución mayor al 90% de la población de 1.45 μm , los valores de la media se presentan en la Tabla 4.5 donde se incluye también el promedio de la distribución de la mezcla de polvos precursores de las espumas obtenidas, donde la media se encuentra en un tamaño de 18.97 μm .

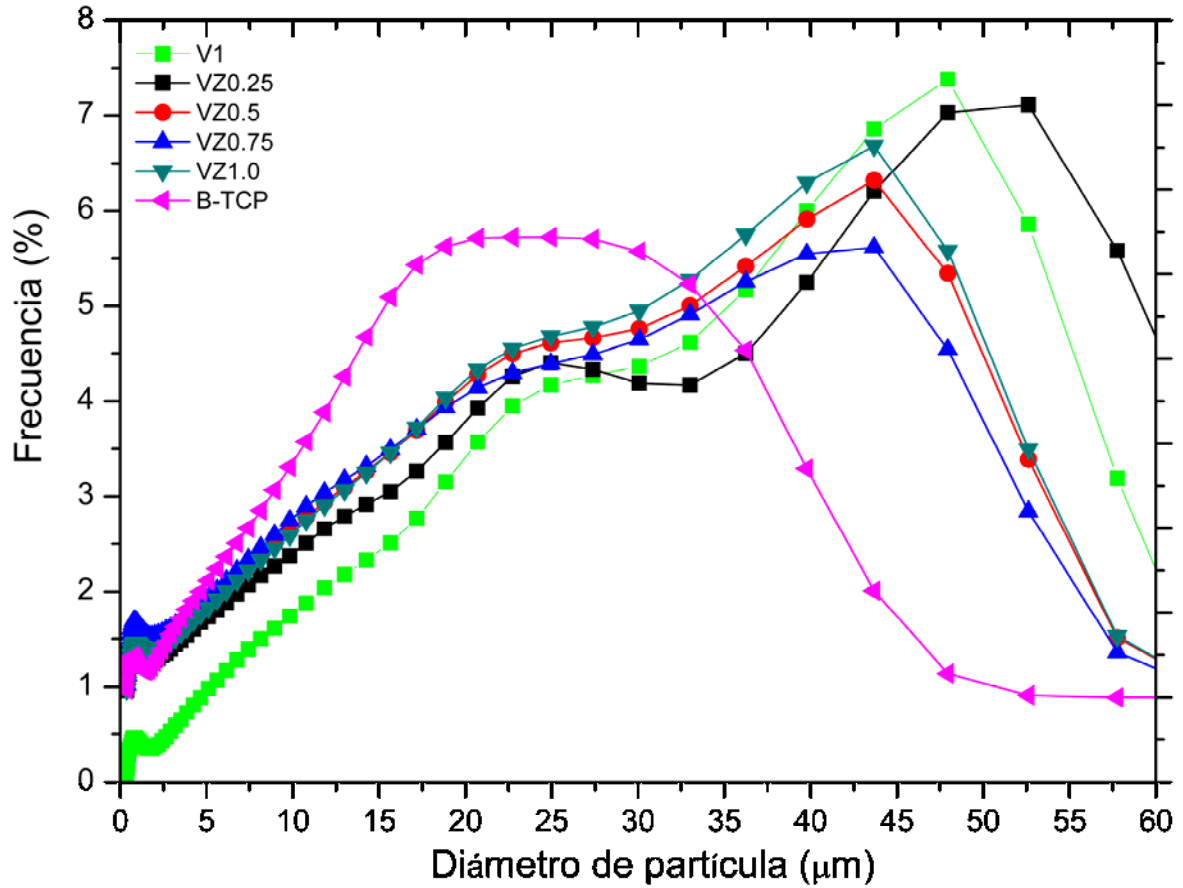


Figura 4.9 Curvas de distribución de tamaño de partícula de los polvos precursores para hacer los andamios.

Tabla 4.4 Valores obtenidos de tamaño de partícula de los polvos precursores a partir del programa Beckman Coulter.

Muestra	Media (µm)	Desviación estándar	< 10 %	< 25 %	< 50 %	< 75 %	< 90 %
β -TCP	5.485	2.25	11.90	9.53	6.72	4.29	1.45
V1	6.02	2.98	53.12	43.26	22.19	11.34	3.15
VZ0.25	19.01	3.18	56.81	46.23	26.66	11.54	3.37
VZ0.5	15.57	3.19	47.29	37.59	22.40	9.43	2.40
VZ0.75	14.41	3.34	46.95	36.54	21.10	8.29	1.88
VZ1.0	12.76	3.52	45.44	34.36	18.88	6.76	1.46
Mezcla de polvos	18.97	2.99	52.56	43.10	26.55	11.95	4.00

El análisis de distribución de tamaño de partícula incluyendo la resina fenólica y el espumante p-TSH se ve una modificación de la curva con respecto a la mezcla de todos los polvos precursores graficados individualmente (Figura. 4.9), ya que la mezcla de los polvos homogenizados tienden a cargarse en valores menores de 10 μm como se observa en la Figura 4.10, sin variación significativa con el resto de las composiciones debido a que la mezcla está formada en su mayoría por el polvo de fosfato tricálcico, lo cual hace que los valores de tamaño de partícula se vean afectados principalmente por éste.

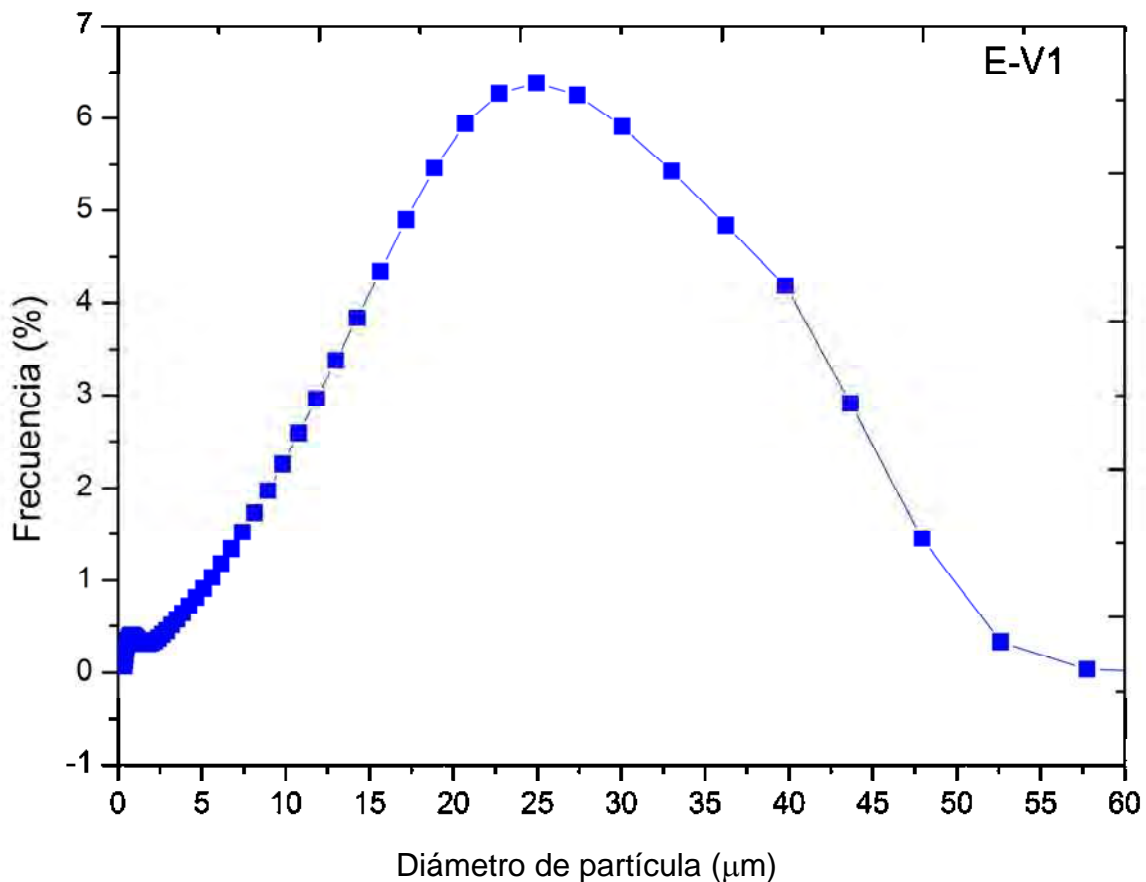


Figura 4.10 Distribución de la mezcla de polvos precursores previa a la obtención del andamio sin zirconia con la relación 80:20 % en peso de β -TCP y biovidrio, incluyendo los polvos de resina fenólica y espumante.

4.3.2 Formación de la estructura porosa interconectada

El proceso de fabricación de los andamios porosos se realizaron con el procedimiento similar al de Lefebvre [111], donde expone que la formación de andamios está constituida por la mezcla de polvos secos inorgánicos (fosfato tricálcico fase beta, biovidrio base fosfato), ligante orgánico (resina fenólica) y un agente espumante (p-sulfonil hidrazida).

La función de la resina fenólica es el de ayudar a la reticulación después de la etapa de formación de espuma y mejorar la resistencia mecánica de la estructura, donde ayudó a unir los diferentes constituyentes de la mezcla de tal manera que el producto final fue menos propenso a que se segregara o al fragmentara. El agente espumante se eliminó por evaporación a una temperatura de 110 °C.

La estructura de espuma resultante depende del tamaño de partícula, forma, densidad y contenido de los polvos precursores, además del contenido, la distribución y la viscosidad del ligante, así como del contenido, distribución y vaporización del agente espumante, aspectos que modifican la porosidad y la estructura final del andamio.

Después de la formación de la espuma y la reticulación se pirolizó el ligante sin deteriorar la estructura tridimensional de la espuma a una temperatura de 500 °C.

Por otro lado, la sinterización se realizó a 980 °C después de la etapa de eliminación del ligante para crear enlaces entre partículas y proporcionar las propiedades físicas y mecánicas en la espuma. Lefebvre encontró que poros grandes se creaban por la formación de celdas debido a la coalescencia durante el espumado, la porosidad intermedia fue resultado de los huecos formados en las paredes celulares durante la formación de espuma y a la descomposición del ligante, finalmente la microporosidad producto del espacio dejado entre partículas finas. A tamaño de partículas finas y bajo contenido de aglomerante se produce una sinterización alta proporcionando una mayor resistencia mecánica al andamio.

4.3.3 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM)

El cambio microestructural obtenido a través de las tres etapas de procesamiento de los andamios correspondiente a la composición de las espumas E-V1, se presenta en la Figura 4.11 inmediatamente después del espumado, (a) en donde se puede observar el característico color café de la resina fenólica, así como la distribución adecuada de las partículas del β -TCP y el vidrio seguido por (b) maquinado de las muestras ya que el contenido de resina le confirió una mayor resistencia a la estructura debido a la unión entre las partículas, de esta manera permitió manipular mejor la muestra para después llevarla a la eliminación de exceso de resina, dejando la estructura con poros expuestos y finalmente, (c) la resina fue pirolizada y sinterizada dándole al andamio las propiedades mecánicas de resistencia para su posterior manejo.

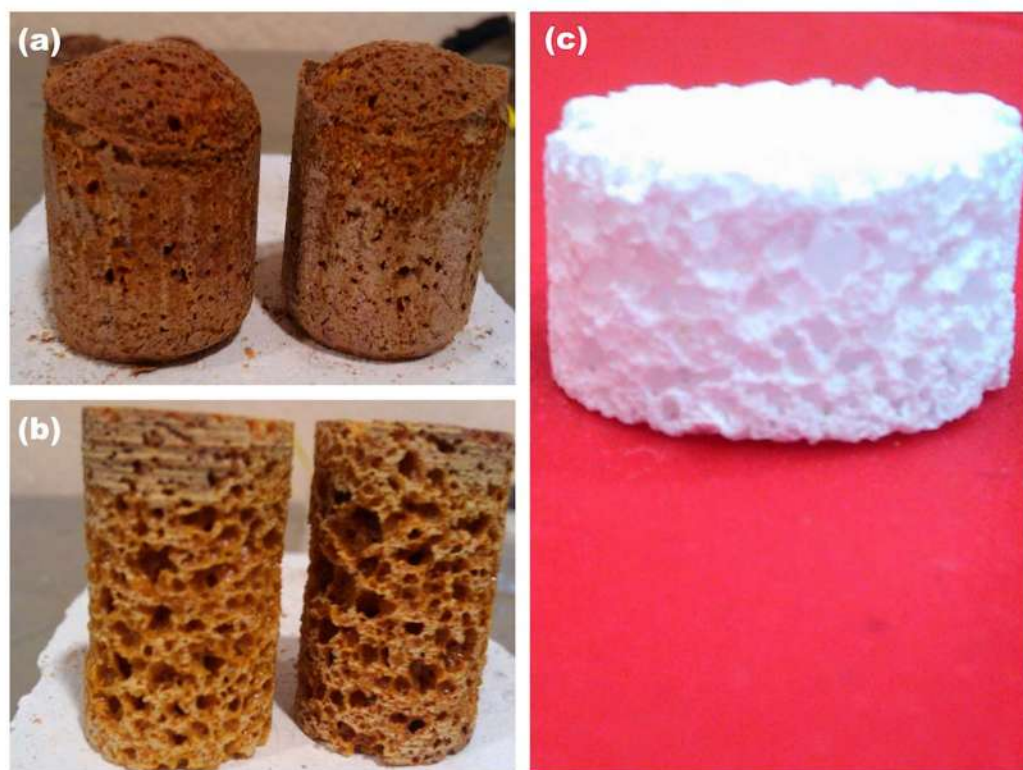


Figura 4.11 Etapas de la fabricación de las espumas (composición E-V1) (a) espumado, (b) maquinado y (c) pirólisis y sinterización.

La estructura porosa obtenida se relaciona con la cantidad de agente espumante adicionado a los andamios tal y como se puede observar en la Figura 4.12, lo que causó cambio en los parámetros

de porosidad interconectada, distribución de tamaño de poro y por lo tanto cambio en el espesor de las paredes de poro. Con la adición de cantidades menores de 2.5 % en peso (Figura 4.12 (a), (b), (c) y (d)) las estructuras obtenidas fueron carentes de porosidad interconectada debido a que no se produce la cantidad suficiente de gas que forme burbujas y permita formación de canales interconectados; sin embargo, los andamios con cantidades de 2.5 y 3.0 % en peso (Figura 4.12 (e) y (f)) presentaron porosidad interconectada, distribución de tamaño de poro amplia, además de un mayor espesor en las paredes de poro, esto se produjo debido a que la cantidad de gas que se genera al descomponerse el agente espumante es mayor al incrementar la cantidad del mismo, debido a que la descomposición del agente espumante (p-TSH) es de tipo exotérmico, esto hace que se descomponga a una temperatura entre 110 a 140 ° C formando dos tipos gases que son el H₂O y N₂, con un rendimiento de 120 a 140 ml/g.

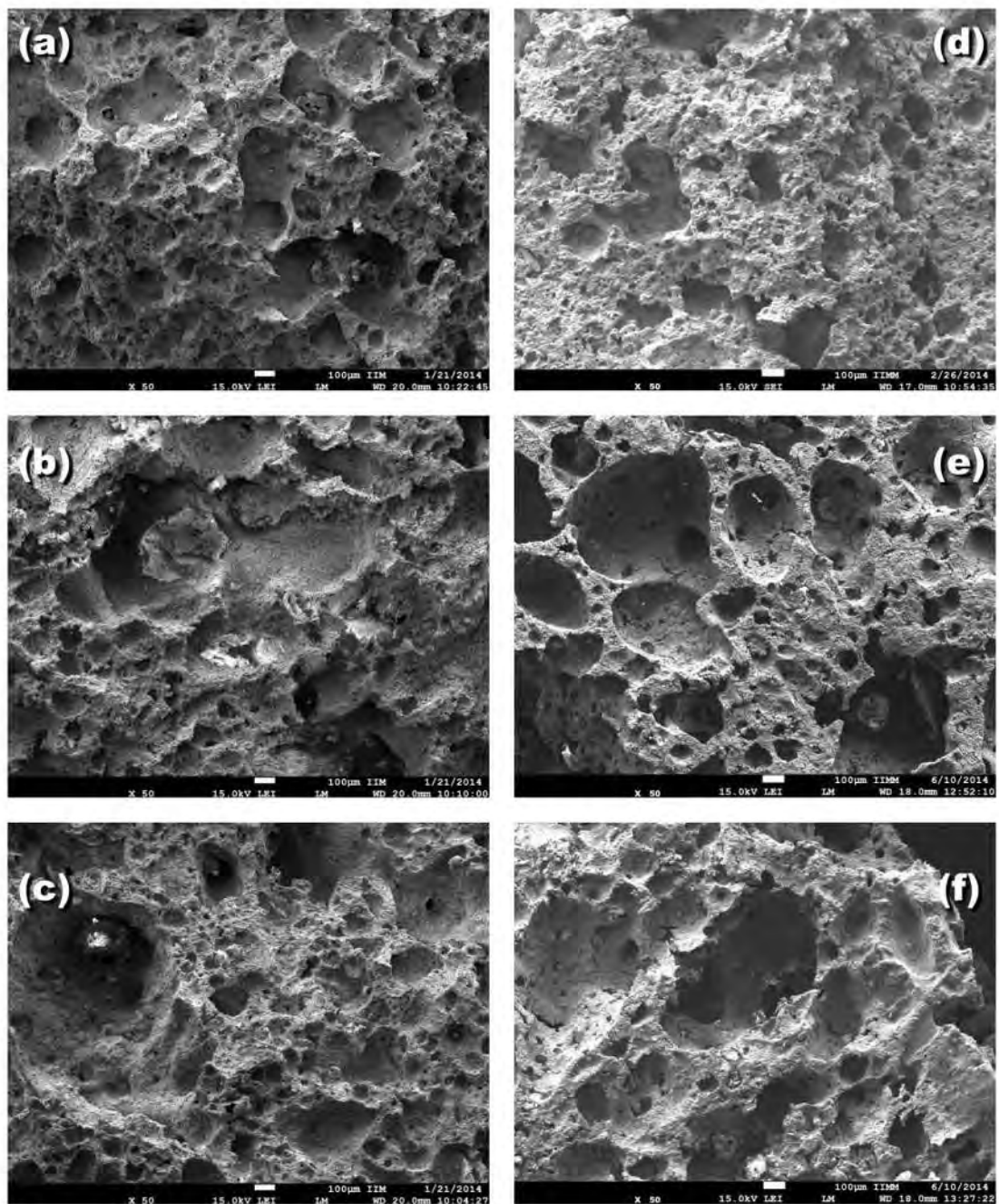


Figura 4.12 Imágenes de FE-SEM donde se muestra la variación de morfología del andamio E-V1 en función del contenido de agente espumante: (a) 0.5, (b) 1.0, (c) 1.5, (d) 2.0, (e) 2.5 y (f) 3.0 % peso.

Yu y col. [112], encontraron que si el agente espumante es calentado arriba de la temperatura de descomposición, el gas se libera en forma de burbujas que forman una capa gaseosa con una tensión superficial mayor, lo que permite que exista una mejor adhesión entre partículas de la superficie y se forme los poros y por lo tanto, la estructura porosa. Por otro, lado White y col. [113] afirmaron

que el espumante no sólo ayuda a la estructura (porosidad, distribución de tamaño de poro e interconectividad) sino que durante el proceso de mojado de las partículas, se observó que el polímero absorbe el agente espumante (CO_2) como una función de la temperatura, presión y tiempo que lo vuelve con una estructura plastificada y en esta etapa empieza la nucleación de burbujas que es inducida por la energía de activación generando núcleos estables.

En las composiciones de 2.5 y 3.0 % en peso no hubo una variación significativa de los parámetros de porosidad interconectada, distribución de tamaño de poro y % en volumen de porosidad, por lo tanto se seleccionó 2.5 % en peso para llevar a cabo la formación de las espumas.

La Figura 4.13 muestra el efecto de la adición de biovidrio dopado con zirconia en los andamios ya sinterizados, es importante resaltar que los andamios con vidrio base fosfato en su estructura presentan una mejor sinterización tal y como se muestra en las Figuras 4.13 (a) y (b).

Rajkumar y col. [7], encontraron que los iones metálicos (Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ti^{4+} and Zr^{4+}) son usados para reforzar sistemas de vidrios, los cuales juegan un rol importante en la estabilidad química de los mismos, debido a que los iones metálicos con radios pequeños como es el caso de zirconio que presenta un radio de 1.6 \AA y una alta carga eléctrica contribuyen a la formación de enlaces fuertes tipo $P - O - M$. La cohesión entre las partículas del β -TCP y el reblandecimiento de la red del biovidrio ayudó a reforzar la red del biovidrio mediante la formación de enlaces de tipo $P - O - P$, los cuales permitieron que se reforzara la estructura del vidrio formando enlaces entrecruzados entre los NBOs (sin unión entre oxígenos) permitiendo una mayor unión entre partículas. Por otro lado, Cai y col. [114] investigaron andamios hechos de β -TCP reforzados con biovidrio, donde comprobaron que el vidrio base fosfato se reblandece introduciéndose en la matriz del fosfato tricálcico y además como resultado de la cristalización del mismo hace que aumenten la resistencia en los bordes de grano debido a la reacción entre el β -TCP y el vidrio base fosfato mejorando las propiedades de resistencia a la compresión.

En el presente estudio se prepararon espumas de fosfato tricálcico sin vidrio base fosfato en donde se observó una pobre unión inter-partícula después de la sinterización, haciéndolo imposible la manipulación de la misma (Figura 4.13 (c) y (d)).

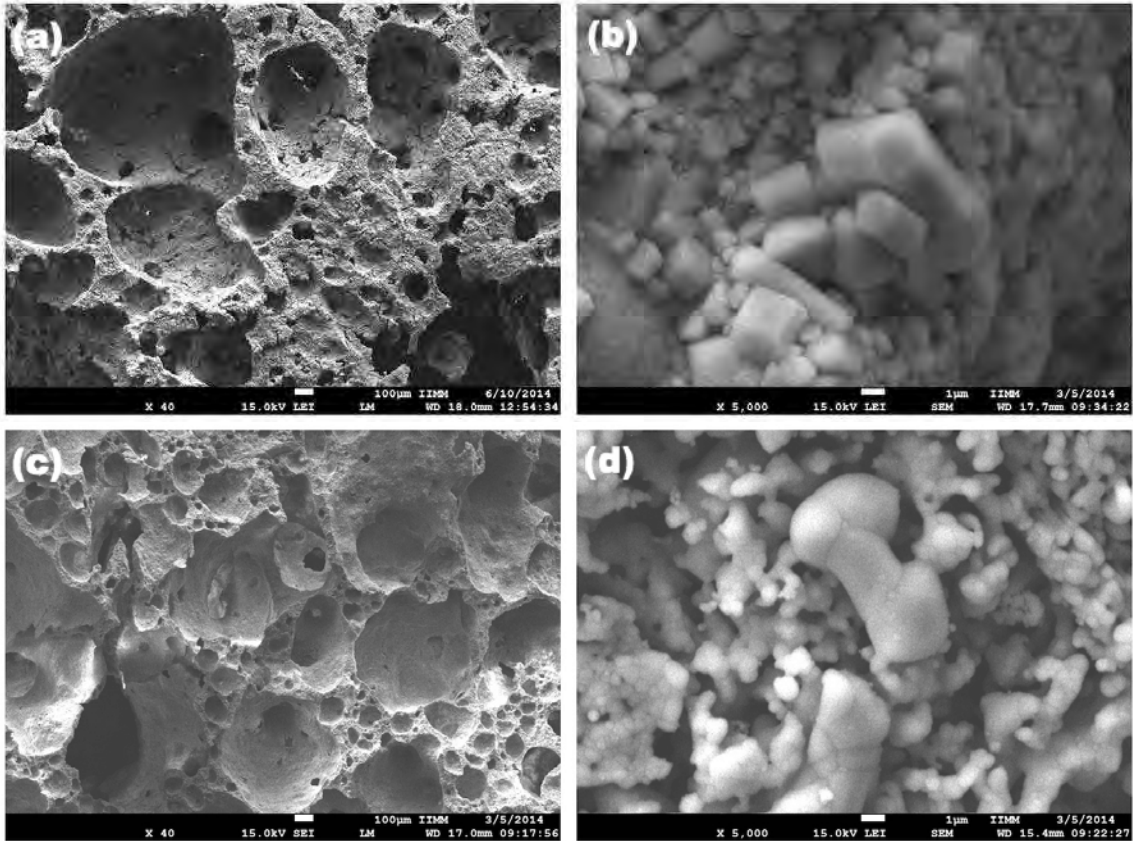


Figura 4. 13 Micrografías de FE-SEM de los andamios del β -TCP con vidrio base fosfato y reforzados con 0.25 % mol de zirconia (a) y (b); andamios de β -TCP con vidrio sin el refuerzo de la zirconia (c) y (d).

4.3.4 Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de DRX de las espumas de β -TCP/biovidrio sin dopar y dopadas con zirconia en diferentes cantidades se observan en la Figura 4.14 y la Tabla 4.5 donde se pueden notar las fases predominantes identificadas. Todas las composiciones exhibieron tres fases consistentes $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ y $\text{Na}_3(\text{PO}_4)$, sin embargo, para las espumas dopadas con zirconia presentaron dos fases nuevas $\text{Ca}(\text{ZrO}_3)$ y ZrP_2O_7 , resultado de la sustitución del zirconio en la estructura del fosfato tricálcico y del vidrio base fosfato, las fases encontradas en la presente investigación también se reportan en otros trabajos que contenían vidrio base fosfato [7,115].

Rajkumar y col. [7], estudiaron el efecto de la zirconia en la estructura interna del vidrio base fosfato después de SBF en donde reportaron que la zirconia provocó un comportamiento anómalo en la red de la estructura del vidrio, es decir, a cantidades menores de 0.5 % mol de zirconia

disminuyó la densidad pero a partir de 0.5 y 1.0 mol % de zirconia incrementó, por lo tanto, hay una relación inversa entre el contenido de zirconia y el volumen molar; ya que al aumentar la densidad disminuye el volumen debido a los cambios de polaridad de los átomos y que la red del vidrio es más compacta. Para entender mejor este proceso, se enlistan los pasos a continuación: el primero, es el rompimiento de enlaces de fosfatos $P - O - P$ en la red de formación del vidrio para después formar enlaces de oxígeno, luego entonces los iones de Zr^{4+} que ya se encuentran conectados con los tetraedros de PO_4 por medio de oxígenos sin puente o conocidos como NBOs, hace que exista una elongación en los enlaces $P = O$ y $P - O - P$, cuando el contenido de zirconia se encuentra en cantidades menores a 0.5 % mol en la red del vidrio da como resultado la creación de enlaces iónicos entrecruzados entre los NBOs y las cadenas, reforzando la estructura del vidrio y reforzando el sistema de vidrio con mayor fuerza y formando enlaces de tipo $P - O - M$.

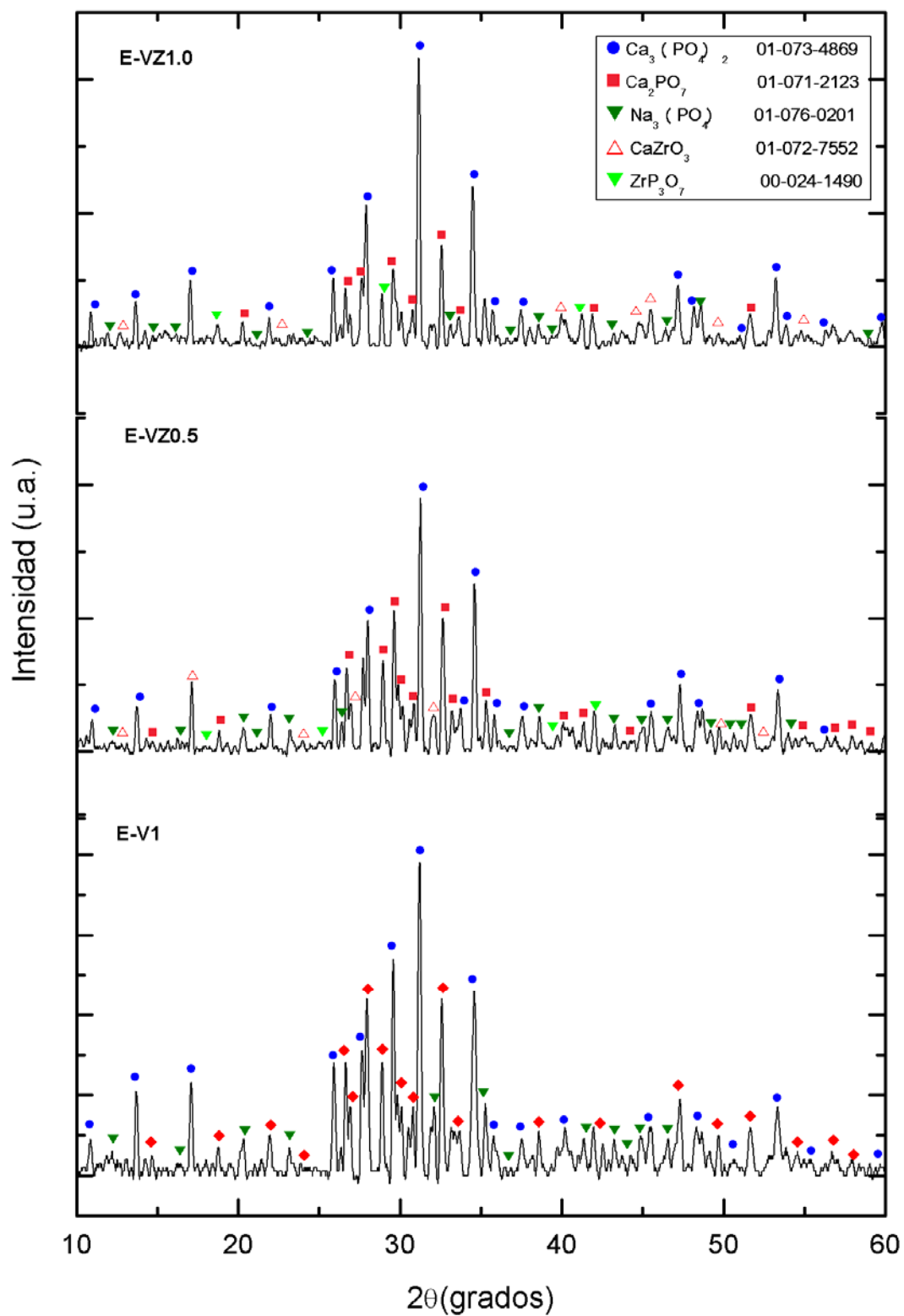


Figura 4.14 Patrones de DRX de las espumas de β -TCP/biovidrio sin dopar (E-V1) y dopados con zirconia en cantidades de 0.5 y 1.0 (E-VZ0.5 y E-VZ1.0).

Tabla 4.5 Principales fases encontradas en las espumas E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-

VZ1.0						
V1	VZ0.25	VZ0.5	VZ0.75	VZ1.0	Fase cristalina	JCPS #
✓	✓	✓	✓	✓	Ca ₂ P ₂ O ₇	01-071-2123
✓	✓	✓	✓	✓	Ca ₃ (PO ₄) ₂	01-073-4869
✓	✓	✓	✓	✓	Na ₃ PO ₄	01-076-0201
	✓	✓	✓	✓	Ca(ZrO ₃)	01-072-7552
	✓	✓	✓	✓	ZrP ₂ O ₇	00-024-1490

4.3.5 FT-IR

Los espectros de infrarrojo de las espumas reforzadas con vidrio con y sin zirconia se presentan en la Fig. 4.15. Los grupos funcionales observados durante el análisis de infrarrojo fueron los grupos orto principalmente PO₄³⁻, que son característicos de los fosfatos de calcio, en especial del fosfato tricálcico que se encuentran en un rango de 400 a 4000 cm⁻¹.

Todas las muestras presentaron vibraciones de 1215 hasta 594 cm⁻¹ que corresponden a los grupos orto (PO₄³⁻) y piro (P₂O₇⁴⁻), sin embargo, los grupos característicos que corresponden al tipo ν₃ se observaron en los rangos de 1130 a 1080 cm⁻¹, en cambio para ν₁ se presenciaron dos longitudes de onda que fue 974 y 560 cm⁻¹, los pirofosfatos que se observaron a 1215 y 726 cm⁻¹, cada grupo vibracional es característicos de los fosfatos de calcio que corresponden a los resultados observados en los patrones de difracción de rayos X. En la Figura 4.15 muestra las principales diferencias representadas por regiones sombreadas entre las espumas dopadas con y sin zirconia.

En la primera zona marcada en el rango de 500 a 600 cm⁻¹ muestra la formación del pico característico de la ZrO₂, localizado a una longitud de onda de 594 cm⁻¹, a mayor intensidad del pico mayor cantidad de zirconia en el andamio; una variación interesante se observó en la región marcada entre 800 y 700 cm⁻¹, donde se observa una mayor intensidad a una longitud de onda de 756 cm⁻¹, que corresponde al grupo de los fosfatos de tipo ν₁ (PO₄), que interactuaron en la formación de NBOs enlazados con el Zr⁴⁺ creando enlaces de tipo P-O-M, se observó además la

formación de NBOs en los grupos de fosfatos de tipo v_3 (PO_4) debido a la ruptura de enlaces de tipo P-O-P en la red de los fosfatos y la formación de nuevos enlaces entre el zirconio, generando terminales de oxígenos sin puente en el rango entre 1000 y 1100 cm^{-1} a una longitud de onda de 1081 cm^{-1} donde tiende a incrementar el pico con el contenido de zirconia.

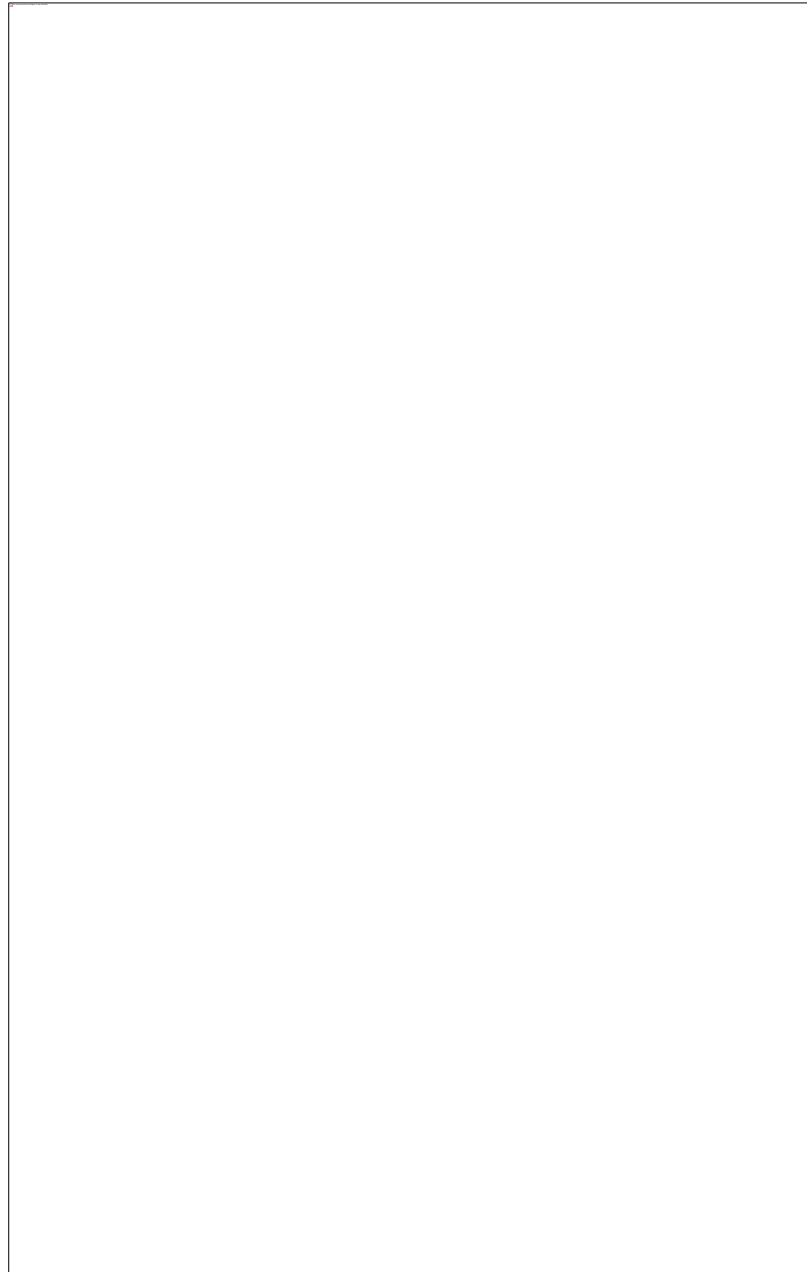


Figura 4.15 Espectro de FTIR que muestra los principales grupos funcionales de los andamios E-V1, E-E-VZ0.5 y E-VZ1.0.

Tabla 4.6 FT-IR donde se observa los principales grupos funcionales de las espumas [116–120].

E-V1			
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo
3422	OH ⁻	720	P-O-P tensión simétrica
1215	P ₂ O ₇ ⁻⁴	609	v ₄ (PO ₄ ³⁻)
1100	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	560	v ₄ (P-O) flexión
1081	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	450	(O-P-O)
1032	v ₃ (PO ₄ ³⁻)		
974	v ₁ (P-O-P) tensión		
E-VZ0.25, E-Z0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0			
Longitud de onda(cm ⁻¹)	Grupo	Longitud de onda (cm ⁻¹)	Grupo
3422	OH ⁻	720	P-O-P tensión simétrica
3200	OH ⁻	609	v ₄ (PO ₄ ³⁻) flexión
1215	P ₂ O ₇ ⁻⁴	594	v ₄ (PO ₄ ³⁻) flexión
1100	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	560	v ₄ (P-O) flexión
1081	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	492	(O-P-O)
1032	v ₃ (PO ₄ ³⁻)	452	(O-P-O)
974	v ₁ (P-O-P) tensión		

4.3.6 Resistencia a la compresión

En la literatura se encuentran condiciones muy variadas en cuanto al ensayo de resistencia a la compresión, ya que no hay una norma que indique como se debe realizar el procedimiento del ensayo de resistencia a la compresión en materiales cerámicos porosos. Se realizó para esta investigación un ensayo por triplicado en los andamios tanto en forma de pastillas (Figura 4.16 (a)) como en forma de cilindros (Figura 4.16 (b)) aunque en los resultados obtenidos en relación con forma geométrica de las probetas no se observaron diferencias significativas.

Los métodos convencionales usados en la medición de las propiedades de resistencia a la compresión de las espumas presentan grandes dificultades debido a la porosidad de las probetas, ya que al momento de fijar las piezas con las mordazas pueden causar que la muestra se fracture (Figura 4.16 (a)), se observó que en las espumas con zirconia presentaron una grieta interna en la que hubo corrimiento de la misma hacia el exterior y esto pudo ser la causa de la falla total de la espuma (Figura 4.16 (b) y (c)) en cambio las espumas sin zirconia, las muestras se pulverizaron casi en su totalidad (Figura 4.16 (c)), por otro lado se pudo observar el comportamiento de las espumas con ambas geometrías presentaron fracturas internas en algunas con longitudes mayores que llevó al fallo de las mismas (Figura 4.16 (d)).

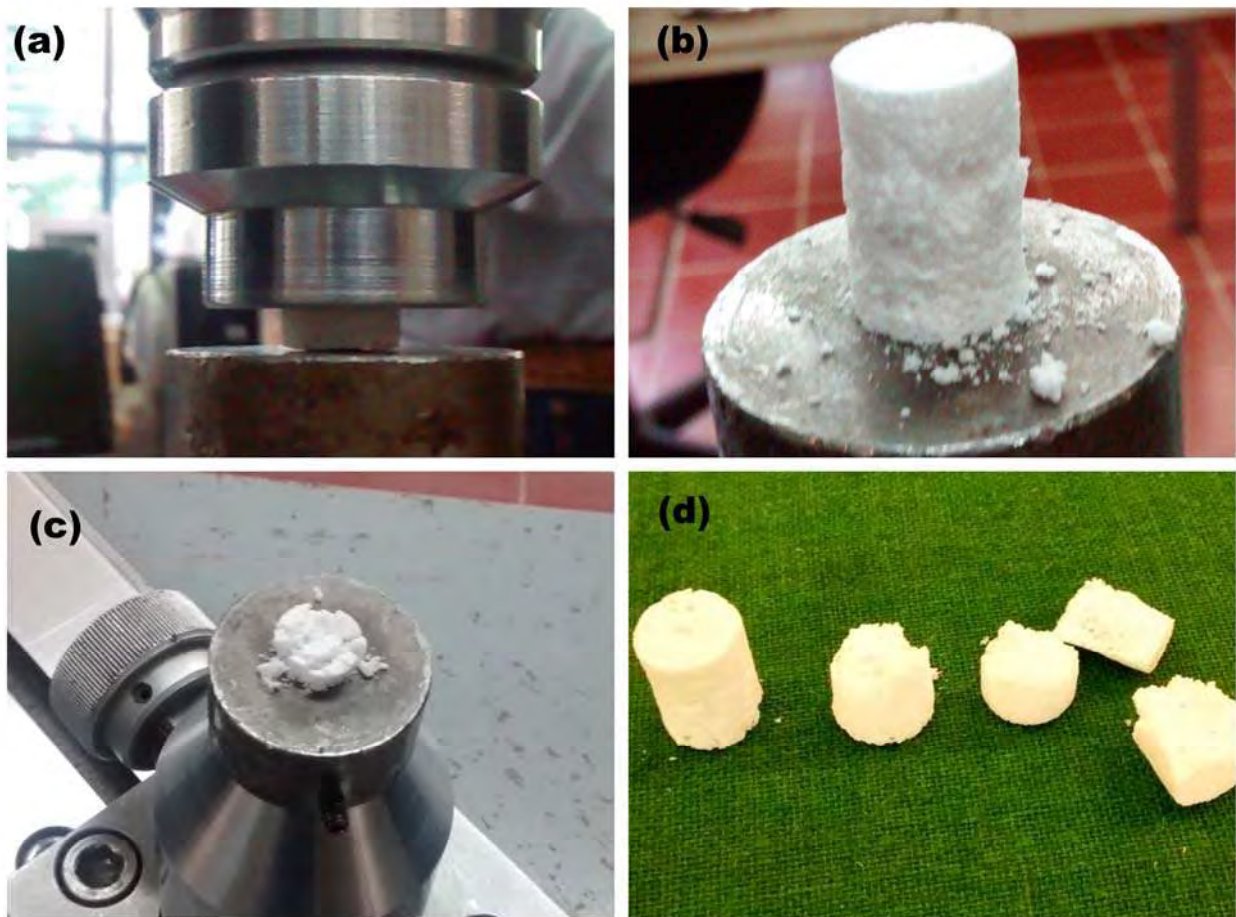


Figura 4.16 Prueba de resistencia a la compresión en los andamios (a) Forma de pastilla, (b) E-VZ1.0, (c) E-V1 y (d) espumas dopadas con zirconia.

Tabla 4.7 Valores de porosidad y resistencia a la compresión de los andamios de β-TCP y vidrio base fosfato, comparados con los valores de los huesos trabecular y cortical.				
Muestra	Porosidad (%)	Resistencia a la compresión (MPa)	Módulo elástico (MPa)	Referencias
E-V1	50 \pm 0.33	1.0 \pm 0.02	357 \pm 0.32	
E-VZ0.25	47 \pm 0.23	0.9 \pm 0.53	610 \pm 0.42	
E-VZ0.50	51 \pm 0.42	0.6 \pm 0.43	574 \pm 0.83	
E-VZ0.75	48 \pm 0.54	0.9 \pm 0.44	600 \pm 0.01	
E-VZ1.0	53 \pm 0.43	0.9 \pm 0.54	434 \pm 0.42	
Cortical	7- 31	100 - 230	7 – 30	[121,122]
Trabecular	30 - 90	2 -12	0-5 – 0.05 (GPa)	[121,123]

Los valores presentados de resistencia a la compresión variaron desde 0.6 hasta 1.0 MPa y el módulo de Young fue encontrado en el rango que va desde 357 a 610 MPa, tales valores se aproximan al del hueso trabecular humano (2-12 MPa y 0.5-0.05 GPa, respectivamente) los cuales se mostraron previamente en la Tabla 4.7, tales valores pueden variar dependiendo la complejidad de la persona, la arquitectura del tejido óseo, edad, estado nutricional, actividad física y en su caso de la enfermedad que presente el individuo [124].

El porcentaje en la porosidad en los andamios se observó que presentaron una variación relativamente pequeña, la cual se encontró en el rango de 47 al 53% sin una clara tendencia en relación a la composición química, debido a que el tamaño de los polvos precursores principalmente el β -TCP, ya que al ser la matriz es el precursor que influye más con respecto a la formación de la porosidad, sin dejar de lado, que el espumante juega un rol crucial en la formación de poros.

Por otro lado, el resto de los precursores ayudaron a la formación de poros con diversos diámetros debido a que la mezcla de las espumas presentaron un tamaño de partícula amplio tal y como se presentaron en las Figuras 4.9 y 4.10.

Tabla 4.8 resume los valores encontrados en la literatura de materiales cerámicos porosos, en donde se puede distinguir la estructura morfológica de los precursores empleados y como influyeron en las propiedades finales de los andamios, se puede observar la resistencia a la compresión y la porosidad presentada, donde se indica claramente que las morfologías fibrosas tienden a reforzar los andamios sin sacrificar la porosidad del andamio; ya que cuando se emplean con precursores en forma de polvos, el andamio presenta mayor porosidad y la resistencia a la compresión es menor.

Tabla 4.8 Estado del arte de las propiedades mecánicas y los valores obtenidos de los materiales porosos. Altura = A, diámetro= D, L= lado, Espesor =E.

Velocidad (mm/min)	Material	Estructura inicial	Porosidad (%)	Resistencia a la compresión (MPa)	Geometría	Dimensiones (mm)	Referencia
0.4	TCP/HA	Nanofibras	73	98	Cilindro	A = 2 D = 1	[125]
10	HA/TCP	Dendritas (bulto)	44	2.3-36	Cilindro	A = 15 D = 10	[126]
0.5	HA/TCP	Dendritas (bulto)	87	0.06-2	Cubo	L = 10	[127]
0.5	HA/TCP	Polvos	90	0.1	Cilindro	A = 20 D = 10	[128]
0.5	45S5	Polvos	90	0.3-0.5	Rectángulo	A = 10 L = 5	[129]
0.5	45S5	Polvos	87	2.19	Cilindro	A = 20 D = 10	[130]
1	45S5	Polvos	5-86	130-2.8	Cilindro	A = 10 D = 5	[131]
0.5	BG	Impresión en tinta	60	136	Cubo	L = 3	[132]
0.5	BG	Dendritas (bulto)	50	10	Pastilla	E = 1.5 D = 4.5	[133]
0.5	BG	Dendritas (bulto)	47	1-10	Cubo	L = 6	[134]
0.01	45S5	Polvos	84	0.4-0.1	Cilindro	A = 10 D = 10	[135]
-----	β -TCP	Polvos	64	5	-	-	[136,137]

4.3.7 Micro-CT

La técnica de micro-CT provee un análisis no destructivo de la estructura interna de los andamios, además permite obtener la porosidad total, distribución de tamaño de poro y morfología del tamaño de poro en aplicaciones para ingeniería de tejido (Figura 4.17).

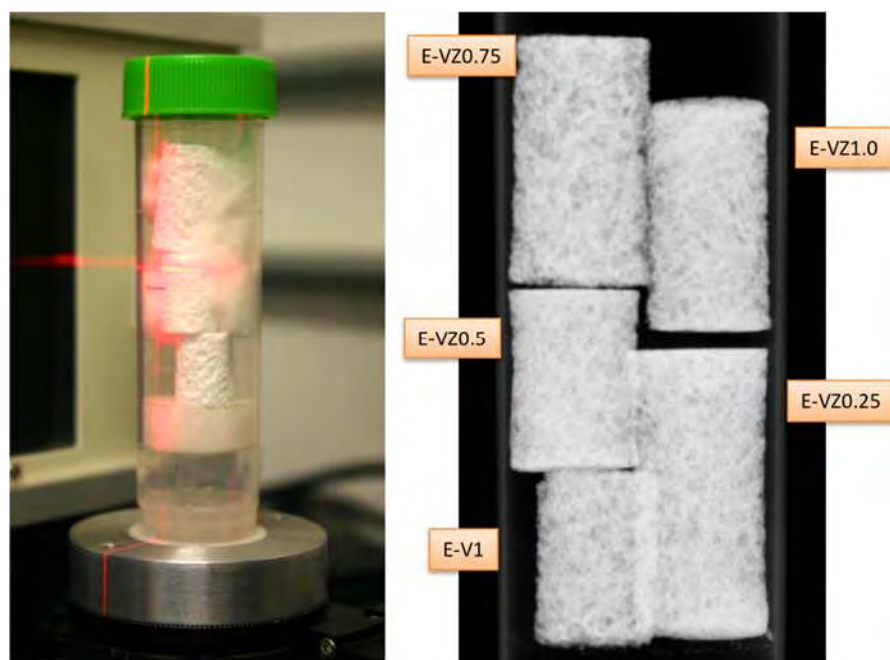


Figura 4.17 Distribución de las espumas de fosfato tricálcico y vidrio base fosfato en el equipo de microtomografía de rayos X.

En el presente estudio se realizaron filtros para el análisis de distribución de tamaño de poro en los andamios, debido a que el filtro hace un mejor procesamiento de imágenes, además de obtener valores más precisos, para ello se hizo uso del programa del *ImageJ*, el cual permitió cuantificar los poros mediante el uso del diámetro de Feret, tomando la distancia promedio entre dos tangentes paralelas respecto al perímetro proyectado de la partícula (Figuras 4.18 y 4.19) [138].

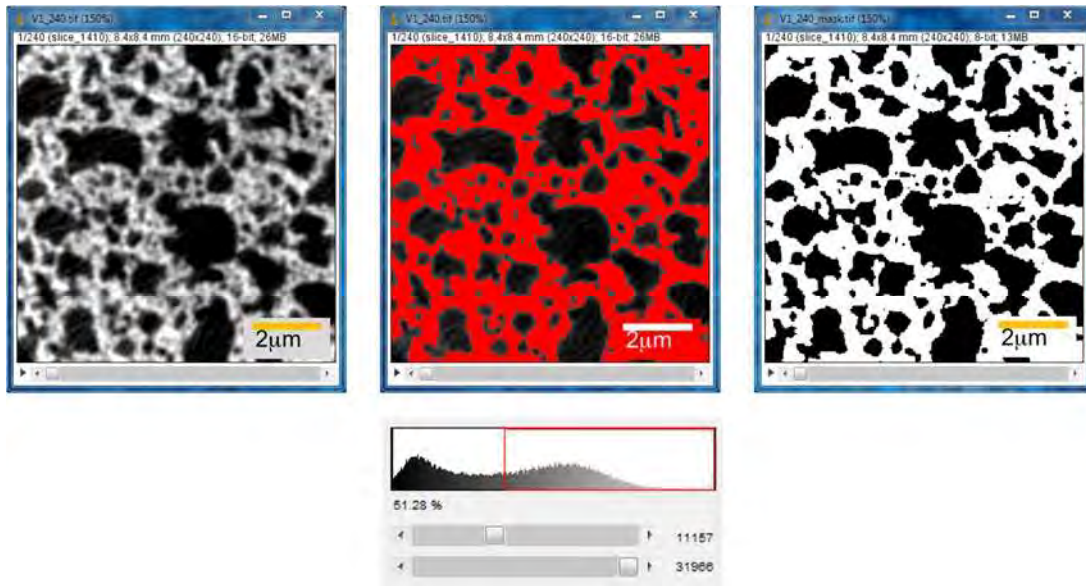


Figura 4.18 Muestra E-VZ1.0 los filtros que se usaron para analizar segmento por segmento cada una de las espumas.

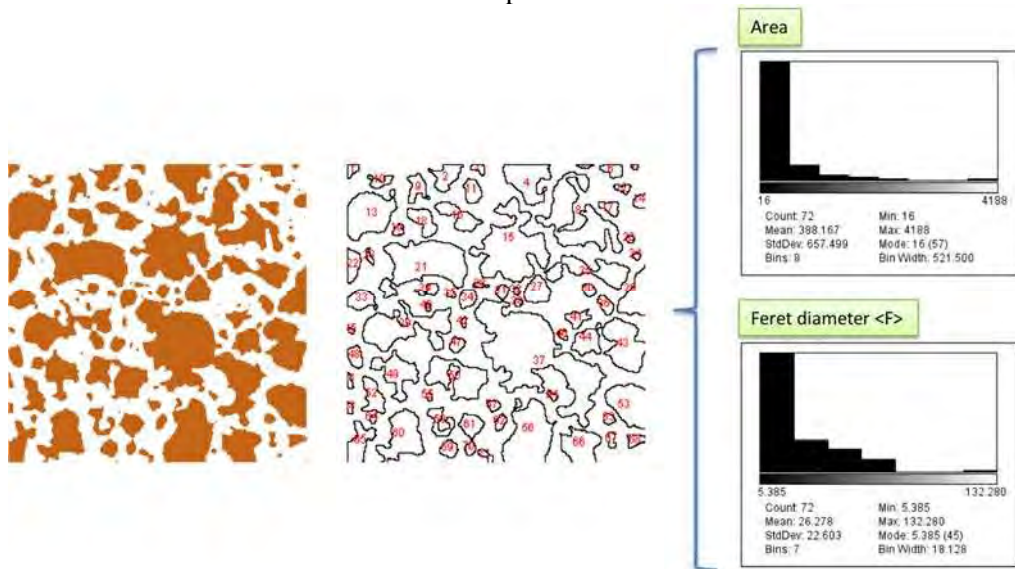


Figura 4.19 Relleno de poros y aplicación del diámetro de Feret para hacer el cálculo de tamaño de poro.

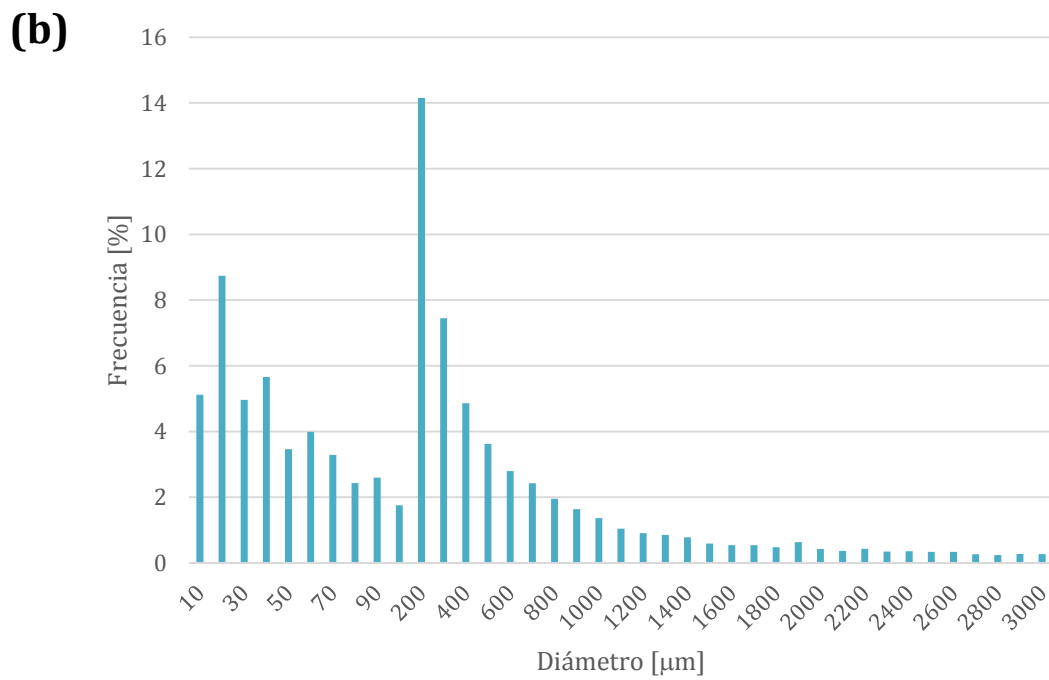
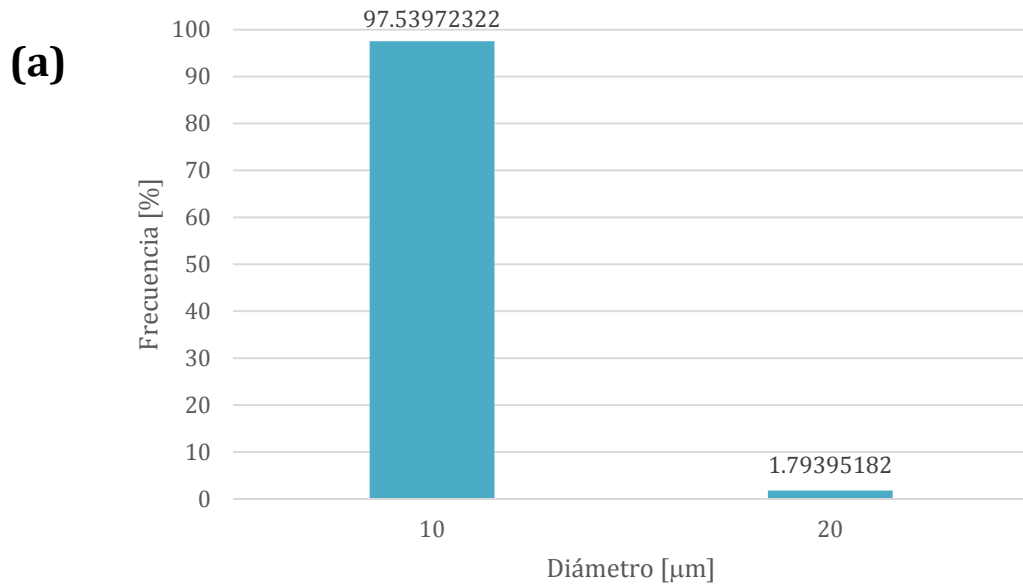
La caracterización estructural en microtomografía no se realiza como una tecnología convencional de análisis para la medición de porosidad como se lleva a cabo en la parte experimental, ya que el proceso de la microtomografía es más preciso sin dañar la muestra.

Cancedda y col. [139] así como Martínez [140], estudiaron el efecto de tamaño de poro en andamios para ingeniería de tejido por medio de micro-CT de rayos X, en donde concluyeron que los resultados de esta técnica no solamente permite obtener imágenes en 3D de calidad muy alta, sino que se obtienen una variedad de datos cualitativos relacionados con la cinética de formación del nuevo hueso y el remplazo del andamio reabsorbible, ya que permite hacer modelos en 3D sin necesidad de dañar la muestra, calcular distribución de tamaño de poro, porosidad interconectada y por supuesto la morfología que presentan los poros, aspectos importantes para una adecuada regeneración ósea.

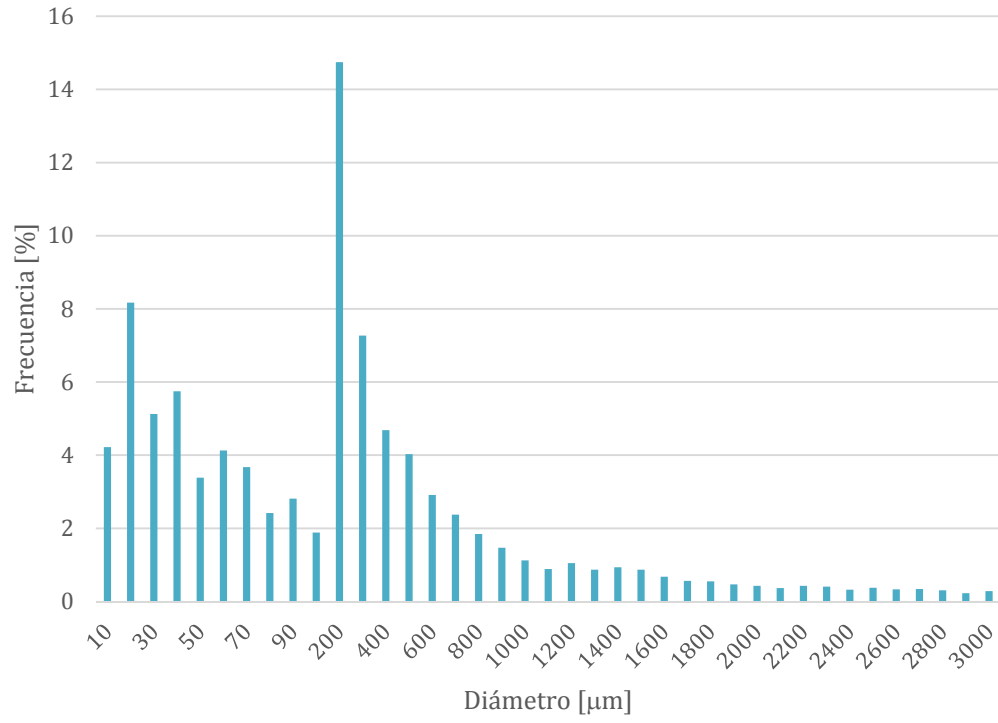
La distribución de tamaño de poro en los andamios sin zirconia se encontraron en un rango de 0.05 a 9.1 μm y para los que contenían vidrio dopado con ZrO_2 fue de 1.41 hasta 3000 μm (Figura 4.20), sin embargo, la mayoría de la población para los andamios dopados con zirconia se encuentran a 200 μm .

Algunos investigadores encontraron resultados similares, por ejemplo Jones y Hench [141] presentaron la definición de un andamio ideal, el cual debe tener una porosidad macroporosa interconectada como el principal criterio y el más importante, en donde además debería presentar un tamaño de poro con diámetro mayor a 100 μm , ya que ese tamaño en específico permitiría la penetración celular, crecimiento y vascularización del tejido así como la liberación de nutrientes al centro del tejido que se está regenerando. Por otro lado, Lo Re y col. [142] presentaron que las propiedades de regeneración dependen directamente de la relación entre el volumen vacío, volumen total y por supuesto de la distribución de tamaño de poro; además este último aspecto lo diferenciaron en dos clases de porosidad: microporos con diámetro menores a 20 μm , que se encargarán de ayudar a la entrega de nutrientes y metabolitos y los macroporos con diámetro mayores que 100 μm , necesarios para la proliferación celular y vascularización. Renghini y col. [143] descubrieron que para andamios 3D, la geometría interna y la arquitectura son aspectos necesarios para la regeneración hueso humano, pero sin dejar de lado las propiedades mecánicas con la finalidad de mantener el espacio del tejido y la forma del andamio para que se lleve a cabo una buena remodelación, por consecuente una porosidad en volumen mayor a 50%, es necesario. La naturaleza de un biomaterial usado para la elaboración de andamios, en el proceso de fabricación y los materiales usados son aspectos que pueden modificar la microestructura del andamio. Mitton

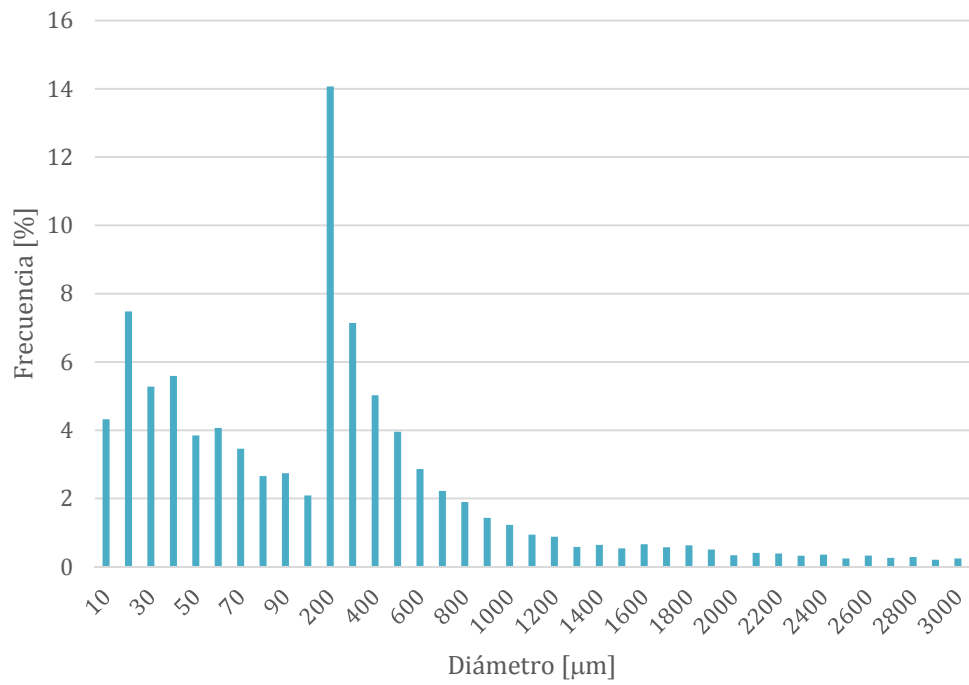
y col. [144] encontraron que la estructura jerárquica del hueso incluye varios tamaños en el caso del hueso trabecular en donde los tamaños de poro mayores permiten una reabsorción en las cavidades de canales Harvesianos (100-300 μm en diámetro).



(c)



(d)



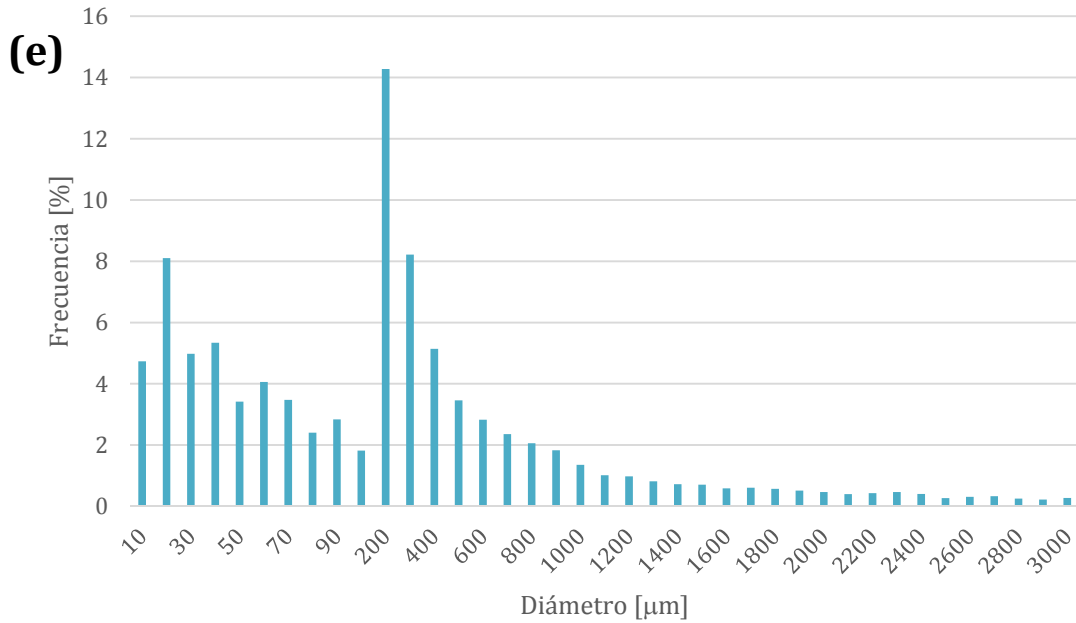


Figura 4.20 Gráficas de distribución de tamaño de poro de los andamios (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75 y (e) E-VZ1.0 muestran la distribución de tamaño de poro.

Como se puede observar en la Figura 4.21 se realizó el modelo en 3D de los andamios donde se ve claramente la estructura porosa interconectada (Figura 4.21 (a)) y se realizó un corte en los andamios en forma de cubo de dimensiones de $8.4 \times 8.4 \times 8.4 \text{ mm}^3$, para calcular el porcentaje de porosidad total (Figura 4.21 (b)).

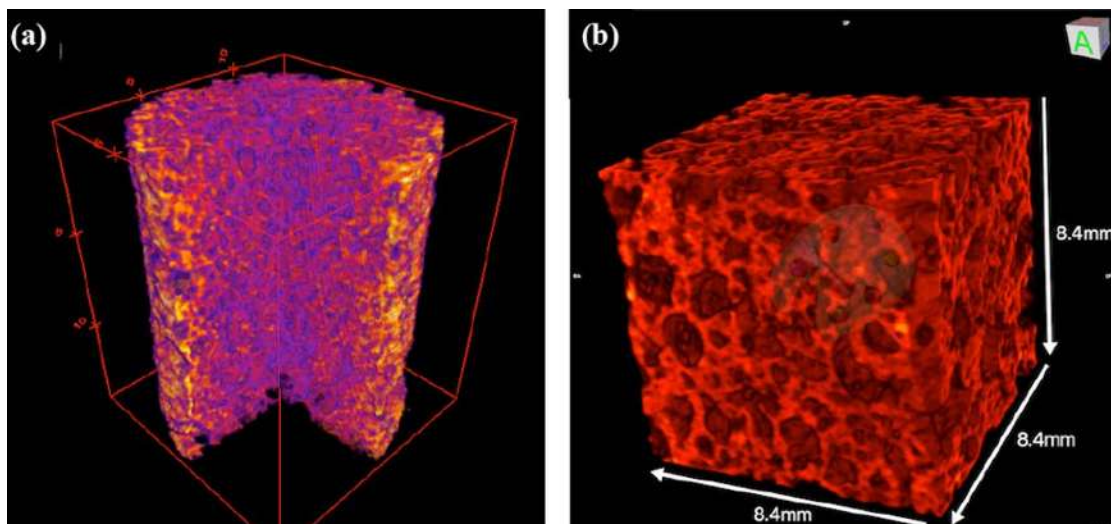


Figura 4.21 Imágenes de μ CT del andamio E-V1, (a) modelo en 3D reconstruido a partir de imágenes en 2D y (b) cubo de 8.4 mm que se obtuvo del modelo en 3D para poder llevar a cabo el análisis de % de porosidad para cada uno de los andamios.

Langer y Peyrin [145] realizaron un estudio a través de diferentes técnicas de tomografía de rayos X, en donde ellos concluyeron que la tomografía es una gran propuesta como método para analizar la estructura de materiales 3D, ya que permite una alta penetración además de un mayor contraste en las imágenes.

Por otro lado, Kasten y col. [146] realizaron un análisis de la porosidad, primero haciendo uso del porosímetro de mercurio para poder explicar los poros que no fueron interconectados y después microtomografía de rayos X para comparar ambos resultados, en donde concluyeron que ambos estudios son necesarios ya que con el porosímetro de mercurio se obtuvieron valores con mayor precisión para tamaños de poro menores a $10\ \mu\text{m}$, debido a que la microtomografía no puede detectar tamaño de poro menores a $5\ \mu\text{m}$ con tanta precisión, sin embargo, esta última afirmación es contradictoria ya que los resultados obtenidos en la presente investigación se llegaron a obtener valores de tamaño de poro $1\ \mu\text{m}$ de diámetro en los andamios que no contenían zirconia (E-V1).

La Figura 4.22 presenta cortes transversales realizados en las espumas con diferentes composiciones, en donde se puede observar que los andamios E-V1 (Figura 4.22 (a)), y E-VZ0.75 (Figura 4.22 (d)), muestran cortes correspondientes a áreas de la zona con mayor porosidad para cada composición, en estas imágenes se puede apreciar la geometría de los poros y la

interconectividad de los mismos, en cambio para las muestras E-VZ0.25, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 (Figura 4.22 (b), (c), (e)) se observan regiones de cortes con menor porosidad, presentando poros de diferentes tamaños, es importante resaltar que para el estudio de la distribución de los poros y tamaño de los mismos es necesario la reconstrucción del modelo en 3D mediante la integración de todos los cortes (Figura 4.22 (f)) para obtener valores certeros tal y como se mostraron previamente en la Figura 4.20.

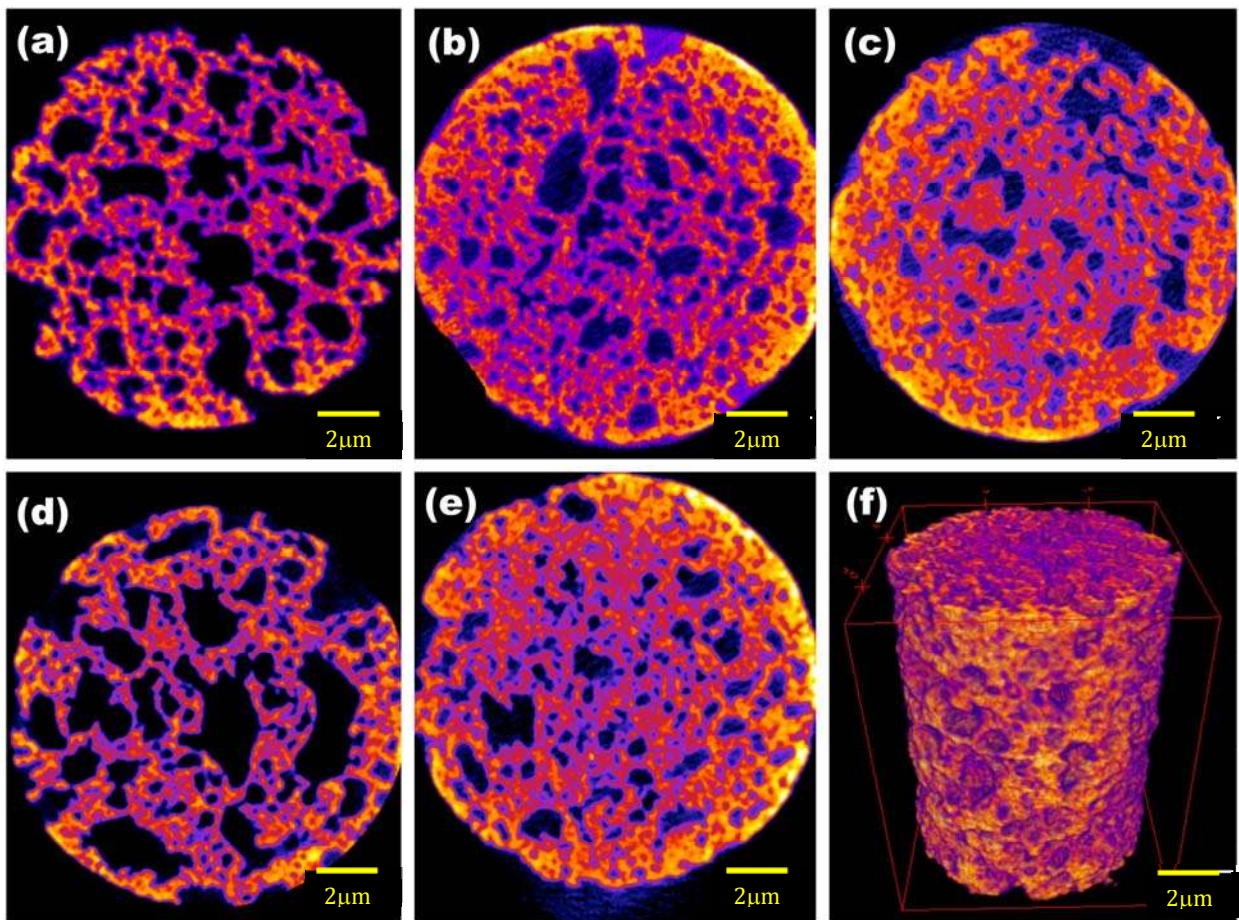


Figura 4.22 imágenes de μ CT de los andamios sinterizados (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75, (e) y (f) E-VZ1.0 con una amplia distribución de tamaño de poro.

Lapczynya y col. [147] realizaron una revisión del estado del arte donde compararon el efecto de tamaño de grano y la microporosidad en andamios de fosfato tricálcico. Ellos encontraron que durante los últimos 40 años se ha estudiado la composición y la arquitectura principalmente en materiales poliméricos y cerámicos, estos materiales presentan mecanismos de reabsorción muy diferentes por ejemplo: disolución por hidrólisis, degradación celular, enzimática y de transporte.

Los aspectos químicos y arquitectónicos en andamios empleados para regeneración ósea son considerados como cruciales para las respuestas *in vivo*, además de otros aspectos como: tamaño de poro, poros interconectados y porosidad, que han sido sujeto de investigaciones para tener un mejor entendimiento de los andamios antes de ser implantados. Lepczynna y col., exponen que los andamios macroporosos de fosfatos de calcio cuando presentan mayor microporosidad y disminución en el tamaño de grano aceleran la reabsorción, sin embargo fue muy difícil para ellos concluir a partir de tamaños de poro (microporos) por dos razones: 1) Es complicado variar un solo parámetro en los andamios por ejemplo; microporos sin cambiar otros aspectos (porosidad) y 2) existen estudios que son contradictorios en fosfato de calcio bifásicos donde el rango de disolución disminuye con la microporosidad y tamaño de grano (Tabla 4.9). Realizaron andamios hechos de β -TCP con el mismo tamaño de poro ($\approx 150 \mu\text{m}$) y porosidad ($\approx 80 \%$), y los separaron en dos grupos de microporosidad: bajo 10% y alto 25%, en donde ellos utilizaron una granulometría pequeña: $1.3 \mu\text{m}$ / grande $3.3 \mu\text{m}$ respectivamente, y así compararlos con los resultados del estado del arte, llegaron a obtener tamaños de poros en rangos cercanos a los que reportan la literatura ($100\text{-}600 \mu\text{m}$).

4.4 Análisis *in vitro*

4.4.1 SBF

La Figura 4.23 muestra imágenes obtenidas por FE-SEM de los andamios antes y después de la inmersión en SBF de los andamios E-V1, E-VZ0.5, y E-VZ1.0. Se puede apreciar que los andamios presentan bioactividad a partir de 7 días presentando formación de la capa de hidroxiapatita, sin embargo, las composiciones E-VZ0.25 y E-VZ0.75 no presentaron la formación de HA en la misma cantidad, como puede observarse en la Figura 4.24 a partir del día 14 empiezan a aparecer pequeñas precipitaciones de HA en la superficie de los andamios.

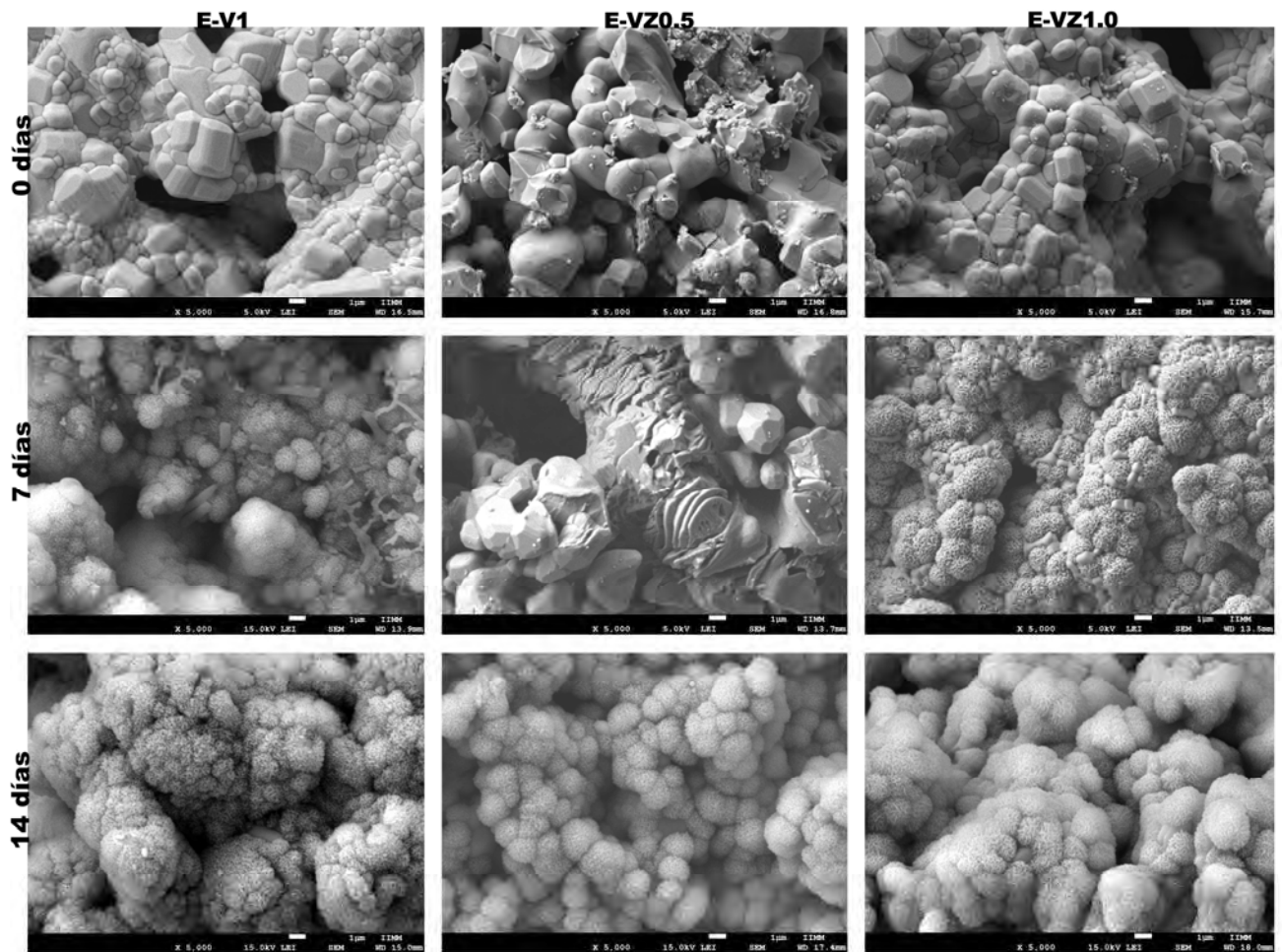


Figura 4.23 Micrografías del FE-SEM de los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 antes y después de la inmersión a 7 y 14 días en SBF.

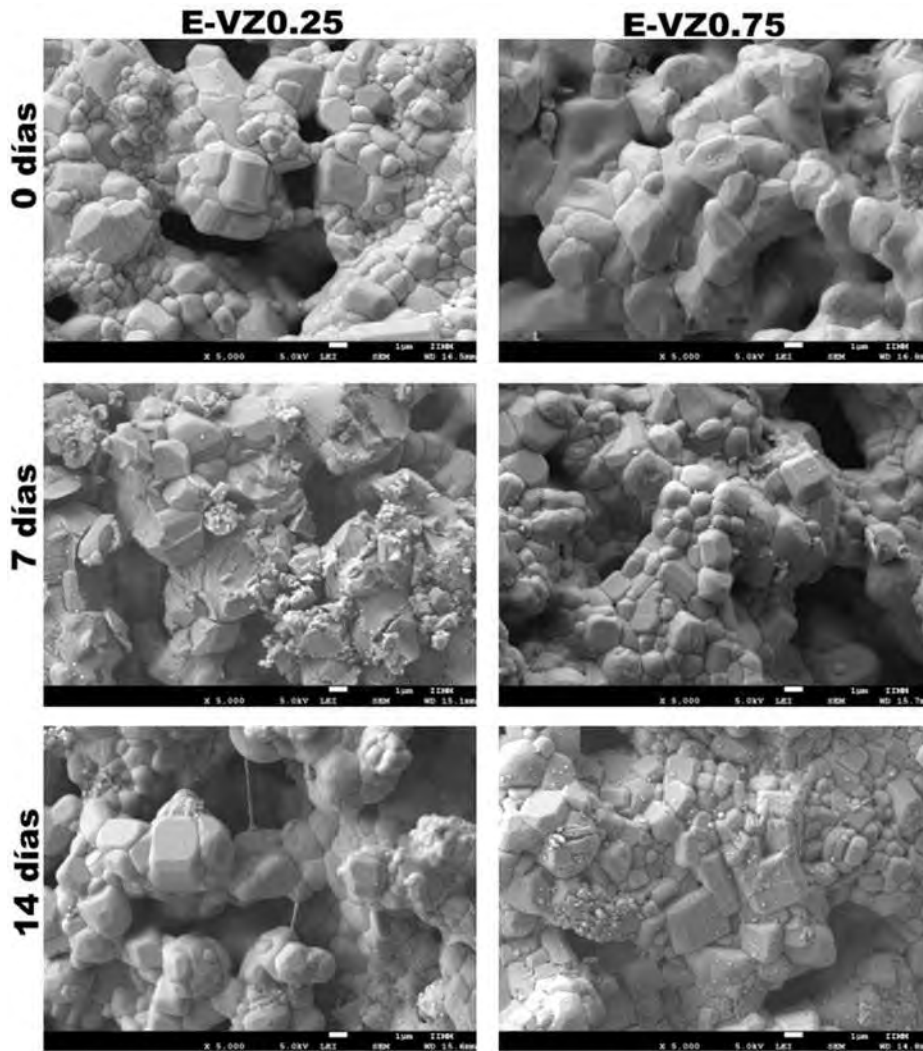


Figura 4.24 Muestra las espumas con 0.25 y 0.75 de zirconia en donde se observa la bioactividad en SBF a diferentes tiempos (0, 7 y 14 días respectivamente).

La morfología característica observada en la superficie de los andamios a mayores aumentos es la tipo flor o coliflor (Figura 4.25). Varios investigadores han reportado diferentes tipos de morfologías de la hidroxiapatita dependiendo del método de síntesis en los que destacan el tipo esfera, irregular, microsfera, nanoesfera, balón, rodillo, prisma, hojuela, diente de león, flor etc., algunas de ellas mostradas en la Figura 2.16 previamente discutida [72–74].

La hidroxiapatita ideal es la que se presenta con una relación $Ca/P = 1.67$, sin embargo, la sustitución de iones de CO_3^{2-} and HPO_4^{2-} es lo que produce que esa relación cambie en los huesos humanos y varía desde 1.5 hasta 1.7 dependiendo la edad y el sitio donde se ubique el hueso. Sin

embargo, cuando la HA es formada a partir de un biomaterial los valores cambian en un rango más amplio desde 1.3 hasta 2.0 de acuerdo a Stanciu y col. [148].

Los resultados encontrados en esta investigación a partir de 7 días de inmersión en SBF fue la formación de precipitaciones de HA y la propagación de las misma, después a 14 días la precipitación ya había nucleado (Figura 4.25) mientras la apatita casi había cubierto la superficie cerámica por completo al día 21 después de la inmersión en SBF.

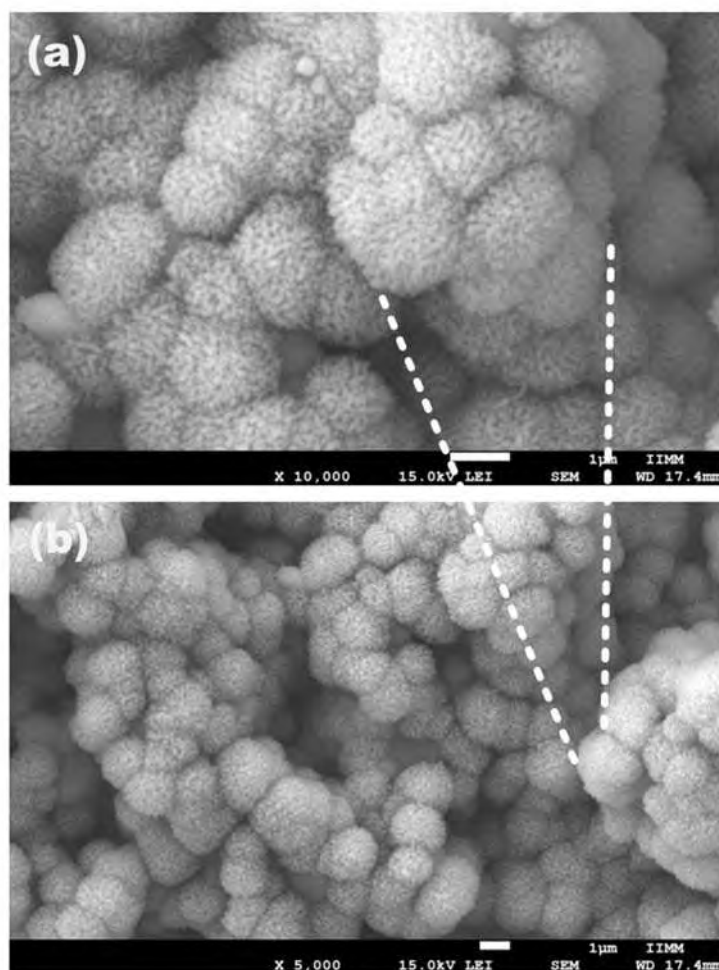


Figura 4.25 Morfología tipo flor o coliflor de la HA precipitada en la superficie del andamio VZ1.0 a 14 días de inmersión en SBF.

Duan y col. [149] observaron la morfología de la HA precipitada como gránulos porosos semiesféricos debido al método de síntesis, ya que cada método de síntesis utiliza diferentes variables como son: temperatura, pH, tamaño de cristal, etc., que provocan un arreglo atómico en la estructura final de la apatita. La morfología que se observó en los andamios de β -TCP reforzados

con biovidrio de la presente investigación fue de tipo flor o coliflor en donde a 28 días las flores estaban conectadas entre sí, formando una capa de apatita similar a la de una esponja.

Otros investigadores estudiaron andamios hechos de fosfatos de calcio sumergidos en SBF obteniendo resultados similares a los de esta investigación en donde ellos además concluyeron que la bioactividad y la degradabilidad están relacionadas con la estabilidad química y la durabilidad de los andamios, por lo que depende de la composición química y microestructura mineral (cristalográfica), así como del entorno del huésped, las muestras sumergidas en SBF que ellos estudiaron presentaron la formación de apatita carbonatada biológicamente activa sin microgrietas después de una semana de inmersión en donde la superficie estaba completamente cubierta, y a dos semanas observaron con mayor claridad la cristalinidad de la HA así como en la morfología de tipo flor [150,151].

Por otro lado ElBatal y col. [152] estudiaron la caracterización de vitrocerámicos en SBF en donde encontraron que después de 2 semanas de inmersión en SBF varios tipos de vitro-cerámicos formaron una capa en su superficie de hidroxiapatita carbonatada, pero con un cambio significativo en el tamaño de cristal de la HA, el tamaño de cristal de la apatita es más pequeño en la superficie del vitrocerámico, esto debido a que ya se tiene una capa policristalina que induce a una cristalinidad con tamaño más fino inducido por un agente nucleante, en esta investigación el agente nucleante que ayudó a que se diera el proceso de cristalización más eficiente fue la zirconia. Bohner y col. [66] realizaron varios experimentos utilizando SBF en donde encontraron varias contradicciones en los resultados presentados por Kokubo y Takadama, ellos llegaron a la conclusión de que cualquier material capaz de formar apatita en su superficie sumergido en SBF, esta apatita sería capaz de unirse al hueso vivo, esta conclusión ha sido una gran contradicción ya que hay varios materiales como el sulfato de calcio hemihidratado (CSH) y el fosfato de calcio dihidratado (DCPD), que forman apatita en SBF pero no se unen con el hueso *in vivo*. Otra contradicción es que el ensayo de SBF ha sido útil para predecir la bioactividad ósea *in vivo* del material dando resultados de tipo cualitativo y cuantitativo, esta afirmación se contradice porque el β -TCP solo no siempre conduce a la formación de apatita en SBF a pesar de su unión con el hueso. Es por esto necesario, la complementación de pruebas *in vitro* que permitan tener un análisis certero y resultados precisos. Bohner hizo un resumen de algunos sustitutos del hueso más

significativos utilizados *in vitro* en los que sobresalen los siguientes materiales biovidrio, β -TCP, CSH, HA, DCPD, se hace la aclaración que las pruebas de biocompatibilidad en SBF algunas veces pueden conducir a falso positivos y a resultados negativos falsos.

Existen varias teorías para predecir la capacidad de unión del hueso y la formación de apatita en solución de SBF, ya que son dos fenómenos distintos. Los cálculos termoquímicos muestran que el suero y el SBF están sobresaturados de cristales de apatita, es decir, el sistema es metaestable y eventualmente se convertirá en estable, hablando termodinámicamente, mediante la inducción de cristales o el tiempo de nucleación, y la velocidad de formación de núcleos de los cristales que sean lo suficientemente grandes (por encima del tamaño crítico) para que sean termodinámicamente estables y puedan seguir creciendo. Cuando se forman cristales de apatita en la superficie de un material sumergido en SBF o suero significa que el tiempo de inmersión fue mayor que el tiempo de inducción. Una vez conociendo lo anterior, los pasos para acelerar la cristalización heterogénea de apatita en una solución sobresaturada son:

1. Proporcionar la suficiente cantidad de núcleos de apatita que permitan la formación de cristales de la misma.
2. Superficie con una energía interfacial baja con apatita o,
3. Cambio de la supersaturación local hacia la precipitación de apatita

Bohner [153] expone que el β -TCP se comporta como un material inerte en SBF e insoluble ya que no observaron la formación de HA en las muestras realizadas.

Sin embargo, los resultados presentados en la presente investigación muestran lo contrario, ya que el andamio formado de β -TCP mezclado con vidrio bioactivo base fosfato permiten la formación de la apatita en la superficie de la espuma después de ser sumergidas en SBF, además se mostrar disolución del andamio tal y como se observará en las gráficas presentadas por ICP más adelante.

4.4.2 pH

En el presente estudio se observaron cambios respectivos de pH en el SBF, la medición de pH se realizó en todas las muestras, ya que se sabe que la tolerancia del pH en el cuerpo humano es 7.4 ± 0.4 , sin embargo se ha observado que en materiales sintéticos existe una variación más amplia donde a pH menores de 9 favorece el crecimiento fibrilar en materiales poroso, sin embargo cuando el pH es ácido (< 7) o ligeramente básico (> 7.8) empieza a provocar efectos secundarios en el cuerpo humano principalmente aumento de temperatura y esto puede ocasionar la muerte celular [154].

En la Figura 4.26 se puede observar que a 7 días de inmersión el pH en todas las muestras se mantuvo en el mismo valor, esto es debido a que no hay una disolución significativa en los andamios, lo que provocó un cambio en el pH fue cuando se produjo una mayor cantidad de iones liberados de las muestras, a mayores tiempos no se observó un cambio considerable en el pH, las condiciones iniciales de pH fueron de 7.4 correspondiente al del cuerpo humano en todas las muestras, el cual siguió incrementando hasta 8.0 hasta el día 28.

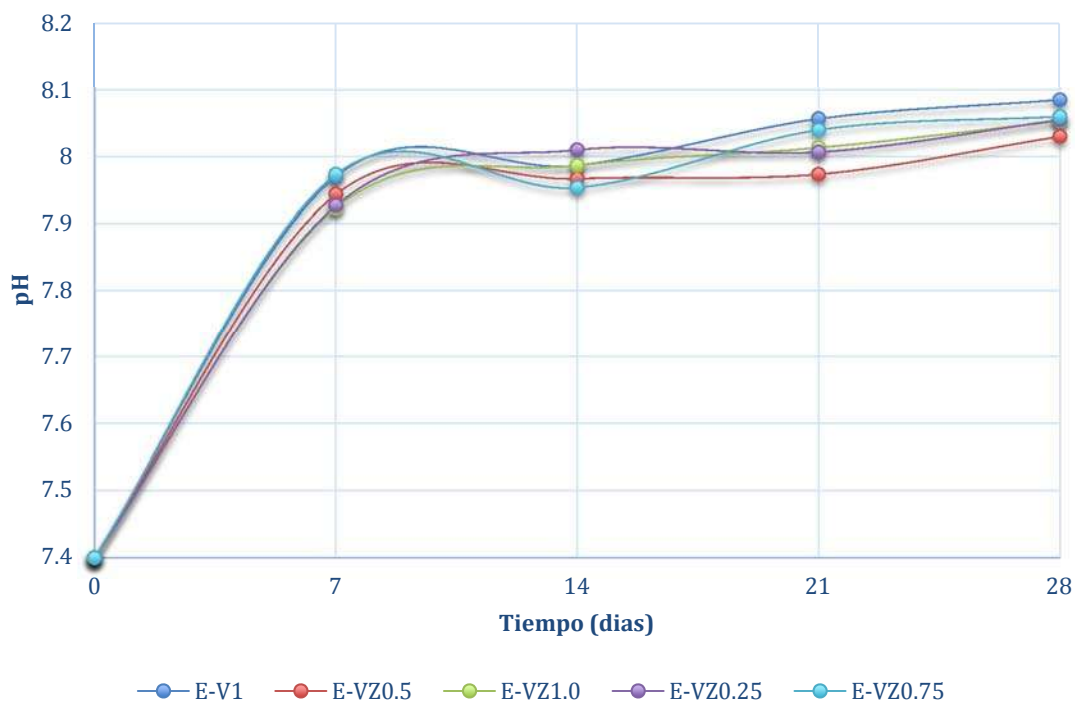


Figura 4.26 Variación del pH en función del tiempo de inmersión en SBF en las diferentes composiciones.

Cüneyt [155] concluyó que el SBF hace que el pH esté variando constantemente hasta la formación de pequeños precipitados de HA que ayudan a la disminución del pH y a la vez permiten la estabilización del mismo, debido a la alta fuerza iónica del SBF; el SBF juega un papel muy importante en la inducción de la formación de la fase cristalina de la HA con alta pureza debido a la formación de pequeñas “semillas” o precipitados que ayudan a que se dé la nucleación de la HA. Por otro lado, Recillas y col. [156] realizaron varias comparaciones en donde obtuvieron que las especies de una solución con fosfato de calcio se ve afectada por el pH, y por lo tanto de las concentraciones de iones PO_4^{3-} y de Ca^{2+} , en donde para que se pueda llevar a cabo la precipitación de la HA es conveniente utilizar un pH más alto de 6 y bajas concentraciones de iones PO_4^{3-} y de Ca^{2+} . Los intervalos de concentración en donde la HA precipita son limitados y es necesario un buen control para evitar la precipitación de otras fases. A pH de 7 es posible precipitar HA con bajas concentraciones de iones de PO_4^{3-} y altas de Ca^{2+} , por ejemplo 1×10^{-10} mol/L y 3.2×10^{-2} mol/L, respectivamente. Al aumentar la fuerza iónica de la solución a un pH constante se observa un incremento de solubilidad, por lo que se sugiere mantener constante el pH y evitar cambios en las concentraciones de los iones PO_4^{3-} y de Ca^{2+} en la solución antes de la precipitación del fosfato de calcio, una vez precipitando la HA es una fase muy insoluble lo que significa que a bajas concentraciones en la solución alcanza la saturación, por lo tanto, las condiciones óptimas de acuerdo a estos investigadores fueron un pH entre 6 y 7.4, pero si se quisiera precipitar HA con un pH más alto sería necesario disminuir la concentración de iones PO_4^{3-} .

4.4.3 Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de FTIR de los andamios después de la inmersión en SBF mostraron la formación de HA, la cual se observó a diferentes tiempos (7, 14, 21 y 28 días) en donde las longitudes de onda encontradas fueron 986, 1100 y 1090 cm^{-1} correspondientes a grupos funciones de tipo fosfato PO_4^{3-} , sin embargo, la formación de enlaces de tipo $P - O - P$ se observaron en el rango de 720 cm^{-1} sin variación significativa con respecto a las bandas observadas antes de la inmersión en SBF, a 1412 cm^{-1} se observó cambio en la intensidad de la banda correspondiente a la formación del grupo funcional carbonato (CO_3^{2-}), así como la formación y crecimiento de bandas a 1637, 2200, y 3400 cm^{-1} correspondientes al grupo OH^- , las longitudes de onda encontradas en la presente

investigación presentaron las mismas longitudes de ondas que las que reportan otros investigadores [70,157].

En la Figura 4.27 muestra los espectros de infrarrojo de la composición E-VZ1.0 y el efecto de la formación de HA al incrementar los días, en donde se puede observar que la principal diferencia en los grupos fosfatos encontrada en el espectro después de inmersión en SBF fue la formación de enlaces de tipo P-O a 1631 cm^{-1} resultado de la interacción de la formación de HA.

Oliveira y col. [158] reportan resultados del análisis de infrarrojo que sustentan la presente investigación, ya que los resultados que obtuvieron a partir de la formación de una capa de apatita en andamios hechos de una mezcla de almidón/policaprolactona después de 7 días de inmersión en SBF mostraron variaciones en la longitud de onda 3400 cm^{-1} que corresponden a moléculas de agua incorporadas en la apatita, debido a que la apatita tiene un carácter higroscópico, es decir, contiene agua unida químicamente en su estructura también conocida como agua estructural. Por otro lado, las bandas a 866 y 1452 cm^{-1} son el resultado de la presencia de carbonatos (CO_3^{2-}) en la estructura de la apatita lo que indica que se formó una apatita carbonatada, tal como se encuentra en el tejido óseo. Las bandas encontradas en el rango de 600 a 800 cm^{-1} son asignadas a enlaces de tipo $P - O - P$ en la apatita.

Por otro lado, Shuai y col. [150] realizaron espumas de fosfato tricálcico sumergidos en SBF por una semana en donde reportaron bandas características a 551 , 609 , 945 , 979 , 1045 y 1250 cm^{-1} correspondientes a los grupos de tipo PO_4^{3-} que pertenecen al β -TCP, además encontraron bandas a 1637 y 3429 cm^{-1} que corresponden a la absorción de agua. Ellos resumieron que las bandas encontradas en las espumas hechas de fosfatos tricálcico después de SBF se encuentran en regiones de 1000 - 1200 cm^{-1} y de 3000 - 3710 cm^{-1} formando enlaces de tipo $P - O - P$ y $P - O$.

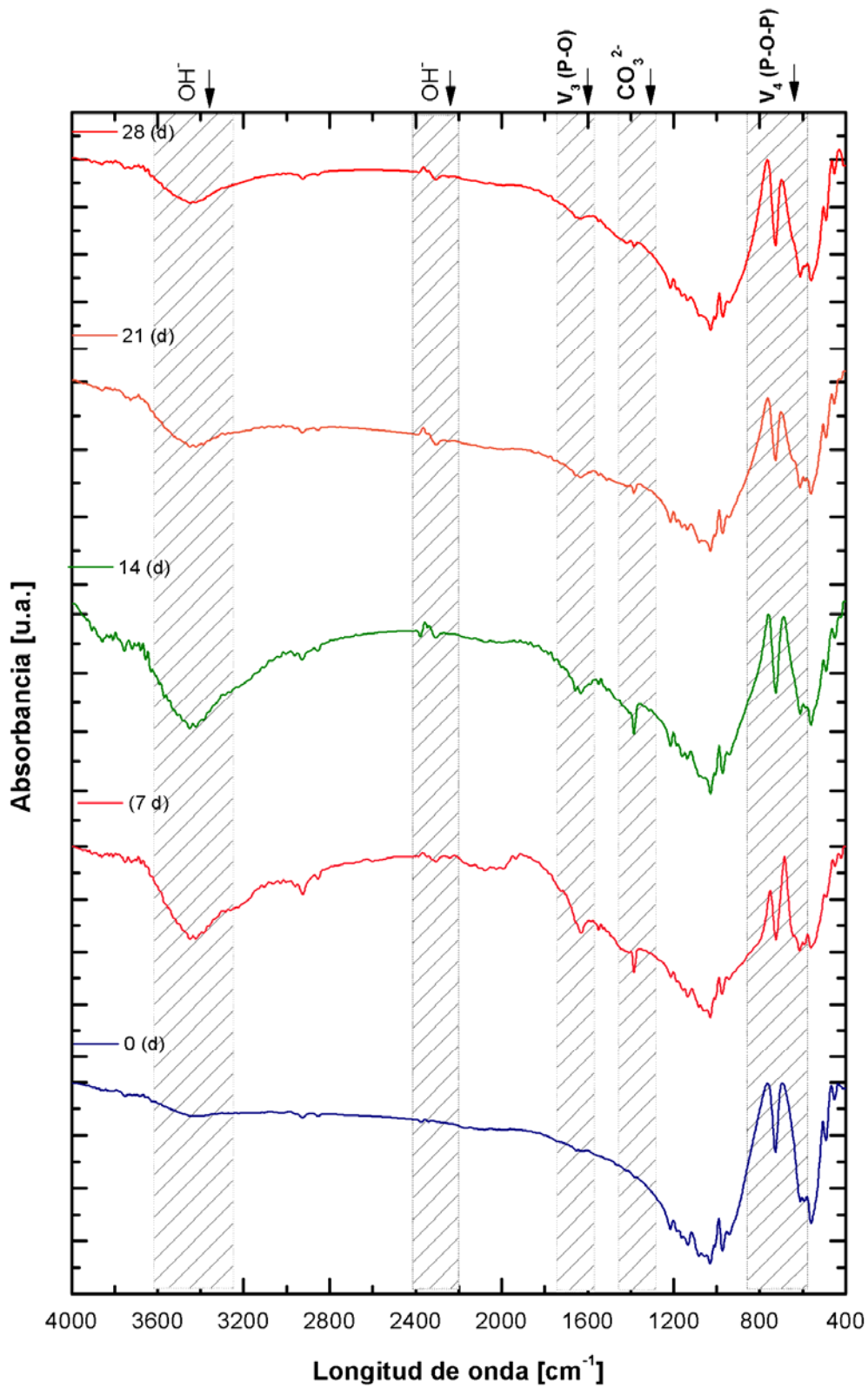


Figura 4.27 Espectro de FTIR para la muestra con la composición E-VZ1.0 a diferentes tiempos de inmersión (0, 7, 14, 21 y 28 día)

La Figura 4.28 muestra los patrones de FTIR en la espuma E-VZ1.0 después de 28 días de inmersión en SBF. Los resultados encontrados por infrarrojo corroboran la presencia de la fase de hidroxiapatita observada también en las imágenes de FE-SEM.

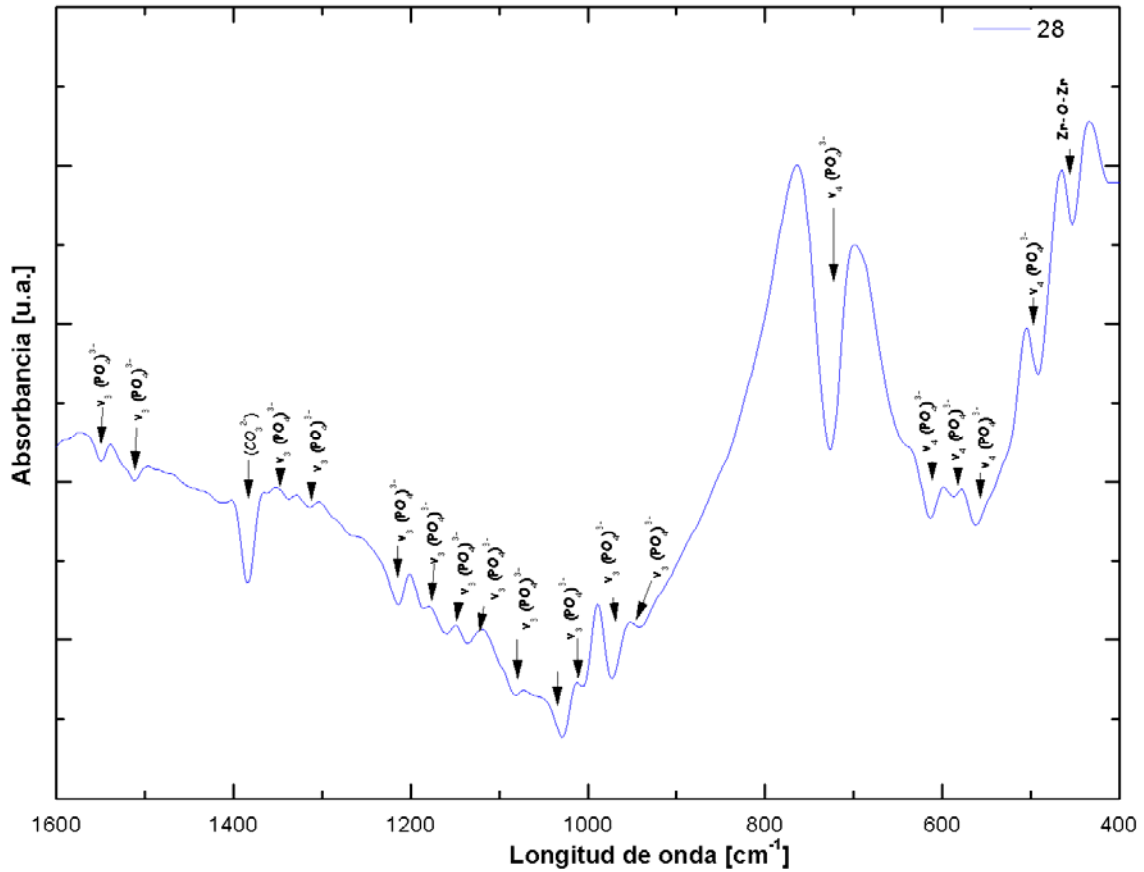


Figura 4.28 Espectro de FTIR muestra las bandas características del andamio E-VZ1.0 después de 28 días de inmersión en SBF.

4.4.4 Estereoscopia Raman

Existen cuatro tipos de frecuencias Raman que son: ν_1 , ν_2 , ν_3 y ν_4 para los ortofosfatos cerámicos que están relacionados con el grupo funcional tetraédrico PO_4^{3-} , ν_1 es la frecuencia relacionada con estiramientos de forma simétrica en los enlaces de tipo $P-O$, en cambio ν_2 se relaciona con un enlace simétrico doble degenerado de tipo $O-P-O$, ν_3 corresponde a un tipo de frecuencia asimétrica de enlaces extendidos $P-O$, y finalmente ν_4 es un enlace triple degenerado de tipo

$O - P - O$. Cada frecuencia tiene rangos de longitudes de onda establecidos es decir, $\nu_1 = 150 - 300 \text{ cm}^{-1}$; para $\nu_2 = 370 - 505 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_3 = 995 - 1120 \text{ cm}^{-1}$ y $\nu_4 = 530 - 645 \text{ cm}^{-1}$ [159–161].

La Figura 4.29 muestra los resultados de Raman para los andamios β -TCP/ biovidrio después de estar en inmersión por un tiempo de 7 días en SBF, en donde se puede apreciar que todas las composiciones mostraron frecuencias de tipo ν_2, ν_3 y ν_4 correspondientes a los enlaces de tipo doble simétrico de tipo $O - P - O$, $P - O$ y enlace triple degenerado de la forma $O - P - O$, además se puede apreciar que a mayor cantidad de zirconia el pico de compuesto $Ca_2P_2O_7$ disminuye casi en su totalidad debido a la formación de grupos fosfatos, se observó también el pico característico de la HA que se encontró a una longitud de onda de 961 cm^{-1} el cual tiende a incrementarse y a formar otro pico adicional correspondiente a la misma fase, tal y como Lo Re y col. [142] encontraron.

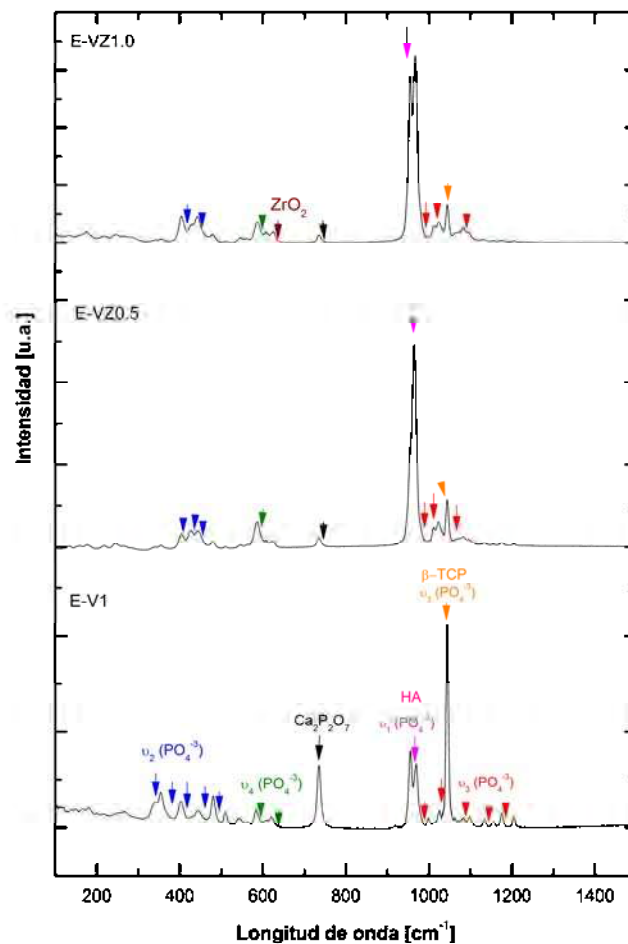


Figura 4.29 Espectros Raman de los andamios de fosfato tricálcico beta reforzados con biovidrio base fosfato y dopados con zirconia después de 7 días de inmersión en SBF.

Azar y col. [159] concluyeron que el espectro Raman cuando se encuentran iones de tipo PO_4^{3-} están relacionados con las vibraciones de las subredes de los iones de Ca^{2+} así como de los modos rotacionales de los iones PO_4^{3-} , además de resumir las vibraciones que pueden presentar el TCP y la HA (Tabla 4.9). Por otro lado Fátima y col., [160] reportaron evidencias de la formación de fases adicionales tales como $\beta - Ca_2P_2O_7$, que presenta bandas en Raman a longitudes de onda de 745 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} .

Tabla 4.9 Picos característicos de frecuencias Raman observadas en β -TCP y HA asociados con los modos vibracionales de tipo PO_4^{3-} [159].							
ν_1		ν_2		ν_3		ν_4	
TCP	HA	TCP	HA	TCP	HA	TCP	HA
946		405		1005	1028	547	579
949			430	1016	1029	555	580
	961		432	1031	1033	578	581
	962		433	1038	1043	588	588
	963		447	1046	1046	599	591
970			449	1059	1048	611	592
			450	1074	1054	624	594
			452	1077	1074	631	606
				1084	1076		607
				1091	1077		608
							615
							617
							624
							631

En la Figura 4.30 se observa como varía el pico de los pirofosfatos ubicado a 745 cm^{-1} así como la aparición del pico de la HA ubicado a longitudes de onda de 961 y 963 cm^{-1} , respectivamente así, como Jing y col., encontraron [162], además se puede apreciar que conforme pasa el tiempo de inmersión de los andamios en SBF se empiezan a formar grupos fosfatos de tipo ν_3 a una longitud de onda de 1150 cm^{-1} y de tipo ν_2 a longitudes de onda de 355 y 389 cm^{-1} , las cuales son resultado de la interacción en la formación de la fase HA.

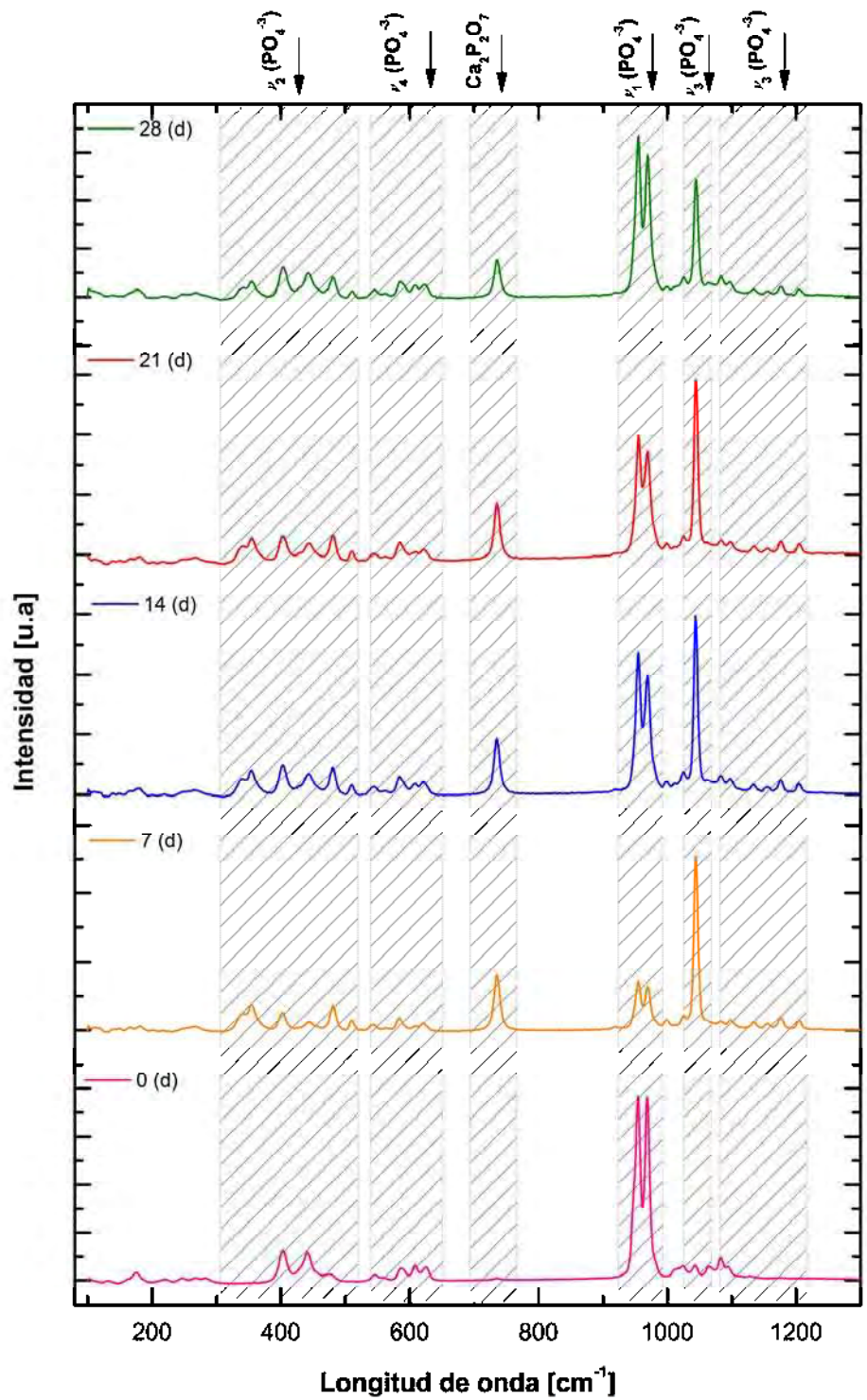


Figura 4.30 Espectros Raman característicos del andamio E-VZ1.0 sumergido en SBF a diferentes tiempos: 0, 7, 14, 21 y 28 días.

4.4.5 Relación Ca/P y pérdida de peso

La relación de Ca/P para el análisis de la fase de hidroxiapatita formada en la superficie de los andamios fue determinada por la técnica de EDS, se encontró una variación de la relación Ca/P desde 1.7 hasta 2.4 debido a la disolución del andamio y a la precipitación de calcio y fósforo como se observa en la Figura 4.31.

De acuerdo a Stanciu y col., [161] presentaron el rango de la relación Ca/P puede ser desde 1.3 hasta 2.0, resultado del desarrollo gradual de la formación de la capa de HA en la superficie del andamio, sin embargo, Khandelwal y Prakash [163] encontraron valores mayores a 2 que cumplen con las características físicas, químicas y morfológicas de la HA.

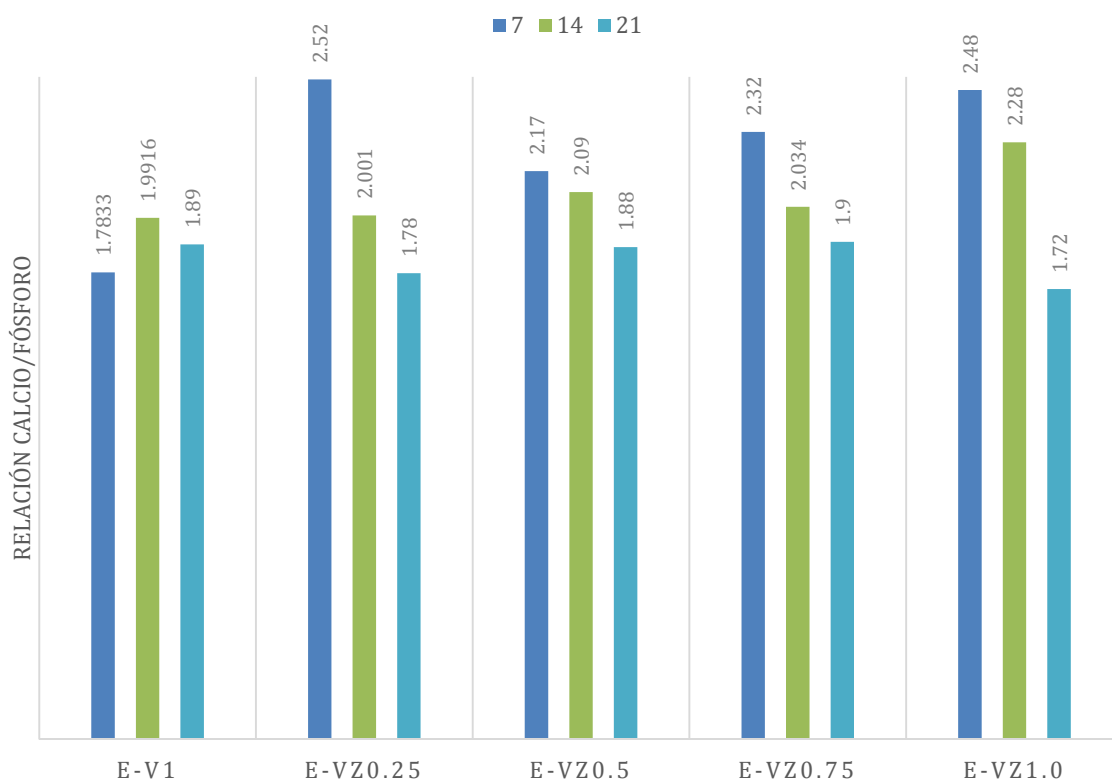


Figura 4.31 Relación Ca/P de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 a diferentes tiempos de inmersión en SBF (7, 14 Y 21 días).

La capacidad de absorción de los andamios fue determinada mediante la inmersión en SBF a 37 °C por un periodo de 7 días. El peso en seco fue obtenido previo a la inmersión en SBF, y con respecto del peso en húmedo de los andamios fue determinado sacando el andamio del SBF con un papel filtro para después remover el agua absorbida en la superficie y luego pesarlo inmediatamente en una balanza electrónica.

Por otro lado, en los andamios se realizó la absorción de agua en condiciones estáticas en donde los resultados a partir de los 7 días se mostró una pérdida de peso de 11.7 % en peso para los andamios que no contenían zirconia en su composición, sin embargo, para los andamios E-VZ0.5 y E-VZ1.0 presentaron una pérdida de peso muy similar de 4.5 % y 4.7 % en peso, respectivamente, sin embargo, el andamio E-VZ0.75 mostró una pérdida del 22.6 % debido al incremento de la temperatura de la estufa en donde se llevaron a cabo los experimentos ya que existían zonas cercanas no permitían un adecuado control mostrando variaciones mayores ± 1 °C, y al aumentar la temperatura existe modificación del pH lo que provoca mayor disolución del andamio, sin embargo, en el resto de composiciones se puede observar que la zirconia ayudó al andamio a reducir el rango de disolución como se muestra en la Figura 4.32. La degradación se ve influenciada por varios factores cinéticos que se deben considerar como son: factores moleculares, factores supramoleculares (cristalinidad, distribución espacial de los componentes), peso molecular, la porosidad, factores ambientales, el grado de resorción en el cuerpo o en el fluido corporal simulado que presente el andamio.

Cai y col. [114] exponen que los estudios de disolución del fosfato tricálcico fase beta reforzados con biovidrio sumergidos en un ambiente que contiene agua en mayor cantidad confirmaron la estabilidad química de los andamios porosos compuestos debido a la cristalización de las fases del vidrio.

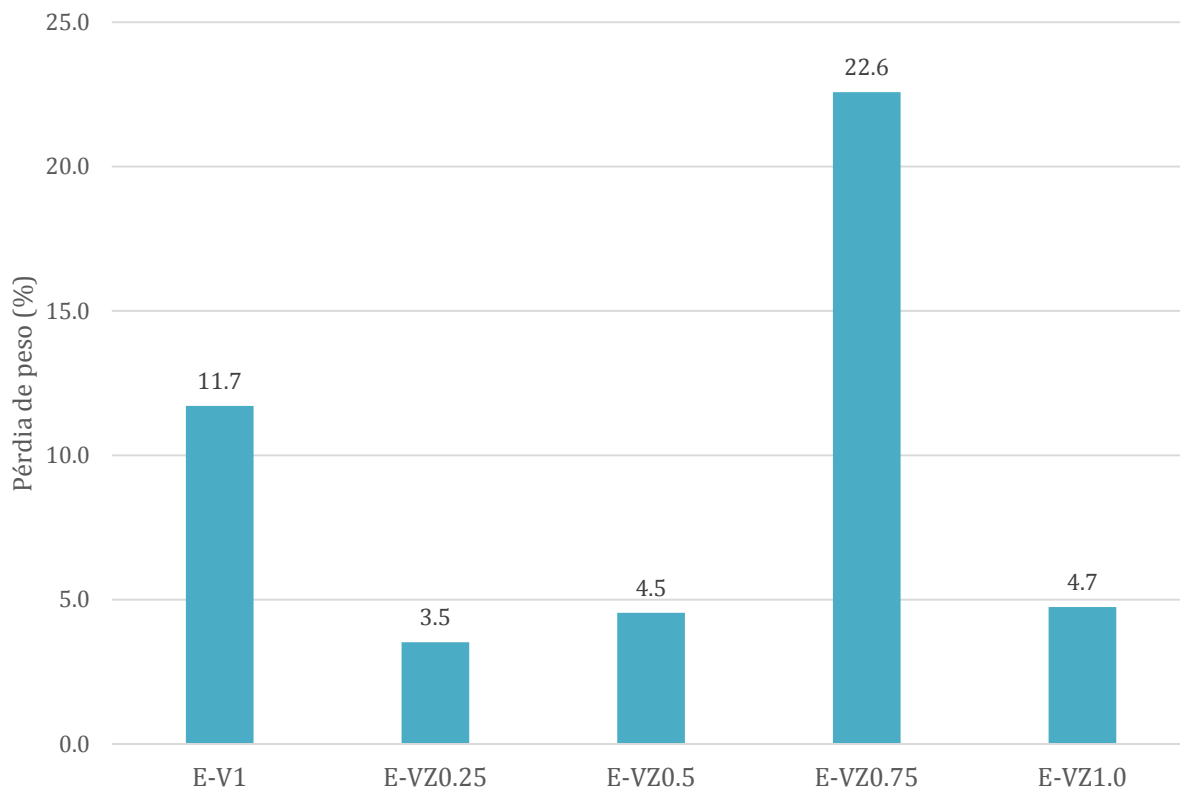


Figura 4.32 Pérdida de peso de las muestras E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 sumergidas en SBF por un periodo de 7 días.

4.4.6 Difracción de rayos x (DRX)

Las fases cristalinas encontradas por medio de los patrones de DRX en de los andamios de β -TCP reforzados con vidrio base fosfato después de 7 días de inmersión en SBF se observan en la Figura 4.33. La principal fase formada fue la hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (JCPDS 00-001-1008) y el fosfato tricálcico $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (JCPDS 00-003-0713), el cual permanece remanente debido a que se encuentra en un 80 % en peso en el andamio, en menor cantidad se observaron dos fases, Na_3PO_4 (JCPDS 01-076-0201) (Tabla 4.10). La diferencia entre β -TCP y la HA es el pico característico ya que para el fosfato tricálcico se encuentra en $2\theta \approx 31.5^\circ$ y la HA at $\approx 31.8^\circ$. Varias investigaciones han explicado la reacción que ocurre entre el β -TCP y el vidrio base fosfato en donde todos coincidieron que durante el proceso de sinterización se forman dos fases nuevas que son CaZrO_3 (JCPDS 01-072-7552) y ZrP_3O_7 que son resultado de la cristalización del vidrio y éstas ocurren a temperaturas en un rango de 650 a 980 °C, estos valores se compararon con los

resultados presentados por varios científicos en donde los resultados son casi idénticos a los obtenidos en la presente investigación [114,164–166].

De acuerdo a la investigación de Wang y col., [157] a fase cristalina Na_3PO_4 es resultado de la incorporación intersticial del ion Na^+ en la estructura de la apatita. Por otro lado las segundas fases CaZrO_3 y ZrP_2O_7 , son el resultado de la incorporación del ion de Zr^{4+} dentro de la estructura del material compuesto, que puede ser resultado de la disolución de la matriz ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) lo que permitió la precipitación del calcio y el fósforo formando la hidroxiapatita.

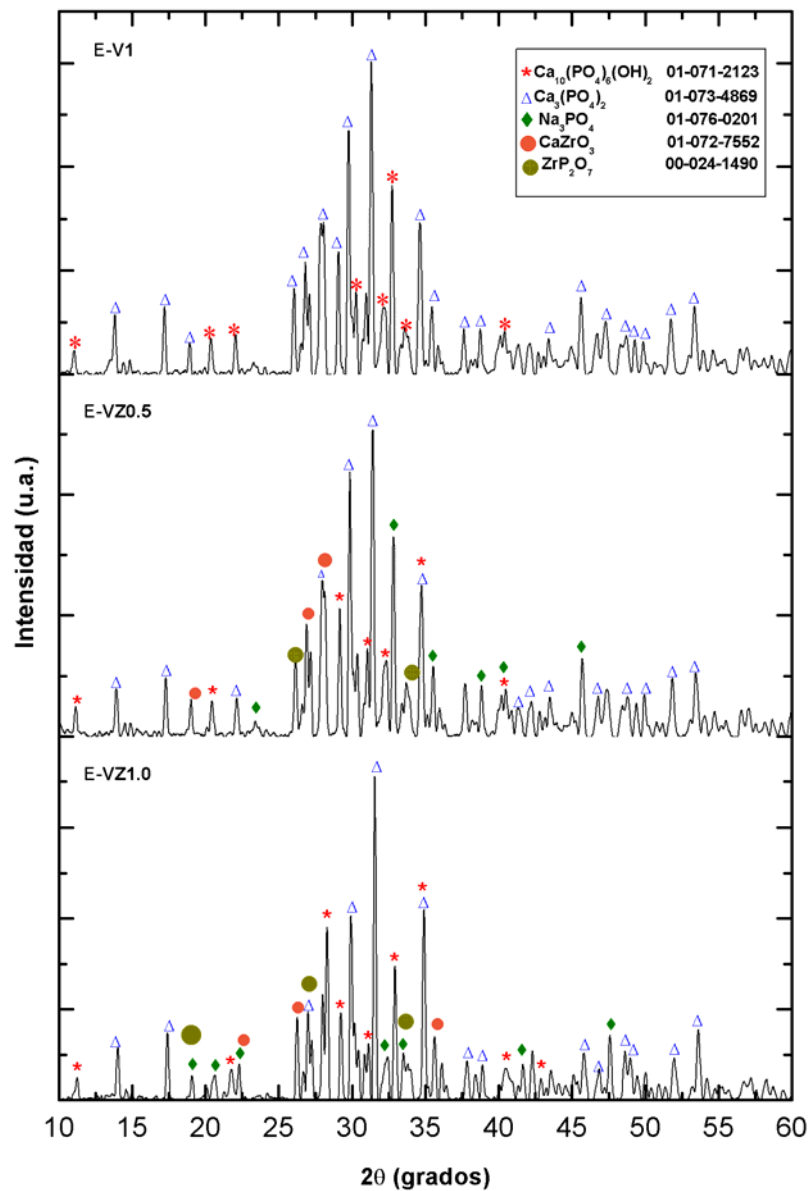


Figura 4.33 Patrones de DRX de los andamios E- V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 sumergidos en SBF por un tiempo de 7 días.

Tabla 4.10 Principales fases encontradas en los andamios después de la inmersión en SBF.

Fase cristalina	E-V1	E-VZ0.25	E-VZ0.5	E-VZ0.75	E-VZ1.0	JCPDS
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	✓	✓	✓	✓	✓	00-001-1008
CaZrO_3		✓	✓	✓	✓	01-072-7552
ZrP_3O_7		✓	✓	✓	✓	00-024-1490
Na_3PO_4	✓	✓	✓	✓	✓	01-076-0201
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	✓	✓	✓	✓	✓	01-073-4869

Los resultados de DRX indican que no sólo se formó la HA sino que también hay otras fases de menor importancia pero que pueden ser cruciales en la bioactividad del material, como se observa en la Figura 4.34.

4.4.7 Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Las soluciones de SBF, donde fueron inmersos los andamios porosos a diferentes tiempos (7, 14, 21 y 28 días) fueron analizados por la técnica de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente, que permitió obtener mediciones de la cantidad de concentraciones de iones de calcio, fósforo y zirconio para entender el comportamiento del material en un ambiente fisiológico.

Los perfiles de concentración de Ca, P y Zr en la solución de SBF en función del tiempo de inmersión se pueden ver en la Figura 4.34. Los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5 y E-VZ1.0, mostraron una disolución de los elementos de calcio y fósforo en SBF durante condiciones estáticas, que provocó la pérdida de iones de calcio y fósforo respectivamente, sin embargo debido a las condiciones estáticas pudo formarse zonas que tienden a disolverse más que otras debido a la acumulación de Ca y P o incluso a la falta de movimiento.

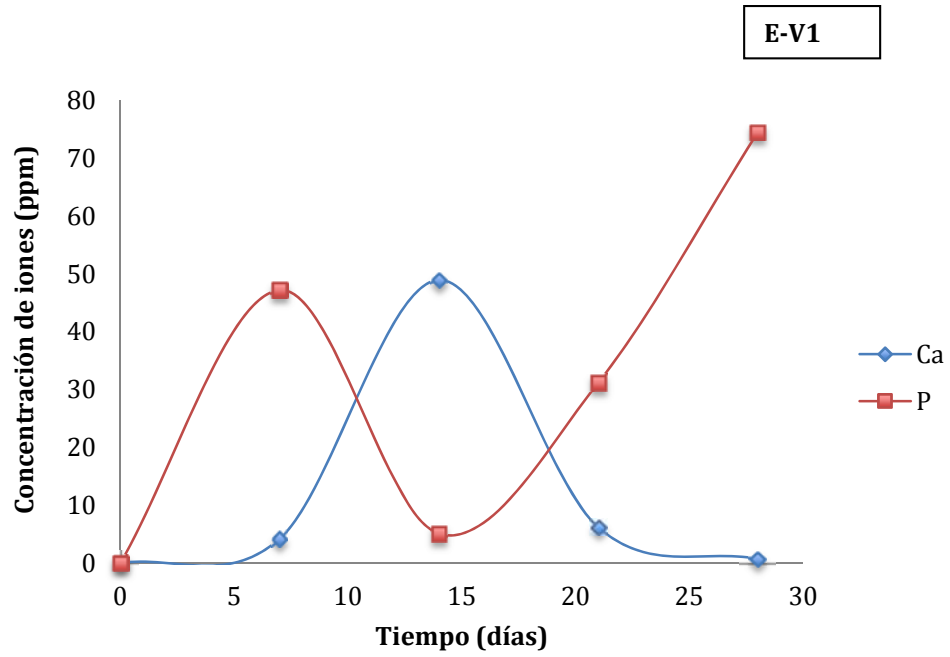
La interacción iónica y la degradación de los andamios se ve afectada por la cantidad de zirconia, ya que la ZrO_2 ayudó a que existiera una estabilización de iones de calcio y fósforo manteniendo valores en las muestras E-VZ0.5 y E-VZ1.0 de 15 ppm a 50 ppm, respectivamente, sin embargo en los andamios sin zirconia presentaron una disolución de calcio y fósforo sin un control de 13 hasta 80 ppm.

Cai y col. [114] concluyen diciendo que hay una mayor disolución de iones Ca^{+} en la superficie de los andamios de fosfato de calcio, lo que conduce a un aumento local del pH del fluido circundante que tiene un efecto directo sobre la solubilidad relativa de las diferentes fases de los fosfatos.

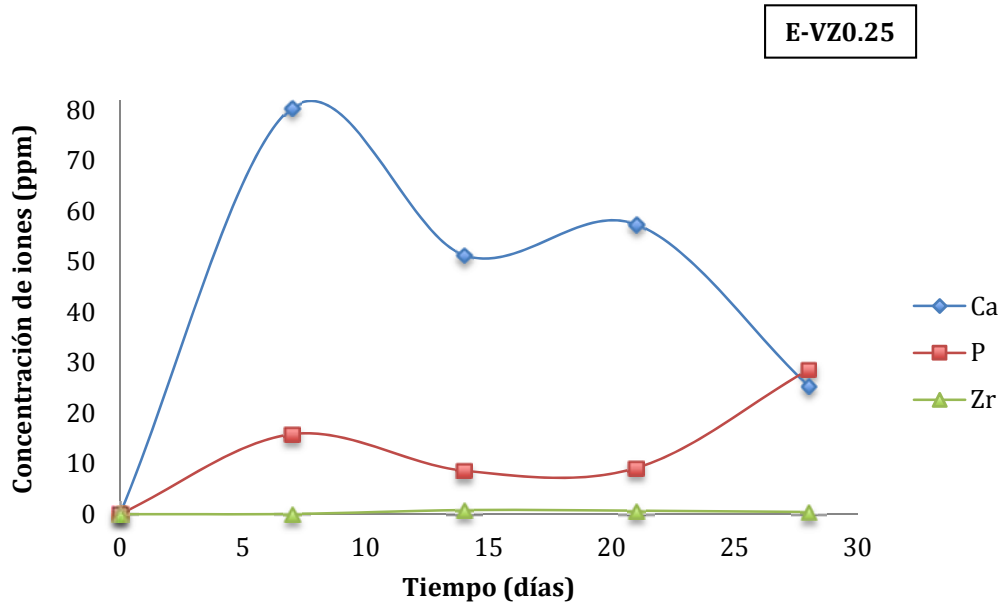
Sallemi y col. [167] explicaron que se produce la liberación de iones Ca^{2+} y Zr^{4+} en la superficies de los andamios cuando se precipita la HA, resultado un reordenamiento en las estructuras iniciales.

Por otro lado, Tang y col. [168] exponen que para la ingeniería de tejido un andamio para la regeneración ósea debe presentar una formación paralela del nuevo hueso, es decir, un balance entre la absorción del andamio y la formación del hueso, lo que se da mediante el control de la cantidad de iones de Ca, por lo tanto, en el presente estudio se observó que cuando se adicionó vidrio base fosfato no solamente mejoraron las propiedades mecánicas sino que se puede apreciar cambio en la degradación del andamio.

(a)

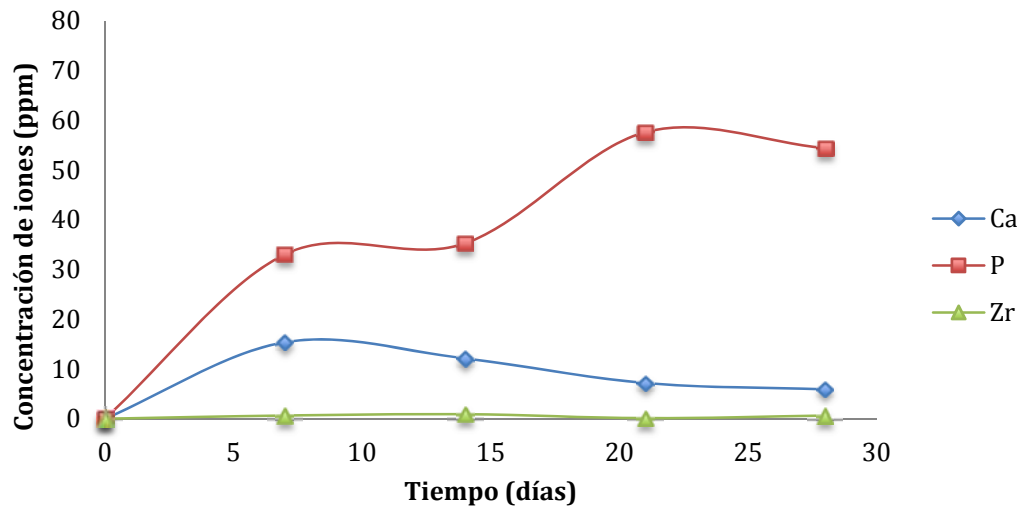


(b)



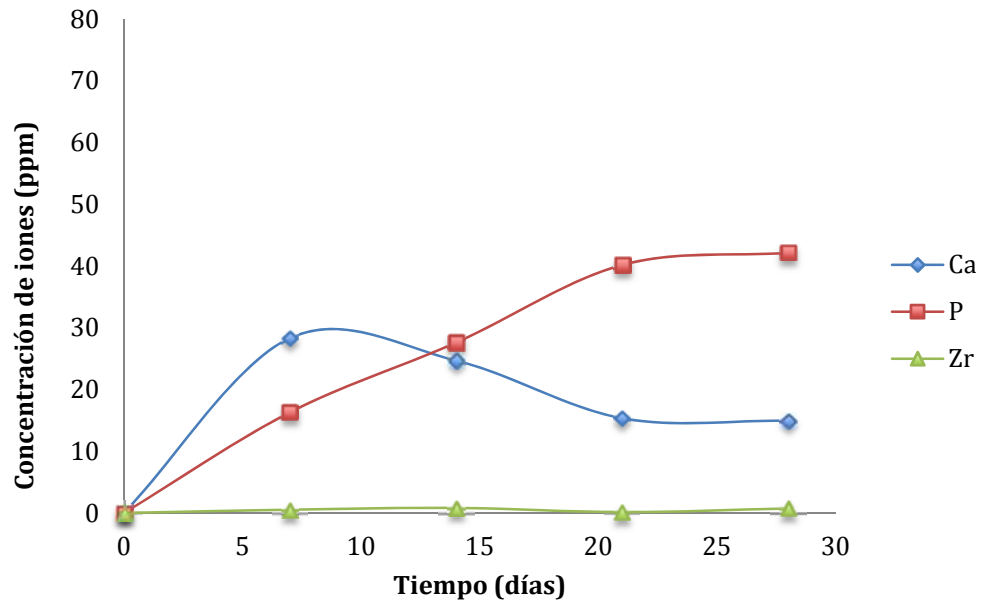
(c)

E-VZ0.5



E-VZ0.75

(d)



(e)

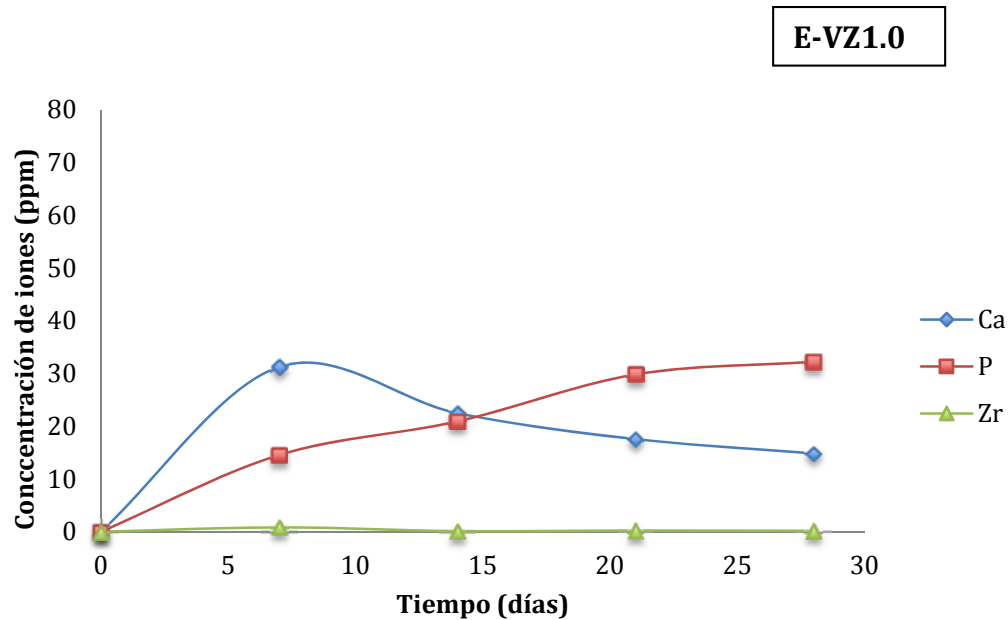


Figura 4.34 Concentraciones de Ca, P y Zr en la solución de SBF a diferentes días de inmersión (a) E-V1, (b) E-VZ0.25, (c) E-VZ0.5, (d) E-VZ0.75 y (e) E-VZ1.0.

4.5 Análisis de cultivo celular

4.5.1 FE-SEM

Es un requisito que las células presenten una buena adhesión celular sobre el andamio, debido a que eso permitirá que las células proliferen y formen la matriz extracelular. Los estudios de cultivo celular fueron llevados a cabo mediante el análisis de los andamios expuestos a un ambiente biológico.

Las imágenes de FE-SEM que se muestran en la Figura 4.35 presentan la adhesión y el esparcimiento de las células MC3T3-E1 sobre los andamios después de 3 días de cultivo. Los resultados obtenidos sugieren que las células se adhirieron en mayor cantidad en los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 con respecto de los andamios E-VZ0.25 y E-VZ0.75. La adhesión presentada fue debida a las características de porosidad así como a la rugosidad de la superficie

que permitió el anclaje de las células y la distribución de tamaño de poro que condujo a la penetración de las células dentro de la estructura porosa del andamio.

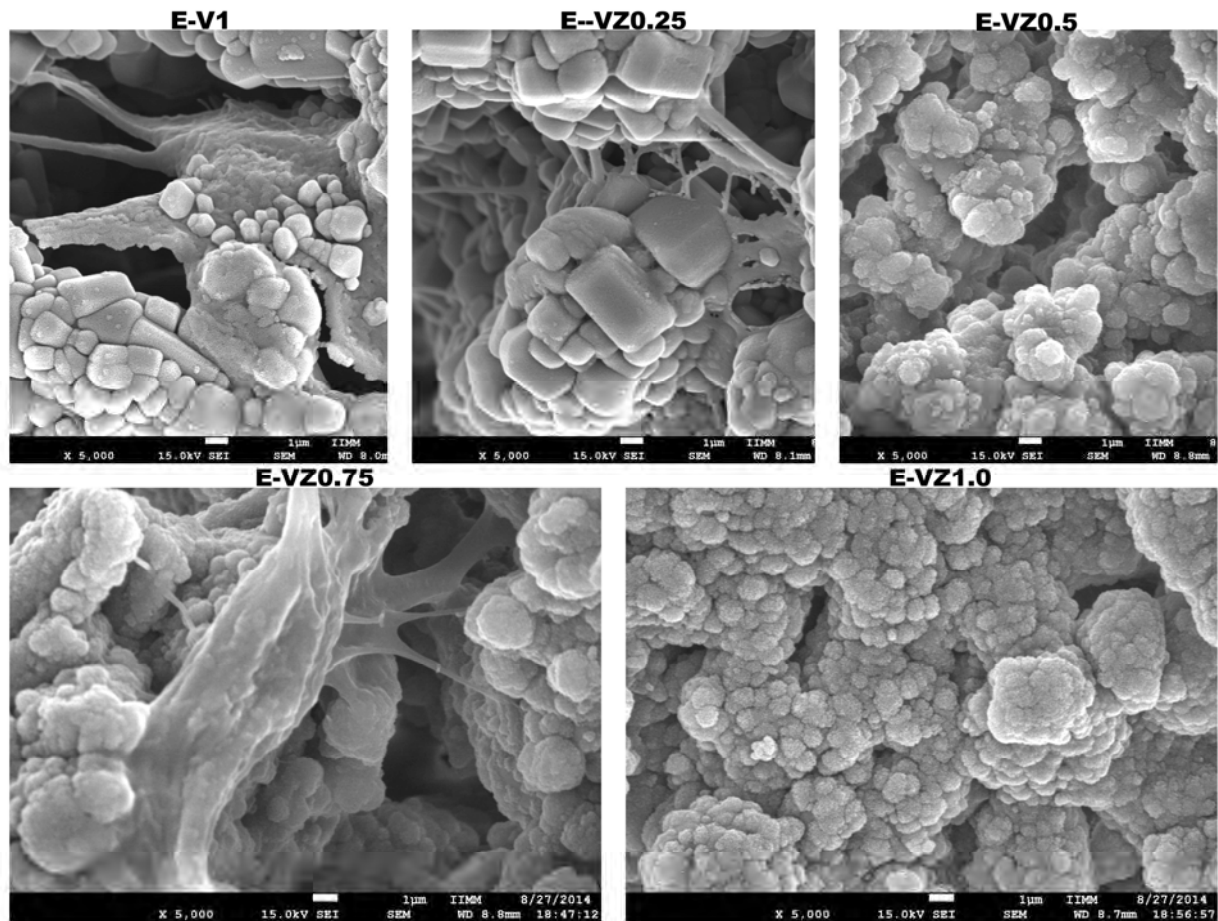


Figura 4.35 Micrografías de FE-SEM de los andamios después de 3 días en medio de cultivo celular de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, EVZ0.75 y E-VZ1.0.

Se realizó la cuantificación de la adherencia celular tal y como se puede observar en la Figura 4.36, en donde se obtuvo que a mayor cantidad de zirconia la respuesta celular también fue mayor debido a que la zirconia aumenta la rugosidad superficial, mejorando el anclaje en la superficie de los andamios, lo que concuerda con los resultado de Walled y col. [169].

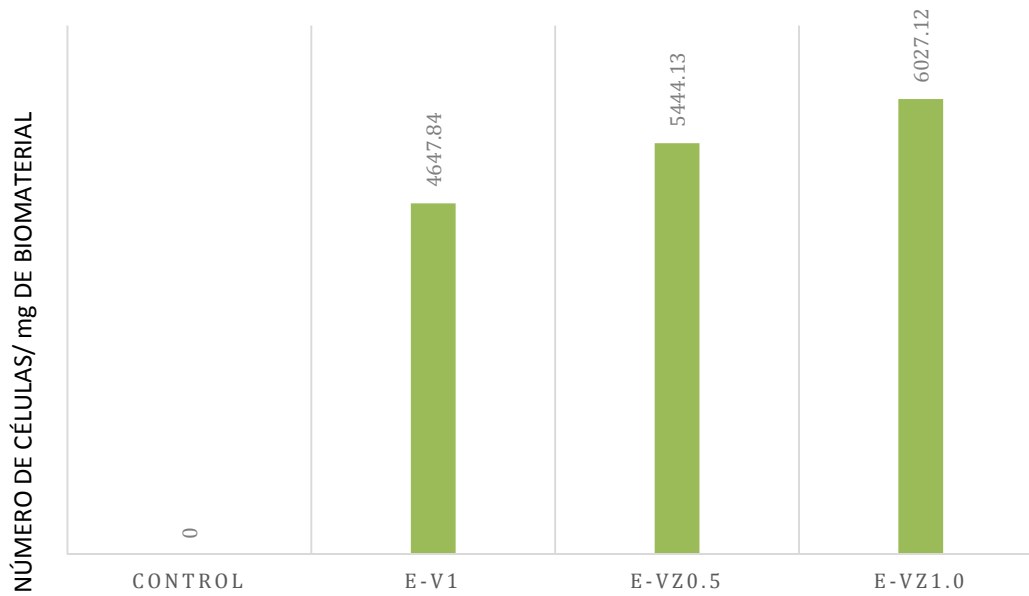


Figura 4.36 Cuantificación de adherencia celular MC3T3-E1 al día 3 de los andamios E-V1, E-VZ05 y E-VZ1.0

En un estudio realizado por Kenapfel y col. [170] se observó que el tamaño de poro en los andamios es crucial para que pueda darse una fijación adecuada de las células. En otro estudio llevado a cabo por los mismos autores realizaron estudios con modelos caninos, con tamaños de poro menores a 50 y hasta 800 μm , observaron que la fuerza de fijación de las células incrementaba para tamaños de poro menores a 100 μm . Sin existir ninguna relación entre el tamaño de poro y la fuerza de fijación para los poros mayores a 150 μm .

Por otro lado, Mastrogiacomo y col. [171] llegaron a la conclusión de que el tamaño de poro y a la interconectividad determinaban la osteoconductividad de los biocerámicos estudiados, ya que ambos se consideran aspectos fundamentales para que pueda formarse el nuevo tejido óseo haciendo la superficie adecuada para una buena adhesión celular y crecimiento del nuevo tejido, además, la interconectividad de los poros provee a la célula las condiciones necesarias para la distribución y migración de las mismas así como la formación de vasos sanguíneos y la posibilidad de remodelación del tejido óseo en el futuro.

En el presente estudio, las células exhibieron excelente adhesión y proliferación para los diferentes tiempos de cultivo (7, 14, 21 y 28) donde se aprecia mejor la formación de la HA con morfología tipo flor en la superficie de los andamios (Figura 4.37, y 4.38), se puede observar la diferencia significativa en la formación de HA a un tiempo de 28 días, en las composiciones V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0, donde se observa la precipitación de HA en cantidades mayores, mientras que en los andamios con composiciones E-VZ0.25 y E-VZ0.75 sólo se puede ver la adherencia celular sin formación de HA (Figura 4.39).

De acuerdo a estudios hechos por Ning y Zhou [172] la adhesión se debe a la extensión de células hasta estar un contacto una con otra y cubrir por completo la superficie de los andamios de fosfato tricálcico, sin embargo, la falta de formación de HA lo atribuyen a la falta de porosidad de las muestras provocando la falta de osteoconducción en el material.

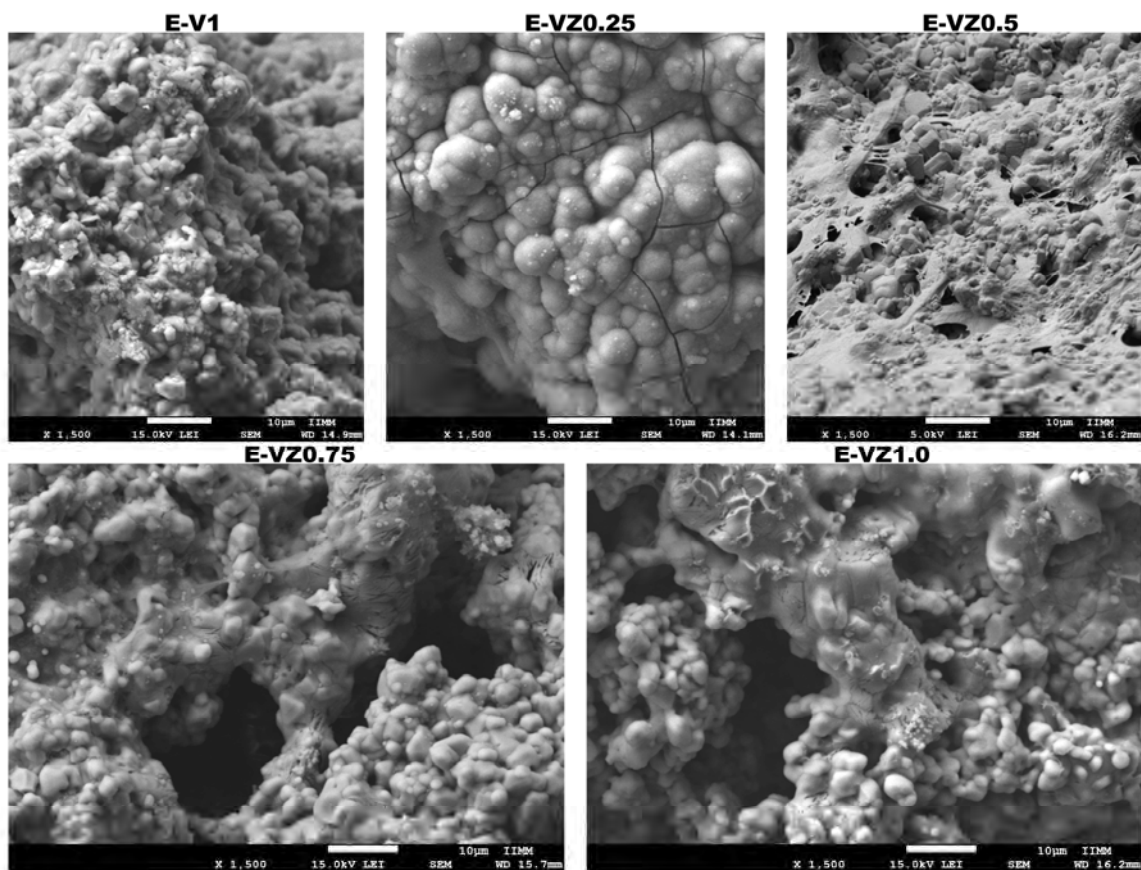


Figura 4.37 Muestra el cultivo celular de los andamios E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-VZ1.0 a 7 días.

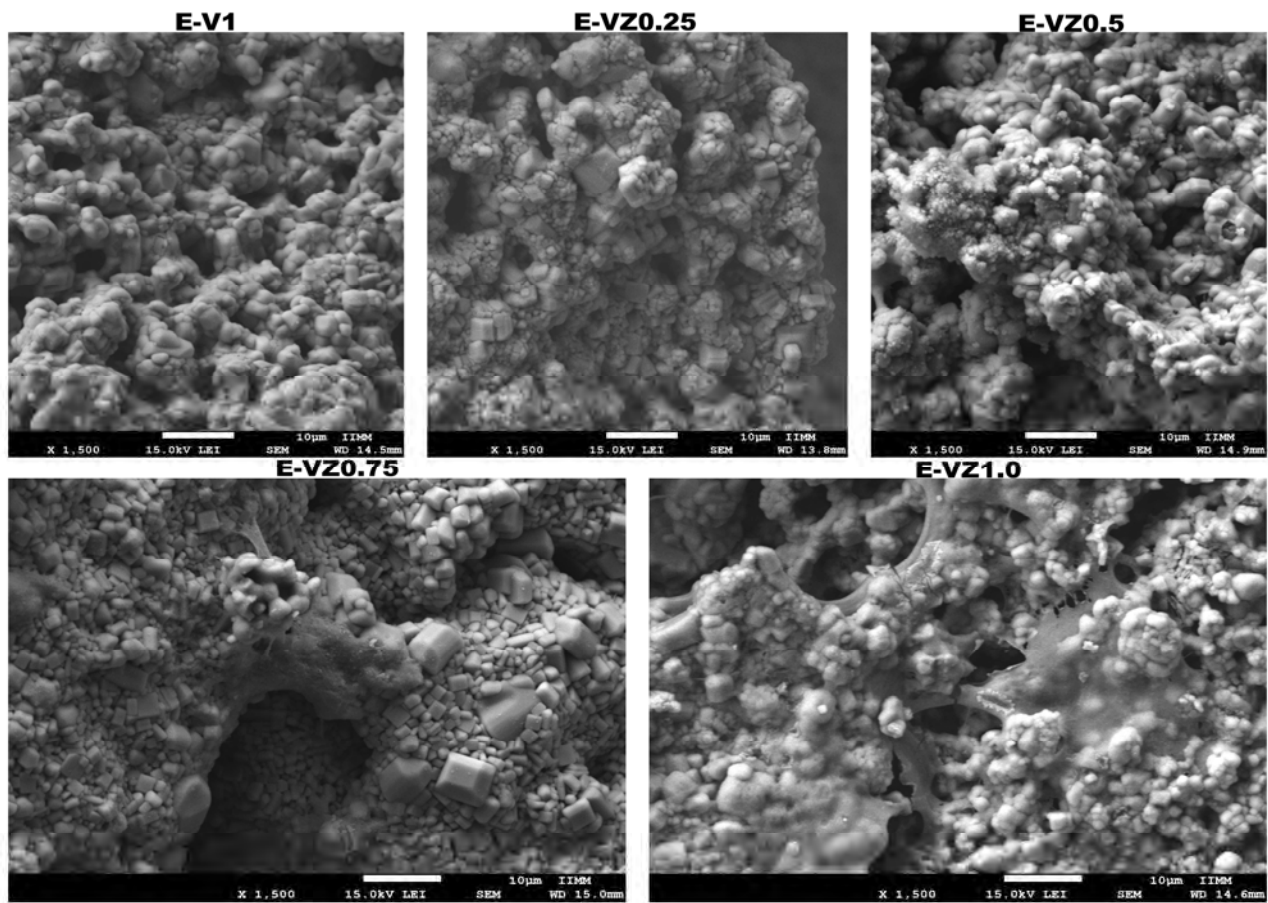


Figura 4.38 Muestra imágenes de FE-SEM a 21 días de cultivo celular de los andamios con 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 de zirconia.

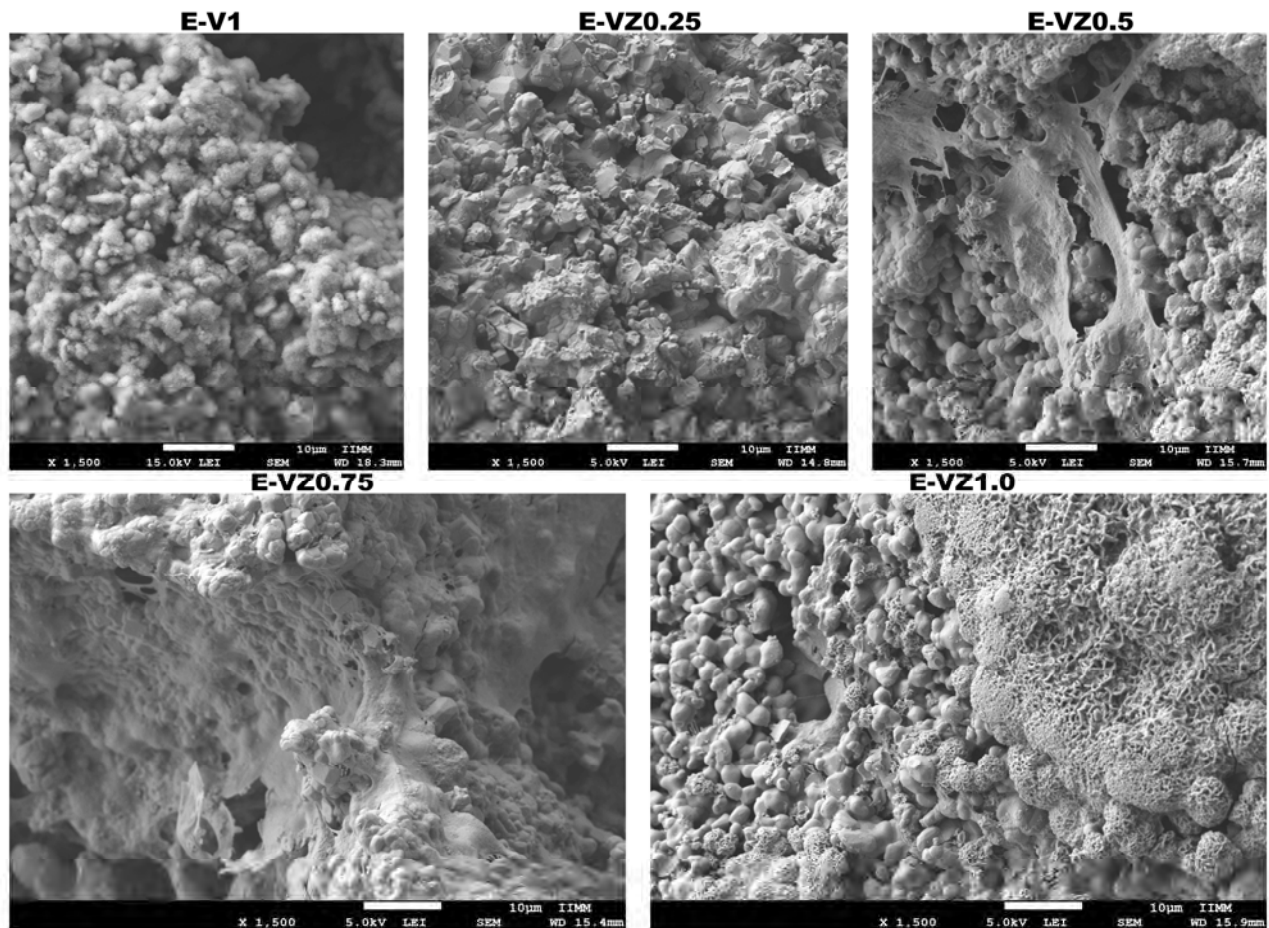


Figura 4.39 Imágenes de FE-SEM donde se observa la formación de HA a 28 días de cultivo en los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 principalmente, en cambio en E-VZ0.25 y E-VZ0.75 se observa adherencia celular.

Murphy y col.[173] realizaron un estudio en donde observaron el efecto del tamaño de poro de los andamios y como éste influía en la adhesión celular, de los resultados concluyeron que el tamaño óptimo de poro debe estar en el rango de 100 a 150 μm , ya que la viabilidad celular es gobernada por el área superficial para que pueda darse la unión entre la célula y el biomaterial. Al incrementar la viabilidad celular disminuía el tamaño de poro debido a que ya no había espacios huecos o poros donde se depositaran las células. Sin embargo, el tamaño óptimo para la adherencia celular dependerá del tipo de línea celular utilizada en los ensayos. Por otro lado, Teixeira y col. [174] concluyeron que la porosidad interconectada es primordial ya que ofrece sitios para que se pueda dar la adhesión celular y permitir el paso de los nutrientes y las moléculas de transporte, los filopodios de la célula se adhieren fuertemente en cada poro que es casi imposible despegarlos,

estos filopodios cada vez se extienden para ir cubriendo toda el área superficial del andamio y puedan seguir proliferando.

En la Figura 4.40 se resumen las fases observadas de adherencia y proliferación en los andamios de fosfato tricálcico reforzados con biovidrio base fosfato; a los 7 días se observó que la estructura del andamio fue alisando las aristas, para después empezar con la formación parcial de HA en la superficie del andamio, a los 14 días la superficie ya presentaba pequeños precipitados y finalmente a partir de 21 días se empezó a precipitar la estructura tipo flor o coliflor.

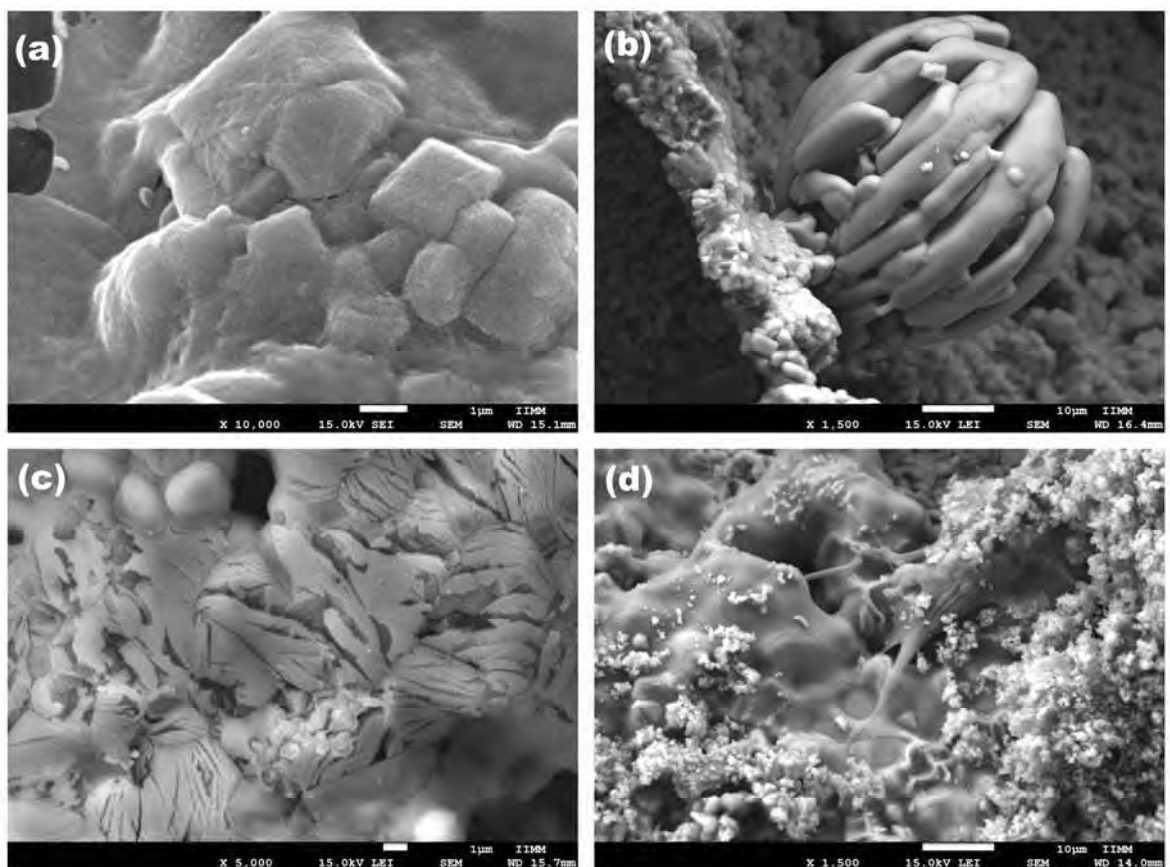


Figura 4.40 Imágenes de FE-SEM donde se observa el proceso de formación de la HA en los andamios: (a) adherencia celular de la célula MC3T3-E1 sobre la superficie del andamio E-VZ1.0 a partir de los 3 días en cultivo celular, (b) formación de pequeñas esferas en la superficie a los 7 días, (c) la superficie empieza a presentar estructuras aciculares típicas de la HA después de los 14 días y finalmente (d) empieza la precipitación de HA en toda la superficie del andamio a 21 días.

4.5.2 Proliferación celular

Los experimentos de proliferación celular se realizaron en las muestras E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0, ya que son las muestras con mejores características estructurales, químicas y morfológicas de la Figura 4.41 se observa que en las tres composiciones se presentó proliferación de las células MC3T3-E1, sin embargo hay una diferencia significativa en el incremento de la fase exponencial en las muestras con zirconia (E-VZ0.5 y E-VZ1.0), ya que en las muestras sin zirconia (E-V1) la concentración celular máxima ocurrió a 7 días mientras que en los andamios con zirconia mostraron máxima concentración después de 3 días de cultivo.

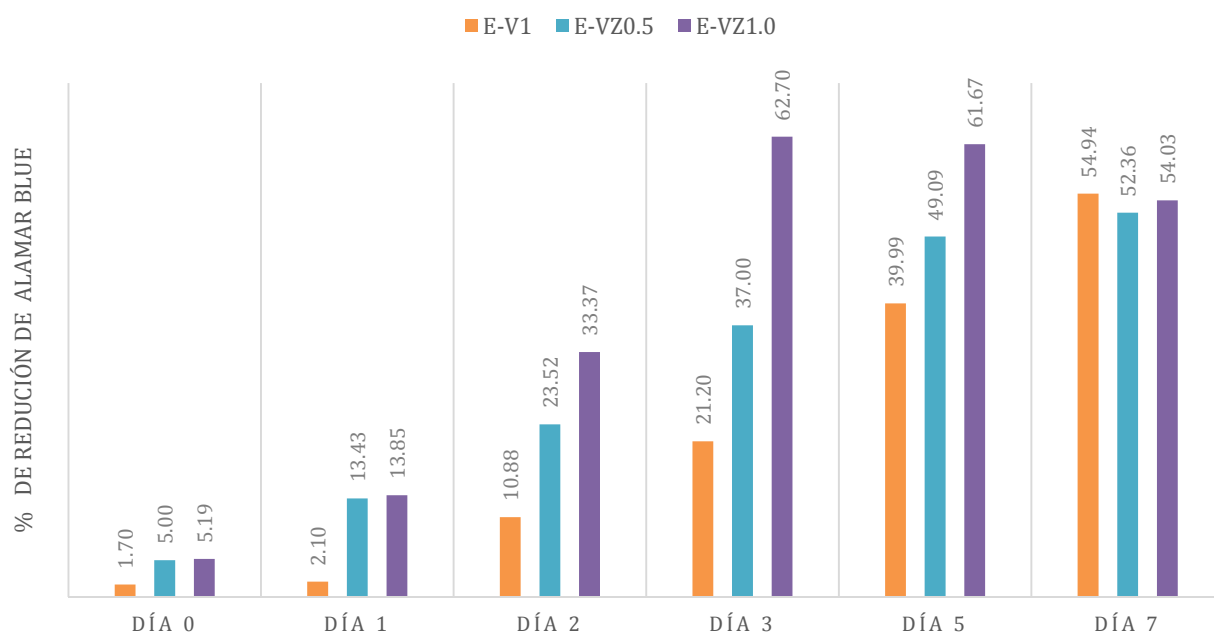


Figura 4.41 proliferación celular de MC3T3-E1 subclona 4 en los andamios de composición E-V1, EVZ0.5 y EVZ1.0 en función del tiempo de cultivo.

Fu y col. [175] realizaron andamios de HA donde mostraron que después de 6 días de incubación de las células MC3T3-E1 triplicaron el número inicial de sembrado, mientras tanto Murphy y col. [173] empleando andamios de colágeno mezclados con glicosaminoglicanos y por otro lado Cao y col.[176] usaron platos de cultivo para proliferar las células para ser empleadas en modelos animales, donde ambos experimentos explicaron que el tamaño de poro afecta al anclaje celular de la célula MC3T3-E1 y por lo tanto a la proliferación.

Ellos encontraron que un tamaño de poro promedio de 325 μm facilitó ampliamente el número de células en comparación con tamaños de poro entre 85 y 190 μm , además después de 48 h observaron que el 62% de las células ya se habían anclado a toda la superficie del andamio lo que ayudó a que se diera un aumento en el número de células.

4.5.3 Actividad Relativa de Alcalino Fosfatasa (ALP)

La Figura 4.42 representa los resultados encontrados de ALP como una de las enzimas asociadas a la membrana celular, ya que se sabe que la fosfatasa alcalina está estrechamente asociada con la diferenciación osteoblástica, regulando el metabolismo de fosfatos y disminuyendo localmente los inhibidores del crecimiento de apatita tal y como han reportado en algunos estudios [177,178], la cual se utilizó como marcador durante la diferenciación osteoblástica y se detectó a partir del día 7, sin embargo, a 14 días las células en el andamio expresaron la actividad de la fosfatasa alcalina a un nivel mayor que se puede atribuir a una mayor cantidad de iones Ca que fueron liberados lentamente por el andamio, generando un ambiente de pH estable (ver la Fig. 4.26) y que permitió estimular una mayor respuesta celular en concordancia con lo encontrado por Ramaswamy y col. [179].

Los datos encontrados en esta investigación permiten rectificar que hubo proliferación celular y diferenciación osteogénica durante los periodos de 7 y 14 días, donde la zirconia tuvo un efecto significativo en la proliferación celular, ya que el efecto de la zirconia ayuda a la modificación de la superficie del andamio permitiendo que exista una mejor adhesión celular, etapa crucial para posteriormente pueda llevarse la proliferación celular.

De acuerdo a lo reportado por Somacal y col. [180] no se ha llegado a una aprobación en la literatura sobre si el tamaño de poro promueve una mejor osteoconducción, pero se ha establecido que el crecimiento óseo se produce cuando el poro es lo suficientemente grande para albergar las células y el sistema del flujo sanguíneo.

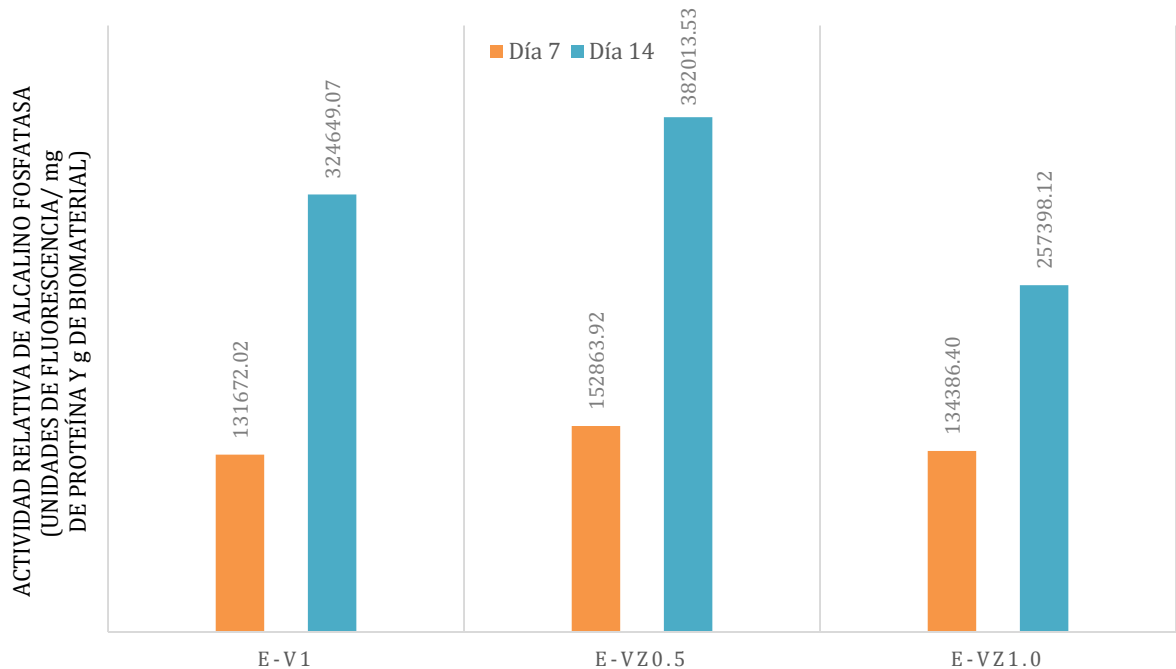


Figura 4.42 ALP a 7 y 14 días de cultivo de los andamios con composiciones E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0

Por otro lado, Kasten y col. [146] sugieren que no solo la porosidad y el tamaño de poro tienen gran influencia sino que además la producción de proteínas que se puede ver a partir de la actividad de alcalina fosfatasa la cual es muy importante para la diferenciación osteogénica.

Los andamios deben de imitar no sólo la morfología, estructura y la función del hueso sino además ser osteoconductivos, osteoinductivos para regenerar el tejido óseo. Un parámetro que es independiente del material es la porosidad o el porcentaje de espacio vacío del sólido. Los poros son completamente necesario para la formación del tejido óseo porque permiten la migración y proliferación de los osteoblastos y también las células mesenquimales. Existe una discrepancia entre cual es el mejor tamaño de poro, sin embargo, la mayoría dicen que está entre los 50 y 100 μm . Los tamaños de poro pequeños solamente están dentro del tejido osteoide no mineralizado e incluso se ha observado que esos poros tan pequeños solamente son penetrados por tejido fibroso así como a tamaños de poros mayores, es decir, a 510 μm se produce una rápida resorción del cerámico y una menor formación de hueso.

Kasten y col. [146] resumieron todo lo anterior en que la porosidad es benéfica para la producción de proteínas pero no influencia la diferenciación osteogénica, es decir, que grandes porosidades

no son necesarias para que se produzca una cantidad alta de ALP. Sin embargo, la distribución de tamaño de poro y la porosidad juegan un papel importante en la diferenciación osteogénica.

Liu y col. [181] concluyeron a partir de los resultados de la fosfatasa alcalina que existe una menor proliferación de las células en muestras en forma de polvos de fosfato tricálcico fase beta y HA después de 7 días de cultivo. Otros investigadores como Wan Kim y col. [182] mostraron resultados donde estos dos compuestos inhiben los efectos de crecimiento de los osteoblastos pero promueven la diferenciación, no se tiene muy claro los efectos en cuanto al tamaño de partícula del compuesto. Sin embargo, la actividad de los macrófagos se ve más marcada en los cementos óseos que están compuestos principalmente de fosfatos de calcio y éstos ayudan a estimular los osteoclastos y la actividad de la reabsorción del hueso.

Se han reportado resultados clínicos de materiales de fosfato de calcio a partir de los cuales se puede concluir que el efecto de la composición química del material así como una gran cantidad de factores biológicos influyen en la formación del nuevo hueso. En cambio Wang y col. [183] encontraron que el incremento de la actividad de ALP en andamios hechos de fosfato de calcio/quitosano en cultivos de células MC3T3-E-1 fue mayor a medida que pasa el tiempo hasta llegar a 14 días.

Los valores reportados de proliferación celular en andamios porosos de fosfato tricálcico fase beta y vidrio bioactivo base fosfato mostraron el doble de proliferación celular con respecto al control en un tiempo menor (Figura 4.42), lo que sugiere que los andamios tienen las características de distribución, tamaño, morfología, interconectividad y forma de poros, que permitieron que las células se anclaran y después proliferaran en los andamios.

4.5.4 Colágeno

El colágeno es la proteína más común en el cuerpo y proporciona resistencia y estabilidad estructural en los tejidos, incluyendo la piel, los vasos sanguíneos, tendones, cartílagos y huesos. Al igual que la HA, el colágeno es uno de los dos componentes principales del hueso y tiene un potencial característico en el cultivo de las células para la formación de hueso [50].

En la Figura 4.43 se muestran los resultados para la tinción roja de Sirius usada para la medición de colágeno que permitió observar que no hubo un cambio significativo de colágeno del día 3 al día 7, lo que sugiere que se deposita una nueva matriz y empieza la mineralización.

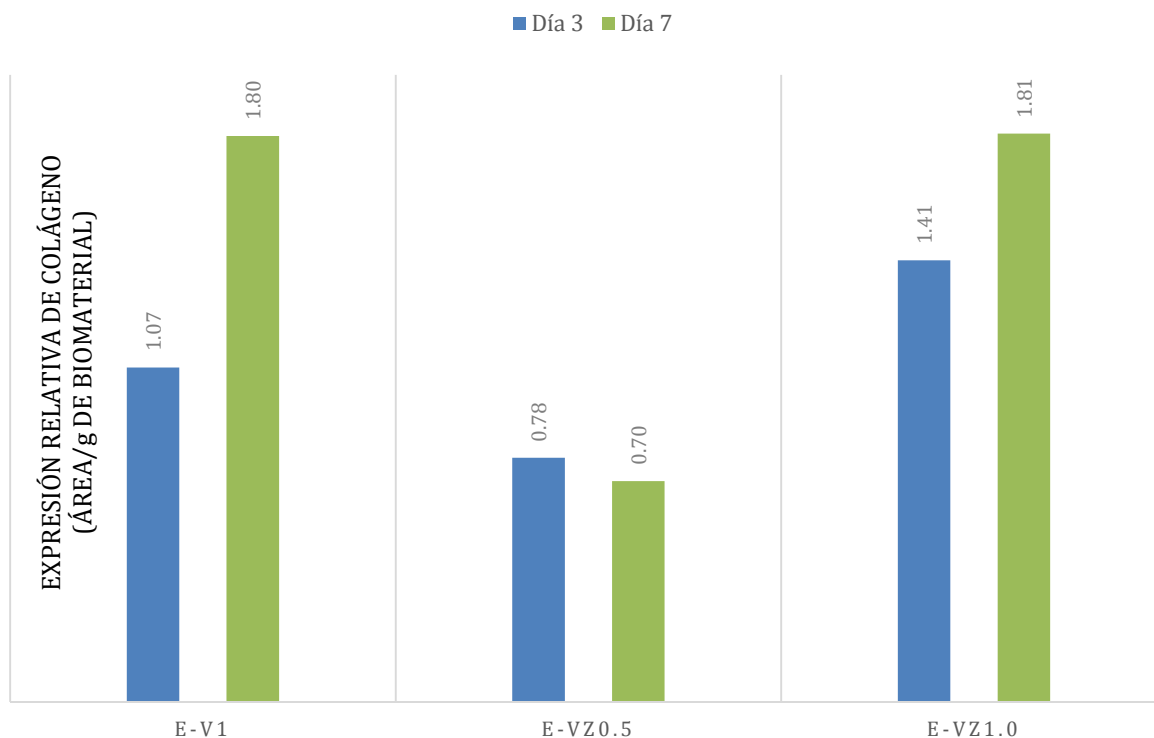


Figura 4.43 Muestra la cantidad de colágeno formado a 3 y 7 días, respectivamente.

El análisis de la cuantificación de colágeno formado por las células MC3T3-E1 en los andamios se realizó debido a que el colágeno es uno de los marcadores osteoblásticos más importantes en la regeneración ósea, ya que los osteoblastos sintetizan las proteínas colágenas, para continuar con la formación de las fibrillas que darán como resultado la matriz extracelular a partir del día 7 en el proceso natural de regeneración ósea, sin embargo en todas las muestras se observó que a partir del día 3 hubo la formación de colágeno, lo que indicó que las células osteoblásticas MC3T3-E1 estaban en el proceso de regeneración ósea produciendo colágeno en tiempos menores.

4.5.5 Mineralización

La deposición de cristales de calcio, debido que la combinación de los mismos provocan la formación de nódulos con un engrosamiento de la matriz extra celular que se produce en mayor cantidad a mayor cantidad de zirconia, lo que produjo una mayor cantidad de calcio por contenido de ADN.

La mineralización requiere la concentración crítica tanto de calcio como de fósforo, en donde se ha visto que la concentración de fósforo se alcanza de manera eficiente ya que la fosfatasa alcalina es capaz de desfosforilar (remover grupos fosfatos) las moléculas que contienen fósforo en la capa de la apatita formada, a partir del día 7 se produjo el aumento la concentración de fósforo requerida para iniciar la mineralización tal y como se observa en la Figura 4.44.

De acuerdo a Gough y col. [185] obtuvieron que en andamios de vidrio bioactivo 45S5 los osteoblastos primarios se unieron, propagaron, proliferaron y formaron nódulos mineralizados cuando realizaron el cultivo celular en andamios porosos tal y como se muestra en el presente estudio como se puede ven en la Figura 4.45.

Los resultados reportados en la presente investigación muestran la formación de la fase mineral que se produce más rápido en los andamios que en el control, lo que demuestra que los andamios que contienen zirconia tienen la capacidad para causar mayor mineralización osteoblástica, esto es muy importante ya que existen materiales para la regeneración ósea en donde son biocompatibles pero a menudo requieren la adición de factores de crecimiento y otros agentes para mejorar las respuestas celular, sin embargo, en las muestras obtenidas en la presente investigación se puede observar que sin la adición de ningún agente extra se obtuvo una respuesta celular que permite observar la mineralización en donde la zirconia juega un papel crucial ya que a mayor contenido de zirconia mayor formación de nódulos mineralizados.

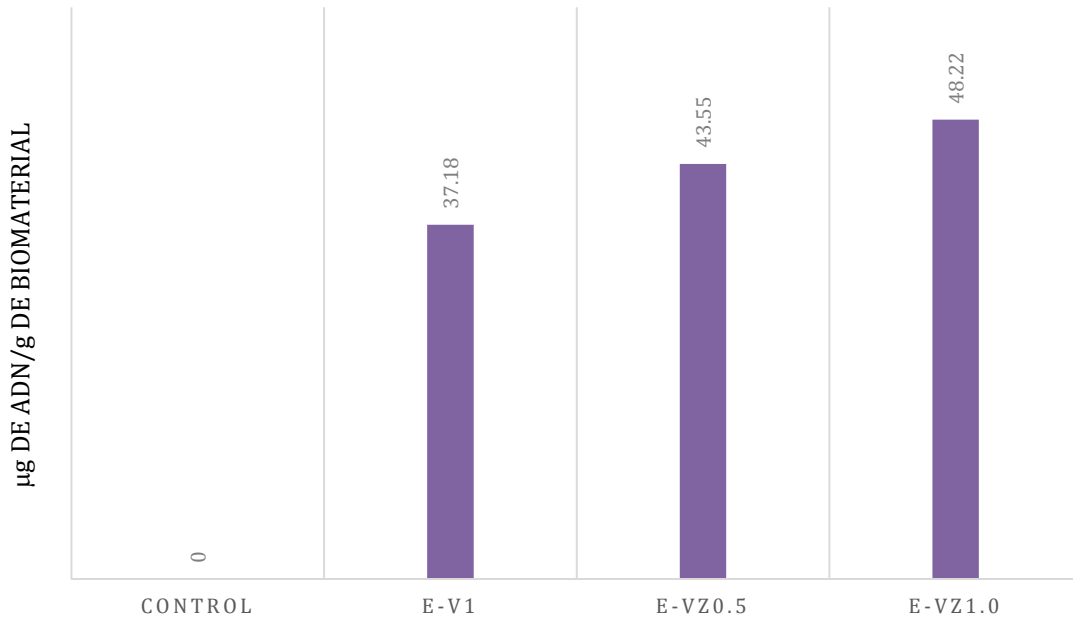


Figura 4.44 Contenido de ADN en los andamios E-V1, E-VZ0.5 y E-VZ1.0 a 7 días de cultivo celular.

CAPÍTULO V

Conclusiones

En el presente estudio se examinó la influencia de la zirconia en la respuesta biológica, propiedades mecánicas y físico-químicas en las espumas de matriz de fosfato tricálcico beta reforzado con biovidrio con base fosfato, llegando a las siguientes conclusiones:

1. Se realizaron cinco composiciones diferentes E-V1 E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 y E-1.0, en donde los mejores resultados se presentaron en las espumas E-V1, E-VZ0.5 y VZ1.0 en relación a sus propiedades mecánicas, ya que presentaron valores de resistencia a la compresión de 0.9 hasta 2 MPa, asociado con el volumen de porosidad total que se encontró en un rango de 68-80%.
2. Todas las muestras presentaron tamaños de poros entre 40-300 μm , y una distribución muy amplia de diámetro de poro (1.5-300 μm) necesario para la regeneración ósea del nuevo tejido.
3. Las fases cristalinas obtenidas en los andamios por medio de difracción de rayos X fueron $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ y $\text{Na}_3(\text{PO}_4)$ en todos los vidrios, esto indicó el proceso de cristalización del mismo durante la sinterización de los andamios, además que la zirconia se estaba incorporando a la red, tanto del fosfato tricálcico como del vidrio formando nuevas fases CaZrO_3 y ZrP_3O_7 .

4. Todas las composiciones (E-V1, E-VZ0.25, E-VZ0.5, E-VZ0.75 Y E-VZ1.0) mostraron características favorables de bioactividad formando hidroxiapatita, aunque algunas con una reacción de formación más rápida debido a la porosidad que presentaron, principalmente en aquellas que tenían tamaños de poro más grandes o cercanos a las a 300 μm ; sin embargo eso llevó a una disolución mayor del andamio.
5. Se obtuvo la fase de hidroxiapatita carbonatada después de que los andamios fueran inmersos en SBF por un tiempo de 7 días mostrando una relación $\text{Ca/P} = 2$ que a partir de los 14 días se equilibró en rangos de 1.66 hasta 1.8. El FTIR permitió corroborar los grupos funcionales de las fases formadas después de que las espumas fueron sumergidas en SBF a diferentes tiempos (7, 14, 21 y 28 días) mostrando longitudes de onda de 1382, 1214 y 452 cm^{-1} características del grupo CO_3^{2-} y a 3422 cm^{-1} grupos OH^- así como grupos funcionales del fosfato tricálcico beta desde 900-1200 cm^{-1} . Los andamios de β -TCP reforzado con vidrio base fosfato se comporta como un material bioactivo en SBF y soluble, debido a la formación apatita en la superficie de la espuma y la disolución de los mismos evidencias presentadas por ICP.
6. El pH de la solución en SBF se incrementó hasta valores cercanos a 8 durante los ensayos *in vitro*.
7. La adhesión celular y proliferación fue confirmada en todos los andamios, sin embargo en aquellos que no contenían zirconia presentaron una máxima concentración de células después de 7 días en cultivo celular, en cambio los andamios con zirconia mostraron un mayor número de células con un máximo después de 3 días de cultivo, y mostrando HA con morfología tipo coliflor.
8. La enzima alcalino fosfatasa (ALP), el análisis de colágeno y de mineralización mostraron que los osteoblastos primarios se unieron, propagaron, proliferaron y formaron nódulos mineralizados en los andamios E-V1, EVZ0.5 y E-VZ1.0 teniendo mejores resultados las muestras con zirconia debido a que modifican la superficie generando un mejor anclaje celular.
9. A partir de los ensayos de proliferación celular se observó el efecto de la zirconia presente en la composición de los andamios, que permitió un mejor anclaje y proliferación celular en tiempos menores que los reportados en la literatura.

10. Considerando que todos los andamios mostraron excelentes resultados de microestructura y bioactividad, se puede concluir que tienen un gran potencial para ser usados para la Ingeniería de tejido óseo.

Recomendaciones

Dentro de un proyecto tan ambicioso como fue éste, siempre se desea que haya una mejora continua y para esto es necesario tomar una serie de recomendaciones en el manejo de los andamios durante la fabricación de los mismos en algunas de las etapas, la primera recomendación es después del espumado, ya que es necesario cuidar el desmoldeo de la espuma evitando que se dañe y esto se logra mediante la adición de una capa de esterato de sodio lo suficientemente abundante en los moldes donde se elaboran las espumas, otra recomendación que es importante hacer el maquinado de la espuma antes de la etapa de pirólisis y sinterizado, ya que tiene suficiente resistencia que permite eliminar el ligante excedente que tapa los poros del andamio, de ser posible sería mejor usar láser para un mejor control de la eliminación de la resina excedente formada en andamio sin tener que dañarlo o incluso provocar la formación de tensiones en el material y que provoquen en un futuro el fallo del andamio.

Otra recomendación sería incluir el análisis del polvo de la zirconia en SBF a diferentes tiempos para ver el comportamiento del mismo, ya que existen antecedentes que han mostrado que es bioactiva pero algunos investigadores han presentado controversias con respecto a este punto.

Por último, sería recomendable la adición de zirconia al vidrio en mayores cantidades que las reportadas en la presente investigación para que permita entender mejor el efecto de la zirconia en el comportamiento químico-mecánico de los andamios.

Trabajo a futuro

Esta investigación tiene una metodología experimental que permite hacer varias modificaciones principalmente en la fabricación de la espuma, ya que el método de metalurgia de polvos no permite tener control en el tamaño y distribución de poro, una alternativa eficaz sería usar la impresión en 3D para la fabricación de andamios porosos.

La microtomografía es una técnica eficaz en el análisis de la porosidad de los andamios, sin embargo, para complementar el estudio de porosidad es necesario realizar un análisis en porosímetro de mercurio, para obtener la cantidad de poros menores a 10 μm .

Sería interesante analizar los andamios en cultivos celulares con diferentes líneas celulares de osteoblastos, para entender mejor el proceso de la producción de la ALP así como el proceso de proliferación, osteoconducción y osteoinducción que se produce en los andamios.

Por último, en la parte *in vivo*, los andamios tienen que ser probados en modelos animales (chinchillas o conejos), seleccionando hembras y machos en cantidades por igual del total de ejemplares, para analizar el efecto que tiene el sexo, edad o incluso la alimentación del animal en la regeneración celular.

Referencias

- [1] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate bioceramics," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 10, pp. 13913–13966, Dec. 2015.
- [2] L. Wang and G. H. Nancollas, "Calcium orthophosphates: Crystallization and Dissolution," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 11, pp. 4628–4669, 2008.
- [3] S. V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art," *J. Funct. Biomater.*, vol. 1, no. 1, pp. 22–107, Nov. 2010.
- [4] J. R. Jones, "Review of bioactive glass: From Hench to hybrids," *Acta Biomater.*, vol. 9, pp. 24457–4486, 2015.
- [5] M. Mazaheri, N. Eslahi, F. Ordikhani, E. Tamjid, and A. Simchi, "Nanomedicine applications in orthopedic medicine: state of the art.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, no. 1, pp. 6039–53, Jan. 2015.
- [6] M. A. Fernandez-Yague, S. A. Abbah, L. McNamara, D. I. Zeugolis, and M. J. Biggs, "Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 84, pp. 1–29, 2015.
- [7] G. Rajkumar, S. Aravindan, and V. Rajendran, "Structural analysis of zirconia-doped calcium phosphate glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 356, no. 28–30, pp. 1432–1438, Jun. 2010.
- [8] E. EI-Meliegy and R. Noort, *Glasses and Glass Ceramics for Medical Applications*. 2011.
- [9] N. Li and R. Wang, "Macroporous sol–gel bioglasses scaffold with high compressive strength, porosity and specific surface area," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 8, pp. 6889–6893, Dec. 2012.
- [10] H. Yuan, K. D. E. Groot, and I. Sa, "Calcium phosphate biomaterials: an overview," *NATO Sci. Ser. II Math. Phys. Chem.*, vol. 171, pp. 37–57, 2005.
- [11] S. V Dorozhkin, "Bioceramics of calcium orthophosphates.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1465–85, Mar. 2010.
- [12] I. V. Antoniac, *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. 2016.
- [13] Y. Tanimoto and N. Nishiyama, "Preparation and physical properties of tricalcium phosphate laminates for bone-tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 85, no. 2, pp. 427–433, 2008.
- [14] M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, and A. Hoshikawa, "Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction," *J. Solid State Chem.*, vol. 175, no. 2, pp. 272–277, 2003.
- [15] K. Lin, L. Chen, H. Qu, J. Lu, and J. Chang, "Improvement of mechanical properties of macroporous β -tricalcium phosphate bioceramic scaffolds with uniform and interconnected pore structures," *Ceram. Int.*, vol. 37, no. 7, pp. 2397–2403, Sep. 2011.
- [16] P. Ducheyne, K. Healy, D. E. Hutmacher, D. W. Grainger, and C. J. Kirkpatrick,

Comprehensive Biomaterials, no. V1. Elsevier Science, 2015.

- [17] I. Y. Kim, K. Koichi, and C. Ohtsuki, "Hydroxyapatite formation through dissolution-precipitation reaction: Effects of solubility of starting materials," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 9 PART A, pp. 14385–14390, 2014.
- [18] S. V Dorozhkin, "Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates.," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 3, pp. 963–77, Mar. 2012.
- [19] B. Ben-nissan, *Advances in Calcium Phosphate Biomaterials*, vol. 2. 2014.
- [20] S. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates," *J. Mater. Sci.*, vol. 42, pp. 1061–1095, 2007.
- [21] L. L. Hench, "The story of Bioglass," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 17, pp. 967–978, 2006.
- [22] D. Bellucci, A. Sola, and V. Cannillo, "Bioactive glass-based composites for the production of dense sintered bodies and porous scaffolds.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 4, pp. 2138–51, May 2013.
- [23] M. Vallet-Regí, "Evolution of bioceramics within the field of biomaterials," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 13, no. 1–2, pp. 174–185, Jan. 2010.
- [24] J. M. Navarro Fernandez, *El vidrio*, vol. 1. 2003.
- [25] A. Neel, A. Ensanya, D. M. Pickup, S. P. Valappil, R. J. Newport, and J. C. Knowles, "Bioactive functional materials: a perspective on phosphate-based glasses," *J. Mater. Chemistry*, vol. 19, pp. 690–701, 2009.
- [26] I. Ahmed *et al.*, "The structure and properties of silver-doped phosphate-based glasses," *J. Mater. Sci.*, vol. 42, no. 23, pp. 9827–9835, 2007.
- [27] N. J. C. and J. W. Nicholson, "EiC November 2006 - Feature - Glass bones," *Royal Society of Chemistry*, 2006. [Online]. Available: <http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2006Nov/GlassBones.asp>.
- [28] G. Kaur, O. P. Pandey, K. Singh, D. Homa, B. Scott, and G. Pickrell, "A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 1, pp. 254–274, 2014.
- [29] A. Balamurugan, G. Balossier, S. Kannan, J. Michel, A. H. S. Rebelo, and J. M. F. Ferreira, "Development and in vitro characterization of sol-gel derived CaO–P₂O₅–SiO₂–ZnO bioglass," *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 2, pp. 255–262, 2007.
- [30] E. Gentleman *et al.*, "The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro," *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3949–3956, 2010.
- [31] V. Miguez-Pacheco *et al.*, "Development and characterization of lithium-releasing silicate bioactive glasses and their scaffolds for bone repair," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 432, Part , pp. 65–72, 2016.
- [32] S. J. Watts, R. G. Hill, M. D. O'Donnell, and R. V Law, "Influence of magnesia on the structure and properties of bioactive glasses," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 356, no. 9–10, pp. 517–524, 2010.
- [33] S. Di Nunzio *et al.*, "Silver containing bioactive glasses prepared by molten salt ion-

- exchange,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 24, no. 10–11, pp. 2935–2942, 2004.
- [34] E. Vernè *et al.*, “Surface characterization of silver-doped bioactive glass,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 25, pp. 5111–5119, 2005.
- [35] C. Stähli, M. James-Bhasin, A. Hoppe, A. R. Boccaccini, and S. N. Nazhat, “Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass® on 3D endothelial cell morphogenesis,” *Acta Biomater.*, vol. 19, pp. 15–22, 2015.
- [36] L. A. Haro Durand *et al.*, “In vitro endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive glass in the SiO₂-CaO-P₂O₅-Na₂O system,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 43, pp. 7620–7630, 2014.
- [37] I. M. Asif, R. M. Shelton, P. R. Cooper, O. Addison, and R. A. Martin, “In vitro bioactivity of titanium-doped bioglass,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 25, no. 8, pp. 1865–1873, 2014.
- [38] A. K. Hassan, H. Kamal, M. Aboelez, and S. Labeeb, “Structural Investigations on Na₂O–CaO-V₂O₅-SiO₂ Bioglass Ceramics,” *Br. J. Appl. Sci. Technol.*, vol. 16, no. 3, pp. 1–9, 2016.
- [39] N. J. Lakhkar, I.-H. Lee, H.-W. Kim, V. Salih, I. B. Wall, and J. C. Knowles, “Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: role and controlled delivery from phosphate-based glasses,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 4, pp. 405–20, Apr. 2013.
- [40] R. Jayakumar *et al.*, “Fabrication of chitin–chitosan/nano ZrO₂ composite scaffolds for tissue engineering applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 3, pp. 274–280, 2011.
- [41] A. Alizadeh *et al.*, “Synthesis of calcium phosphate-zirconia scaffold and human endometrial adult stem cells for bone tissue engineering,” *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 44, no. 1, pp. 66–73, 2016.
- [42] Q. Z. Chen and A. R. Boccaccini, “Improved Mechanical Reliability of Bone Tissue Engineering (Zirconia) Scaffolds by Electrospraying,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 89, no. 5, pp. 1534–1539, 2006.
- [43] C. Mansur, M. Pope, M. R. Pascucci, and S. Shivkumar, “Zirconia-calcium phosphate composites for bone replacement,” *Ceram. Int.*, vol. 24, no. 1, pp. 77–79, 1998.
- [44] L. Fu, K. A. Khor, and J. P. Lim, “Yttria stabilized zirconia reinforced hydroxyapatite coatings,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 127, no. 1, pp. 66–75, 2000.
- [45] V. V Silva, R. Z. Domingues, and F. S. Lameiras, “Microstructural and mechanical study of zirconia-hydroxyapatite (ZH) composite ceramics for biomedical applications,” *Compos. Sci. Technol.*, vol. 61, no. 2, pp. 301–310, 2001.
- [46] A. Rapacz-Kmita, A. Ślósarczyk, and Z. Paszkiewicz, “Mechanical properties of HAp–ZrO₂ composites,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 26, no. 8, pp. 1481–1488, 2006.
- [47] J. Z. Yang, R. Sultana, X. Z. Hu, and P. Ichim, “Novel layered hydroxyapatite/Tri-calcium phosphate-zirconia scaffold composite with high bending strength for load-bearing bone implant application,” *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 22–30, 2014.
- [48] J.-W. Pöttgen-Raine, Hoffmann Rolg-Dieter, “Handbook of Ceramic Hard Materials,”

WILEY-VCH, 2004. [Online]. Available: <http://www.hardmaterials.de/index.html>.

- [49] S. Bose, M. Roy, and A. Bandyopadhyay, “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds,” *Trends Biotechnol.*, vol. 30, no. 10, pp. 546–54, Oct. 2012.
- [50] F. J. O’Brien, “Biomaterials & scaffolds for tissue engineering,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, 2011.
- [51] J. Dittmann, E. Koos, and N. Willenbacher, “Ceramic capillary suspensions: Novel processing route for macroporous ceramic materials,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 96, no. 2, pp. 391–397, 2013.
- [52] S. . S. B. K. J. Kundu, “Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications,” in *Tissue Engineering*, vol. 1, 2010, pp. 141–158.
- [53] K. J. . Burg, S. Porter, and J. F. Kellam, “Biomaterial developments for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2347–2359, Dec. 2000.
- [54] C. Simon Jr., “Biomaterials Group,” *National Institute of Standards and Technology*, 2016. [Online]. Available: <https://www.nist.gov/mml/bbd/biomaterials/scaffold-fabrication>.
- [55] P. Miranda, E. Saiz, K. Gryn, and A. P. Tomsia, “Sintering and robocasting of beta-tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications,” *Acta Biomater.*, vol. 2, no. 4, pp. 457–66, Jul. 2006.
- [56] M. Lee, J. C. Y. Dunn, and B. M. Wu, “Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 20, pp. 4281–9, Jul. 2005.
- [57] J. Tavares and N. Jorge, *Lecture Notes in Computational Vision and Biomechanics*. 2012.
- [58] J. S. Khurana, *Bone Pathology*, Second. USA: Humana Press, 2009.
- [59] T. Adachi, Y. Osako, M. Tanaka, M. Hojo, and S. J. Hollister, “Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 3964–72, Jul. 2006.
- [60] G. Bevill, “Micromechanical modeling of failure in trabecular bone,” vol. Ph.D. p. 183, 2008.
- [61] I. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, M. A. Alobera-Gracia, M. del-Canto-Pingarrón, and L. Blanco-Jerez, “Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue,” *Med. oral, Patol. oral y cirug??a bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 47–51, 2006.
- [62] E. E. Golub and K. Boesze-Battaglia, “The role of alkaline phosphatase in mineralization,” *Curr. Opin. Orthop.*, vol. 18, no. 5, pp. 444–448, 2007.
- [63] S. Serrano, “ESTRUCTURA Y FUNCION DEL HUESO [Dinamica],” *II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.*, 1998. [Online]. Available: <http://www.conganat.org/iicongreso/conf/018/dinamica.htm>.
- [64] J.-M. Delaisse, “The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation,” *Bonekey Rep.*, vol. 3, no. April, p. 561, 2014.
- [65] J. O. Hollinger, “An introduction to biomaterials.” November 28, 2011), p. 553, 2006.

- [66] M. Bohner and J. Lemaître, “Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 12, pp. 2175–2179, Apr. 2009.
- [67] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–15, May 2006.
- [68] H.-M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo, and T. Nakamura, “The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 1, no. 1, pp. 17–22, Nov. 2004.
- [69] J. a Juhasz, S. M. Best, A. D. Auffret, and W. Bonfield, “Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 4, pp. 1823–9, 2008.
- [70] X. Lu and Y. Leng, “Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 10, pp. 1097–108, Apr. 2005.
- [71] A. Rámila and M. Vallet-Regí, “Static and dynamic in vitro study of a sol–gel glass bioactivity,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 16, pp. 2301–2306, Aug. 2001.
- [72] M. Sadat-Shojai, M.-T. T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, “Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, Aug. 2013.
- [73] R. L. Reis and J. S. Román, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press, 2004.
- [74] G. M. Oliveira *et al.*, “PLD bioactive ceramic films: The influence of CaO-P₂O₅ glass additions to hydroxyapatite on the proliferation and morphology of osteoblastic like-cells,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 4, pp. 1775–1785, 2008.
- [75] S. Liu, W. Gong, Y. Dong, Q. Hu, X. Chen, and X. Gao, “The effect of submicron bioactive glass particles on in vitro osteogenesis,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 49, pp. 38830–38836, 2015.
- [76] K. C. Baker *et al.*, “Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 26, no. 8, pp. 1351–1360, 2006.
- [77] H. F. Greer, M.-H. Liu, C.-Y. Mou, and W. Zhou, “Dipole field driven morphology evolution in biomimetic vaterite,” *CrystEngComm*, vol. 18, no. 9, pp. 1585–1599, 2016.
- [78] I. R. Mary, S. Sonia, S. Viji, D. Mangalaraj, C. Viswanathan, and N. Ponpandian, “Novel multiform morphologies of hydroxyapatite: Synthesis and growth mechanism,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 361, no. November, pp. 25–32, 2016.
- [79] M.-G. Ma, “Hierarchically nanostructured hydroxyapatite: hydrothermal synthesis, morphology control, growth mechanism, and biological activity,” *Int. J. Nanomedicine*, no. APRIL 2012, p. 1781, 2012.
- [80] M. E. Castano Orozco, R. L. M. Teresa, and J. Forero, “Curso teórico-demostrativo ‘Conceptos básicos de Biología Molecular,’” *Curso teórico-demostrativo ‘Conceptos básicos de Biología Molecular.’* pp. 29 – 45, 2003.
- [81] A. Pae, H. Lee, K. Noh, and Y.-H. Woo, “Cell attachment and proliferation of bone marrow-

- derived osteoblast on zirconia of various surface treatment,” *J. Adv. Prosthodont.*, vol. 6, no. 2, pp. 96–102, 2014.
- [82] U. States and M. Arora, “Cell Culture Media : A Review,” *Mater. Methods*, vol. 1, pp. 1–27, 2013.
- [83] M. Vandrovcová and L. B. A. Č. Áková, “Adhesion , Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface- Modified Materials Developed for Bone Implants,” *Physiol. Res.*, vol. 8408, pp. 403–417, 2011.
- [84] G. Russmueller *et al.*, “3D Printable Biophotopolymers for in Vivo Bone Regeneration,” *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 6, pp. 3685–3700, 2015.
- [85] S. Mobini *et al.*, “Bioactivity and biocompatibility studies on silk-based scaffold for bone tissue engineering,” *J. Med. Biol. Eng.*, vol. 33, no. 2, pp. 207–214, 2013.
- [86] L. Bačáková, E. Filová, F. Rypáček, V. Švorčík, and V. Starý, “Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering,” *Physiol. Res.*, vol. 53, no. SUPPL. 1, 2004.
- [87] A. L. Rosa and M. M. Beloti, “TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells cultured on titanium,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 17, pp. 2927–2932, 2003.
- [88] S. S. Singh, A. Roy, B. E. Lee, I. Banerjee, and P. N. Kumta, “MC3T3-E1 proliferation and differentiation on biphasic mixtures of Mg substituted β -tricalcium phosphate and amorphous calcium phosphate.,” *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 45, pp. 589–98, Dec. 2014.
- [89] J. Daňková *et al.*, “Highly efficient mesenchymal stem cell proliferation on poly- ϵ -caprolactone nanofibers with embedded magnetic nanoparticles,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. Volume 10, no. 1, p. 7307, Dec. 2015.
- [90] Y.-K. Lee *et al.*, “Proliferation, differentiation, and calcification of preosteoblast-like MC3T3-E1 cells cultured onto noncrystalline calcium phosphate glass.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 69, no. 1, pp. 188–95, 2004.
- [91] A. Hunter, C. W. Archer, P. S. Walker, and G. W. Blunn, “Attachment and proliferation of osteoblasts and fibroblasts on biomaterials for orthopaedic use,” *Biomaterials*, vol. 16, no. 4, pp. 287–295, 1995.
- [92] S. Cao, H. Li, K. Li, J. Lu, and L. Zhang, “In vitro mineralization of MC3T3-E1 osteoblast-like cells on collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds coated carbon/carbon composites,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 104, no. 2, pp. 533–543, 2016.
- [93] S. Ackermann, J. Scheffe, J. Duss, and A. Steinfeld, “Morphological Characterization and Effective Thermal Conductivity of Dual-Scale Reticulated Porous Structures,” *Materials (Basel)*, vol. 7, no. 11, pp. 7173–7195, 2014.
- [94] C. Ohtsuki and D. Ph, “How to prepare the simulated body fluid (SBF) and its related solutions , proposed by Kokubo and his colleagues .,” vol. 3, pp. 1–5, 2010.
- [95] J. Si *et al.*, “Characterization of 3D elastic porous polydimethylsiloxane (PDMS) cell scaffolds fabricated by VARTM and particle leaching,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, no. 4, pp. 1–9, 2016.

- [96] Life Technologies Protocols, “AlamarBlue® Cell Viability Assay Protocol,” *Thermo Fisher Scientific*, no. Figure 3. 2008.
- [97] Abcam, *Alkaline Phosphatase Assay Kit*, vol. 1, no. April. 2015.
- [98] H. Tullberg-Reinert and G. Jundt, “In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 112, no. 4, pp. 271–276, 1999.
- [99] N. Su *et al.*, “Overexpression of H1 calponin in osteoblast lineage cells leads to a decrease in bone mass by disrupting osteoblast function and promoting osteoclast formation,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 28, no. 3, pp. 660–671, 2013.
- [100] L. Shea and D. Wang, “Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds,” *Tissue Eng.*, vol. 6, no. 6, pp. 605–622, 2000.
- [101] Y. Wang, J. Gao, J. Hu, and Y. Zhang, “Solid reaction mechanism of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CaCO}_3$ with and without yttria,” *Rare Met.*, vol. 28, no. 1, pp. 77–81, 2009.
- [102] H. El Briak-benabdeslam *et al.*, “Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from dicalcium phosphate dihydrate and calcium oxide : A kinetic study,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, 2002.
- [103] C. Moseke and U. Gbureck, “Tetracalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications,” *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 10, pp. 3815–3823, 2010.
- [104] N. Rangavittal, a R. Landa-Cánovas, J. M. González-Calbet, and M. Vallet-Regí, “Structural study and stability of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate: two important bioceramics,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 660–668, 2000.
- [105] P. S. Prevéy, “X-Ray Diffraction Characterization of Crystallinity and Phase Composition in Plasma-Sprayed Hydroxyapatite Coatings,” *J. Therm. Spray Technol.*, vol. 9, no. 3, pp. 369–376, 2000.
- [106] D. D. S. Tavares, L. D. O. Castro, G. D. D. A. Soares, G. G. Alves, and J. M. Granjeiro, “Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted β -tricalcium phosphate,” *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 21, no. 1, pp. 37–42, 2013.
- [107] L. Berzina-Cimdina and N. Borodajenko, “Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy,” *Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology*, pp. 123–148, 2012.
- [108] E. Boccardi *et al.*, “Study of the mechanical stability and bioactivity of Bioglass® based glass-ceramic scaffolds produced via powder metallurgy-inspired technology,” *Biomed. Mater.*, vol. 11, no. 1, p. 015005, 2016.
- [109] E. A. Aguilar-Reyes, C. A. León-Patiño, B. Jacinto-Díaz, and L.-P. Lefebvre, “Structural Characterization and Mechanical Evaluation of Bioactive Glass 45S5 Foams Obtained by a Powder Technology Approach,” *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 95, no. 12, pp. 3776–3780, 2012.
- [110] A. Zamanian, S. Farhangdoust, M. Yasaei, M. Khorami, and M. Hafezi, “The effect of particle size on the mechanical and microstructural properties of freeze-casted macroporous hydroxyapatite scaffolds,” *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, vol. 11, no. 1, pp. 12–21, 2014.

- [111] L.-P. Lefebvre, "Method of Making open cell material," 2003.
- [112] C.-J. Yu, H. H. Eifert, J. Banhart, and J. Baumeister, "Metal foaming by a powder metallurgy method: Production, properties and applications," *Mater. Res. Innov.*, vol. 2, no. 3, pp. 181–188, 1998.
- [113] L. J. White, V. Hutter, H. Tai, S. M. Howdle, and K. M. Shakesheff, "The effect of processing variables on morphological and mechanical properties of supercritical CO₂ foamed scaffolds for tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp. 61–71, 2012.
- [114] S. Cai, G. H. Xu, X. Z. Yu, W. J. Zhang, Z. Y. Xiao, and K. D. Yao, "Fabrication and biological characteristics of ??-tricalcium phosphate porous ceramic scaffolds reinforced with calcium phosphate glass," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 1, pp. 351–358, 2009.
- [115] S. M. Rabiee, N. Nazparvar, M. Azizian, D. Vashae, and L. Tayebi, "Effect of ion substitution on properties of bioactive glasses: A review," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 6, pp. 7241–7251, Jul. 2015.
- [116] B. Nasiri-Tabrizi and A. Fahami, "Mechanochemical synthesis and structural characterization of nano-sized amorphous tricalcium phosphate," *Ceram. Int.*, vol. 39, no. 8, pp. 8657–8666, Dec. 2013.
- [117] S. Nath, R. Tripathi, and B. Basu, "Understanding phase stability, microstructure development and biocompatibility in calcium phosphate–titania composites, synthesized from hydroxyapatite and titanium powder mix," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 1, pp. 97–107, Jan. 2009.
- [118] I. Cacciotti and A. Bianco, "High thermally stable Mg-substituted tricalcium phosphate via precipitation," *Ceram. Int.*, vol. 37, no. 1, pp. 127–137, Jan. 2011.
- [119] A. J. V. C. S. M., "Cerámica y Vidrio Síntesis y caracterización de soluciones sólidas de V-ZrSiO₄ preparadas a partir de geles coloidales," *Bol. la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, vol. 37, no. 8, pp. 39–46, 1998.
- [120] J. M. Hernández Enríquez, R. García Alamilla, L. a. García Serrano, and Y. a. Cueto Hernández, "Síntesis, caracterización y actividad fotocatalítica de óxido de titanio modificado con nitrógeno," *Boletín la Soc. Española Cerámica y Vidr.*, vol. 50, no. 5, pp. 245–252, Nov. 2011.
- [121] M. S. Kamath, S. S. S. J. Ahmed, M. Dhanasekaran, and S. W. Santosh, "Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 183–95, 2014.
- [122] S. Spalthoff, P. Jehn, R. Zimmerer, U. Möllmann, N.-C. Gellrich, and H. Kokemueller, "Heterotopic bone formation in the musculus latissimus dorsi of sheep using β -tricalcium phosphate scaffolds: evaluation of an extended prefabrication time on bone formation and matrix degeneration.," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 44, no. 6, pp. 791–797, Jan. 2015.
- [123] L. Qin, H. K. Genant, J. F. Griffith, and K. S. Leung, *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffold Materials: Techniques and Applications*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [124] V. Karageorgiou and D. Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.,"

Biomaterials, vol. 26, no. 27, pp. 5474–5491, Sep. 2005.

- [125] H. R. R. Ramay and M. Zhang, “Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering.,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 21, pp. 5171–80, Sep. 2004.
- [126] A. Macchetta, I. . Turner, and C. . Bowen, “Fabrication of HA/TCP scaffolds with a graded and porous structure using a camphene-based freeze-casting method.,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1319–27, May 2009.
- [127] D. Meifang, “Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-co-glycolic acid),” *Acta Biomater.*, vol. 4, pp. 638–645, 2008.
- [128] M. Ebrahimi, P. Pripatnanont, N. Monmaturapoj, and S. Suttapreyasri, “Fabrication and characterization of novel nano hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate scaffolds in three different composition ratios.,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 100, no. 9, pp. 2260–8, Sep. 2012.
- [129] Q. Z. Chen, I. D. Thompson, and A. R. Boccaccini, “45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering.,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2414–25, Apr. 2006.
- [130] H. Ghomi, M. Fathi, and H. Edris, “Fabrication and characterization of triple nanobioceramic composite foam,” *J. Compos. Mater.*, vol. 46, no. 15, pp. 1809–1817, May 2012.
- [131] M. Mozafari, M. Rabiee, M. Azami, and S. Maleknia, “Biomimetic formation of apatite on the surface of porous gelatin/bioactive glass nanocomposite scaffolds,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 257, no. 5, pp. 1740–1749, Dec. 2010.
- [132] Q. Fu, E. Saiz, and A. P. Tomsia, “Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration.,” *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 10, pp. 3547–54, Oct. 2011.
- [133] X. Liu, M. N. Rahaman, and Q. Fu, “Bone regeneration in strong porous bioactive glass (13-93) scaffolds with an oriented microstructure implanted in rat calvarial defects.,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 1, pp. 4889–98, Jan. 2013.
- [134] X. Liu, M. N. Rahaman, G. E. Hilmas, and B. S. Bal, “Mechanical properties of bioactive glass (13-93) scaffolds fabricated by robotic deposition for structural bone repair.,” *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 6, pp. 7025–34, Jun. 2013.
- [135] C. Xu *et al.*, “Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic Bioglass-Collagen-Phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering.,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 4, pp. 1051–8, Feb. 2011.
- [136] G. B. M. Ribeiro, R. M. Trommer, L. A. dos Santos, and C. P. Bergmann, “Novel method to produce β -TCP scaffolds,” *Mater. Lett.*, vol. 65, no. 2, pp. 275–277, Jan. 2011.
- [137] H. El Briak-BenAbdeslam, C. Mochales, M. P. Ginebra, J. Nurit, J. A. Planell, and P. Boudeville, “Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from dicalcium phosphate dihydrate and calcium oxide: A kinetic study,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 67A, no.

3, pp. 927–937, 2003.

- [138] T. Doktor and D. Kytýr, “Assessment of pore size distribution using image analysis,” *Youth symposium on experimental solid mechanics. Trieste, Italy.*, pp. 155–157, 2010.
- [139] R. Cancedda *et al.*, “Bulk and interface investigations of scaffolds and tissue-engineered bones by X-ray microtomography and X-ray microdiffraction,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 15, pp. 2505–24, May 2007.
- [140] A. Martínez-dávalos, “An Overview of the Development and Evaluation of a Benchtop microCT Scanner,” *Proc. XI Mex. Symp. Med. Physics*, pp. 7–11, 2010.
- [141] J. R. Jones and L. L. Hench, “Regeneration of trabecular bone using porous ceramics,” *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 7, no. 4–5, pp. 301–307, Aug. 2003.
- [142] G. Lo Re, F. Lopresti, G. Petrucci, and R. Scaffaro, “A facile method to determine pore size distribution in porous scaffold by using image processing,” *Micron*, vol. 76, pp. 37–45, May 2015.
- [143] C. Renghini, V. Komlev, F. Fiori, E. Verné, F. Baino, and C. Vitale-Brovarone, “Micro-CT studies on 3-D bioactive glass-ceramic scaffolds for bone regeneration,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 4, pp. 1328–37, May 2009.
- [144] D. Mitton, J. Rappeneau, and R. Bardonnnet, “Effet d’un traitement utilisant le CO₂ supercritique, sur les propriétés mécaniques de l’os spongieux humain,” *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.*, vol. 15, no. 4, pp. 264–269, 2005.
- [145] M. Langer and F. Peyrin, “3D X-ray ultra-microscopy of bone tissue,” *Osteoporos. Int.*, vol. 27, no. 2, pp. 441–455, 2016.
- [146] P. Kasten, I. Beyen, P. Niemeyer, R. Luginbuhl, M. Bohner, and W. Richter, “Porosity and pore size of β -tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: An in vitro and in vivo study,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 6, pp. 1904–1915, 2008.
- [147] H. Lapczynya *et al.*, “Effect of Grain Size and Microporosity on the in vivo Behavior of beta-Tricalcium Phosphate Scaffolds,” *Eur. Cells Mater.*, vol. 28, pp. 299–319, 2014.
- [148] G. Stanciu, I. Sandulescu, and B. Savu, “Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface,” *J. Biomed. &*, vol. 1, pp. 34–39, 2007.
- [149] S. Duan *et al.*, “Microstructure Evolution and Mechanical Properties Improvement in Liquid-Phase-Sintered Hydroxyapatite by Laser Sintering,” *Materials (Basel)*, vol. 8, no. 3, pp. 1162–1175, Mar. 2015.
- [150] C. Shuai, J. Zhuang, H. Hu, S. Peng, D. Liu, and J. Liu, “In vitro bioactivity and degradability of β -tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 60, no. 2, pp. 266–273, 2013.
- [151] B. San Miguel *et al.*, “Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 94, no. 4, pp. 1023–1033, 2010.
- [152] H. A. ElBatal, M. A. Azooz, E. M. A. Khalil, A. Soltan Monem, and Y. M. Hamdy,

- “Characterization of some bioglass-ceramics,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 80, no. 3, pp. 599–609, 2003.
- [153] M. Bohner, “Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery.,” *Eur. Spine J.*, vol. 10 Suppl 2, pp. S114–21, Oct. 2001.
- [154] J. Liu, K. Li, H. Wang, M. Zhu, and H. Yan, “Rapid formation of hydroxyapatite nanostructures by microwave irradiation,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 396, no. 4–6, pp. 429–432, Oct. 2004.
- [155] A. Cüneyt Tas, “Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 14, pp. 1429–1438, Jul. 2000.
- [156] S. Recillas, V. Rodríguez-Lugo, M. L. Montero, S. Viquez-Cano, L. Hernandez, and V. M. Castaño, “Studies on the precipitation behavior of calcium phosphate solutions,” *J. Ceram. Process. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 5–10, 2012.
- [157] M.-C. Wang, W.-J. Shih, I.-M. Hung, H.-T. Chen, M.-H. Hon, and H.-H. Huang, “Characterization of calcium phosphate apatite with variable Ca/P ratios sintered at low temperature,” *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 1, pp. 1223–1233, Jan. 2015.
- [158] A. L. Oliveira, P. B. Malafaya, S. A. Costa, R. A. Sousa, and R. L. Reis, “Micro-computed tomography (μ -CT) as a potential tool to assess the effect of dynamic coating routes on the formation of biomimetic apatite layers on 3D-plotted biodegradable polymeric scaffolds,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 18, no. 2, pp. 211–223, 2007.
- [159] P. N. De Aza, C. Santos, a. Pazo, S. De Aza, R. Cuscó, and L. Artús, “Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 1. Raman Spectrum of beta-Tricalcium Phosphate,” *Chem. Mater.*, vol. 9, no. 4, pp. 912–915, 1997.
- [160] I. De Fátima Gimenez, I. O. Mazali, and O. L. Alves, “Application of Raman spectroscopy to the study of the phase composition of phosphate based glass-ceramics,” *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 62, no. 7, pp. 1251–1255, 2001.
- [161] P. L. Stanciu, G. A. Sandulescu, B. Savu, S. G. Stanciu, K. M. Paraskevopoulos, X. Chatzistavrou, E. Kontonasaki, “Investigation of the Hydroxiapatite Growth on Bioactive Glass Surface,” *J. Biomed. Pharm. Eng.*, vol. 1, pp. 34–39, 2007.
- [162] N. Jing, X. Jiang, Q. Wang, Y. Tang, and P. Zhang, “Attenuated total reflectance/Fourier transform infrared (ATR/FTIR) mapping coupled with principal component analysis for the study of in vitro degradation of porous polylactide/hydroxyapatite composite material,” *Anal. Methods*, vol. 6, no. 15, p. 5590, 2014.
- [163] H. Khandelwal and S. Prakash, “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Powder by Eggshell,” *J. Miner. Mater. Charact. Eng.*, vol. 4, no. March, pp. 119–126, 2016.
- [164] Y. X. Pang and X. Bao, “Influence of temperature, ripening time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 23, no. 10, pp. 1697–1704, Sep. 2003.
- [165] K. C. B. Yeong, J. Wang, and S. C. Ng, “Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄,” *Biomaterials*, vol. 22, no. 20, pp. 2705–2712, Oct. 2001.

- [166] C. Bergmann *et al.*, “3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses,” *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 30, no. 12, pp. 2563–2567, Sep. 2010.
- [167] I. Sallemi, J. Bouaziz, F. Ben Ayed, “Elaboration and Characterization of Bioceramic Based on Tricalcium Phosphate and Zirconia,” *Int. J. Curr. Eng. Technol.*, vol. 3, pp. 1691–1700, 2013.
- [168] D. Z. Tang *et al.*, “Biphasic calcium phosphate nano-composite scaffolds reinforced with bioglass provide a synthetic alternative to autografts in a canine tibiofibula defect model,” *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 127, no. 7, pp. 1334–1338, 2014.
- [169] L. S. M.S.Walled, C. Schille, S. Spintzyk, M.S.A. Al Qahtani, E. Engel, J. Geis-Gerstorfer, F. Rupp, *Effect of surface modification of zirconia on cell adhesion, metabolic activity and proliferation human osteoblast*, vol. 1. 2016.
- [170] H. Kienapfel, C. Sprey, A. Wilke, and P. Griss, “Implant fixation by bone ingrowth,” *J. Arthroplasty*, vol. 14, no. 3, pp. 355–368, Apr. 1999.
- [171] M. Mastrogiacomo *et al.*, “Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 17, pp. 3230–3237, 2006.
- [172] C. Q. Ning and Y. Zhou, “On the microstructure of biocomposites sintered from Ti, HA and bioactive glass,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 17, pp. 3379–87, Aug. 2004.
- [173] C. M. Murphy, M. G. Haugh, and F. J. O’Brien, “The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 3, pp. 461–466, 2010.
- [174] S. Teixeira *et al.*, “In vivo evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 93, no. 2, pp. 567–575, 2010.
- [175] Q. Fu, M. N. Rahaman, B. S. Bal, and R. F. Brown, “Proliferation and function of MC3T3-E1 cells on freeze-cast hydroxyapatite scaffolds with oriented pore architectures,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 29, no. 7, pp. 2147–2153, 2009.
- [176] H. Cao, Y. Ke, Y. Zhang, C. J. Zhang, W. Qian, and G. L. Zhang, “Icariin stimulates MC3T3-E1 cell proliferation and differentiation through up-regulation of bone morphogenetic protein-2,” *Int. J. Mol. Med.*, vol. 29, no. 3, pp. 435–439, 2012.
- [177] K. Anselme, “Osteoblast adhesion on biomaterials,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 7, pp. 667–681, 2000.
- [178] R. Ramezanifard, E. Seyedjafari, A. Ardeshirylajimi, and M. Soleimani, “Biomimetic scaffolds containing nanofibers coated with willemite nanoparticles for improvement of stem cell osteogenesis,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 398–406, 2016.
- [179] Y. Ramaswamy, C. Wu, A. Van Hummel, V. Combes, G. Grau, and H. Zreiqat, “The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 33, pp. 4392–4402, 2008.
- [180] T. S. N. Silva *et al.*, “Use of calcium phosphate cement scaffolds for bone tissue engineering : in vitro study,” *Acta Cirúrgica Bras.*, vol. 26, no. 1, pp. 7–11, 2011.

- [181] H. Liu, H. Yazici, C. Ergun, T. J. Webster, and H. Bermek, "An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 5, pp. 1472–1479, 2008.
- [182] S. W. Kim *et al.*, "Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells.," *Bone*, vol. 37, no. 3, pp. 359–69, Sep. 2005.
- [183] de G. J, Wang, J, de, Boer, and K, "Proliferation and Differentiaition of MC3T3-E1 cells on Calcium Phosphate/Chitosan," *J.Dent.Res*, vol. 8, pp. 650–654, 2008.
- [184] A. K. Ghag, J. E. Gough, and S. Downes, "The osteoblast and osteoclast responses to phosphonic acid containing poly(ϵ -caprolactone) electrospun scaffolds," *Biomater. Sci.*, vol. 2, no. 2, pp. 233–241, 2014.
- [185] J. E. Gough, J. R. Jones, and L. L. Hench, "Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold," *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 2039–2046, 2004.