



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR A
SUPERFICIES
NANOESTRUCTURADAS DE ÓXIDO DE CIRCONIO**

T E S I S

QUE PRESENTA:

JANETH SERRANO BELLO

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

**TUTOR: DR. HIGINIO ARZATE
ASESOR: DR. OCTAVIO ÁLVAREZ FREGOSO**



MÉXICO D. F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Al Dr. Higinio Arzate, mi tutor. Gracias por su confianza, apoyo, paciencia y por sus invaluable consejos. Le agradezco por compartir conmigo parte de sus conocimientos para ser mejor profesionalista, pero sobre todo, mejor ser humano.

A los miembros de mí jurados de examen. Dra. María Cristina Piña Barba, Ana María Fernández Presas, Luis Felipe Jiménez García, Laurie Ann Ximenez Fyvie. Gracias por sus valiosos comentarios que enriquecieron este trabajo.

A mi amigo. Enrique Romo por su gran amistad, confianza y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio. Silvia, Lía, Mercedes, Enrique, Gonzalo y Juan Luis. Gracias por su confianza, apoyo, sugerencias y lo más importante; gracias por su valiosa amistad.

A Leticia Baños, Carlos Flores, Octavio Álvarez y Omar Novelo. Por su asesoría técnica.

A mis padres. Ofelia Bello y José Serrano a quienes agradezco el amor, apoyo, comprensión y confianza que me han brindado en cada momento de mi vida.

A mi hermano. Carlos Alberto Serrano por brindarme su confianza, por ser mi amigo y un gran ejemplo a seguir.

A mi alma mater. Universidad Nacional Autónoma de México. Por dejar en mí el anhelo de superación y perseverancia.

A mis dos amores. Arturo y Emiliano, por ser parte muy importante en mi vida y mi corazón, pero sobre todo, por mantener encendida la llama que alimenta mi espíritu... Los amo.



Índice

Resumen

Abstract

1 Antecedentes

1.1. Tejido óseo

1.2. Sustitutos biológicos

1.2.1. Materiales cerámicos

1.2.2. Materiales nanoestructurados

2 Justificación y planteamiento del problema

3 Hipótesis

4 Objetivos

4.1. Objetivo general

4.2. Objetivos específicos

5 Metodología

5.1. Elaboración de la cerámica nanoestructurada de óxido de circonio (ZrO_2)

5.1.1. Depósito de óxido de circonio por medio de la técnica de rocío pirolítico

5.1.2. Difracción de rayos X

5.1.3. Microscopia electrónica de barrido

5.1.4. Microscopia de fuerza atómica

5.2. Respuesta celular sobre la superficie

5.2.1. Ensayo de adhesión celular

5.2.2. Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad)

5.2.3.

5.2.4. Ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina

5.2.5. Análisis de los niveles de OPN, BSP y ALP por medio de inmunotransferencia

5.2.6. Ensayo de biomineralización y caracterización del mineral depositado

5.2.7. Análisis estadístico

6 Resultados

6.1. Elaboración de la cerámica nanoestructurada de óxido de circonio

6.1.1. Difracción de rayos x

6.1.2. Microscopía electrónica de barrido

6.1.3. Microscopía de fuerza atómica

6.2. Respuesta celular

6.2.1. Adhesión celular

6.2.2. Viabilidad celular

6.2.3. Inmunofluorescencia

6.3. Análisis de proteínas

6.3.1. Actividad específica de la fosfatasa alcalina

6.3.2. Expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización

6.4. Caracterización del tejido mineral depositado

6.4.1. Tinción con alizarina roja

6.4.2. Microscopía de fuerza atómica

6.4.3. Microscopía electrónica de barrido

6.4.4. Microanálisis de energía dispersiva con rayos x (EDS)

7 Discusión

8 Conclusiones

9 Referencias

Resumen

Progresos recientes en la síntesis de materiales nanoestructurados basados en su auto-organización han dado la pauta para desarrollar nuevos biomateriales con el objetivo de lograr la regeneración ósea. El objetivo de este trabajo fue el de determinar la biocompatibilidad celular y formación de tejido mineralizado en superficies nanoestructuradas de óxido de circonio (ZrO_2). Las superficies se depositaron en sustratos de vidrio por rocío pirolítico, estas estructuras se caracterizaron con difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía de fuerza atómica (MFA), para conocer sus características superficiales. Posteriormente, se esterilizaron y se sembraron células derivadas del hueso alveolar humano [CDHAH (2×10^4)] durante 30 minutos y 24 horas para determinar la adhesión de acuerdo al método de Hyman *et al.*, posteriormente se determinó el grado de viabilidad celular a los 0, 1, 3, 5 y 7 días por medio de MTT. Se realizó inmunofluorescencia a las 24 horas para conocer la organización y expansión celular. Asimismo, se cuantificó la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALPSA) a los 5 y 15 días, y la expresión de osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP) por medio de inmunotransferencias (Western blot). La formación de mineral se analizó por medio de MFA, MEB y dispersión electrónica de rayos X (EDS). Los resultados indicaron que la mejor superficie experimental es la depositada a 330°C . Las superficies permitieron un incremento en la adhesión celular de 1.72 a 2.17 veces con respecto al control ($p < 0.05$). El ensayo de MTT mostró un aumento en la actividad metabólica de CDHAH, lo que indica que esta topografía no tuvo efectos tóxicos en las células. La morfología celular presentó diferentes puntos focales de adhesión, contactos celulares y lamelopodios, esto nos indica una buena disposición del citoesqueleto en la superficie. La actividad específica de la fosfatasa alcalina fue de 5.80 y 16.99 veces con respecto al control a los 5 y 15 días ($p < 0.05$). Los Western blots revelaron una mayor expresión de OPN, BSP y ALP a los 15 días. En los resultados de biomineralización se observó una conformación en placas del mineral en las superficies experimentales comparadas con el control. Los resultados de EDS mostraron que la relación Calcio/Fosforo era de 1.54, en las superficies experimentales y controles, esta relación nos indica que era hidroxiapatita de tipo biológico. La diferencia entre

experimentales y controles es la cantidad de hidroxiapatita formada. Se concluyó que la topografía nanoestructurada de ZrO_2 es biocompatible al no afectar la viabilidad celular, promover la adhesión y la organización del citoesqueleto de los osteoblastos humanos, aumentar la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de OPN y BSP, así como promover la biomineralización, lo que indica que estas superficies nanoestructuradas podrían constituir – una alternativa para las áreas de implantología y ortopedia.

Abstract

With the progress in the synthesis and characterization of nanophase ceramics, the applications in the bone tissue engineering field have gained much attention for researchers.

Oxide of zirconium ceramics deposited by spray pyrolysis, were used to determine its biological compatibility and differentiation *in vitro* cell cultures by using human alveolar bone – derived osteoblast [CDHAH (2×10^4)] . The substrate used was corning glass slides pieces which were analyzed by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM).

Biological compatibility was assessed by attachment, MTT assay, activity of alkaline phosphatase enzyme, and Western blot of mineralization molecule as osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP and alkaline phosphatase (ALP).

Cell attachment was favored by 1.72 to 2.17 times the attachment with respect to the control at 30 minutes and at 24 hours ($p < 0.05$). MTT assay showed an increase of MTT conversion compared to control on day 3 and continued until day 7 of experimental culture and cell morphology showed well attached cells to the semi-spherical nanostructured ceramic covering long extensions of the area with a lot of spreading, elongation and lamellae morphology.

Analysis of cellular differentiation of human alveolar bone derived osteoblasts cultured onto oxide of zirconium ceramic showed and increment in the activity of alkaline phosphatase enzyme at 5 and 15 days, 5.80 and 16.99 more than the controls, respectively ($p < 0.05$); a higher levels of expression of bone-related molecules as bone sialoprotein, osteopontin and alkaline phosphatase at all times of culture; and a higher density of mineral – like tissue with small tiny needle – shaped crystals with a Ca/P ratio of 1.54 at 5 and 15 days of culture.

Based on our results it is clear that oxide of zirconium nanostructured films stimulate the bioactivity of osteoblasts and provides a microenvironment that favors the mineralization process.

In the future, this material could have a potential use for the areas of osteoinductive processes in biomedical implants.

1. Antecedentes

Con la tendencia mundial de una mayor expectativa de vida y en consecuencia el aumento en la población adulta tanto en países desarrollados como no desarrollados, los científicos en el campo de la ingeniería de tejidos, están continuamente en la búsqueda de nuevas alternativas para mejorar los implantes biomédicos. Estas nuevas alternativas, tienen el objeto de diseñar substitutos biológicos que restauren y mantengan la función normal en tejidos dañados y enfermos, ya que las estrategias necesarias para la regeneración completa de los tejidos humanos debe ser el punto final en el campo de la ingeniería de tejidos.

Es innegable el estudio del tejido óseo, ya que es el principal sostén y protección de los órganos del cuerpo, incluyendo el cerebro, la médula espinal y los dientes.

1.1. Tejido óseo

El tejido óseo es un tipo especializado de tejido conectivo, el cual es el constituyente principal de los huesos en los vertebrados. La matriz extracelular de este tejido se encuentra calcificada por lo cual es uno de los tejidos más duros del cuerpo. Este tejido se caracteriza por su rigidez, resistencia y por ser dinámico al cambiar constantemente de forma en relación con las tensiones que recibe¹.

Los huesos también sirven como palancas para los músculos que se insertan en ellos para lograr movimiento. Además, son un gran reservorio de diversos minerales del cuerpo, por ejemplo almacenan cerca de 99% del calcio corporal^{1,2}.

El hueso está constituido principalmente por tres tipos celulares (osteoblastos, osteocitos y osteoclastos), matriz orgánica, colágenas y por una fase mineral.

Osteoblastos:

Los osteoblastos son células de aproximadamente 20-30 μm , de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proviene de las células

mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos³.

Los osteoblastos sintetizan la matriz orgánica o sustancia osteoide a un ritmo de 2 a 3 μm por día y expresan una enzima característica, la fosfatasa alcalina (ALP), que permite la mineralización a un ritmo de 1 a 2 μm por día. Actualmente, se sabe que, sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso, dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular, y contribuyen a la mineralización de la sustancia osteoide, gracias a la fosfatasa alcalina, median la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas y sintetizan factores de crecimiento^{2, 3}.

La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de las cuales pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento (bone lining cells) o en osteocitos (15%). Ambos tipos celulares representan estadios más avanzados de maduración. Las células limitantes son células elongadas y planas, con un núcleo en forma de huso, apenas con organelos. Pueden expresar los marcadores osteoblásticos como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, y fosfatasa alcalina así como el receptor de parathormona (PTH). Permanecen a lo largo de la superficie endóstica, constituyendo con el endostio una capa protectora de la superficie ósea, que juega un papel importante en la activación del remodelado óseo^{3, 4}.

Osteocitos:

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio. Estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse de oxígeno y nutrientes^{2, 3, 4}.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción^{3, 4}.

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44⁵.

Osteoclastos:

Son las células encargadas de la reabsorción, son células que miden aproximadamente 100 μm , son multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad es aprovechada para su identificación, tanto *in vivo* como *in vitro*. Además tienen receptores para la calcitonina.

Los osteoclastos proceden de células madre hematopoyéticas medulares denominadas “Unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos” (CFU-GM), precursoras de macrófagos y monocitos.

Los osteoclastos tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo, que es donde tiene lugar la reabsorción y una zona clara, rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Para ello, los osteoclastos se movilizan hacia la zona a reabsorber y, seguidamente, se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo sellando los bordes del área mediante las integrinas. Las integrinas del osteoclasto, particularmente $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, reconocen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) existente en la colágena y otras proteínas de la matriz osteoide. A este nivel el pH es ácido, ya que secretan ácidos generados por la anhidrasa carbónica II y enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas, catepsina K, glucuronidasa, etc., que van a originar la reabsorción del hueso mediante la solubilización de la matriz orgánica primero y de la mineral después^{2, 4}.

Respecto a la osteoclastogénesis, actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos^{4, 5}. Así, el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células

gigantes multinucleadas. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: OPG (osteoprotegerina, proteína sintetizada por osteoblastos y pre-osteoblastos), RANKL (ligando situado en la superficie de osteoblastos y pre-osteoblastos) y RANK (receptor del anterior situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). El RANKL (receptor activator of NF κ B ligand) antiguamente llamado ODF (osteoclast differentiation factor) es una citocina transmembrana perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la reabsorción. Asimismo, los efectos del RANKL tanto *in vivo* como *in vitro*, son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), proteína circulante producida por los osteoblastos y pre-osteoblastos perteneciente a la súper familia de los receptores de TNF^{2, 6}.

Cuando se unen OPG y RANKL se inhibe la unión de RANKL a RANK y se inhibe la diferenciación osteoclástica. Por ello OPG, RANK y RANKL son importantes reguladores de la osteoclastogénesis⁶.

Matriz orgánica:

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Está formada fundamentalmente por proteínas, entre las que destaca la colágena I (90%). La matriz juega un papel importante en el conjunto del sistema óseo, siendo evidente este hecho cuando aparecen enfermedades de la colágena como la osteogénesis imperfecta. Sin embargo, actualmente debe considerarse a la matriz extracelular mineralizada como algo más que un reservorio de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular, así como en la integridad y función del tejido óseo^{2, 3}.

Colágenas:

El 90% de la matriz orgánica o extracelular (MEC) está constituida por colágena, sobre todo tipo I (>90%) y tipo V (<5%) (tabla 1). También se ha comprobado la presencia en pequeñas proporciones de colágena tipo III, relacionado con las fibras de Sharpey y tipo XII, formado bajo estrés mecánico. En la molécula de colágena se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las

integrinas $\alpha 1\beta 1$ y $\alpha 2\beta 1$ de superficie de las células óseas^{4,5}. Contiene característicamente, los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina siendo, este último, un marcador específico de todos los fenotipos de colágena y estando sus valores de excreción urinaria en relación directa con la tasa de reabsorción ósea. Las fibras de colágena se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre aminoácidos y a través de la formación de puentes de piridinolina, entre las hidroxilisinas y lisinas².

Fase mineral:

El componente mineral del hueso representa el 65% del peso óseo. Está formado por calcio, fosfato y carbonato (en proporciones de 10:6:1) en forma de pequeños cristales de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ de tamaño nanométrico, con una longitud media de 50 nm, una anchura de 25 nm y un espesor de sólo 2-5 nm, dispersos en la matriz orgánica^(2,7), en menor proporción hay magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. El plasma se encuentra sobresaturado de calcio y fósforo respecto a la hidroxiapatita, por lo que debe haber sustancias que inhiban la mineralización. Las proteínas con capacidad adhesiva favorecen la mineralización, mientras que los proteoglicanos, magnesio, ATP y pirofosfato la inhiben².

La rigidez, resistencia y dureza del hueso están relacionadas con su contenido mineral, las partes “duras” producidas por el organismo son materiales extremadamente complejos donde tanto los componentes minerales como macromoleculares cumplen diversos cometidos en la generación de un material con características físico-químicas concretas. Es evidente que los materiales formados están en equilibrio dinámico con su entorno y van cambiando con la edad. Todos estos factores son de gran importancia en el diseño de nuevos materiales y en el desarrollo de los biomateriales.

Colágena	Tipo I, III, V, XII
Proteoglicanos	Sulfato de condroitina, decorina, biglicano, hialuronano
Proteínas con ácido carboxiglutamico	Osteocalcina, proteína matriz con ácido carboxiglutámico.
Glicoproteínas	Osteonectina Fosfatasa alcalina Proteínas con RGD: Fibronectina Trombospondina Osteopontina Vitronectina Sialoproteína ósea
Proteínas del plasma	Albumina α 2-SH-glicoproteína
Factores de crecimiento	IGF- I, II TGF- β PDGF BMP,s de la 1 a la 7 VEGF

Tabla 1.- Proteínas de matriz osteoide²

1.2. Sustitutos biológicos

Los sustitutos biológicos son biomateriales de origen sintético o natural que pueden ser usados por cualquier periodo de tiempo, como una parte o un sistema completo que trata de aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo sin afectar al resto del organismo.

La ingeniería biomédica, como integración de la medicina y la ingeniería de materiales, ha avanzado rápidamente en las últimas décadas. Los biomateriales cumplen funciones básicas en el cuerpo humano, asegurando la calidad de vida de las personas enfermas o de quienes han sufrido accidentes traumáticos,

proveyéndolas de implantes ortopédicos, reguladores de sistemas cardiovasculares y biosensores, entre otros.

Según su composición química, los biomateriales se clasifican en metálicos, poliméricos, cerámicos y compuestos (tabla 2), de acuerdo con su origen, en naturales y sintéticos, y por su estructura, en sólidos y porosos⁸. También existe otra clasificación de acuerdo a la interacción con los tejidos; bioinertes, bioactivos y bioabsorbibles. Los materiales bioinertes, pueden resistir largos periodos de tiempo en un entorno altamente corrosivo como los fluidos corporales, sin cambios notables. Su mayor inconveniente es la separación entre el implante y el tejido por una cápsula fibrosa no adherente. Estos materiales se emplean para implantes permanentes, cirugía maxilofacial y craneofacial. Entre los materiales englobados dentro de este grupo, se identifican materiales metálicos como el titanio, cromo-cobalto y sus aleaciones, así como materiales cerámicos basados en óxidos de aluminio, circonio y magnesio.

Los materiales bioactivos son aquellos que promueven actividades en el tejido en cuestión. En el caso de los metales para evadir la corrosión de estos y evitar problemas de baja bioactividad y biocompatibilidad entre el implante y el tejido, se realizan recubrimientos, principalmente con materiales cerámicos, lo que aumenta la resistencia al desgaste de este tipo de implantes, minimizando la liberación de iones metálicos. De esta manera, los implantes recubiertos de estos materiales, mantienen las propiedades mecánicas del sustrato metálico y mejoran la osteointegración y bioactividad debido a las capas de recubrimiento del material cerámico (principalmente fosfato cálcico)⁹.

Los materiales biodegradables o bioreabsorbibles, se diseñan para degradarse gradualmente siendo reemplazados por el tejido huésped. Los constituyentes de estos materiales degradados deben ser aceptados por el organismo y es necesario un ajuste de la razón de biodegradación del material con la razón de formación del nuevo tejido.

Por otra parte los materiales para implantes deben reunir adecuadas propiedades biológicas, físicas, químicas y mecánicas.

Propiedades Biológicas:

Es de fundamental importancia que cualquier material implantado en el organismo no provoque reacciones alérgicas, tóxicas o infecciosas de carácter local o sistémico¹⁰.

Propiedades Físico-Químicas:

Los materiales para implantes pueden presentar alteraciones superficiales, como corrosión, solubilidad de algunos componentes y desintegración en función del tiempo^{8,10}. Puesto que la mayor parte de los implantes son de naturaleza metálica, su resistencia a la corrosión y, por consiguiente, su biocompatibilidad, dependen de una capa de pasivación y si es posible, genere una interacción adecuada con el sustrato biológico¹⁰.

Propiedades Mecánicas:

Los materiales seleccionados para implantes, deben poseer adecuadas propiedades mecánicas; fundamentalmente, rigidez, resistencia (traccional, a la fluencia, a la fatiga), tenacidad (resistencia a la fractura) no sólo para recibir las cargas a las que están sometidos, sino también para transmitir las al hueso al que están integrados. La rigidez del implante indica la mayor o menor deformación que experimenta ante la aplicación de cargas, y se determina mediante el módulo de elasticidad (cociente entre la carga aplicada y la deformación que ésta produce dentro del rango de comportamiento elástico del material)^{8,11}.

Biomaterial	Propiedades	Aplicaciones
<p>Metálicos</p> <p>Aceros inoxidables, aleaciones de titanio (Ti), cobalto (Co), Nitinol.</p> <p>Cobre (Cu).</p> <p>Amalgamas y aleaciones dentales.</p> <p>Espirales vasculares elásticas.</p>	<p>Alta densidad, resistencia mecánica al desgaste, impacto, tensión y compresión, resistencia a la corrosión.</p> <p>Se corroe en el útero.</p> <p>Biocompatibles con saliva.</p> <p>Biocompatibles con sangre.</p>	<p>Implantes y fijaciones ortopédicas con tornillos placas, alambres, varillas, clavos, implantes dentales.</p> <p>Dispositivos anticonceptivos.</p> <p>Implantes dentales y reparaciones.</p> <p>Reparación de venas y arterias.</p>
<p>Plásticos (Polímeros)</p> <p>Hule (goma) sintético, polietileno, polipropileno, acrílicos, teflón.</p>	<p>Baja densidad y resistencia mecánica, facilidad de fabricación, formación de biopelículas.</p>	<p>Suturas, sustitución de arterias, tendón artificial, cirugía plástica estética, restauración maxilofacial: nariz, oreja, mandíbula, dientes.</p>
<p>Cerámicos</p> <p>Óxidos metálicos, alúmina (Al_2O_3), circonio (ZrO_2), óxido de titanio (TiO_2), fibras de carbono, apatita artificial</p>	<p>Compatibles, resistencia a la corrosión, inertes, resistencia a la compresión, alta densidad y dureza, dificultad de maquinado y fabricación.</p>	<p>Prótesis de cadera, dientes cerámicos y cementos.</p>
<p>Compuestos</p> <p>Metal cubierto con cerámica: Ti con hidroxiapatita porosa. Material cubierto con carbón y diamante</p>	<p>Buena biocompatibilidad, inertes, alta resistencia a la corrosión y a la tensión. Falta de consistencia en la fabricación del material.</p>	<p>Implantes ortopédicos reforzados con fibras de carbono, válvula artificial cardiaca, restauración de articulaciones.</p>

Tabla 2.- Propiedades y aplicaciones de los cuatro tipos de biomateriales.

1.2.1. Materiales cerámicos

Las cerámicas son materiales inorgánicos no metálicos, son frágiles por naturaleza; sin embargo, tienen baja resistencia al impacto y poca ductilidad especialmente en situaciones que involucran concentraciones de esfuerzos.

Los materiales cerámicos que se utilizan en cirugía reconstructiva se pueden clasificar en dos grandes grupos: bioinertes y bioactivos. Los bioinertes pueden resistir largos periodos de tiempo en un entorno altamente corrosivo como los fluidos corporales, sin cambios notables. Su mayor inconveniente es la separación entre el implante y el tejido por una cápsula fibrosa no adherente. Estos materiales se emplean para implantes permanentes de cirugía maxilofacial y craneofacial. Su principal representante es la alúmina.

Los materiales bioactivos pueden enlazarse al tejido óseo. Ciertas composiciones de vidrios y vitrocerámicas poseen esta propiedad, como también la hidroxiapatita y el fosfato tricálcico en forma densa y porosa. El fenómeno de la bioactividad es un ejemplo más de la reactividad química del material cerámico con el entorno en el que se encuentra^{12,13}.

Las primeras cerámicas que fueron utilizadas en aplicaciones médicas, fueron la alúmina y el circonio, estas cerámicas son conocidas como inertes, por este motivo las eligieron para su utilización en implantes⁸.

Las cerámicas de circonio exhiben tres estructuras cristalinas, las cuales son monoclinica, tetragonal y cúbica. La transformación de tetragonal - monoclinica ocurre aproximadamente a la temperatura de 1000°C, la consecuencia de esto es que la circonia pura se fractura durante el enfriamiento, sólo la adición de óxidos, como el itrio (Y_2O_3) puede hacer que se estabilice a temperatura ambiente, esto permite que la circonia sea utilizada como material estructural¹².

En 1970 Garvie, Gupta y colaboradores¹³ mostraron que la resistencia a la fractura disminuye debido a que la circonia exhibe una transformación mecánica, esto afecta a la propagación de la resistencia a la fractura. El estrés que se induce en la transformación de fase de cristales tetragonales a monoclinicos generan una punta de grieta, la cual se acompaña de una transformación volumétrica induciendo estrés compresivo¹⁴.

La cerámica de circonia estabilizada con itrio pertenece a la familia de materiales fuertes, los cuales pueden resistir fuerzas mayores de 1000 MPa, estas

propiedades abrieron camino a nuevos dispositivos biomédicos, como ejemplo en 1980, las cerámicas estabilizadas con itrio fueron muy populares en la manufactura de cabezas femorales y prótesis de cadera. Esta cerámica fue preferida porque tiene un balance único entre dureza y resistencia. Hoy en día se han implantado más de 600,000 cabezas de fémur de circonia en todo el mundo, principalmente en Estados Unidos y Europa, incrementando su uso en aplicaciones dentales como la fabricación de postes endodónticos, brackets, incrustaciones, coronas y prótesis fijas, recientemente desarrolladas en procedimientos asistidos y fabricados por computadora (CAD/CAM). Sin embargo, se han realizado diversas investigaciones donde se han descubierto serias limitaciones en estas cerámicas, ya que sufren una lenta transformación de tetragonal a monoclinica y es debido a la humedad atmosférica, seguida de microfracturas y pérdida de resistencia, ya que el incremento de agua penetra entre el circonio durante la exposición de humedad, siendo el oxígeno del agua el que se localiza en sitios libres y el hidrógeno es depositado en espacios intersticiales adyacentes haciendo que granos nucleadores estén presentes en la superficie y se dé el fenómeno de envejecimiento y corrosión, (fig. 1) induciendo microfracturas^{12,14}.

Consecuencia del envejecimiento en los implantes ortopédicos:

Las consecuencias del proceso de envejecimiento en implantes de circonio están asociadas a la rugosidad y microfractura del material. El uso de las prótesis genera puntos de corrosión, esto es debido a la penetración de agua, proveniente del tejido adyacente, la cual penetra al material y genera puntos de corrosión generando a su vez estrés tensional, lo que da como resultado puntos de fracturas. Estos puntos, tanto de corrosión como de fractura, están en contacto con el tejido periimplantar, haciendo que se activen las células de la respuesta inmune, especialmente los macrófagos; los cuales secretan citocinas proinflamatorias que estimulan a los osteoclastos para la resorción ósea, y eventualmente se da la pérdida de la prótesis, haciendo necesario su reemplazo^{12, 15}.

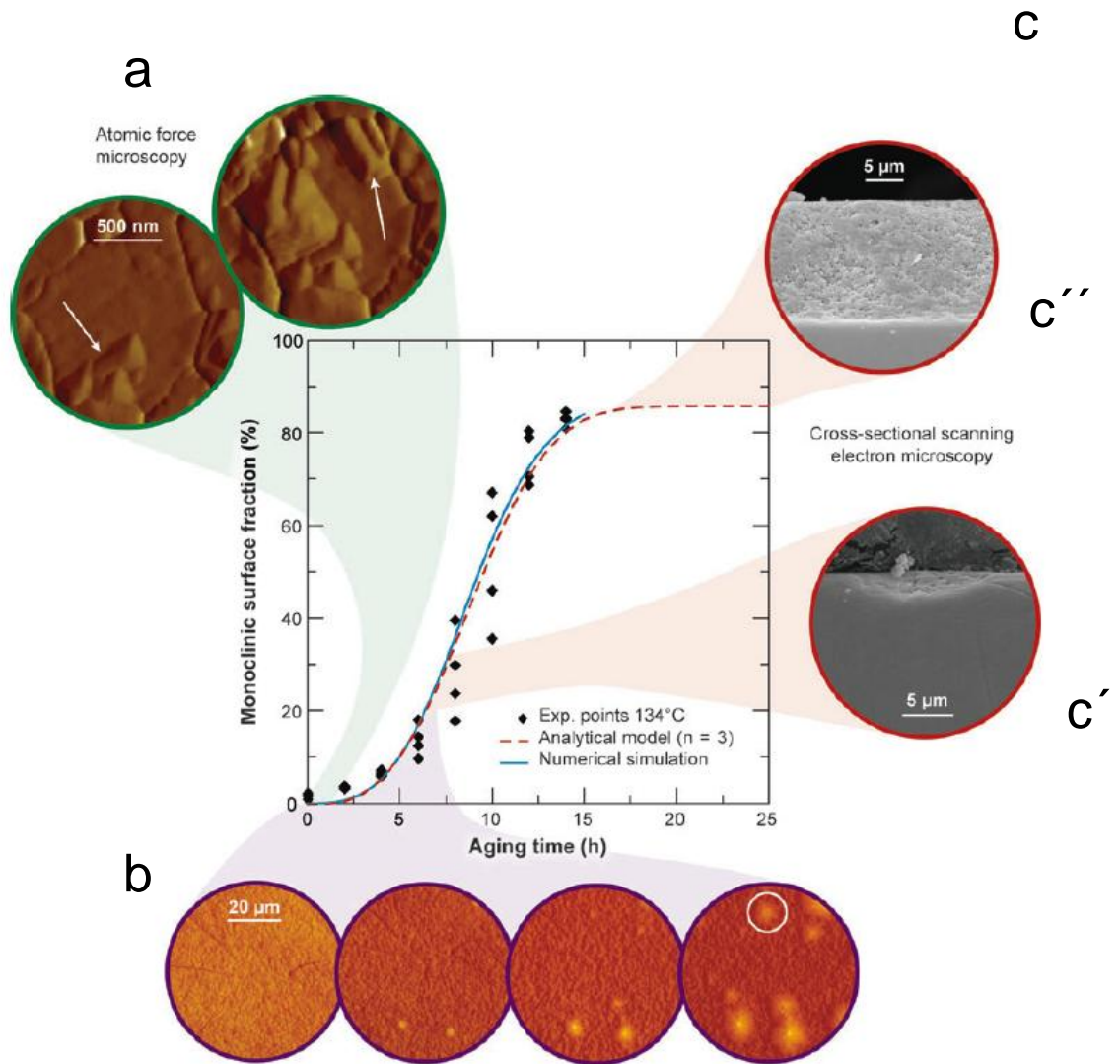


Figura 1.- Descripción de la transformación tetragonal a monoclinica donde se observa la generación de puntos de estrés. Se marca el porcentaje de la fracción monoclinica con respecto al tiempo en horas. a) Estadios de transformación observados mediante microscopía de fuerza atómica, donde se observa el inicio de transformación (flechas) en las primeras 2 h y la propagación del resto de los granos, b) proceso de enucleación y crecimiento observado por interferometría óptica (el área del círculo indica un grano entre 5 y 7 h) y c) Fotomicrografías electrónicas de barrido, donde se muestra una superficie lisa a las 6 h, (c') y posteriormente a las 17 h se realizaron cortes transversales donde se observa una superficie rugosa (c''). Figura tomada de Chevalier J. *et al*¹².

1.2.2. Materiales nanoestructurados

En años recientes se han realizado avances significativos con el uso de la nanotecnología, llevándola al desarrollo de nuevos materiales metálicos, cerámicos y poliméricos, estructurados a nivel de nanoescala (tabla 3).

Nanomateriales	Aplicación biomédica y asociación con las propiedades del nanomaterial
Nanopartículas de oro	Diagnostico de cáncer y terapia del cáncer
Nanopartículas de platino	Catálisis atractiva
Nanopartículas de titanio	Pigmentos, protectores solares en crema, recubrimientos ortopédicos, diodos laser, amplificadores, sensores biológicos debido a sus propiedades ópticas
Nanotubos de carbón y nanofibras	Conductores electrónicos
Nanofibras de alúmina	Filtros de aire y de agua
Nanofibras de polianilina	Sensores de vapor químico
Nano- hidroxiapatita	Implantes ortopédicos, ingeniería de tejidos hueso/cartílago y en diversas enfermedades óseas

Tabla 3.- Nanomateriales y su aplicación biomédica¹.

La nanotecnología es definida como los materiales y sistemas cuyas estructuras y componentes exhiben nuevas propiedades y cambios significativos cuando son generados y controlados en nivel atómico, molecular y supramolécula^{16,17}. Los avances en diversos campos de investigación que han comenzado a beneficiarse de la nanotecnología son la industria computacional, manufacturera, petrolera y de exploración espacial, ya que los nanocompuestos usualmente poseen mejores propiedades de rendimiento que los materiales tradicionales, las propiedades

relevantes incluyen incremento en la flexibilidad, textura, transparencia, abrasión, resistencia al calor y disminución de la permeabilidad de gases^{18,19}. En resumen, las nanopartículas poseen propiedades especiales ópticas, magnéticas, químicas y electro-ópticas, estas propiedades significativas de las nanopartículas, cumplen con la demanda para el diseño de películas nanocompuestas multifuncionales. En este sentido es importante agregar que otra característica relevante de los materiales nanoestructurados es el desarrollo de su auto-conformación, organización autónoma de los componentes de patrones o estructuras, sin que ocurran como resultado de la intervención humana²⁰. A este respecto, la regeneración de tejidos blandos y mineralizados alrededor de un implante o el desarrollo de nuevos tejidos para el reemplazo de biomateriales de implante, proveerá nuevas alternativas en el campo de la regeneración tisular. En el presente uno de los mayores retos en este campo es el de integrar diferentes funciones dentro de matrices extracelulares sintéticas que idealmente deben permitir la adhesión, permitir la inmediata fijación del implante previo a la mediación de los procesos celulares que toman lugar en la regeneración tisular^{20,21}.

El hueso puede ser considerado como un material nanoestructurado por sí mismo, está compuesto por entidades biológicas como proteínas colágenas y no-colágenas y cristales de hidroxapatita que poseen dimensiones nanométricas en su matriz extracelular. Por ejemplo, la dimensión del cristal de hidroxapatita en el hueso natural es de 50 a 100 nm en longitud y de 1 a 10 nanómetros en diámetro (fig. 2)⁷, por lo cual las células interactúan con superficies rugosas nanoestructuradas en el organismo y si esta rugosidad puede ser duplicada a través del uso de materiales con fases nanoestructuradas podríamos dilucidar muchos procesos celulares de gran valor en la ingeniería de tejidos. Asimismo, los principales requerimientos para producir un tejido por medio de la ingeniería son: secuencia concentrada de señales reguladoras, la presencia y número de células responsivas, y una construcción de matriz extracelular adecuada, lo último, contrasta profundamente con los materiales implantados hoy en día para tratar de regenerar los tejidos del organismo humano, los cuales pueden presentar superficies rugosas en la escala de micras pero son usualmente lisas en la escala nanométrica^{22, 23}. En las últimas nueve décadas de administrar los bioimplantes al ser humano, muchas de las prótesis sintéticas consisten de materiales con partículas y/o tamaños de grano con dimensiones en el orden de 1 a 10⁴ μm, así

estos materiales convencionales proveen una superficie poco rugosa que no promueve el depósito adecuado de matriz extracelular por parte de las células. Además se ha reportado que la adhesión celular a la matriz extracelular juega un papel importante en regular los procesos celulares, tales como: quimioatracción, adhesión, proliferación y diferenciación celular^{24, 25}. La adhesión celular a la matriz extracelular biológica y también a matrices sintéticas ha mostrado tener una gran importancia que concierne a la ingeniería de tejidos, muchos biomateriales los cuales tienen sitios específicos o inespecíficos de reconocimiento se han desarrollado y evaluado *in vitro* para determinar sus efectos sobre el ambiente celular^{26, 27, 28}, lo cual ha llevado al desarrollo de estos nuevos materiales. Claramente el uso de materiales nanoestructurados en la ingeniería de tejidos en general, representa un paradigma a cambiar en el campo de los biomateriales. Debido a que los estudios en biomateriales han mostrado que las propiedades de la superficie tales como la rugosidad, capacidad de adsorber agua y la química de su superficie se tornan relevantes, cuando se enfoca a los mecanismos de regulación celular, lo que se traduce en que la topografía tiene un fuerte efecto sobre la respuesta celular del material.

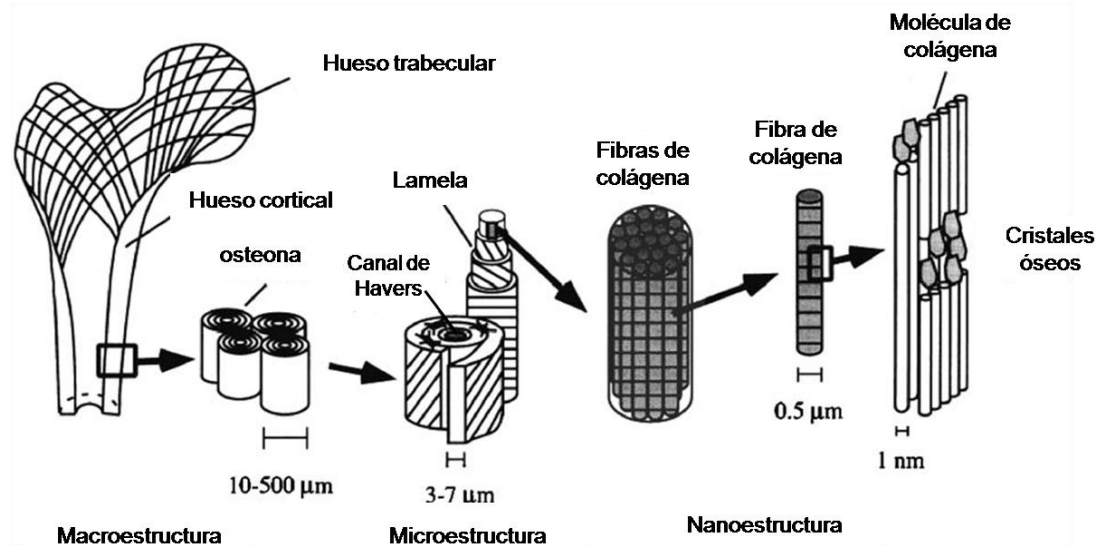


Figura 2.- Estructura esquemática de un fémur humano. Modificado de Liu H *et. al*⁷.

2. Justificación y planteamiento del problema

En la actualidad se están utilizando implantes metálicos para todas aquellas aplicaciones clínicas que requieren soportar carga, lo que origina problemas importantes. La gran diferencia de propiedades mecánicas entre el implante artificial y el hueso natural. La presencia de iones que procediendo del implante artificial, pueden ser tóxicos o perjudiciales y son causa de dolor. Además estos materiales imposibilitan la regeneración de hueso natural. Una alternativa para terminar en parte con estos problemas mientras no se logre un material similar al hueso, es la modificación superficial de materiales en cuanto a su textura, morfología y composición en rangos nanométricos, lo cual puede llevar a la solución para lograr materiales con mejor aceptación en el ambiente celular de un organismo. Esto es debido a que las células están habituadas a interactuar con matrices extracelulares donde sus componentes pueden estar en rangos nanométricos. Por ende la caracterización biológica de la respuesta celular a las superficies nanoestructuradas, sin liberación de sustancias tóxicas y proporcionando una superficie adecuada, podría ser capaz de permitir la adherencia, diferenciación y depósitos de matriz mineralizada proporcionando nuevos elementos para su futura aplicación como implantes ya sea dentales u ortopédicos.

3. Hipótesis

Las superficies nanoestructuradas de las cerámicas de óxido de circonio (ZrO_2), depositadas por rocío pirolítico, son viables para ser utilizadas como biomateriales, ya que permiten la adherencia y proliferación celular, el depósito de matriz mineralizada, y la expresión de ciertas proteínas involucradas en el proceso de mineralización; como la osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y fosfatasa alcalina (ALP).

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Obtener las superficies nanoestructuradas de ZrO_2 y evaluar biológicamente el papel de estas superficies sobre la respuesta celular (adherencia, viabilidad y depósitos de matriz mineralizada) por parte de los osteoblastos humanos *in vitro*.

4.2. Objetivos específicos

1. Depositar las cerámicas nanoestructuradas de ZrO_2 sobre una superficie lisa.
2. Evaluar la toxicidad de las cerámicas nanoestructuradas empleando osteoblastos, por medio de prueba de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).
3. Establecer el efecto de la morfología superficial de las cerámicas nanoestructuradas, medido a través de la rugosidad en la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos *in vitro*.
4. Determinar el efecto de la interacción célula – superficie nanoestructurada en la expresión de proteínas (OPN, BSP y ALP) relacionadas con el proceso de biomineralización.
5. Analizar el proceso de biomineralización en las superficies por parte de osteoblastos humanos *in vitro*.

5. Metodología

5.1. Elaboración de la cerámica nanoestructurada de óxido de circonio (ZrO_2)

La primera parte del estudio consistió en elaborar las superficies de óxido de circonio (ZrO_2), por la técnica de rocío pirolítico. Posteriormente se realizaron, en dichas superficies pruebas biológicas, adhesión, viabilidad, inmunofluorescencia, ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina, análisis de osteopontina, sialoproteína ósea y fosfatasa alcalina por Western blot y finalmente se caracterizó el tejido mineral depositado en las superficies.

5.1.1. Depósito de óxido de circonio por medio de la técnica de rocío pirolítico

En un reactor de proceso pirolítico, se colocó una solución de cloruro de circonio al 0.05M, esta solución fue depositada homogéneamente durante 2 minutos, por medio de un rocío a 100 diferentes sustratos de vidrio (Corning glass 7059) de 1cm^2 . Cada uno de estos sustratos fueron previamente colocados en el plato de calentamiento de dicho reactor, donde se varió la temperatura, desde los 300°C para el primer sustrato, 320°C para el segundo y así sucesivamente incrementando la temperatura cada 20°C hasta alcanzar los 500°C . Se realizaron 6 depósitos por cada temperatura.

Una vez teniendo todos los sustratos experimentales se les realizaron pruebas de difracción de rayos X (DRX) y de microscopia electrónica de barrido (MEB), para determinar cuál sería la temperatura adecuada, y depositar todos los sustratos experimentales en las mismas condiciones.

1.1.2. Difracción de rayos X

Para conocer la cristalinidad del material, se analizó cada una de las superficies por DRX usando un difractómetro Siemens D-500 con una longitud de radiación de onda de 1.5406Å .

1.1.3. Microscopía electrónica de barrido

Para conocer la morfología superficial de cada una de las muestras, se utilizó un microscopio electrónico de barrido, Cambridge –Leica Stereoscan 440.

Las muestras fueron cubiertas por una capa delgada de oro y barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectadas en una imagen de TV.

1.1.4. Microscopía de fuerza atómica.

Este microscopio se utilizó para determinar la morfología superficial a nivel de nanómetros, empleando un microscopio Park Scientific Instruments con autosonda en modalidad de contacto y modo constante de fuerza de 5 nN.

1.2. Respuesta celular sobre la superficie.

Después de caracterizar la superficie de la cerámica, las superficies experimentales fueron aquellas que se depositaron a 350°C, y las superficies controles fueron únicamente el vidrio. Todas las superficies fueron esterilizadas en una autoclave, durante 20 minutos a una temperatura de 121°C y una presión de 15 libras, posteriormente se realizaron sobre los sustratos los ensayos celulares.

5.2.1. Ensayo de adhesión celular

Para establecer el efecto de la morfología superficial nanohemisférica de las cerámicas sobre la adhesión celular, las células derivadas del hueso alveolar fueron cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas de ZrO₂, en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 2×10^3 y se cultivaron durante 30 minutos y 24 horas en el medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml y fungisona 0.3 µg/ml), 100 mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato

de sodio. Las células que no se adhirieron a las superficies fueron removidas por lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos). Las células adheridas a las cerámicas fueron fijadas con 3.5% de paraformaldehído. La adherencia celular fue evaluada de acuerdo al método reportado por Hyman²⁹, de la siguiente manera; las células fijadas fueron incubadas con 0.1% de toluidina, se lavaron con PBS para remover el colorante no específico y posteriormente el colorante se extrajo con 500 μ l de SDS al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100 μ l y fueron leídos en un lector para análisis de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), a una longitud de onda de 605 nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre sustratos de vidrio. Los experimentos fueron por triplicado, repitiéndose por lo menos tres veces.

1.2.2. Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad)

Para determinar si las cerámicas nanoestructuradas pueden afectar la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para oxidar una sal de tetrazoilo (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazoilo) a un producto insoluble de color azul. Las células derivadas del hueso alveolar fueron cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 20×10^3 por 1, 3, 5 y 7 días. Después de cada periodo experimental, las células fueron incubadas con MTT (120 mg/ml) a 37°. El sobrenadante fue removido y a cada pozo de cultivo se le adicionó una solución con 0.04 M de ácido clorhídrico en isopropanol y la placa se leyó a 570nm en un lector de ELISA. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre sustratos de vidrio. Los experimentos se realizaron por triplicado repitiéndose tres veces.

1.2.3. Detección de actina por medio de inmunofluorescencia

Se utilizaron cultivos celulares a una densidad de 5×10^2 en placas de cultivos de 8 pozos, al término del tiempo experimental, las células se fijaron con 3.7% de formaldehído y se incubaron con un primer anticuerpo contra actina para determinar la presencia de actina. La concentración del anticuerpo primario fue de 1:300 en

PBS, conteniendo 1 mg/ml de BSA e incubados durante 12 horas a 4°C. Los portaobjetos se lavaron con PBS frío por 10 minutos y se incubaron con el segundo anticuerpo anti-actina durante una hora a 4°C diluido a una concentración de 1:50 en PBS. Por último los portaobjetos se lavaron con PBS más 0.1% de tritón X-20 y cubiertos con glicerol-PBS (1:9 v/v) conteniendo 20 mg/ml 1,2, diazabicyclo (2,2,2) octano (DACO). La inmunotinción se visualizó por inmunofluorescencia indirecta en un microscopio Axiophot, Carl Zeiss.

Los controles negativos fueron aquellos a los cuales no se les adicionó el primer anticuerpo.

1.2.4. Ensayo de la actividad específica de la fosfatasa alcalina

Se sembraron células derivadas del hueso alveolar sobre las cerámicas nanoestructuradas de ZrO₂ en placas de 24 pozos a una densidad de 2x10³ como se describió anteriormente. Las células fueron cultivadas por 5 y 15 días. Al término de cada periodo de incubación, las células fueron lavadas con PBS. Las células se sometieron a sonicación en una solución amortiguadora con 10 mM de Tris-HCL pH 7.4 más 0.1% de tritón X-100. Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo utilizando el sustrato p-nitrofenil fosfato (PNP) a una concentración de 8 mM y como activador enzimático 2 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) en una solución amortiguadora con 10 mM de tris-HCl pH 9.8 e incubado a 37°C por 30 minutos, la reacción enzimática se detuvo adicionando 50 µL de 0.05 N de hidróxido de sodio (NaOH) y se realizaron mediciones de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. La concentración de proteína se determinó según la técnica de Lowry usando como control estándar albúmina sérica bovina (BSA). Los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos tres veces.

1.2.5. Análisis de los niveles de OPN, BSP y ALP por medio de Western blot

Para correlacionar el papel regulador de la interacción de las células osteoblásticas con la superficie de las cerámicas nanoestructuradas de ZrO₂, se determinó si los niveles de proteínas asociadas al proceso de biomineralización se veían afectados. Las células derivadas del hueso alveolar fueron cultivadas a una densidad celular de

2×10^3 por 5 y 15 días. En cada tiempo experimental, las células se recuperaron y fueron lisadas en un amortiguador de lisis frío (1mM de EDTA pH 8, 10 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0.05% 2-mercaptoetanol, 0.5% de tritón X-100, 1 mM fenilmetilsulfonilfluoruro, 5 μ M leupeptina y 10 μ M aprotinina). La cantidad de proteína se determinó por la técnica de Lowry³⁰. Las mismas cantidades de proteína total (10 μ g/línea) fueron cargadas en los geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF la cual fue bloqueada con 5% de leche descremada más 0.1% de Tween 20 en PBS pH 7.6 durante 1 hora. Las membranas fueron incubadas con cada uno de los anticuerpos específicos contra las proteínas involucradas en el proceso de biomineralización (anti-OPN, anti-BSP y anti-ALP) a una concentración de 1:300 durante una hora a temperatura ambiente. Después las membranas se lavaron con PBS con 0.1% de Tween 20 y fueron incubadas con un anticuerpo anti-conejo IgG conjugado a peroxidasa de rábano a una concentración 1:1000 durante 1 hora. Pasado este tiempo, fueron lavadas con PBS y se revelaron con diaminobenzidina. Las membranas fueron digitalizadas y analizadas con un programa de análisis y documentación de electroforesis EDAS 290, Kodak. El nivel relativo de cada proteína se determinó midiendo la intensidad relativa integrada por todos los pixeles en cada banda de proteína, excluyendo el fondo local.

1.2.6. Ensayo de biomineralización y caracterización del tejido mineral depositado

La biomineralización fue evaluada sembrando las células derivadas del hueso alveolar a una densidad celular de 2×10^3 durante 5 y 15 días sobre las cerámicas nanoestructuradas de ZrO_2 en cajas de cultivos de 24 pozos. Se utilizó un medio inductor de la biomineralización que contenía DMEM suplementado con 10% SFB, 50 mg/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato, 10 M de dexametasona y una solución de antibióticos compuesta de penicilina (100 U/ml). El medio se cambió cada 2 días. Al término de cada periodo experimental, las muestras fueron lavadas con PBS a 37 °C, fijadas con glutaraldehído al 4% y deshidratadas gradualmente con etanol a diversas concentraciones 30, 50, 70, 80, 95, 100% durante 10 minutos y la deposición del mineral se identificó utilizando una solución saturada de alizarina roja S a pH 4.2, la cual fue adicionada a los cultivos durante 5 minutos. El exceso de

colorante fue eliminado lavando abundantemente con PBS y se esperó el tiempo necesario para que las superficies se secaran.

Para determinar el patrón de mineralización del tejido mineral generado por los cultivos celulares, se utilizaron técnicas de microscopía de alta resolución, tales como: microscopía de fuerza atómica (MFA) y microscopía electrónica de barrido (MEB) empleando las técnicas anteriormente descritas. Para determinar la composición del mineral se empleó el microanálisis de energía dispersiva electrónica de rayos X (EDS).

1.2.7. Análisis estadístico

Los resultados que se obtuvieron por triplicado de los ensayos de adhesión celular, viabilidad, actividad específica de fosfatasa alcalina y Western blot, fueron analizados por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA), mediante el programa GraphPad InStaT, comparando los resultados a los diferentes tiempos tanto de los controles con los experimentales, posteriormente se realizó la prueba posthoc de Tukey-Kramer con el mismo programa estadístico.

6. Resultados

6.1. Elaboración de la cerámica nanoestructurada de óxido de circonio (ZrO_2)

Cada una de las muestras que se depositaron homogéneamente a diferentes temperaturas, se observaron a simple vista como una capa homogénea de color blanco, la cual corresponde al óxido de circonio (fig. 3), posteriormente a estas superficies experimentales se les realizó diferentes pruebas para determinar la temperatura de depósito y conocer las características superficiales de estas estructuras y posteriormente evaluar la respuesta celular en cultivos de osteoblastos humanos en un sistema *in vitro*.

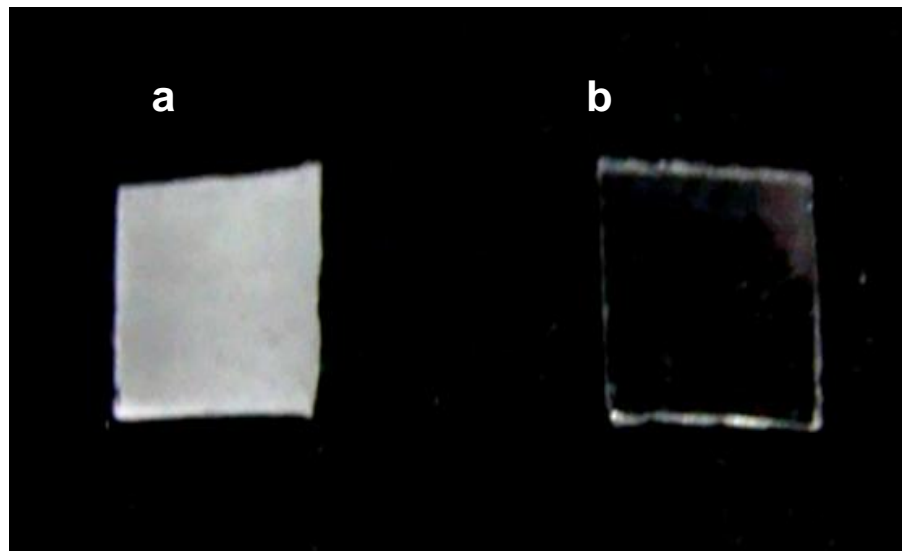


Figura 3.- Muestras a) Óxido de circonio depositado homogéneamente y b) vidrio utilizado como control.

6.1.1. Difracción de rayos X

Cada una de las muestras depositadas a diferentes temperaturas se sometieron a un análisis de difracción de rayos X, donde se observaron diferentes patrones de cristalinidad según la temperatura de depósito, a los 350°C se observó que su comportamiento correspondió a un sólido amorfo (fig. 4), es decir a un patrón que careció de ordenamiento de largo alcance, superior al tamaño de las moléculas o unidades repetitivas, en dichos sólidos amorfos no existió ordenamiento periódico.

Estos patrones de difracción fueron aumentando según la temperatura de depósito, hasta obtener un sólido cristalino como en el caso de las muestras depositadas a 500°C, estos tuvieron una estructura periódica, ordenada y como consecuencia una forma no cambiante.

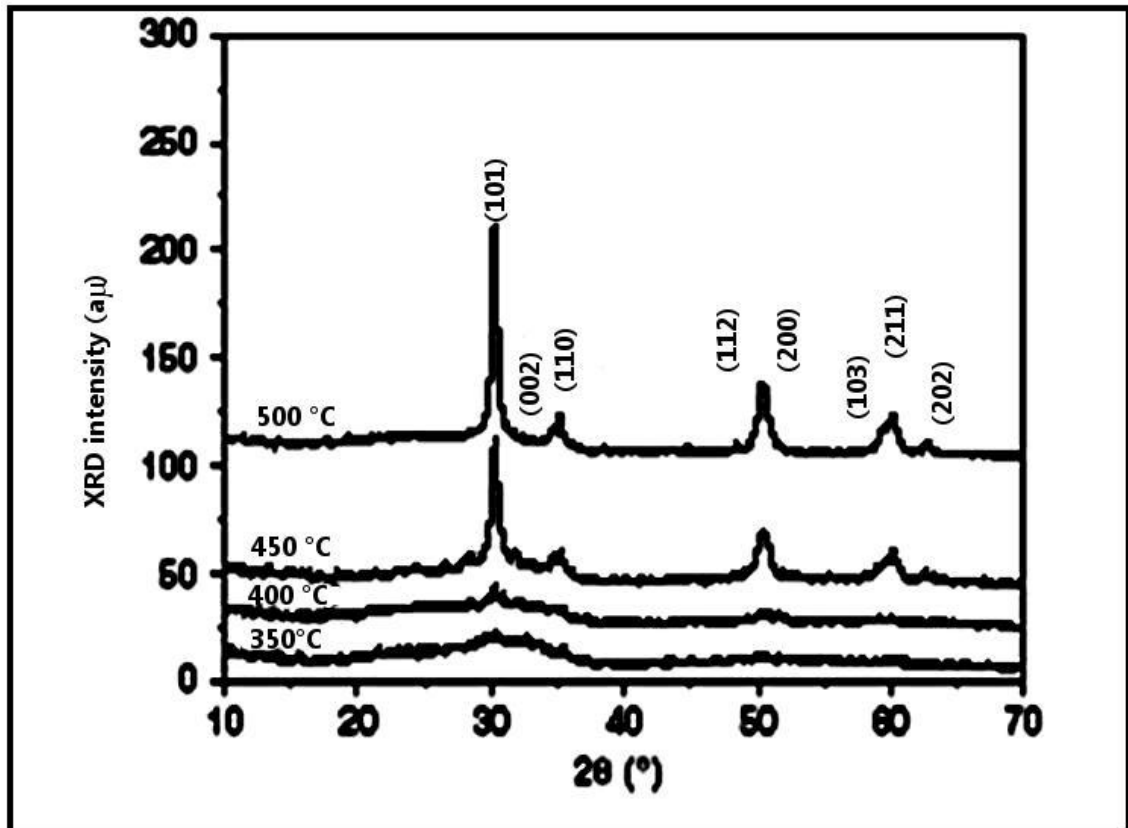


Figura 4.- Patrón de difracción de rayos X de muestras depositadas a diferentes temperaturas.

6.1.2. Microscopía electrónica de barrido

Cada una de las muestras depositadas a diferentes temperaturas se observaron en un microscopio electrónico de barrido para determinar su morfología superficial. Al depositar óxido de circonio a temperaturas menores de los 350°C se observaron formaciones parecidas a redes concéntricas con cúmulos del material (fig. 5a), a los 350°C (superficie que corresponde a un sólido amorfo) se observó una estructura organizada donde existió formación de redes del material depositado, estas redes simulaban fibras que formaron a su vez poros, toda esta estructura de redes y poros dieron la apariencia de formaciones de redes de colágena (fig. 5b). A los 380°C se observó una estructura con cúmulos de óxido de circonio, dando una apariencia

burda (fig. 5c) y a los 420°C se observó una estructura con grandes cúmulos del material, donde las redes y poros se habían perdido observando así una superficie densa.

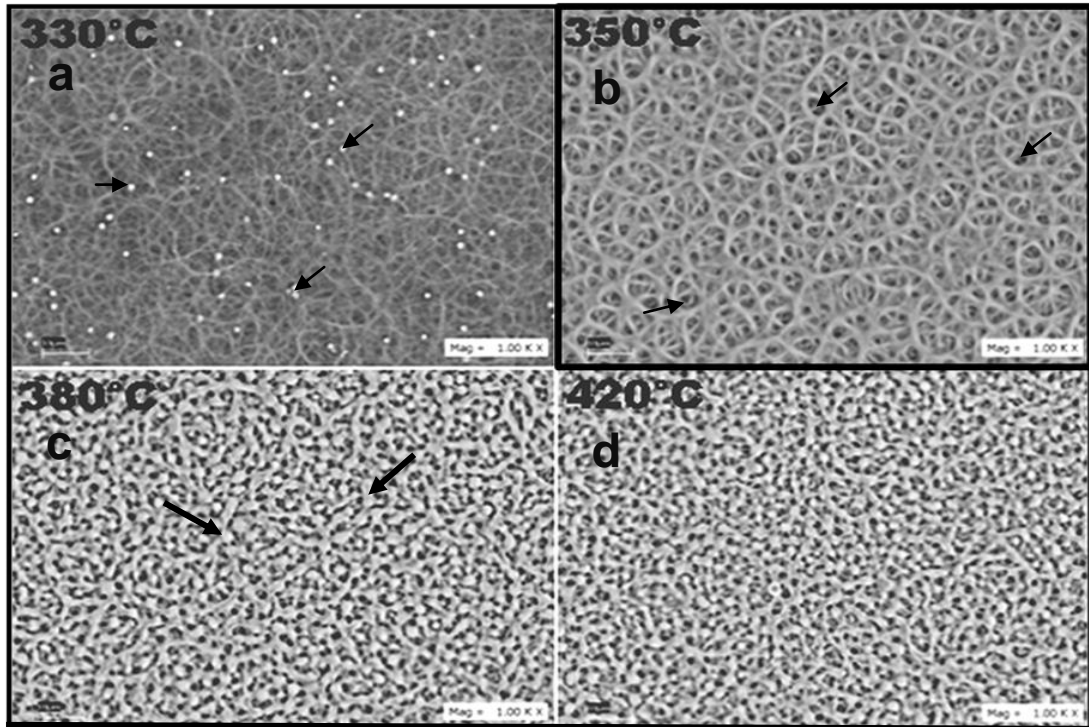


Figura 5.- Superficies observadas en MEB a diferentes temperaturas, a) la formación de redes concéntricas y pequeñas acumulaciones del material (flechas), b) estructura con redes que simulan fibras y poros (flechas), c) estructura con acumulaciones de óxido de circonio y d) estructura densa con grandes cúmulos del material.

Por las características observadas en la difracción de rayos X y en microscopía electrónica de barrido, se determinó que las superficies con las cuales se mediría la respuesta biológica serían de las superficies depositadas a 350°C.

6.1.3. Microscopía de fuerza atómica

La superficie de óxido de circonio elegida para realizarle las pruebas biológicas (la que se depositó a 350°C), se analizó en un microscopio de fuerza atómica, donde se observaron cúmulos del material de aproximadamente 65.7 nm de ancho (Fig. 6 A), estos cúmulos se agruparon y formaron redes, que a su vez constituyeron poros de aproximadamente 290 nm de longitud. En su estructura en 3D (Fig. 7B) se

observaron valles y crestas que midieron desde su base hasta su punto más alto 1.88 μm (Fig. 6 C).

Una vez que se caracterizo la superficie y se determinó la temperatura de depósito, la cual fue de 350°C, posteriormente se realizaron los experimentos de adhesión celular, proliferación e inmunofluorescencia.

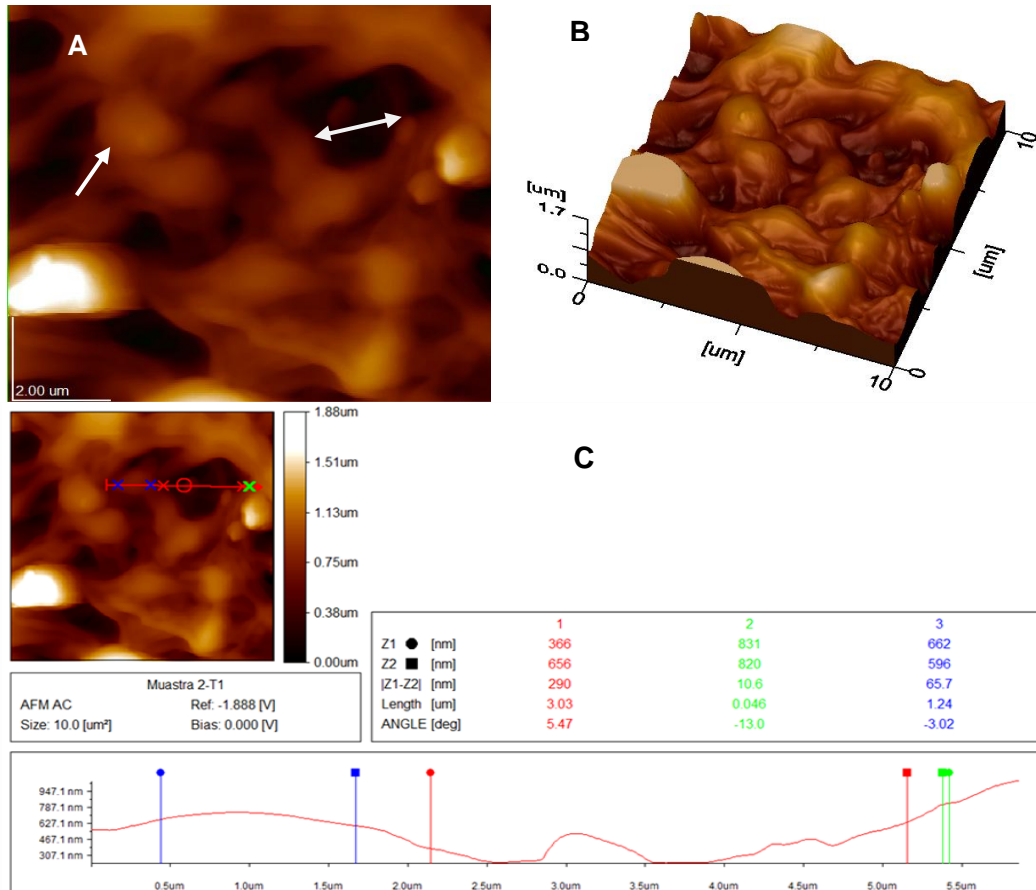


Figura 6.- MFA de la superficie de óxido de circonio A) Cúmulos del material que forman redes (flecha) y poros (doble flecha), B) Estructura 3D donde se muestran valles y crestas, C) Mediciones de las estructuras que conforman la superficie (redes, poros, valles y crestas)

6.2.1. Adhesión celular

Para determinar la influencia de la superficie nanoestructurada de óxido de circonio en la adhesión celular, fueron sembradas células derivadas del hueso alveolar humano a una densidad de 2×10^4 durante 30 min y 24 h de acuerdo al método de Hyman *et al.*, donde se observó un incremento en la adhesión celular de 1.72 veces más con respecto al control a los 30 min y 2.17 veces más a las 24 h con respecto al control, obteniendo una $p=0.0006$ (fig. 7), considerando una diferencia estadísticamente significativa, al realizar la prueba estadística de ANOVA. Para

saber entre que grupos se encontraban mayores diferencias, se realizó el análisis de Tukey-Kramer, el cual indicó que la mayor diferencia se presentó entre el grupo control a los 30 min y el experimental a las 24 h con una $p < 0.01$, seguido del control a las 24 h contra el experimental a las 24 h con una $p < 0.01$. Estos resultados indicaron que la superficie promovió la adhesión celular.

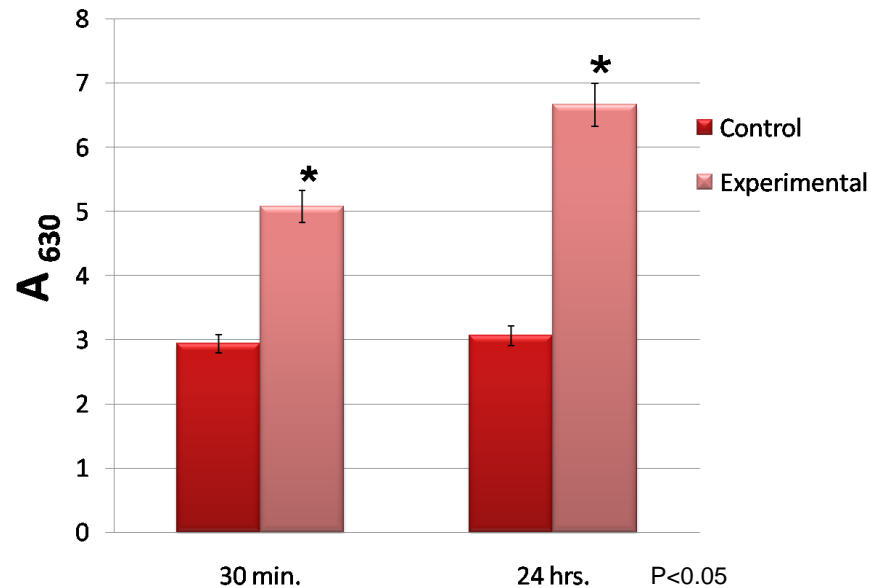
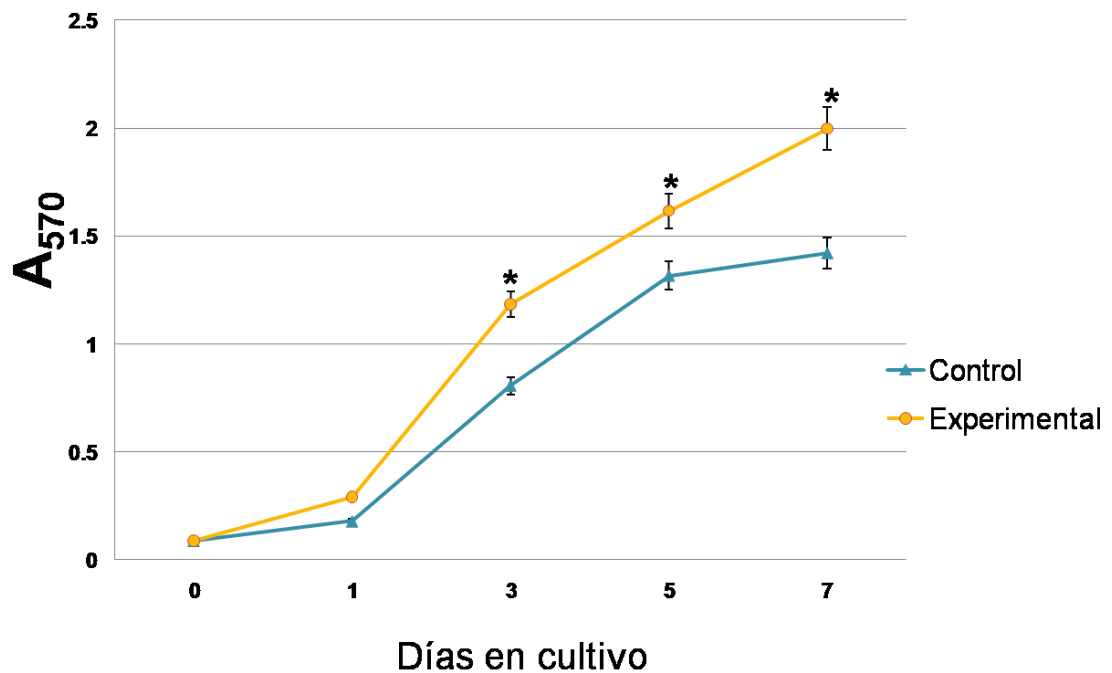


Figura 7.-. Adhesión celular de los osteoblastos humanos. Se observa un incremento de 1.72 veces a los 30 min y 2.17 veces a las 24 h respecto al control.

6.2.2. Viabilidad celular

Para valorar si la superficie nanoestructurada era viable para las células, se midió la actividad de oxidación del MTT por la enzima deshidrogenasa, la cual aumentó con respecto al control 1.6 veces al primer día en cultivo, 1.46 al tercer día, 1.22 al cuarto día y 1.40 al quinto día, con una $p < 0.0001$ (fig. 8). Para saber en cuál de los grupos se encontraba la mayor diferencia, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, la cual indicó que existía una mayor diferencia estadística entre los grupos controles y experimentales a partir del tercer día ($p < 0.001$) así como entre los experimentales en los días 3, 5 y 7 con una $p < 0.001$.

Con base en los resultados, se puede deducir que las superficies experimentales no son citotóxicas.



* $p < 0.0001$

Figura 8.- Viabilidad celular. Se observa un aumento en la oxidación de MTT a partir del tercer día.

6.2.3. Inmunofluorescencia

Para correlacionar el papel regulador de la interacción de las células osteoblásticas con la superficie de las cerámicas nanoestructuradas de ZrO_2 se realizó inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-actina para observar la estructura del citoesqueleto a las 24 h. Se observó que en el grupo control las células tenían forma estrellada y elongada con núcleo irregular, escasos contactos celulares y diversos puntos focales de adhesión. En el grupo experimental se observó mayor presencia celular, con forma poligonal y núcleos circulares, presentaron diversos filopodios y contactos célula – célula (Fig. 9), lo que indica que la superficie nanoestructurada de ZrO_2 promovió la organización del citoesqueleto y de agrupaciones celulares.

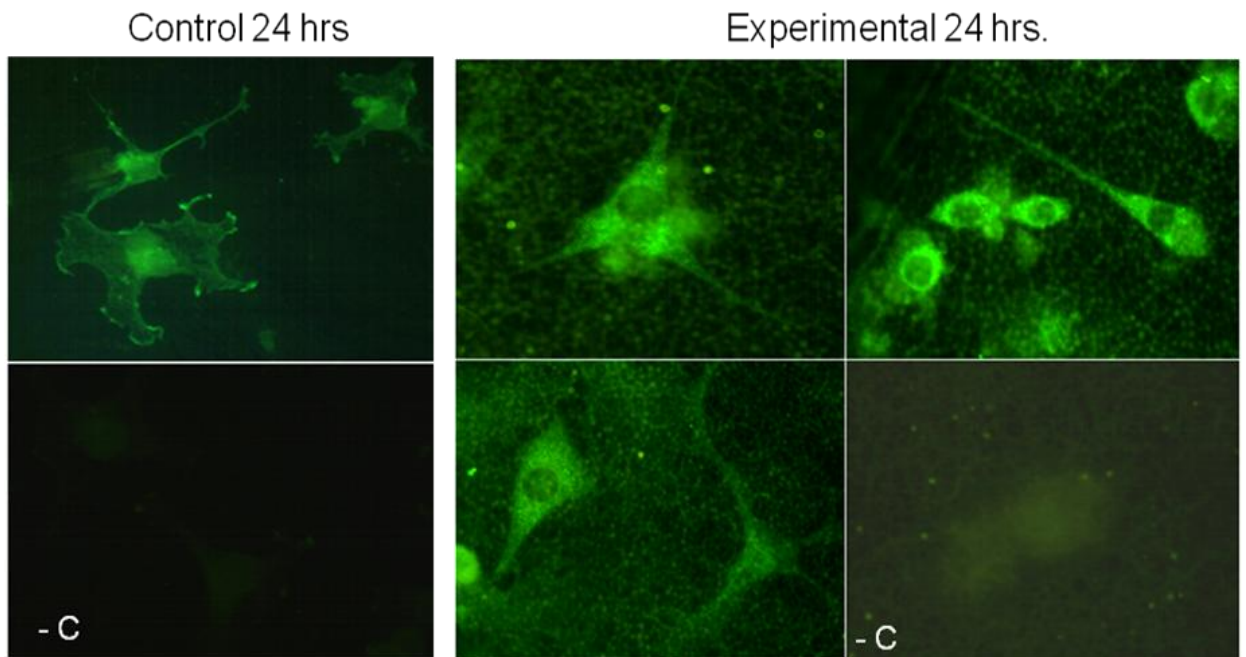


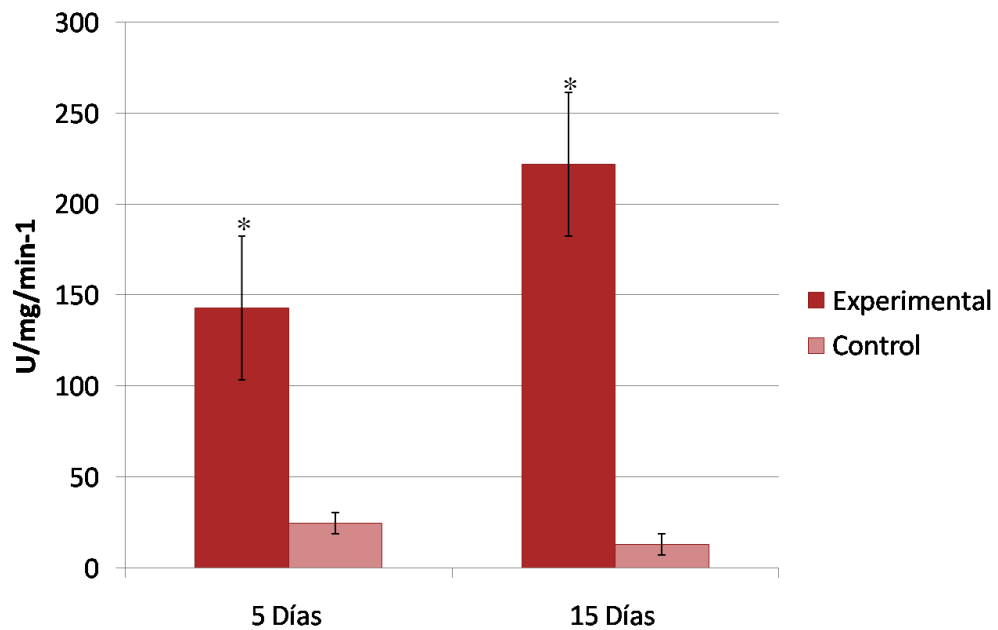
Figura 9.- Inmunofluorescencia contra actina. Grupo control, células con forma estrellada. En el grupo experimental presentó células poligonales con núcleos circulares y contactos célula - célula.

6.3. Análisis de proteínas

Se determinó la relación entre la superficie de ZrO_2 con la actividad específica de la fosfatasa alcalina (ALP), además se evaluó la expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización (OPN, BSP y ALP) por medio de Western blot.

6.3.1. Actividad específica de la fosfatasa alcalina

Se determinó la actividad específica de la ALP a los diferentes tiempos de cultivo celular. La actividad específica de ALP fue de 5.8 veces mayor a los 5 días en los cultivos experimentales y 16.9 veces mayor a los 15 días (Fig.10), con respecto al control. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos controles y experimentales en los dos periodos de tiempo con una $p < 0.001$, esto indica que hay mayor actividad de esta proteína en los grupos que estuvieron en contacto con la superficie nanoestructurada de ZrO_2 .



Grafica 3. Actividad específica de la fosfatasa alcalina. Se observó una mayor actividad de esta proteína en los dos periodos de tiempo con respecto al control.

6.3.2. Expresión de proteínas asociadas al proceso de biomineralización

Para conocer los niveles de expresión de diferentes proteínas involucradas al proceso de biomineralización, se realizaron análisis de Western blot. En este análisis se observaron altos niveles de expresión asociadas a la superficie experimental (fig. 11), sobresaliendo la fosfatasa alcalina (ALP) a los 15 días, seguida por la osteopontina a los 5 días.

Posteriormente para saber la relación cuantitativa con respecto al control, se midió con el programa EDAS 290 (Kodak, USA), la intensidad de los pixeles de las bandas, donde se observó una mayor expresión en los grupos experimentales (fig. 12). Al realizar la prueba estadística de ANOVA se observó diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.0001$). Se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, la cual indicó que existía una mayor diferencia estadística de los grupos controles en comparación a los experimentales de osteopontina y fosfatasa alcalina a los 15 días, así como una diferencia entre OPN experimental a los 5 días contra la OPN experimental a los 15 días, de igual manera la ALP experimental a los 5 días contra ALP experimental a los 15 días ($p < 0.001$).

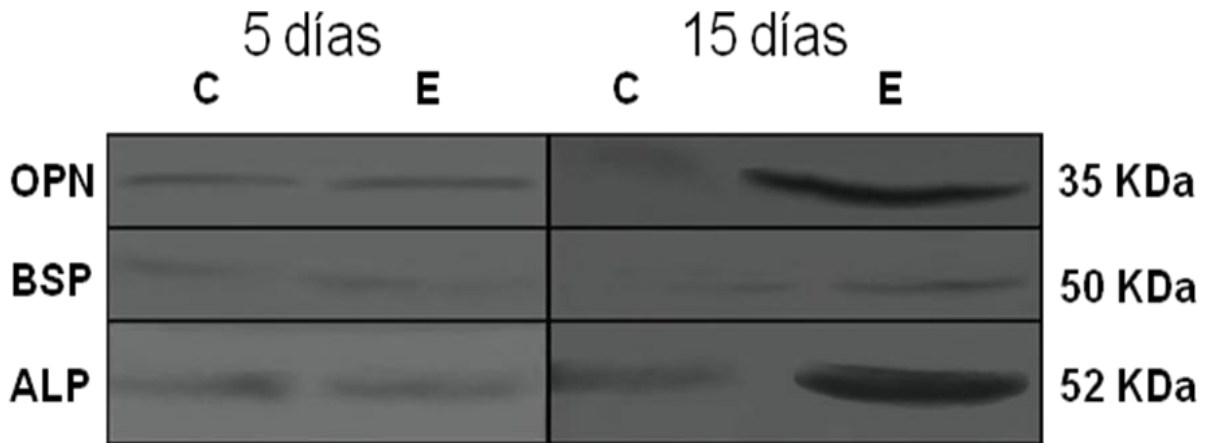


Figura.- 11.- Expresión de osteopontina (OPN), sialoproteína ósea (BSP) y fosfatasa alcalina (ALP).

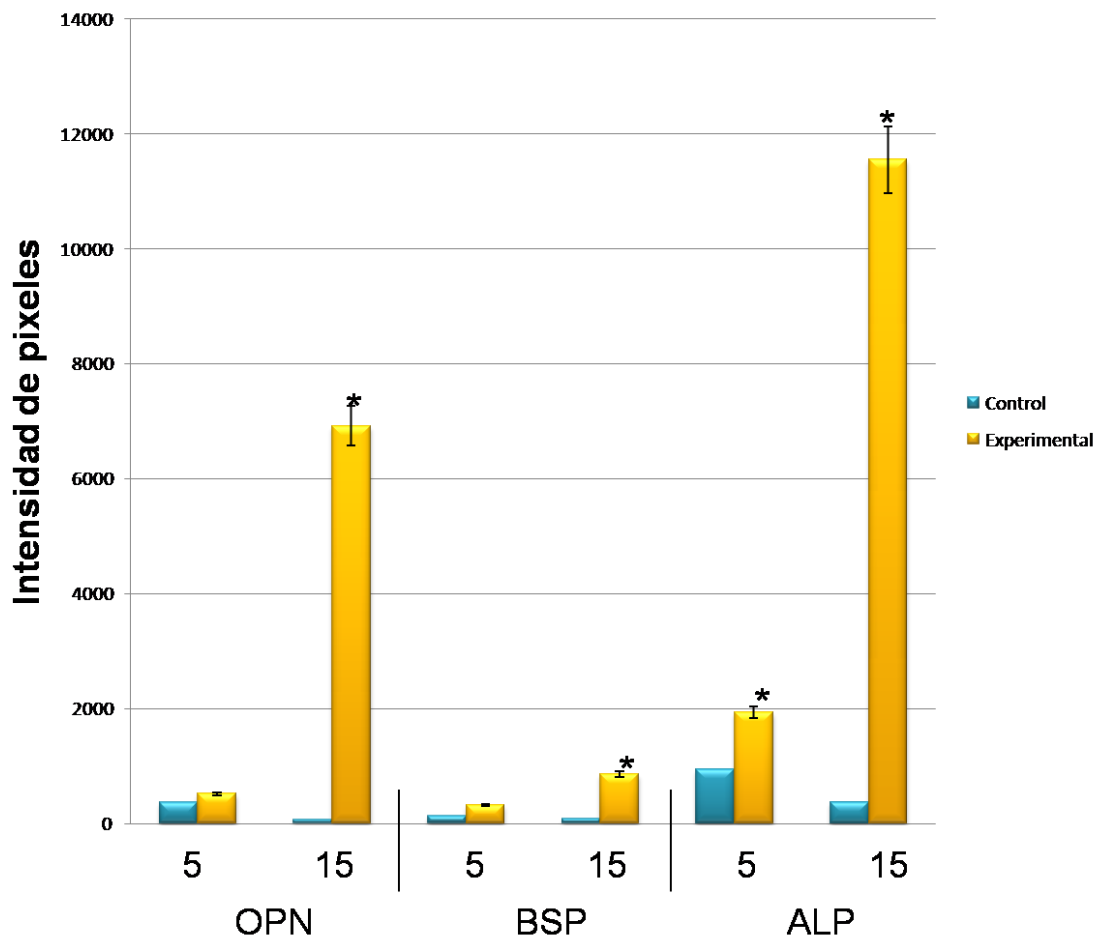


Figura 12.- Relación de la expresión de moléculas involucradas en el proceso de biomineralización.

6.4. Caracterización del tejido mineral depositado

El tejido mineral depositado en las superficies nanoestructuradas de ZrO_2 se caracterizó por medio de tinción con alizarina roja, microscopía de fuerza atómica, microscopía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X (EDS).

6.4.1. Tinción con alizarina roja

Al observar en el microscopio estereoscópico los nódulos de calcio en las superficies de ZrO_2 , se identificó un mayor y homogéneo depósito de dichos nódulos en los grupos experimentales en los diferentes periodos de tiempo, en comparación con los controles en los que se identificaron depósitos aislados de mineral (Fig. 13).

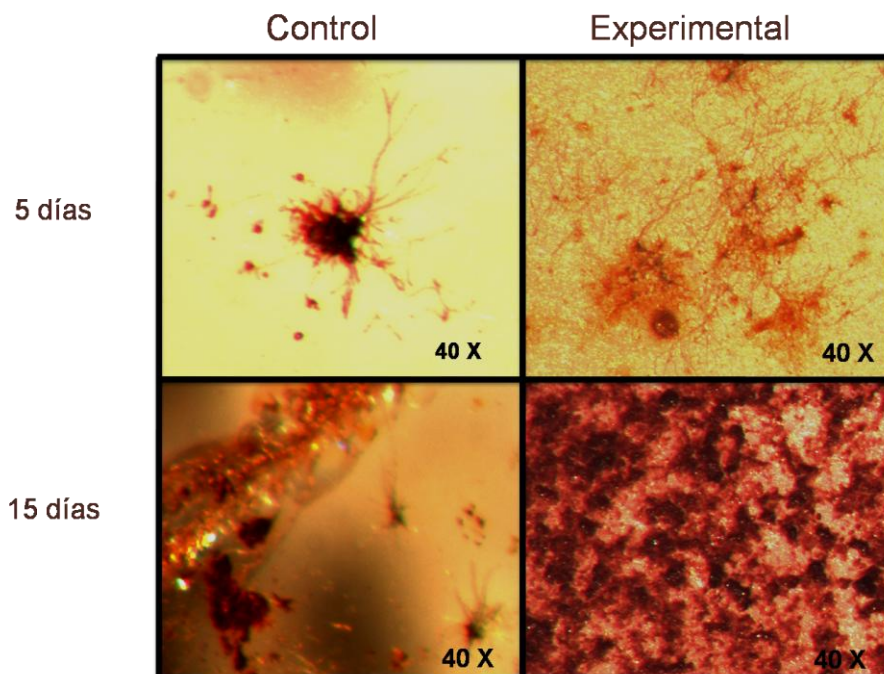


Figura 13.- Tinción de los nódulos de calcio con alizarina roja, tomado de un microscopio estereoscópico.

6.4.2. Microscopía de fuerza atómica

La formación de los nódulos de calcio se analizó en un microscopio de fuerza atómica en modo contacto, donde se observó en las superficies de grupo experimental, una dirección preferencial de los cristales, en ambos periodos de tiempo. A los 5 días se observó claramente la orientación en forma de placas delgadas las cuales están empalmadas una sobre otra, en el grupo control no se observó una disposición ordenada, a los 15 días en las superficies experimentales se siguió observando una dirección, con laminas más gruesas, en las superficies control, se observó una disposición desorganizada y sin dirección (fig. 14).

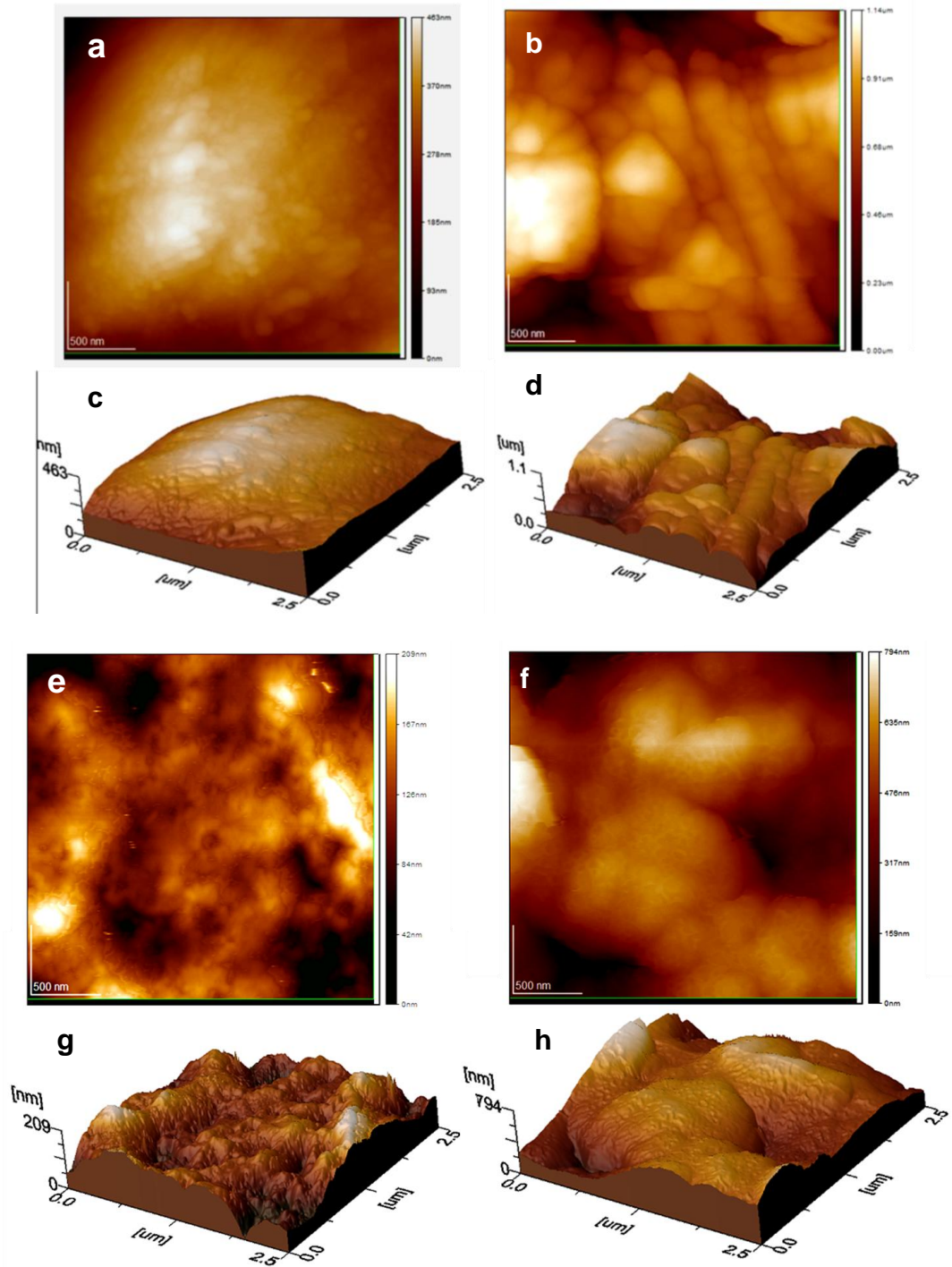


Figura 14.-. Fotomicrografía de los cristales en microscopía de fuerza atómica, a, c y e, g corresponden a los grupos control a los 5 y 15 días respectivamente y b, d y f, h, corresponden a los grupos experimentales a los 5 y 15 días.

6.4.3. Microscopía electrónica de barrido

El mineral depositado en las superficies nanoestructuradas de óxido de circonio se examinó por microscopía electrónica de barrido (fig. 15). Se encontró a los 5 días de cultivo en las superficies experimentales, pequeñas estructuras esféricas las cuales correspondían a aglomeraciones del depósito mineral. Estas aglomeraciones aumentaron de tamaño a los 15 días observando una mayor área mineralizada distribuida homogéneamente a lo largo de la superficie dando una apariencia de redes y poros, lo que indica que el depósito mineral copió la forma original de las superficie de oxido de circonio. Sin embargo, en los grupos controles, los cuales eran superficies lisas, se observaron pequeñas formaciones aisladas de formas irregulares.

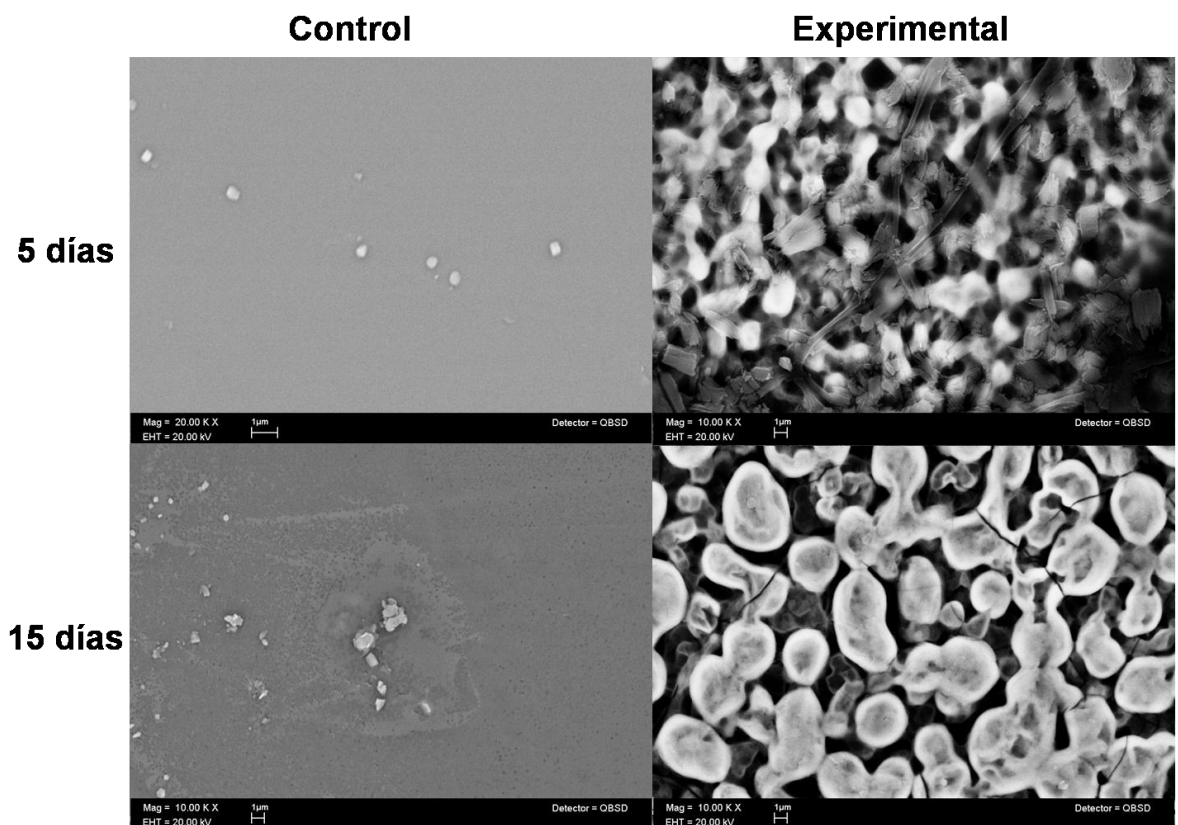


Figura 15.- Fotomicrografía de los nódulos de calcio en MEB, donde se observa un mayor ordenamiento de los nódulos en los grupos experimentales.

6.4.4. Microanálisis de energía dispersiva electrónica con rayos X (EDS)

Para conocer la composición del mineral depositado, se analizó mediante microanálisis de energía dispersiva con rayos X, la relación de calcio fósforo (Ca/P) que se presentó a los 5 y 15 días de cultivo (fig. 16).

Las muestras control presentaron cúmulos aislados de mineral por lo cual sólo se midieron los porcentajes Ca/P en esos cúmulos específicos, sin embargo a las superficies experimentales se les realizó un barrido a toda la superficie.

La relación de los grupos control fue de 1.50 a los 5 días y de 1.54 a los 15 días, lo que esta relación correspondió a Hidroxiapatita biológica.

La relación Ca/P de los grupos experimentales por la gran cantidad de mineral, se logró obtener una relación de los elementos de toda la superficie. Se encontró un porcentaje atómico de 2.12% para el Ca y 1.59% para P. Otros elementos como sodio (3.12%), magnesio (1.53%) y circonio (2.50%) estuvieron presentes en la composición global. La relación Ca/P para los 5 y 15 días fue de 1.54, lo que corresponde a los valores de hidroxiapatita (tabla 4).

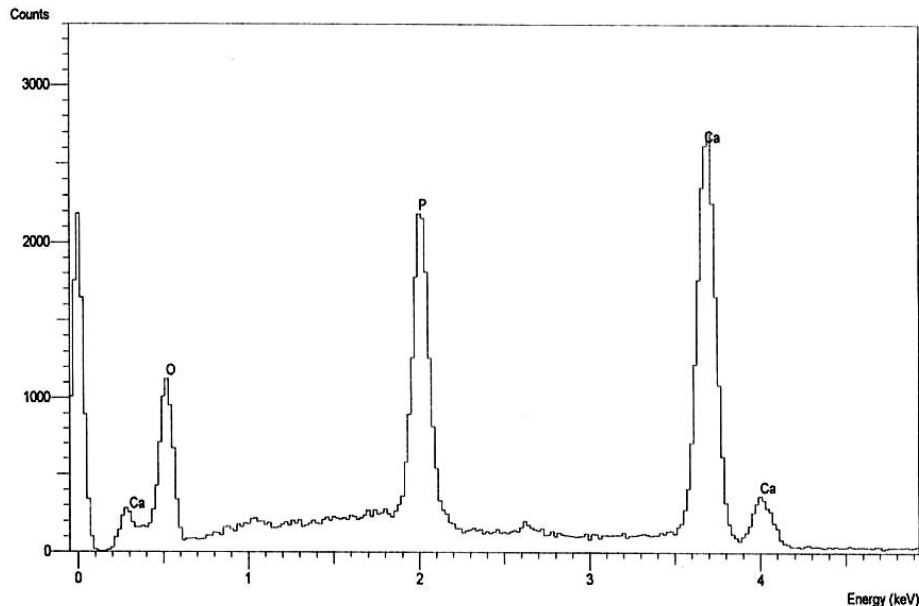


Figura 16.- EDS de las superficies experimentales a los 15 días. Se muestra la relación Ca/P= 1.54. Correspondiente a hidroxiapatita biológica.

Ca/P	Fórmula	Nombre del mineral
1	CaHPO_4	Monetita
1	$\text{CaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$	Brushita
1.3	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4\text{H}_2\text{O}$	OCP
1.43	$\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	Whitloquita
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Hidroxiapatita
1.50	$\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$	Hidroxiapatita biológica

Tabla 4. Relación Ca/P y su equivalente en mineral.

7. Discusión

En este estudio se evaluó la respuesta biológica de las superficies nanoestructuradas de óxido de circonio elaboradas mediante la técnica de rocío pirolítico.

El estudio se dividió en cuatro partes, la primera fue la elaboración de la superficie, en segundo término se evaluó la respuesta celular, seguida del análisis de proteínas involucradas en el proceso de biomineralización y finalmente se caracterizó el mineral depositado.

Elaboración de la superficie:

Las películas de óxido de circonio se depositaron a 350°C, ya que los resultados de microscopía electrónica de barrido y la difracción de rayos X mostraron que esta temperatura era la óptima. Se pudo observar una disposición de redes y poros, dando la apariencia de una matriz extracelular a niveles nanométricos. Esta disposición se evaluó en microscopía de fuerza atómica donde se observaron granos esféricos de aproximadamente 65.7 nm. El límite de nanopartículas observadas en imágenes de 3D mostraron que estuvo bien definido y se corroboró su distribución por toda la región. Otros estudios ha reportado que la respuesta celular es mayor³¹ en superficies en esta misma escala. Esto contrasta profundamente con los materiales implantados hoy en día para tratar de regenerar los tejidos del organismo humano, ya que estos pueden presentar rugosidades en la escala de micras pero son usualmente lisas en la escala nanométrica³². De hecho, en las últimas nueve décadas en las que se han administrado los bioimplantes al ser humano, la mayoría de las prótesis sintéticas, consisten de materiales con partículas y/o tamaños de grano con dimensiones en el orden de 1 a 10⁴ μm. Así estos materiales convencionales proveen una superficie poco rugosa que no promueve el depósito adecuado de matriz extracelular por parte de las células. Se ha reportado que la adhesión celular a la matriz extracelular juega un papel importante en regular los procesos celulares, tales como: quimioatracción, adhesión, proliferación y diferenciación celular^{24, 26}.

Otro punto importante para el material es que los puntos de difracción de rayos X que se obtuvieron, indican que se tratan de un sólido amorfo. Esto es importante si se compara con las cerámicas convencionales debido a que estas presentan una

microestructura cristalina lo cual genera puntos de corrosión y fracturas por estrés¹², por lo tanto esta superficie al no ser cristalina, no genera tales defectos.

Respuesta biológica:

En la segunda fase, se determinó la biocompatibilidad de la superficie evaluando la adhesión, proliferación y la morfología del citoesqueleto de los osteoblastos.

La adhesión celular fue favorecida ya que aumentó 1.72 veces con respecto al control, es importante remarcar que el incremento de la adhesión celular en las superficies nanoestructuradas es un buen indicador de que la superficie no es tóxica para las células. El ensayo de MTT lo confirma ya que hubo un incremento con respecto al control, el cual fue directamente proporcional al incremento de la actividad metabólica de los osteoblastos en la superficie del material e inversamente proporcional a los efectos tóxicos de la topografía superficial.

El incremento en la adhesión y la actividad con MTT de las células puede estar favorecido por la nanofase esférica de la formulación de óxido de circonio. Resultados similares han sido reportados por aumento en la adhesión de materiales nanoestructurados, en donde el tamaño de grano juega un papel crucial, mediante la adhesión, independiente de la química de la superficie, sólo dependiendo de la óptima topografía superficial del material^{33, 34}.

La topografía superficial influye en la orientación celular así como en su morfología celular ya que al estudiar la organización del citoesqueleto de los osteoblastos por medio de inmunofluorescencia, se observó que su morfología fue poligonal con núcleos circulares, además de que presentan diversos filopodios y contactos célula – célula comparadas con el control, las cuales eran de forma estrellada y alargada con núcleo irregular y con escasos contactos celulares. En trabajos previos se han reportado resultados similares en cuando a la morfología celular en escala de micras,^(35, 36) donde la distancia entre las partículas juegan papel crucial en la respuesta celular, ya que estas partículas dan una orientación preferencial en la forma del sustrato que refiere a la tendencia de la orientación celular³¹.

Análisis de proteínas:

La diferenciación celular de cultivos de osteoblastos humanos en las superficies nanoestructuradas, fue evaluado por la prueba de la actividad específica de la

fosfatasa alcalina y la expresión de moléculas relacionadas con la promoción de mineralización.

La actividad de la ALP es un marcador de diferenciación que marca el proceso inicial de mineralización y regula el metabolismo de los fosfatos y la formación de hueso^{37, 38}. Los resultados de la actividad específica de la fosfatasa alcalina pueden trasladarse a la iniciación de biomineralización de la matriz extracelular de los osteoblastos en la superficie del material. Los resultados del presente estudio pueden ser soportados por trabajos previos donde se ha reportado una correlación entre el aumento de la actividad de la ALP y la mineralización, cuando los osteoblastos son cultivados en materiales nanoestructurados comparados con los materiales convencionales^{40, 41}.

El proceso de biomineralización se lleva a cabo por proteínas no colágenas como BSP, la cual participa en el relleno de los espacios creados durante el ensamble de colágena, confiriendo cohesión entre el mineral con el tejido permitiendo la deposición del mineral en las fibras de colágena. Varios autores sugieren que las fosfoproteínas como BSP tienen una precisa asociación espacial en los estadios tempranos del mineral, ligando fuertemente a hidroxiapatita y actuando como un específico y potente nucleador de cristales de hidroxiapatita *in vitro* y necesariamente por la iniciación y formación del crecimiento del cristal^{41, 42}.

Los resultados del presente estudio revelan que la proteína BSP mostró significativamente altos niveles de expresión en los cultivos experimentales cuando se compararon con el control. Los niveles de expresión de dicha proteína de matriz está relacionado con el estadio temprano del proceso de biomineralización y relacionado con el crecimiento inicial de los cristales de hidroxiapatita. Los resultados de este estudio mostraron altos niveles de expresión de esta proteína de matriz con el elevado depósito en las superficies, al igual que de la osteopontina. En los resultados se observó una elevada expresión de esta proteína, la cual es una fosfoproteína capaz de unirse al calcio, que tiene una elevada afinidad hacia la hidroxiapatita y juega un papel importante en la mineralización del hueso y en calcificación distrófica.

Caracterización del mineral depositado.

El cristal examinado por microscopio de fuerza atómica mostró una orientación preferencial en forma de placas a los 5 días, las cuales se fusionaron a los 15 días y

continuaron con la misma dirección. En el microscopio electrónico de barrido se observó una secuencia morfológica del mineral, la cual es similar al tejido depositado por osteoblastos humanos. Se formaron pequeñas estructuras esféricas las cuales eran aglomeraciones de mineral depositado, estos depósitos se pudieron observar intercalados con una pequeña morfología globular adherida a la superficie a los 15 días de cultivo, donde se reveló una larga área mineralizada formada por grandes cúmulos de depósitos de mineral con estructuras de agujas similares a la orientación de los cristales de hidroxiapatita, los cuales se encontraron homogéneamente en la superficie del material.

En los cultivos experimentales y controles el microanálisis de rayos X del mineral depositado por osteoblastos humanos se mostró la presencia de calcio y fosfato, la relación fue de 1.54 lo que corresponde a hidroxiapatita biológica. Estos resultados muestran que la biomineralización no es afectada por la composición de la superficie nanoestructurada. Sin embargo, esta superficie promueve el aumento de depósito del mineral ya que en los grupos controles se encontraron cúmulos aislados y en los experimentales se encontró en toda la superficie.

8. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que:

De todos los depósitos realizados a diferentes temperaturas de las cerámicas nanoestructuradas, la que obtuvo una mejor conformación microestructural fue la depositada a 350°C, correspondiendo a un sólido amorfo.

En microscopía electrónica de barrido esta superficie mostró la apariencia de tener redes.

En microscopía de fuerza atómica, se corroboró que se trata de una superficie nanométrica.

Las superficies nanoestructuradas pueden ser consideradas como biocompatibles al permitir la adhesión y proliferación de osteoblastos humanos.

En las superficies experimentales se observó mayor presencia celular y buena disposición del citoesqueleto de los osteoblastos.

La fosfatasa alcalina, osteopontina y sialoproteína ósea, proteínas involucradas en el proceso de biomineralización se expresaron más en las superficies nanoestructuradas con respecto al control, lo que indica que las superficies experimentales promueven la mineralización de cristales de hidroxiapatita en toda la superficie.

El desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados para la ingeniería de tejidos en general, representa un paradigma a cambiar en el campo de los biomateriales, debido a que su estudio ha mostrado que las propiedades de la superficie tales como la rugosidad y química de su superficie, se tornan relevantes cuando se enfoca a los mecanismos de regulación celular, lo que se traduce en que la topografía tiene un fuerte efecto sobre la respuesta celular del material, siendo fuertes candidatos para estructurar implantes dentales e incluso prótesis ortopédicas.

9. Referencias

1. Geneser F. Histología. 3° Edición, Ed. Panamericana, México, 2000, 813 pp.
2. Bilezikian J, Raisz L, Rodan G. Principles of bone Biology. Ed. Academic Press, London, 1996, 1398 pp.
3. Fernández I, Hernández G, Alobera M, Del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: 47–51.
4. You L, Temiyasathit S, Lee P, Hyun C, Tummala P, Yao W, Kingery W, Malone AM, Kwon RY, Jacobs CR. Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008; 42: 172–179.
5. Bonewald Lf, Johnson MI. Osteocytes, mecanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008; 42(4): 606–15.
6. Wright H, McCarthy S, Middleton J, Marshall M. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Musculoskelet Med* 2009; 2: 56–64.
7. Liu H, Webste T. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 2007; 28: 354–369.
8. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J. Review: Biomaterials in orthopaedics. *J. R. Soc. Interface* 2008; 5: 1137–1158.
9. Abraham G, González M, Cuadrado T. Hacia nuevos biomateriales: aportes desde el campo de la química macromolecular. *Química* 2001; 4: 22–32.
10. Biomaterials network: <http://www.biomat.net>
11. Valdez B, Schorr M, Valdez E, Carrillo M., Biomateriales para la rehabilitación del cuerpo humano. *Ciencia y desarrollo* 2005; 1: 1–10.
12. Chevalier J, Gremillard L, Deville S. Low-Temperature degradation of zirconia and Implications for Biomedical Implants. *Mater. Res* 2007; 37: 1–32.
13. Denry I, Kelly R. State of the art of zirconia for dental applications. *Dent. Mat* 2008; 34: 299–307.
14. Hernigou P, Bahrami T. Zirconia and alumina ceramics in comparison with stainless-steel heads. *Bone Join Surg* 2003; 85-B: 504–509.

15. Kelly R. Dental ceramics: current thinking and trends. *Dent Clin N Am* 2004; 48: 513–530.
16. Whitesides GM. The right size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology* 2003; 21: 1161–1165.
17. Mazzola L. Commercializing nanotechnology. *Nature Biotechnology* 2003; 21:1137–1143.
18. Siegel RW. Creating nanophase materials. *Sci Am* 1996; 275: 42–50.
19. Murray CB, Kagan CR, Bawendi MG. Synthesis and characterization of monodisperse nanocrystals and close-packed nanocrystal assemblies. *Annu Rev Mater Sci* 2000; 30: 545–610.
20. Catle Catledge SA, Marc D, Fries A, Yogesh K, Lacefield J. Nanostructured ceramics for biomedical implants. *J Nanosci Nanotechnol* 2002; 2: 293–312.
21. Bartold M, Narayanan S, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000; 24: 253–269.
22. Kaplan FS. Form and function of bone. In: Simon SR, editor. *Orthopaedic Basic Science*. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons 1994; 21: 127–185.
23. Schmalzried T, Campbell P, Chao F. Biological issues in metal total hip arthroplasty. *Biomaterials Forum* 200; 23: 6–20.
24. DeFife KM, Shive MS, Hagen KM, Clapper DL, Anderson JM. Effects of photochemically immobilized polymer coatings on protejo adsorption, cell adhesion, and the foreign body reaction to silicone rubber. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 298–307.
25. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 47–55.
26. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295: 1009–1014.
27. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295: 1014–7.

28. Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res A* 2003; 66: 247–259.
29. Hyman EG, Engvall E, A'Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Rouslathi E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 20–23.
30. Lowry O, Roberts N, Wu M, Hixon W, Crawford E. The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement. *J Biol. Chem* 1954; 207: 19–37.
31. Kunzler T, Huwiler C, Drobek T, Janos V. Systematic study of osteoblast response to nanotopography by means of nanoparticle-density gradients, *Biomaterials* 2007; 28: 5000–5006.
32. Biggs M, Richards R, Gadegaard N, Wilkinson C, Dalby M. The effects of nanoscale pits on primary human osteoblast adhesion formation and cellular spreading. *Mater Med* 2007; 18: 399–404.
33. Woo KM, Chen VJ. Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. *Biomed Mater Res* 2003; 67: 531–537.
34. Webster TJ, Ejiófor Ju. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: Ti, Ti6Al4V and CoCrMo. *Biomaterials* 2004; 25: 4731–4739.
35. Ramaswamy Y, Chengtie W, Hummel A, Combes V, Grau G, Zreiqat H. The responses of osteoblasts, osteoclasts and endothelial cells to zirconium modified calcium-silicate-based ceramic. *Biomaterials*. 2008; 29: 4392–4402.
36. Shah A, Sinha R, Hickok N, Tuan R. High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys. *Bone* 1999; 24: 499–506.
37. Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblast functions on theta+delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 2005; 26: 953–960.
38. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthopaedics Rel Res*. 1995; 314: 266–280.
39. Price RL, Gutwein LG, Kaledin L, Tepper F, Webster TJ. Osteoblast function on nanophase alumina materials: Influence of chemistry, phase, and topography. *J Biomed Mater Res A* 2003; 67A: 1284–1293.



40. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R, Enhanced functions of osteoblast on nanophase ceramics, *Biomaterial* 2000; 21: 1803–1810.
41. Bosshar DD, Zalzal S, Mckee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum *Anat. Rec.* 1998; 250: 13–33.
42. Hunter GK, Golberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialiprotein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90, 8562–8565.