



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE  
LA SALUD**

**SÍNTESIS DE CERÁMICAS NANOESTRUCTURADAS DE  
ALUMINATO DE MAGNESIO PARA SU APLICACIÓN EN  
LA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**C.D. ALDA MARÍA MALAGÓN ESCANDÓN**

**Director de Tesis**

**Dr. MARCO ANTONIO ÁVAREZ PEREZ  
POSGRADO DE ODONTOLOGÍA**

**MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**

Javier Sacristán de Alva gracias por estar incondicionalmente a mi lado, apoyarme y motivarme a continuar estableciéndome nuevas metas.

Nuria de Alva Ruíz y José Sacristán Ruíz-Funes gracias por su cariño, consejos y ser un ejemplo de trabajo y disciplina.

A mi tutor Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez por su apoyo y dedicación en el proyecto.

A la Mtra. Cecilia Verduzco Martínez y la Dra. Silvia Maldonado Frías porque gracias a ustedes comenzó mi interés por la investigación.

Al Dr. Octavio Álvarez Fregoso y Dr. Manuel García Hipólito por su apoyo durante la síntesis y caracterización del material.

Se agradece la asesoría, así como el importante y excelente apoyo técnico del Dr. Fernando Suaste Olmos y del Dr. Jesús Arenas Alatorre.

A Conacyt que me otorgó una beca durante mis estudios de maestría.

Al apoyo por parte de la DGAPA-UNAM en el financiamiento de los proyectos PAPIIT IN213912 y PAPIIT IN210815.

## RESUMEN

La necesidad de un biomaterial ideal con aplicación en la biongeniería de tejido óseo ha generado gran interés científico para determinar las condiciones superficiales más adecuadas, especialmente en la composición química y la topografía, que sean capaces de favorecer la actividad celular y finalmente logren la regeneración y/o biointegración del biomaterial.

Este estudio comprende la síntesis y caracterización de cerámicas de  $Mg_2AlO_4$ , así como la evaluación del comportamiento de las células osteoblásticas fetales humanas en contacto con las cerámicas de  $Mg_2AlO_4$  que presentan distintas propiedades superficiales.

La síntesis de las cerámicas se realizó mediante el método de rocío pirolítico; que ha sido utilizado eficazmente en la obtención de nanopartículas y materiales nanoestructurados; ya que es posible controlar y modificar diversas condiciones, lo que permitió la obtención de 5 diferentes topografías superficiales.

Para la caracterización de las muestras obtenidas se emplearon las técnicas de difracción de rayos x (XDR), microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Las cerámicas de alúmina se han utilizado por décadas en implantología dental y ortopédica, sin embargo, su principal desventaja se debe a su carácter bioinerte, que limita su uso en la bioingeniería tisular. Recientemente se ha propuesto que dopar a la cerámica de alúmina con cationes divalentes puede incrementar su carácter bioactivo y con ello aumentar la posibilidad de uso en la bioingeniería de tejido óseo. Un catión importante en la regeneración ósea es el  $Mg^{2+}$  debido a que es parte esencial de la estructura cristalina de la fase inorgánica del hueso, por ello se propuso adicionar este catión divalente a la estructura de la cerámica alúmina para mejorar su biocompatibilidad, por lo que se evaluaron las funciones celulares como la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos fetales humanos sembrados sobre las muestras de  $Mg_2AlO_4$  obtenidas a 400, 450, 500, 550 y 600°C por la técnica de rocío pirolítico.

En este trabajo se integra la información obtenida de la caracterización fisicoquímica y el comportamiento de las células en contacto con las cerámicas de  $Mg_2AlO_4$  y se correlaciona con la información de publicaciones científicas actuales, evaluando la influencia de los factores en los resultados de este estudio, por lo que podemos determinar el uso potencial de la cerámica de  $Mg_2AlO_4$  sintetizada a 600°C como un biomaterial en la bioingeniería de tejido óseo para su aplicación en una fase preclínica.

## ABSTRACT

The need for an ideal biomaterial with applications in bone tissue engineering have been an area of enormous scientific interest, especially to determine the most suitable surface conditions, especially the chemical composition and topography, which are able to promote cell activity and finally achieve the regeneration and / or biointegration of the biomaterial.

This study involves the synthesis and characterization of  $Mg_2AlO_4$  as well as evaluating the behavior of human fetal osteoblastic cells in contact with the  $Mg_2AlO_4$  ceramic having different surface properties.

The synthesis  $Mg_2AlO_4$  ceramic was performed by spray pyrolysis method; which it has been used effectively in obtaining nanoparticles and nanostructured materials as it enables control and modify various conditions, which allowed obtaining 5 different surface topographies.

For characterization of the all samples obtained techniques x-ray diffraction, scanning electron microscopy and atomic force microscopy were employed.

Alumina ceramics have been used for decades in dental and orthopedic implants, but its disadvantage, is mainly to its inert character limiting its use in tissue engineering. Recently it has been proposed that the dope alumina ceramics with divalent cations can increase its bioactive nature and thereby increasing the possibility of use in tissue engineering. An important cation in bone regeneration is  $Mg^{2+}$  because it is an essential part of the crystal structure of the inorganic phase of bone, therefore was proposed further this divalent cation to the backbone of the ceramic to improve their biocompatibility and cell function, so that we evaluated some cellular functions such as adhesion, proliferation and differentiation of human fetal osteoblasts seeded onto  $Mg_2AlO_4$  ceramic samples obtained by spray pyrolysis technique at different temperatures (400, 450, 500, 550 and 600°C).

In this thesis work, the information obtained from the characterization, identification of the phases and the evaluation of the behavior of cells in contact with the  $Mg_2AlO_4$  ceramic were integrated and correlated with the current scientific literature evaluating the factors that may influence in the results of this study, we can determine the possible use of  $Mg_2AlO_4$  ceramics synthesized at 600 ° C as a potential biomaterial for use in bone tissue regeneration for preclinical application.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 HUESO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 REGENERACIÓN ÓSEA .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 Uso de injertos y sustitutos óseos para la regeneración ósea .....	18
2.2.2 Injerto de hueso autólogo .....	19
2.2.3 Aloinjertos óseos.....	20
2.2.4 Sustitutos óseos .....	20
<b>2.3 BIOINGENIERIA DE TEJIDOS.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Biomateriales .....	21
2.3.1.1 Clasificación de los biomateriales .....	22
2.3.1.2 Biomateriales en la regeneración ósea .....	25
2.3.1.3 Biomateriales cerámicos nanoestructurados .....	28
<b>2.4 MODIFICACIÓN DE LA ALÚMINA MEDIANTE LA ADICIÓN DE MAGNESIO PARA LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.....</b>	<b>30</b>
2.4.1 Cerámicas tipo hidrotalcita.....	31
<b>2.5 CÉLULAS EMPLEADAS EN LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.....</b>	<b>33</b>
2.5.1 Osteoblastos .....	33
2.5.2 Células del periostio .....	34
2.5.3 Células de la médula ósea .....	34
2.5.4 Células troncales mesenquimales .....	34
2.5.5 Células vasculares.....	34
<b>2.6 APLICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA BIONGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.....</b>	<b>35</b>
<b>2.7 EVENTOS QUE OCURREN POSTERIOR A LA IMPLANTACIÓN DE UN BIOMATERIAL .....</b>	<b>38</b>
2.7.1 Adhesión celular .....	38
2.7.2 Respuesta celular a la nanotopografía .....	39
2.7.3 Osteointegración .....	44
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS CERÁMICOS .....</b>	<b>46</b>
3.1.2 Técnica de rocío pirolítico ultrasónico .....	47

<b>CAPÍTULO 4.</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN</b> .....	<b>49</b>
4.1.1 Difracción de Rayos X (XDR). .....	49
4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM). .....	50
4.1.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM). .....	51
<b>CAPÍTULO 5.</b> .....	<b>54</b>
<b>5.1 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>54</b>
<b>5.2 OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>55</b>
<b>5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>55</b>
<b>5.4 HIPÓTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 6.</b> .....	<b>56</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
<b>6.1 DISEÑO DEL BIOMATERIAL</b> .....	<b>56</b>
<b>6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN</b> .....	<b>56</b>
6.2.1 Depósito de cerámicas nanoestructuradas .....	56
<b>6.3 CARACTERIZACIÓN</b> .....	<b>57</b>
6.3.1 Difracción de Rayos X .....	57
6.3.2 Microscopía electrónica de barrido .....	57
6.3.3 Microscopía de fuerza atómica .....	57
<b>6.4 ESTERILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS</b> .....	<b>57</b>
<b>6.5 CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>57</b>
<b>6.6 BIOCMPATIBILIDAD CELULAR</b> .....	<b>58</b>
6.6.1 Ensayo de adhesión celular .....	58
6.6.2 Ensayo de proliferación celular .....	58
6.6.3 Morfología celular .....	59
<b>6.7 BIOACTIVIDAD CELULAR</b> .....	<b>59</b>
6.7.1 Fosfatasa alcalina .....	59
6.7.2 Caracterización del material mineral depositado por tinción de Alizarina Roja S. ....	60
<b>6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO 7.</b> .....	<b>62</b>
<b>7.1 RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
7.1.1 Caracterización mediante difracción de rayos X. ....	62
7.1.2 Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido .....	67
7.1.3 Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica .....	71
7.1.4 Adhesión celular .....	73

7.1.5 Proliferación celular .....	74
7.1.6 Morfología celular .....	76
7.1.7 Fosfatasa alcalina .....	78
7.1.8 Caracterización del material mineral.....	79
CAPÍTULO 8.....	81
DISCUSIÓN .....	81
CAPÍTULO 9.....	86
CONCLUSIONES .....	86
REFERENCIAS.....	87
ANEXO .....	100

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura 1..	13
Figura 2..	14
Figura 3 ..	18
Figura 4..	19
Figura 5..	20
Figura 6..	25
Figura 7..	31
Figura 8..	39
Figura 9..	40
Figura 10..	41
Figura 11..	42
Figura 12..	44
Figura 13..	47
Figura 14..	51
Figura 15..	53
Figura 16..	56
Figura 17..	60
Figura 18..	64
Figura 19..	65
Figura 20..	65
Figura 21..	66
Figura 22..	67
Figura 23..	67
Figura 24 ..	69
Figura 25..	70
Figura 26..	72
Figura 27..	73
Figura 28..	75
Figura 29 ..	77
Figura 30..	78
Figura 31..	79
Figura 32..	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.COMPOSICIÓN DEL HUESO .....	14
Tabla 2.ELEMENTOS TRAZA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS .....	15
Tabla 3. APLICACIONES DE BIOMATERIALES EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	26
Tabla 4. APLICACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO.....	36
Tabla 5. PARÁMETROS PARA CALCULAR LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DE UN BIOMATERIAL .....	43
Tabla 6. CAMBIOS EN LA DISTANCIA INTERPLANAR .....	63
Tabla 7. RESULTADOS DE RUGOSIDAD SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS .....	71
Tabla 8. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR .....	100
Tabla 9. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR .....	100
Tabla 10. RESULTADOS ESTADÍSTICOS EN ENSAYOS DE FOSFATASA ALCALINA.....	101
Tabla 11. RESULTADOS ESTADÍSTICOS EN ESAYOS DE ALIZARINA ROJA .....	101

## CAPÍTULO 1.

### INTRODUCCIÓN

A pesar del conocimiento generado acerca de las causas fisiológicas y patológicas que llevan al daño y/o pérdida del tejido óseo<sup>1,2</sup> sigue siendo un reto la regeneración o remplazo de dicho tejido; principalmente porque los biomateriales deben cumplir con las condiciones necesarias para biointegrarse y ser funcionales<sup>2-6</sup>.

Uno de los retos actuales es crear un ambiente más propicio para la función osteoblástica y posteriormente permitir la regeneración y osteointegración<sup>2,3,7-14</sup>, los trabajos realizados para entender estas interacciones, sugieren que los eventos que controlan las respuestas célula-sustrato pueden delimitarse a dos propiedades importantes: (I) las propiedades físico-químicas de la superficie del biomaterial y; (II) la topografía superficial que presenta el biomaterial<sup>15</sup>.

La topografía superficial es la propiedad que más atención ha recibido por parte de los investigadores del área de la bioingeniería de tejidos mineralizados en las últimas nueve décadas que se han administrado implantes biológicos al ser humano. Esta propiedad puede conceptualizarse como la morfología del sustrato en cuanto a tamaño, forma y textura; que se considera como uno de los parámetros más importantes que afecta la respuesta de los osteoblastos cuando se utilizan biomateriales para sustituir o regenerar el tejido óseo<sup>16</sup>.

En años recientes, con los avances en la tecnología; las investigaciones enfocadas a la regeneración del tejido óseo se han centrado en la aplicación biomédica de nanomateriales; en especial en sus propiedades físico-químicas y de topografía superficial que presentan cuando se comparan con sus homólogos en fase convencional<sup>17,18</sup>.

Lo anterior se debe a que el hueso es considerado como un material compuesto nanoestructurado; ya que está compuesto por una matriz orgánica que contiene proteínas colágenas y no colágenas y una matriz inorgánica compuesta principalmente por cristales de hidroxapatita que poseen dimensiones nanométricas en su matriz extracelular, así como otros minerales traza como el  $Mg^{2+}$ , que es indispensable para la homeostasis del tejido óseo<sup>13</sup>, y que además es capaz de sustituir al ión calcio en sus sitios de formación de la red cristalina sin alterar sus propiedades.

Mediante estudios *in vitro* se ha reportado que los osteoblastos son células capaces de percibir, sentir y responder a los cambios nanotopográficos de los biomateriales para orientarse y que logran favorecer la migración en estas superficies; así como presentar una respuesta biológica favorable en cuanto a, proliferación y síntesis de proteínas de matriz extracelular como la colágena tipo I<sup>10,12</sup> y fosfatasa alcalina<sup>19,20</sup>.

Esto ha llevado a estudiar las propiedades de los biomateriales en fase nanométrica, la cerámica de alúmina, se han usado por décadas en fase convencional; debido a sus excelentes propiedades físicas y mecánicas como la alta resistencia a la carga y a la compresión que han sido analizadas anteriormente, pero presentan deficiencias asociadas a la interacción célula-sustrato como citotoxicidad y la adhesión inicial de células fibroblásticas que favorecen la formación de tejido fibroso en la interfase célula-sustrato; lo que constituye la principal causa de fracaso aséptico en la biointegración de un biomaterial; lo cual se debe a su carácter bioinerte<sup>11,21</sup>, por lo que se han buscado estrategias que permitan potencializar sus propiedades favorables y eliminar las propiedades indeseables; en estudios recientes se ha propuesto la adición de  $Mg^{2+}$  en nanomateriales con aplicación en la ingeniería de tejido óseo; el  $Mg^{2+}$  como se mencionó anteriormente es un mineral esencial en la regulación del proceso de osificación, posee propiedades antisépticas contra estreptococos y alta tasa de degradabilidad; por lo tanto algunos autores proponen introducir cationes divalentes a manera de composito, con el fin de modificar las propiedades superficiales de un material bioinerte y transformarlo en un material bioactivo; por ello nosotros proponemos la síntesis de una cerámica composito de  $MgAl_2O_4$ , con el fin de crear un sinergismo de sus propiedades benéficas y eliminar los efectos indeseables antes mencionados asociados al  $Al^{3+}$ <sup>28</sup>.

Se utilizó la técnica de rocío pirolítico ultrasónico para la síntesis de la nanocerámica; en donde el compuesto precursor se encuentra fase de vapor y es posible controlar la distribución, altura y diámetro de partículas depositadas sobre sustratos de vidrio coring 7059 en función de la temperatura del sustrato y a través de controlar y variar la temperatura de depósito pudimos producir diferentes topografías con distintas escalas de rugosidad de las películas nanoestructuradas. Identificar las respuestas celulares asociadas a los cambios superficiales podría tener un gran impacto en la implantología biomédica; ya que se ha reportado, que la nanotopografía es capaz de influenciar el comportamiento celular. Con esta perspectiva, nosotros realizamos estudios preliminares de la respuesta celular a los cambios nanotopográficos de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  en términos de biocompatibilidad y bioactividad.

## CAPÍTULO 2.

### ANTECEDENTES

#### 2.1 HUESO

El hueso es un componente del sistema esquelético que está involucrado en la protección, soporte y motilidad del cuerpo humano.

Los osteocitos, osteoblastos y osteoclastos son las principales células que favorecen los procesos de formación, mantenimiento y regeneración ósea.

Los osteoblastos son células diferenciadas de las células troncales mesenquimales presentes en la médula ósea, presentan una morfología cúbica aplanada y tienen un diámetro promedio de 20µm, forman una matriz colágena tipo I desordenada que se mineraliza con cristales de hidroxapatita para formar el hueso, mientras que los osteoclastos reabsorben y remodelan áreas de tejido óseo en una estructura de fibras paralelas, orientadas en direcciones alternadas dependiendo de las fuerzas aplicadas al hueso<sup>41</sup>.

Los osteocitos son las células más abundantes en el tejido óseo maduro, derivan de los osteoblastos, poseen una morfología dendrítica que permite y favorece interacciones osteocito-osteocito y de osteocitos con otras células de la superficie ósea mediante osteosincitos, aún se desconoce con precisión sus funciones pero se relacionan con procesos de regeneración ósea e intercambio iónico en la superficie ósea<sup>42</sup>.

La macro y microestructura ósea son afectadas por factores genéticos, metabólicos y mecánicos. Estos factores intrínsecos son la causa principal de la diversidad en la macroestructura<sup>29-31</sup>.

Todos los huesos presentan una doble estructura:

- Periostio o capa externa: es un tejido suave, denso y continuo que lo cubre estrechamente, mediante una delgada capa de fibras colágenas, llamadas fibras de Sharpey, las cuales se extienden dentro del hueso subyacente.
- Endostio: estructura membranosa que cubre la superficie externa del hueso cortical, hueso esponjoso y canales de Volkman donde se encuentran los vasos sanguíneos, el endostio se encuentra en contacto directo con el espacio de la médula ósea, canales de vasos sanguíneos, osteoblastos y osteoclastos<sup>29</sup>. (Figura 1).

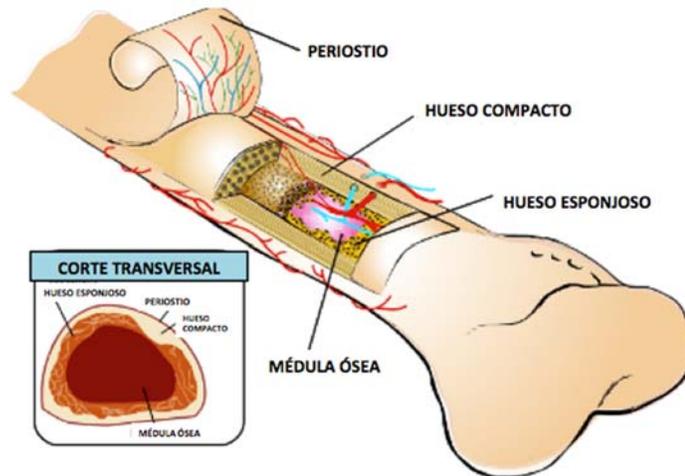


Figura 1. Esquema donde se puede observar la estructura ósea de un hueso largo, junto con un corte transversal que permite identificar la localización de sus componentes.

Fuente: <http://www.goventureoasis.com/resources/png/5120509022010.png>

El hueso puede clasificarse estructuralmente en:

### a) Hueso Cortical

Este tipo de hueso es denso en su superficie externa o perióstica, la cual forma una capa protectora alrededor de la cavidad interna endosteal, la matriz ósea es sólida debido a que es conformada con un componente orgánico, sustancia fundamental y otro inorgánico, con minerales como hidroxapatita, dejando sólo pequeños espacios llamados lagunas que en su interior contienen osteocitos.

Este tipo de hueso forma cerca del 80% de la masa esquelética, es indispensable para la estructura y soporte del peso corporal, debido a su alta resistencia a la flexión y torsión<sup>32,37</sup>.

### b) Hueso Esponjoso

El tejido está organizado en una red de placas y espículas interseccionadas, llamadas trabéculas. Estas cavidades contienen médula roja (células hematopoyéticas) y médula amarilla (adipocitos); estas características cambian de acuerdo a la edad y al sitio anatómico<sup>37</sup>.

Ambos tipos de hueso son altamente complejos a nivel microscópico, por lo general pueden ser considerados como una forma de tejido conectivo especializado que presenta una composición híbrida, orgánica e inorgánica con estructuras en rango macrométrico y nanométrico<sup>38</sup>. (Tabla 1 y Figura 2)

Tabla 1.COMPOSICIÓN DEL HUESO

Componente	Porcentaje
Inorgánico (Hidroxiapatita*)	65%
Orgánico (Colágena Tipo I*)	20%
Agua	15%

\* Componente principal

Fuente: Clarke, Bart. "Normal bone anatomy and physiology." Clinical journal of the American Society of Nephrology 3.Supplement 3 (2008):133

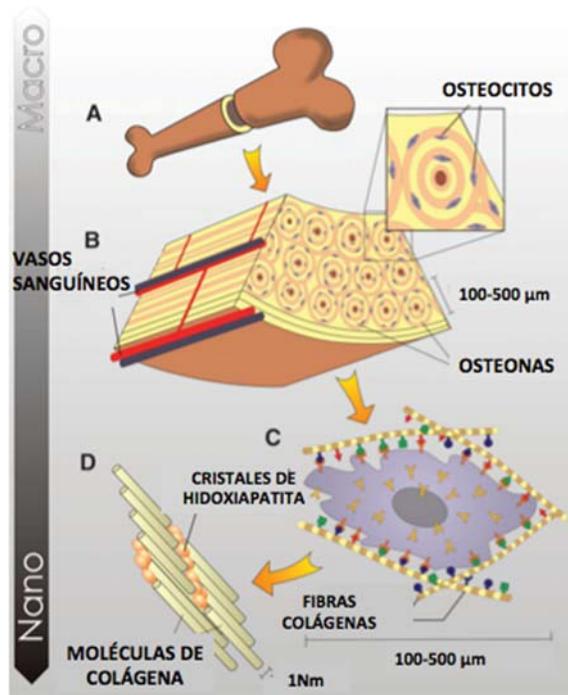


Figura 2. Esquema de los componentes micrométricos y nanométricos del hueso, así como la localización e interacción de los componentes orgánicos e inorgánicos del mismo.

Fuente: Stevens, Molly M., and Julian H. George. "Exploring and engineering the cell surface interface." Science 310.5751 (2005): 1135

### - Componente Inorgánico:

Está compuesto principalmente de nanocristales de hidroxiapatita de aproximadamente 4nm, que presentan la siguiente fórmula química  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ <sup>36</sup>; la fase mineral primaria está formada por remanentes de apatita mineral madura derivada de agrupaciones de  $(Ca_9PO_4)_6$  alineadas al azar con agua de cristalización para formar precursores de fosfato cálcico amorfo, la composición de la hidroxiapatita puede presentar variaciones de acuerdo a la proporción de Calcio-Fósforo; esto se debe al aumento de otros elementos traza como sodio, potasio, magnesio, manganeso, fluoruro, citrato y cloruro, los cuales son indispensables en la homeostasis de tejido óseo<sup>37</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.ELEMENTOS TRAZA EN LOS TEJIDOS MINERALIZADOS (PORCENTAJE DE PESO TOTAL)**

ELEMENTO	ESMALTE DENTAL	DENTINA	HUESO
Calcio	36.1%	35%	35.5%
Fósforo	17.3%	17.1%	17.1%
Dióxido de carbono	3%	4%	4.4%
Magnesio	.5%	1.2%	.9%
Sodio	.2%	.2%	1.1%
Potasio	.1%	.007%	.1%
Cloro	.3%	.001%	.1%
Flúor	.016%	.017%	.02%
Sulfuro	.1%	.2%	.6%
Zinc	.016%	.018%	-
Silicón	.003%	-	.04%
Relación atómica Ca/P	1.62%	1.59%	1.71%
Cristalinidad	70-75%	33-37%	33-37%

Fuente: Sáenz, Alejandro, et al. "Ceramic biomaterials: An introductory overview." Journal of Materials Education 21.5/6 (1999): 301.

### - Componente Orgánico:

Está compuesto principalmente de fibras colágenas tipo I con un diámetro aproximado de 50nm, las cuales se unen en fibrillas de 500 nm y posteriormente se agrupan en fibras y forman una estructura laminar alrededor de los conductos Haversianos en el hueso cortical con un diámetro de 3-7  $\mu\text{m}$ <sup>38</sup>.

Las proteínas no colágenas representan el 10-15% del total de proteínas óseas, de las cuales el 25% se originan de manera exógena o a partir de la albúmina sérica y  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína, las cuales se unen a la hidroxiapatita debido a su pH ácido<sup>39</sup>.

Las proteínas no colágenas derivan del suero y pueden ayudar a regular la mineralización de la matriz y  $\alpha$ 2-HS-glicoproteína, la cual en humanos es la análoga de la fetuína, puede regular la proliferación de células óseas<sup>39</sup>. Las

proteínas de origen exógeno son factores de crecimiento y una variedad de moléculas trazas que afectan la actividad celular ósea <sup>39</sup>.

La expresión de proteínas y genes específicos del hueso son importantes marcadores para analizar el fenotipo osteoblástico en estudios *in vivo e in vitro*<sup>35</sup>, la regulación transcripcional de estos genes es fundamental para la regulación de los procesos de diferenciación y que puedan llevar a cabo su función, entre los que podemos encontrar<sup>38</sup>:

- Proteoglicanos: Son receptores de membrana que regulan el diámetro de las fibras colágenas, favorecen el ensamblaje de fibras colágenas de la matriz extracelular y participan en el proceso de mineralización.
- Osteonectina: Es una proteína que se une a la colágena y a su vez a los cristales de hidroxapatita por su afinidad al  $Ca^{2+}$  y favorece el proceso de mineralización.
- Osteopontina: Esta proteína contiene la secuencia RGD, participa en procesos de adhesión, migración y diferenciación celular.
- Osteocalcina: Es la proteína no colágena más abundante, tienen afinidad por el calcio y por la hidroxapatita sin cristalizar, está involucrada en el recambio óseo.
- Sialoproteína ósea: es una fosfoproteína altamente glicosilada y sulfatada, posee un motivo RGD que es capaz de unirse a la hidroxapatita y a integrinas de la superficie celular, favorece la remodelación ósea <sup>40</sup>.

En el hueso y otros tejidos mineralizados, los cristales mineralizados son formados por placas delgadas de forma irregular, con un rango de tamaño que va de 20 Å a 1000 Å. Estos cristales de hueso exponen una gran área superficial a los fluidos extracelulares, lo cual es indispensable para el intercambio iónico<sup>30</sup>.

La mineralización del hueso comienza con su nucleación dentro de cavidades y poros presentes en las fibrillas de colágena; esta nucleación heterogénea es catalizada por la presencia de grupos éster fosfatados, los cuales están presentes en las fibrillas de colágena que eventualmente se interconectan con todas las fibras colágenas. Esta composición híbrida del hueso en donde la matriz orgánica es reforzada con cristales de fosfato de calcio y la combinación de colágena y la matriz mineralizada hacen que el hueso sea lo suficientemente fuerte y flexible para resistir la carga y el estrés <sup>30,38,40</sup>.

## 2.2 REGENERACIÓN ÓSEA

La regeneración ósea es un proceso que implica una serie de eventos celulares y moleculares complejos que generan la formación de nuevo tejido óseo que conserva su composición, estructura y funcionalidad<sup>41</sup>.

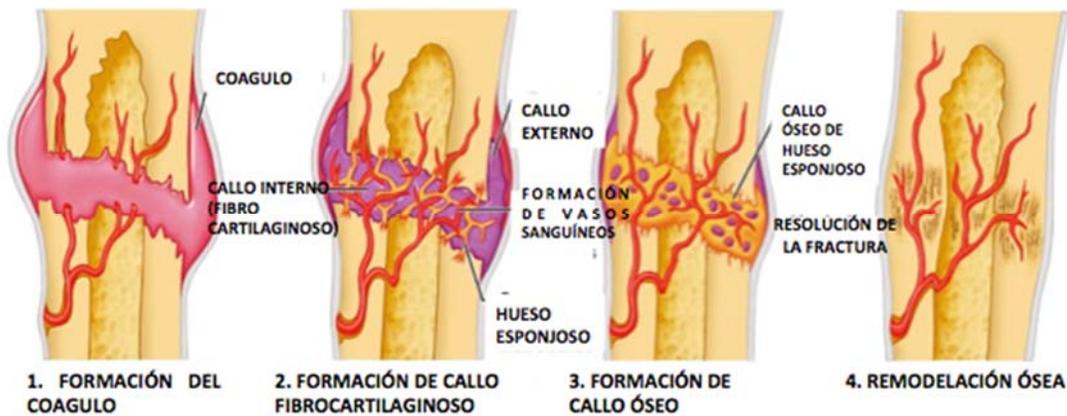
Después de un daño, se pierde la integridad del endotelio vascular, el sangrado a estructuras adyacentes causa un coagulo desde la periferia del hueso dañado hasta sus extremos, existe un proceso inflamatorio, que se manifiesta con una producción de citocinas pro inflamatorias como: Factor de necrosis tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6)<sup>31</sup>.

Los fibroblastos llegan al sitio de la lesión y forman tejido de granulación que está compuesto por colágena tipo III y vasos sanguíneos; en el extremo proximal del hueso se reclutan condroblastos que provienen del periostio y producen cartílago hialino, en el extremo distal del hueso se reclutan osteoblastos provenientes del periostio e inducen la formación de la matriz ósea, principalmente colágena tipo I, que se combinan formando el callo óseo<sup>31,41</sup>.

Los macrófagos producen citocinas y varios factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); que inducen la angiogénesis y la formación ósea a partir del reclutamiento de células progenitoras del periostio, mediante un proceso llamado síntesis de matriz extracelular<sup>31</sup>,

La matriz formada, posteriormente se somete a una sustitución ósea y el cartílago hialino a una osificación endocondral; éstos procesos producen la maduración del tejido óseo o hueso lamelar, posteriormente los osteoblastos y canales vasculares penetran la matriz mineralizada y se establece el trabeculado óseo, el remodelado óseo finaliza con la deposición de hueso compacto por los osteoblastos en lagunas de resorción de osteoclastos<sup>31,37</sup>.

La neovascularización de un tejido dañado es la clave de la regeneración debido a que provee la zona de oxígeno y facilita la remoción de residuos metabólicos y la liberación de células progenitoras a partir de células hematopoyéticas<sup>41</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la regeneración de tejido óseo comprende principalmente 4 fases que requieren la interacción de una compleja serie de eventos celulares y moleculares.

Fuente: <http://www.idingada.org/proses-penyembuhan-tulang/>

### 2.2.1 Uso de injertos y sustitutos óseos para la regeneración ósea

El hueso posee una vasta capacidad de regeneración y remodelación a lo largo de la vida, mediante procesos de resorción y deposición de nuevo tejido mineralizado<sup>41</sup>, esto se debe principalmente al potencial de diferenciación de las células troncales mesenquimales y/o células osteogénicas mediante una compleja interacción de hormonas, factores de crecimiento y señalización del ambiente con la matriz extracelular ósea<sup>42-43</sup>.

En algunas ocasiones las pérdidas óseas o defectos son tan extensos que requieren la adición de injertos o sustitutos óseos, esto para ayudar a restituir la periferia de una prótesis, la reparación de fracturas, o para aportar un nicho biológica y mecánicamente estable que permita la fijación de un implante<sup>44-47</sup>.

Existen tres principales estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades óseas o pérdida de hueso en pacientes<sup>44</sup>.

1. Implantación de células recién aisladas o células cultivadas ya sea de carácter troncal u óseo
2. Regeneración tisular in situ
3. Implantación de un tejido similar a hueso acoplado in vitro a partir de células y andamios<sup>44</sup>.

Para elegir el mejor material se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las necesidades clínicas de su aplicación
- Tamaño del defecto y masa ósea total requerida
- Propiedades biomecánicas
- Composición química

- Disponibilidad
- Bioactividad (osteoconductividad y osteoinductividad)
- Tiempo deseado de resorción
- Manipulación
- Efectos asociados
- Costo
- Implicaciones éticas <sup>41</sup>.

### 2.2.2 Injerto de hueso autólogo

Los injertos de hueso autólogo se definen como el uso del propio hueso del paciente de un sitio donador, generalmente la cresta iliaca para colocarlo en el sitio afectado, así como la aplicación de distintos tipos de hueso esponjoso, cortical vascularizado, cortical no vascularizado y médula ósea estos injertos poseen propiedades osteoconductoras y osteoinductoras<sup>48</sup>. (Figura 4)



**Figura 4. Esquema de osteotomía donde se toma un injerto óseo de espesor total de la sínfisis mentoniana.**

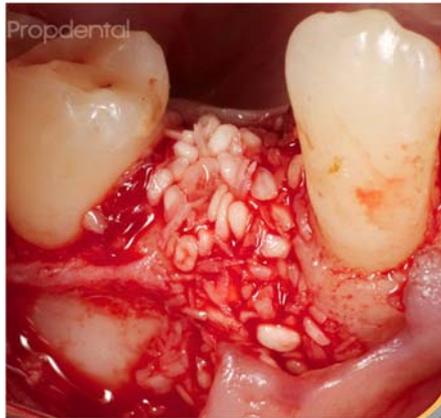
Fuente: [http://www.clinicadentalabra4.com/images/casos-clinicos/730\\_cirugia\\_oral\\_e\\_implantologia\\_injertos\\_oseos\\_menton\\_caso\\_5.jpg](http://www.clinicadentalabra4.com/images/casos-clinicos/730_cirugia_oral_e_implantologia_injertos_oseos_menton_caso_5.jpg)

Aunque el uso de injertos autólogos se considera un estándar de oro en la regeneración de tejido óseo, presenta numerosas deficiencias y contraindicaciones, que limitan su uso, donde principalmente encontramos:

- El daño al sitio donador
- Limitada cantidad obtenida
- Problemas estructurales y anatómicos
- Elevada tasa de resorción durante la regeneración
- Implicaciones éticas <sup>49</sup>

### 2.2.3 Aloinjertos óseos

Son injertos tomados de cadáveres u otros individuos, para prevenir la respuesta inmune del huésped en contra del injerto, los aloinjertos son procesados para remover sus componentes celulares vivos, el producto final es un injerto óseo que contiene las bases de un material mineral osteoconductor, pero carece de las propiedades osteoinductivas que poseen los injertos autólogos<sup>41</sup> (Figura 5).



**Figura 5. Esquema de un aloinjerto bovino liofilizado, colocado en el alveolo dental post extracción quirúrgica dental.**

Fuente: <http://www.propdental.es/wp-content/uploads/2013/04/regeneracion-osea-guiada.jpg>

Entre las limitaciones de su uso se encuentran:

- Riesgo de transmisión de enfermedades y de presentar una respuesta inmunológica debido a fallas durante el procesamiento.
- Resultados clínicos impredecibles y muy variados<sup>49,50</sup>.

### 2.2.4 Sustitutos óseos

Los avances tecnológicos han permitido desarrollar materiales sintéticos como alternativas en sustitución de los injertos autólogos y aloinjertos óseos, éstos son capaces de obtener resultados favorables, debido a sus múltiples presentaciones como bloques, gránulos de diferentes tamaños, masillas y pasta inyectable<sup>41</sup>.

Sus propiedades dependen directamente en el método clínico de aplicación, sitio de receptor, tamaño y causa del defecto óseo.

La reparación y regeneración ósea son procesos complejos que requieren la interacción entre las células, el andamio, y el nanoambiente que aporta las moléculas de señalización necesarias; en donde las propiedades de la superficie favorecen la proliferación celular, actividad osteoblástica y angiogénesis del

tejido<sup>31,41</sup>, por lo que es necesaria la interacción de los siguientes 4 factores para la regeneración ósea:

- Matriz osteoconductiva: Características del injerto o biomaterial que permite la orientación de vasos sanguíneos y la formación de nuevos sistemas haversianos.
- Estímulo osteoinductor: Se lleva a cabo mediante una cascada de señalizaciones y activación de receptores intracelulares y extracelulares, principalmente miembros de la familia TGF-  $\beta$ , que estimulan y activan las células mesenquimales del huésped a diferenciarse en osteoblastos y formar hueso.
- Células con potencial osteogénico: Son células osteoprogenitoras que se encuentran en el injerto o son sembradas sobre los biomateriales y que poseen la capacidad de proliferar y diferenciarse en osteoblastos y posteriormente en osteocitos.
- Ambiente que ofrezca estabilidad mecánica de osteointegración: Esto finalmente se logra mediante la unión a la superficie del biomaterial, con el hueso del huésped<sup>38,41,42</sup>.

Los materiales artificiales son empleados principalmente con 2 aplicaciones:

1. Biomateriales
2. Andamios para interactuar con células en la bioingeniería de tejidos

## **2.3 BIOINGENIERIA DE TEJIDOS**

El concepto de bioingeniería de tejidos se presenta como el enfoque actual de investigación en ortopedia e implantología.

La bioingeniería de tejidos ha emergido como un campo interdisciplinario en el que se aplican los principios biológicos y la ingeniería para desarrollar nuevos sustitutos que permitan restaurar y mantener la función de tejidos dañados<sup>51</sup>, estos biomateriales son indispensables para poder guiar de manera rápida, predecible y controlable la regeneración de los tejidos del huésped.

Los biomateriales funcionan como andamios, ya que al interactuar con las células permiten formar estructuras tridimensionales que tienen como objetivo sustituir a la matriz extracelular nativa para restablecer estructural y funcionalmente los tejidos dañados y/o perdidos, y en consecuencia aumentar la tasa de regeneración tisular<sup>52,53</sup>.

### **2.3.1 Biomateriales**

Actualmente la definición más aceptada de biomaterial, lo describe como cualquier sustancia o combinación de sustancias distintas a los fármacos; las cuales pueden ser de origen natural o sintético y que pueden ser utilizados por un período indefinido de tiempo; aumentando o sustituyendo parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función corporal, con el fin de mantener o mejorar la calidad de vida del individuo<sup>53</sup>.

### **2.3.1.1 Clasificación de los biomateriales**

Los biomateriales pueden clasificarse de acuerdo a su origen en:

- Naturales
- Sintéticos
- Compositos

### **BIOMATERIALES NATURALES**

Un biomaterial se define como natural si es un producto, compuesto o sustancia producida por un organismo vivo, que se encuentre en la naturaleza y posea características biológicas con aplicaciones terapéuticas sustentadas para su uso en el desarrollo farmacológico, diseño de drogas y dispositivos con aplicación clínica<sup>54</sup>.

Aunque el desarrollo de biomateriales naturales ha existido durante siglos, su uso ha tenido un notable resurgimiento en el área biomédica, pero sus principales limitaciones se encuentran en la síntesis; ya que puede ser demasiado complicada debido a la complejidad estructural y muy costosa en términos de producción a escala industrial, así como otras contraindicaciones como las reacciones inmunogénicas que causan posterior a su implantación, toxicidad, la inestabilidad química y térmica, tiempo de degradación y a la variabilidad estructural y molecular de cada lote <sup>54</sup>.

### **BIOMATERIALES SINTÉTICOS**

Son aquellos biomateriales sintetizados a partir de sustancias o mezclas químicas y que requieren de la tecnología para su fabricación, sus principales ventajas respecto a los biomateriales naturales son: la alta reproductibilidad, se pueden realizar diversos cambios durante su síntesis con el fin de mejorar sus propiedades y ajustarlas a las necesidades de aplicación, y pueden ser más accesibles en cuanto a costo y disponibilidad<sup>54</sup>.

De acuerdo a su naturaleza química se clasifica en:

- Metales
- Cerámicos
- Polímeros

## METALES

Los metales se definen como materiales en el que existe un solapamiento entre la banda de valencia y la banda de conducción en su estructura. Esto le confiere capacidad de conducir fácilmente calor y electricidad.

Estos materiales son usados desde el siglo XX, en un principio eran aleaciones inoxidable a base de vanadio, después se utilizaron otras como: cromo, cobalto, níquel, hierro, molibdeno, tungsteno y titanio, las cuales sólo son toleradas por el organismo en mínimas cantidades <sup>55</sup>.

La biocompatibilidad de los biomateriales metálicos está en consideración; debido a que sufren corrosión en un ambiente *in vivo*, la consecuencia de su corrosión es la desintegración del biomaterial, lo cual debilita su estructura y el efecto de la corrosión en el organismo es dañino debido a los subproductos liberados que estarán en contacto con los órganos y tejidos circundantes<sup>56,57</sup>.

Se han realizado estudios *in vivo e in vitro* con diversas aleaciones tratando de resolver las principales problemáticas que son la resistencia a la corrosión y obtener un módulo de Young o de elasticidad similar al hueso, pero hasta ahora no se ha encontrado un metal y/o aleación ideal<sup>56</sup>.

## CERÁMICOS

Los cerámicos son materiales no metálicos e inorgánicos, su uso posee ventajas comparado con la aplicación clínica de otros materiales<sup>47</sup>, su estructura es altamente dependiente de su proceso de fabricación y su temperatura de síntesis; lo que permite lograr una amplia gama de tamaños, formas, distribución de granos y poros, además presentan una excelente biocompatibilidad con el tejido óseo, no son carcinogénicos, no causan reacción alérgica ni inflamatoria, presentan resistencia a la corrosión, a la tensión y una distribución uniforme de cargas compresivas a lo largo del biomaterial<sup>47</sup>.

Los biomateriales cerámicos se clasifican generalmente en biovidrios, vitrocerámicos y fosfatos cálcicos; su aplicación como biomateriales y específicamente como sustituto óseo comenzó alrededor de 1920, donde se observó que las células del huésped eran capaces de colonizar su superficie, pero dejaron de utilizarse por casi 50 años; por un gran auge en la industria metalúrgica<sup>56</sup>, hasta 1970 donde comenzaron a usarse los fosfatos cálcicos como rellenos de defectos óseos<sup>58-62</sup>.

La alfa-alúmina ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) fue uno de los materiales cerámicos pioneros usados en la regeneración ósea debido a las similitudes con la fase inorgánica mineral ósea y su alta resistencia a la fricción y el desgaste en su aplicación en ortopedia, debido

a sus excelentes propiedades mecánicas pero poca interacción celular comenzó a usarse en combinación con otros biomateriales <sup>47</sup>.

Una nueva generación de biomateriales bioactivos ha ganado mucha atención, debido a sus propiedades químicas y mecánicas que pueden optimizarse dependiendo del método y condiciones de síntesis para mejorar la interacción con las células del huésped así como el proceso de osteointegración, por lo que la búsqueda del biomaterial cerámico ideal se centra en los materiales bioactivos y en las condiciones superficiales que permitan y favorezcan el biomimetismo con el tejido óseo<sup>63-66</sup>.

## **POLÍMEROS**

Los polímeros son materiales de origen natural y sintéticos por lo que tienen gran importancia tanto como productos naturales como en las economías industriales modernas.

Algunos polímeros naturales como los ácidos nucleicos y las proteínas llevan y manipulan información biológica, mientras que otros polímeros como los polisacáridos son elementos estructurales de algunos organismos y proporcionan energía para permitir la actividad celular, a partir de los años 60s los polímeros naturales como la colágena, dextrano, gelatina, quitina y quitosano han sido empleados como materiales reabsorbibles y como biomateriales; principalmente aplicados en la bioingeniería de tejido conectivo<sup>54</sup>.

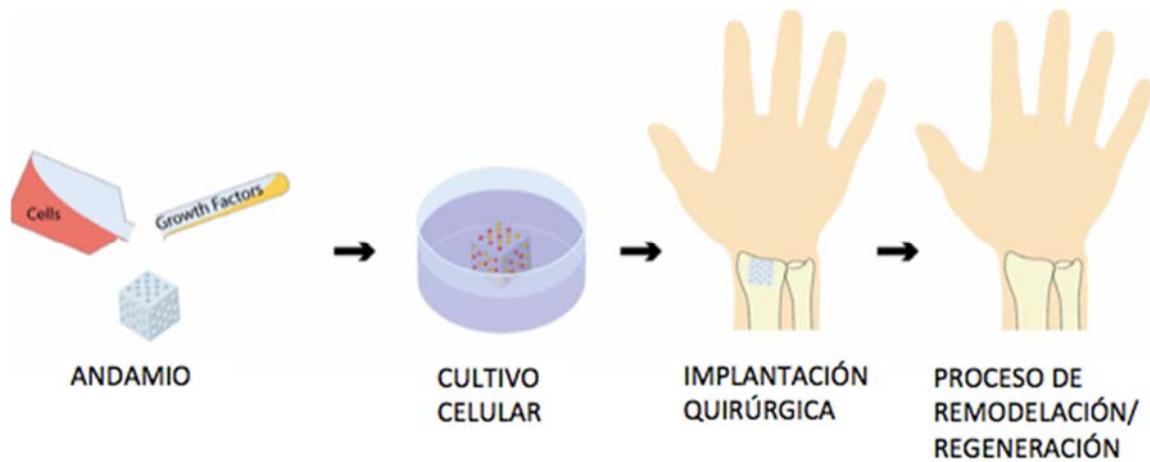
Los polímeros sintéticos como la policaprolactona, el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico y el nylon han sido usados ampliamente en dispositivos médicos, materiales con fines protésicos, materiales dentales, sistemas de liberación de fármacos, entre otros; presentan ventajas respecto a los polímeros naturales como: uniformidad en composición de lote a lote y la facilidad de obtener diversas presentaciones<sup>70</sup>, entre sus desventajas se encuentran los altos costos de manufactura. La manufactura de estos materiales se considera un riesgo a la salud ambiental y humana; por lo tanto varios autores concluyen que la atención debería centrarse en los polímeros naturales, aunque aún no se logran superar los principales problemas con los polímeros naturales, como su propensión a la calcificación y el deterioro biológico<sup>54</sup>.

## **BIOMATERIALES COMPOSITOS**

Son aquellos compuestos por materiales de distinta naturaleza química (orgánica e inorgánica, sintética y natural). Sus propiedades son mejoradas con respecto a las de sus componentes por separado. Se constituyen por un material base, llamado matriz, la cual es generalmente inorgánica, que proporciona estructura y estabilidad, durante su síntesis se añaden fibras, las cuales son de naturaleza orgánica y presentan una tasa de degradación más rápida, aportando flexibilidad a la estructura<sup>54</sup>.

### 2.3.1.2 Biomateriales en la regeneración ósea

La bioingeniería de tejido óseo, como otras áreas de la biomedicina, tiene como objetivo restaurar, mantener o mejorar la función tisular; requiere la interacción de células, biomateriales y factores de crecimiento.



**Figura 6. Esquema de los requerimientos para la bioingeniería de tejidos y su interacción en la regeneración ósea.**

Fuente: Drosse, Inga, et al. "Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach." *Injury* 39 (2008): S13

El objetivo de la bioingeniería es ayudar, guiar y/o inducir la regeneración de los tejidos de manera predecible, controlable y rápida, así como ser biocompatible con los tejidos duros y blandos; por lo que requiere la intervención de diversos factores como morfología, topografía, composición química superficial, carga superficial, técnica quirúrgica de implantación así como ser probada previamente en modelos biológicos adecuados y bajo diversas condiciones de calidad y cantidad de hueso remanente<sup>67-71</sup> (Figura 6).

La selección de un material para ser utilizado en regeneración tisular es rigida dependiendo de su aplicación, por ejemplo; la regeneración ósea requiere materiales capaces de proveer las propiedades mecánicas y químicas necesarias para promover el proceso de biomineralización<sup>67</sup> (Tabla 3).

Desde hace aproximadamente 50 años se dió un gran avance en el área de los biomateriales los cuáles han evolucionado a través de tres generaciones, la primera generación son materiales bioinertes, la segunda generación materiales

bioactivos y biodegradables y la tercera generación son materiales diseñados con el fin de estimular respuestas específicas en el huésped a nivel molecular<sup>47</sup>.

Anteriormente se consideraban a los materiales bioinertes ideales, ya que causan mínima respuesta inmune, pero presentan una alta tasa de fracaso ya que no cumplen con las necesidades mecánicas y a la encapsulación fibrosa del implante, que es la principal causa de falla aséptica<sup>67</sup>; debido a esta problemática se ha incrementado el uso de una nueva generación de biomateriales bioactivos que fomentan la formación y resorción ósea a un ritmo que permita la formación del tejido mineral que reemplace gradualmente el implante en términos mecánicos y espaciales<sup>69</sup>.

Los materiales cerámicos bioactivos han recibido gran atención por su gran capacidad de estimular la proliferación celular, diferenciación celular y la regeneración de tejido óseo<sup>72</sup>.

Sin embargo aún existen varios retos en la generación de biomateriales bioactivos, como la falta de unión química directa y la interacción con el entorno circundante; como alternativa a esta problemática se han propuesto diferentes alternativas que permitan mejorar la biocompatibilidad y la interacción célula-material. Una estrategia prometedora es generar una topografía superficial similar a la Matriz extra celular (MEC) del tejido que se desea regenerar<sup>51</sup>.

El sustituto óseo ideal debe permitir el soporte de capilares y células del huésped en crecimiento en la estructura tridimensional para la formación ósea, este proceso de reparación ocurre naturalmente aún cuando el sitio de la lesión no reciba un tratamiento (osteoconducción)<sup>73-76</sup>, sin embargo para que se lleve a cabo la utilización de un andamio óseo ideal se debe buscar la diferenciación celular a osteoblastos debido a la capacidad pluripotente de las células que se encuentran en el ambiente óseo (osteoinducción)<sup>77</sup>, que sea osteogénico, biocompatible, biodegradable, y estructuralmente lo más similar al hueso (intra- y extra-geométricamente). Asimismo; debe presentar una mínima reacción fibrótica, cuyas características físicas como el módulo elástico logre imitar al hueso, fácil uso clínico y costeable<sup>78,79</sup>.

**Tabla 3. APLICACIONES DE BIOMATERIALES EN LA REGENERACIÓN ÓSEA.**

MATERIAL		APLICACIÓN
<b>METALES</b>		
Aleaciones 316 y 316		Placas para fracturas, tornillos y clavos para cadera
Aleaciones Cromo-Cobalto-Molibdeno		Prótesis y componentes de carga en reemplazo total de articulación
Ti6Al4V		Prótesis

TNTZ	Continúa en investigación
Aleaciones Níquel-Titanio	Ejes para fijación interna para huesos largos, correctores espinales, espaciadores vertebrales e implantes dentales
Aleaciones de Níquel sin memoria de forma	Continúa en investigación
<b>CERÁMICOS</b>	
Alúmina	Aplicaciones ortopédicas de carga, implantes dentales
Alúmina ISO 6474	Implantes dentales
PSZ	Reconstrucción maxilar Recubrimientos de implantes para regenerar tejidos
<b>FOSFATOS CÁLCICOS CERÁMICOS</b>	
Cemento H/R	Fisura palatina Topes apicales
Biopex	Defectos óseos
Bonesource	Defectos óseos periodontales
<b>BIOVIDRIOS</b>	
45S5 BG 45S5.4F BG	Reconstrucción maxilofacial
45B15S5 BG	Implantes dentales
52S4.6 BG	Unión de vértebras
<b>VITROCERÁMICOS</b>	
KGC KGS	Implantes dentales Reconstrucción maxilofacial
A/W GC	Protesis vertebral
MB GC	Prótesis de cresta iliaca
<b>POLÍMEROS</b>	
Ácido polimeta acrilato (PMMA)	Cementos óseos acrílicos Anclajes de prótesis de cadera
Polietileno (PE)	Recubrimientos de copas acetabulares en artroplastias de cadera

Polidimetilsulfoxido (PDMS)	Injerto tibial y patelar en artroplastia de rodilla
Polipropileno (PP)	Reemplazo de pequeñas articulaciones en mano y pie Fijación ósea
Polisulfona (PS)	Fijación ósea Artroplastías totales
Policarbonato (PC)	Regeneración ósea Liberación de fármacos
Ácido Poliglicólico(PGA)	Fijación ósea reabsorbible Regeneración ósea
Policaproclatona (PLC)	Fijación ósea reabsorbible Regeneración ósea
Polidioxanona (PDS)	Fijación ósea reabsorbible Regeneración ósea
<b>COMPOSITOS</b>	
Hidroxisapatita- Titanio	Placas para fracturas, tornillos y clavos para cadera
PLGA/45S5 Bioglass	Regeneración ósea
PDLLA/45S5 Bioglass	Recubrimiento de implantes Regeneración de cartílago
PCL/HA	Regeneración ósea guiada
PLGA/HA	Regeneración ósea

Fuente: Burg, Karen JL, Scott Porter, and James F. Kellam. "Biomaterial developments for bone tissue engineering." *Biomaterials* 21.23 (2000): 2356

### 2.3.1.3 Biomateriales cerámicos nanoestructurados

Un elemento crucial en la bioingeniería de tejidos es crear un nanoambiente extracelular favorable, ya que la matriz extracelular es la principal guía en el proceso de diferenciación y regeneración celular <sup>121</sup>.

Durante la última década ha aumentado el interés científico por crear métodos de fabricación de biomateriales que permitan obtener cambios en su superficie con el fin de optimizar y controlar estas respuestas biológicas.

El desarrollo de la nanotecnología ha permitido en gran medida la capacidad de controlar y manipular materiales a nivel molecular, atómico y supramolecular; con

ello la obtención de materiales con elementos estructurales en al menos un plano con dimensiones en un rango de 1-100 nm, llamados nanomateriales, estos avances han sido fundamentales en biomedicina<sup>122</sup> y son muy prometedores en el área de regeneración tisular debido a la composición nanométrica de diversos tejidos, logrando mimetizarlos y proporcionar un ambiente extracelular idóneo para la adhesión, proliferación y diferenciación celular<sup>123,124</sup>.

El diseño químico de un material se obtiene mediante la organización espacial y control de moléculas biológicas en una posición y tamaño determinados, estas proteínas como fibronectina, vitronectina, laminina y colágena de la MEC, así como motivos RGD, los cuales actúan como ligandos y favorecen la interacción célula-MEC mediante integrinas transmembranales que actúan como receptores de adhesión celular.

Las moléculas inorgánicas también pueden organizarse para modificar indirectamente el comportamiento celular, la alteración de la química superficial conlleva a una activación biológica (absorber proteínas) o inactivación (repeler proteínas) así como la selectividad por ciertas proteínas, el biomimetismo se da por la señalización directa e indirecta ya que requiere de la unión de receptores a su ligando<sup>122</sup>, éstos ligandos no sólo optimizan la funciones celulares como la motilidad, proliferación, formación de adhesiones focales (por lo tanto una adhesión celular más fuerte) y también controlan la distancia entre las células adheridas; mediante varios estudios se ha comprobado que la distancia óptima entre ligandos debe ser menor a 70 nm y se han obtenido mejores resultados con distancias de aproximadamente 10 nm<sup>122,125</sup>.

En la MEC existen naturalmente poros, fibras y protuberancias, que conforman una estructura nanofibrilar tridimensional, además los receptores celulares de superficie con dominios funcionales son nanoestructuras, por lo que la interacción entre moléculas biológicas, los componentes de MEC y las células ocurren en nanoescala y estos procesos tienen una influencia directa en el comportamiento y función celular como la proliferación celular y expresión de genes<sup>72</sup>.

La orientación de los filamentos de actina y microtúbulos es el primer evento en la alineación celular guiada por adhesiones focales<sup>122</sup>.

En lo que refiere al área de biomateriales nanocerámicos, han presentado un gran auge ya que son capaces de mimetizarse estructuralmente con el hueso lo que favorece la obtención de mejores propiedades biológicas y mecánicas con respecto a su fase convencional, debido al aumento de la resistencia a la fractura, fuerza flexional del material y módulo de Young o de elasticidad similar al del tejido óseo, considerando el estrés y las condiciones del entorno a las que estará expuesto el biomaterial.

La superficie de un andamio ejerce un efecto crítico en la determinación de la biocompatibilidad y posteriormente en la integración, porque se encuentra en contacto directo con los tejidos, los biomateriales nanocerámicos presentan una mayor área superficial por volumen. En lo que refiere a las propiedades biológicas

se basa en investigaciones sobre la capacidad de algunas células como los osteoblastos de sentir y reaccionar a cambios en la superficie, de aproximadamente 10 nm, especialmente a surcos y crestas con orientación paralela con una altura promedio de 300 nm y una profundidad entre 60 y 70 nm que no sólo interviene en la orientación de las células adheridas sino también en la estructuración de la matriz mineralizada<sup>122-128</sup>.

## **2.4 MODIFICACIÓN DE LA ALÚMINA MEDIANTE LA ADICIÓN DE MAGNESIO PARA LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.**

La cerámica de alúmina es un material bioinerte que ha sido usado con limitado éxito en implantología y ortopedia; aunque posee excelentes propiedades mecánicas superficiales que disminuyen el coeficiente de fricción y la tasa de desgaste, presenta poca biocompatibilidad, por lo tanto se ha usado para mejorar la resistencia mecánica de otras cerámicas como fosfato de calcio que posee mayor biocompatibilidad<sup>135</sup>, otra técnica para mejorar la biocompatibilidad de la alúmina es realizar cambios químicos superficiales como hidroxilación o implantación de iones como magnesio<sup>135</sup>, esto sugiere que los cambios superficiales logran modificar las propiedades de un material bioinerte a un material bioactivo y biocompatible<sup>122,135</sup>, esto se atribuye principalmente a localización superficial de grupos OH<sup>-</sup> y carboxilo en la superficie del biomaterial<sup>122</sup>.

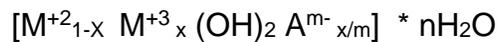
El magnesio es el segundo catión intracelular más abundante, es de gran importancia en la función enzimática y transporte de iones transmembrana<sup>129</sup>, el cuerpo humano tiene un contenido aproximado de 25 g y el 60-70% del total se encuentra en la composición mineral de los huesos. El calcio y el magnesio presentan fenómenos de sinergismo y antagonismo, su deficiencia está asociada con diversos desórdenes clínicos, en especial con la osteoporosis; ya que este ión influye indirectamente en el metabolismo del tejido mineral, esto permite el intercambio iónico entre el hueso y otros órganos, también interviene directamente en los procesos de cristalización del tejido mineral, el equilibrio fosfato cálcico mediante el aumento de la solubilidad del carbonato de calcio y la disminución de la solubilidad del fosfato cálcico, regula los niveles de calcio por acción indirecta en la glándula paratiroidea y la organización estructural de los minerales, lo que impide que los minerales se depositen en forma de cálculos<sup>130-133</sup>.

Recientemente se ha observado que la adición de cationes divalentes como Mg<sup>2+</sup> a materiales bioinertes favorece la adhesión inicial de osteoblastos, disminuye la toxicidad asociada al Al<sup>3+</sup><sup>22-25</sup>; esto se debe a un aumento de la fuerza iónica del medio y/o el efecto directo de los cationes de Mg<sup>2+</sup>, esto mediante su interacción a los sitios de unión del Al<sup>3+</sup><sup>147</sup>, también favorece una unión química entre el biomaterial y el tejido del huésped, ya que en condiciones biológicas, el magnesio es uno de los principales sustitutos del calcio en la composición de la hidroxiapatita<sup>130,134</sup>, en algunos estudios se ha observado un mayor potencial

osteoinductivo de la hidroxiapatita que posee magnesio en su composición que la que no lo posee<sup>130</sup>.

### 2.4.1 Cerámicas tipo hidrotalcita

Los compuestos cristalinos tipo hidrotalcita, se conocen también como arcillas aniónicas o hidróxidos dobles, poseen una fórmula general:



Donde  $M^{+2}$  es un catión divalente como Magnesio,  $M^{+3}$  es un catión trivalente como el Aluminio y  $A^{m-}$  es un anión de compensación intercapa.

Su estructura está conformada por  $Mg^{+2}$  que se encuentra coordinado octahédricamente a seis grupos  $OH^{-1}$ , estos octahédros comparten sus aristas para formar láminas bidimensionales que se enlazan mediante puentes de hidrógeno.

Cuando algunos cationes divalentes de  $Mg^{+2}$  son reemplazados por cationes trivalentes de  $Al^{+3}$ , se forma hidrotalcita y la capa laminar o de hidróxidos adquiere carga positiva, la cual es compensada por la carga de la capa interlaminar que contiene un anión ( $CO_3^{-2}$ ), en el espacio de la capa interlaminar se encuentra el agua de cristalización, la cual se encuentra unida dentro de la red cristalina pero no se encuentra unida covalentemente a ninguna molécula o ión, por lo que en el proceso de transformación de fase son las primeras moléculas en ser eliminadas fácilmente mediante reacciones de deshidratación sin alterar el arreglo de la red cristalina<sup>136</sup> (Figura 7).

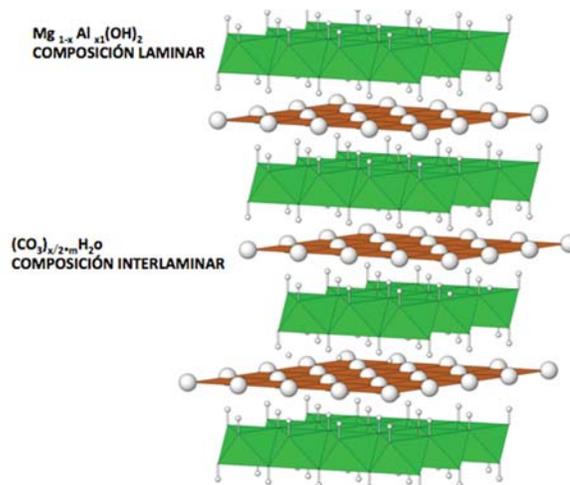


Figura 7. Esquema de la estructura e interacción laminar de los componentes atómicos de un material tipo hidrotalcita.

Fuente: Mills, Stuart J., et al. "Contribution to the crystallography of hydrotalcites: the crystal structures of woodallite and takovite." Journal of Geosciences 57.4 (2012): 278.

Los compuestos tipo hidrotalcita que inicialmente presenta la fórmula  $Mg_{16}Al_2O_8(OH)_{16}CO_3 \cdot 4 H_2O$ , presentan una descomposición térmica que se lleva a cabo mediante diferentes etapas, a temperaturas entre 150-200°C provocando una reacción de deshidratación parcial de las moléculas de agua de la capa interlamina sin alterar el arreglo de la red cristalina y se obtiene la fase  $Mg_{16}Al_2O_8(OH)_{16}CO_3$ , entre 250-450°C se llevan a cabo la descarboxilación y la deshidroxilación parcial de la estructura resultante y se obtiene la fase  $Mg_6Al_2O_8(OH)_2$ ; cabe mencionar que estos compuesto son estables térmicamente a temperaturas mayores a 400°C; a 500°C; se forma la fase  $Mg_6Al_2(OH)_2$ , a temperaturas mayores a 550° C se comienzan a formar MgO y AlO, que a partir de los 600°C se transforma en  $MgAl_2O_4$ <sup>136</sup>.

El  $MgAl_2O_4$  es un óxido compuesto que posee propiedades físicas intermedias entre el óxido de magnesio y el óxido de aluminio<sup>137</sup>.

Es un material que puede clasificarse como un cerámico policristalino<sup>138</sup>, que es estable química y térmicamente; resistente a la erosión y corrosión, poroso y con partículas esféricas que también presentan alta porosidad, el espacio interlamina favorece la retención de biomoléculas<sup>139</sup>.

## 2.5 CÉLULAS EMPLEADAS EN LA BIOINGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO

Como se mencionó anteriormente, el hueso está compuesto por una variedad de diferentes linajes celulares como: células vasculares, células de la médula ósea, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, las cuales llevan a cabo distintas funciones que permiten el funcionamiento del hueso como un órgano altamente dinámico, aunque todas estas células son necesarias en condiciones *in vivo*, sólo algunas tienen la capacidad de formar un tejido similar a hueso en condiciones *in vitro*<sup>44</sup>.

### 2.5.1 Osteoblastos

La bioingeniería de tejido óseo requiere al menos de células osteoprogenitoras vivas u osteoblásticas, que aporten el potencial osteogénico. Los osteoblastos son células especializadas derivadas de las células troncales mesenquimales que sintetizan colágena y sustancia fundamental ósea, ya que expresan los genes que codifican para la síntesis de proteínas que conforman la matriz extracelular<sup>44</sup>.

Presentan una morfología cúbica, con un núcleo único, citoplasma basófilo, aparato de Golgi bien desarrollado y numerosas mitocondrias. Son células polarizadas, que vierten sus productos de secreción mediante su zona citoplasmática que está en contacto con la matriz ósea. Los osteoblastos participan el proceso de mineralización de la matriz orgánica ya que producen vesículas de matriz, de unos 100 nm de diámetro, rodeadas de membrana celular, que acumulan  $Ca_2$  y  $PO_4$ , los cuales son ricos en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que son capaces de generar iones  $PO_4$ , elevando su concentración en el medio extracelular y creando centros de nucleación para el depósito de las sales minerales<sup>42</sup>.

Los osteoblastos tienen dos destinos posibles: ser rodeados por la matriz ósea que producen y sufrir diferenciación inducida por factores de crecimiento y convertirse en osteocitos o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo minerales<sup>42</sup>.

Los osteoblastos que están en contacto con matriz osteoide son células poliédricas con largas y delgadas prolongaciones citoplasmáticas que se asocian mediante uniones comunicantes con prolongaciones. Se les atribuyen propiedades mecanotransductoras, debido a la capacidad de sensar y diferenciar características superficiales bioquímicas como la distancia entre ligandos y biofísicas como la nanotopografía del biomaterial en el que fueron implantadas, esto principalmente por sus adhesiones focales y por la interacción de proteínas que son polimerizadas y despolimerizadas dependiendo de la motilidad, el arreglo morfológico y de orientación espacial que requiera la célula en determinadas condiciones superficiales<sup>80</sup>; todos estos procesos intervienen en la adhesión celular y mineralización de la matriz<sup>81-83</sup>.

Los osteoblastos, son células fáciles de aislar, mantener y propagar fuera del cuerpo humano por períodos prolongados de tiempo. Estas células pueden subdividirse de acuerdo a si son células adultas o células troncales embrionarias, ambas son autorrenovables y capaces de diferenciarse. No existen problemas legales ni inmunológicos relacionados con su uso clínico<sup>81-83</sup>.

### **2.5.2 Células del periostio**

Estas células están localizadas dentro del periostio, pueden diferenciarse en fibroblastos, osteoblastos o células reticulares. Las células del periostio derivadas de células mesenquimales generan células comprometidas a uno o más linajes celulares, con un aparente grado de plasticidad e interconversión<sup>44</sup>.

### **2.5.3 Células de la médula ósea**

Son las primeras células enfocadas a la ingeniería de tejido óseo, usadas de manera autóloga o de forma sinérgica con médula ósea, la cual contiene precursores osteogénicos que se ha observado tienen potencial para dirigir efectivamente la regeneración ósea<sup>44</sup>; ya que se les puede adicionar marcadores específicos después de su aislamiento, pero presentan algunas limitaciones como su complicada obtención, la obtención insuficiente de células osteoprogenitoras en un aspirado, la disminución de células con capacidad de regeneración debido a múltiples enfermedades, fracaso por una transferencia insuficiente de células progenitoras y que sólo representan el 0.001% de la población total de células nucleadas en la médula ósea de un adulto sano<sup>44</sup>.

### **2.5.4 Células troncales mesenquimales**

Son células indiferenciadas con potencial de autorenovación, su número es menor comparadas con otras líneas celulares; poseen una alta tasa de proliferación, su pluripotencia permite que puedan diferenciarse en distintos fenotipos como: osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, miocitos, adipocitos y células del estroma medular, lo que aún conlleva cierto riesgo en su aplicación clínica<sup>44</sup>. Aunque sus aplicaciones en la ingeniería de tejido óseo son prometedoras es necesario realizar más investigaciones enfocadas principalmente en la terapia celular para reconstrucción ósea<sup>44</sup>.

### **2.5.5 Células vasculares**

El uso de células vasculares puede ofrecer diversas ventajas hipotéticas, la terapia celular con células endoteliales progenitoras, es capaz de brindar un sustrato; constituido por células vasculares, factores de crecimiento y las citocinas, capaces de promover la regulación de la actividad celular.

Las células vasculares progenitoras son capaces de determinar los nuevos sitios de vascularización ósea, cuando éstos se encuentran en regeneración y requieren de aporte sanguíneo<sup>44</sup>.

Estas células son relativamente fáciles de aislar y expandir (maduras provienen de los vasos sanguíneos o progenitoras provenientes de la médula ósea), son muy prometedoras en la ingeniería de tejidos complejos como el hueso debido a que pueden usarse en combinación con osteoblastos para optimizar los resultados<sup>44</sup>.

## **2.6 APLICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA BIONGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.**

Los factores de crecimiento son una familia de proteínas que controlan la actividad celular de tejidos específicos, mediante un sistema de regulación complejo<sup>85</sup>. La incorporación de factores de crecimiento a los biomateriales les confiere propiedades osteoinductivas<sup>41</sup>. La necesidad de comprender los mecanismos mediante los cuales los osteoblastos forman naturalmente hueso, permitió el cuestionamiento acerca de la existencia de factores que regulen su comportamiento y la formación ósea, lo que estableció las bases para la terapéutica de regeneración ósea<sup>85</sup> (Tabla 4).

En 1965 Marshall Urist realizó estudios en la matriz ósea desmineralizada y encontró que había sustancias capaces de estimular la formación de nuevo tejido óseo, las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), en los siguientes 20 años, se identificó su estructura y sus propiedades fueron estudiadas y probadas *in vivo* e *in vitro*, así como comercializadas para su aplicación clínica en defectos óseos<sup>86</sup>.

Las BMPs son factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia de TGF- $\beta$ , ambas presentan semejanzas estructurales y secuenciales. La familia de BMPs está conformada por 20 miembros, los cuales comparten un cierto grado de similitudes y están implicadas en diversas funciones como la formación ósea después de un daño en adultos. La señalización de BMPs se da mediante los receptores de proteínas morfogenéticas óseas (BMPRs), los cuales se activan mediante señalización intracelular transmitida por proteínas Smads, induciendo con ello la transcripción de genes específicos; su principal función es modulada por BMPs extracelulares de unión a proteínas como nogina y cordina, las cuales inhiben la señalización de BMPs mediante el bloqueo de la interacción con los BMPRs<sup>87-89</sup>.

**Tabla 4. APLICACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LA REGENERACIÓN DE TEJIDO ÓSEO**

<b>FACTOR</b>	<b>FUNCIÓN</b>	<b>EFECTO BIOLÓGICO IN VIVO E IN VITRO</b>
<b>MENSAJEROS EXTRACELULARES</b>		
<b>TGF-β</b>	Factor mitogénico y osteogénico	Induce la diferenciación a osteoblastos en células indiferenciadas Inhibe osteogénesis en célula comprometidas
<b>BMP-2</b>	Factor osteogénico	Inicia el proceso de formación ósea y regeneración Induce la expresión de otras BMP's
<b>BMP-4</b>	Factor osteogénico	Potencial osteocodrogenénico in vivo e in vitro
<b>BMP-7</b>	Promueve la regeneración ósea en el sitio de fractura	Potencial osteogénico in vivo e in vitro Activa osteoblastos inmaduros
<b>FGFb</b>	Factor mitogénico y osteogénico	Mutación genética que provoca condrodisplasia y craniosinostosis.  Estimula la expresión de Sox 9
<b>PDGFs</b>	Factor mitogénico y osteogénico	Estimula la proliferación de osteoblastos, condrocitos y células mesenquimales .
<b>EGF</b>	Factor epitelial	Estimula la proliferación de células epiteliales.
<b>IGF-I, II</b>	Factor mitogénico y osteogénico	Estimula el crecimiento de láminas, formación ósea, osificación endocondral y proliferación de osteoblastos.
<b>Wnt</b>	Factor mitogénico y osteogénico	Es crucial en la proliferación de células osteoprogenitoras y puede inhibir la maduración de osteoblastos.
<b>Ihh</b>	Factor osteocondrogénico	Es esencial en la formación de plaquetas y formación de hueso endocondral.

		Induce la expresión de PTHrP.
<b>PTHrP</b>	Factor osteocondrogénico	Es esencial en la formación de plaquetas y formación de hueso endocondral.
<b>MENSAJEROS INTRACELULARES</b>		
<b>MAPKs</b>	Transducción de señalización en osteogénesis	Esenciales en la regulación intracelular de factores osteogénicos
<b>PKA/CREB</b>	Transducción de señalización en osteogénesis	Transducción de señal osteogénica
<b>β-catenin</b>	Factor de transducción osteogénica	Esenciales en la regulación de Wnt
<b>Runx2</b>	Factor de transcripción temprano en osteogénesis	Principal regulador en la fase inicial de osteogénesis
<b>Osterix</b>	Factor de transcripción tardío en osteogénesis	Principal regulador en la fase final de osteogénesis Inhibidor de condrogénesis
<b>Dlx5</b>	Factor de transcripción en osteogénesis	Induce la maduración de osteoblastos Inhibe la formación de osteocitos
<b>Msx2</b>	Factor de transcripción en osteogénesis	Induce la proliferación de precursores celulares, su respuesta depende de Dlx5.

Fuente: Carreira, A. C., et al. "Bone morphogenetic proteins facts, challenges, and future perspectives." Journal of dental research (2014): 336.

Las BMP no son las únicas moléculas con capacidad osteoinductiva existen otras moléculas que intervienen en la regeneración ósea como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-I), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) <sup>86</sup>.

Los factores de crecimiento se encuentran usualmente en la MEC y son liberados después de un daño para contribuir al proceso de reparación, durante la reparación ósea; las células del microambiente óseo como osteoblastos, células

de la médula ósea, células endoteliales, fibroblastos y células inflamatorias migran al sitio de la lesión <sup>86,87</sup>.

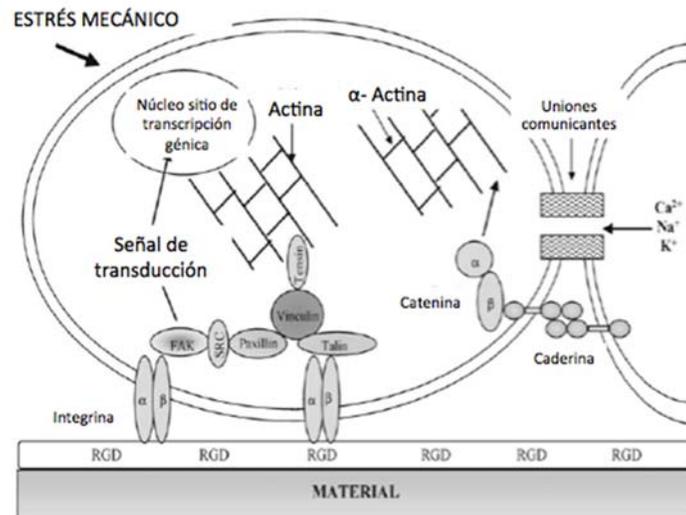
## **2.7 EVENTOS QUE OCURREN POSTERIOR A LA IMPLANTACIÓN DE UN BIOMATERIAL**

Inmediatamente después de la implantación se lleva a cabo una respuesta por parte del huésped al material, que se manifiesta como una producción de proteínas provenientes de la sangre y de los fluidos circundantes del nicho receptor y posteriormente de la actividad celular que se está llevando a cabo en la interfase entre el tejido del huésped y el biomaterial, el cual absorbe éstas proteínas creando un film que proveerá las condiciones necesarias para la adhesión celular y posteriormente la osteointegración del biomaterial<sup>90-92</sup>.

### **2.7.1 Adhesión celular**

La adhesión celular a la superficie de un andamio es un mecanismo en donde la topografía y energía superficial del biomaterial son fundamentales<sup>92</sup>, la primera fase de interacción célula-biomaterial comprende la unión, adhesión y migración de las células, que será determinante en la capacidad de proliferación y diferenciación de las células osteoblásticas en contacto con el andamio<sup>92</sup>.

Los osteoblastos inmediatamente después de entrar en contacto con una superficie, comienzan a adherirse mediante proteínas como fibronectina y vitronectina que se encuentran presentes en la MEC, los sitios de unión específicos a proteínas como la secuencia RGD (arginina, glicina y ácido aspártico); son reconocidos por heterodímeros de integrinas en la membrana celular; las integrinas se ensamblan en adhesiones focales de .5 -1  $\mu\text{m}$  de longitud, que son los sitios de unión que se encuentran entre la membrana celular y la superficie del sustrato, se encuentran a una distancia aproximada de 10-15 nm, participan en la mecanotransducción de señales, por medio del reconocimiento de las propiedades biofísicas y bioquímicas superficiales, están acoplados a filamentos de Actina-F mediante proteínas como vinculina, paxilina, talina y tensina, que se encuentran en la cara interna y son mediadores de la interacción entre filamentos de actina y las proteínas receptoras de membrana; las adhesiones focales se forman durante la fase de adhesión celular, pero presentan continuamente ensamble y desensamble durante el movimiento celular <sup>(65)</sup>, se requiere una distancia óptima aproximada de 70 nm para permitir la asociación de parejas de integrinas activadas, lo que favorece establecer y mantener una adhesión firme a la superficie del biomaterial <sup>94-96</sup> (Figura 8).



**Figura 8. Esquema del mecanismo de unión de las proteínas de adhesión al dominio RGD, efecto en la morfología celular como respuesta a la superficie del biomaterial.**

Fuente: Biggs, Manus Jonathan Paul, R. Geoff Richards, and Matthew J. Dalby. "Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 6.5 (2010): 627.

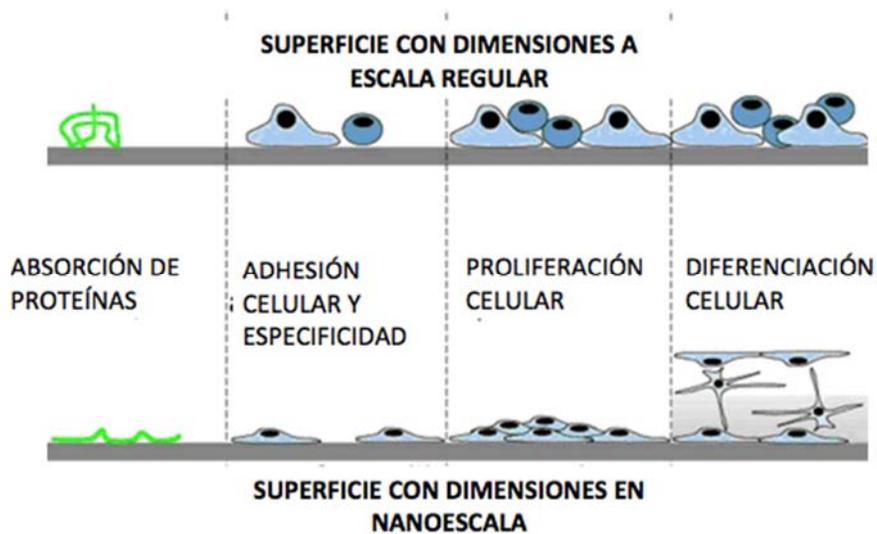
La adhesión de los osteoblastos a la superficie del material involucra diversas biomoléculas de transducción, seguido de una señalización para generar una respuesta celular, estudios *in vitro* muestran un aumento en la absorción de proteínas como fibronectina y albúmina en la superficie del biomaterial desencadenan una adhesión más fuerte por aumento en la expresión de integrinas, adhesiones focales más fuertes así como una reorganización del citoesqueleto<sup>(69)</sup>. La arquitectura del citoesqueleto de actina es esencial para mantener la morfología y adhesión celular, si se ensamblan en haces largos, la proteína F-Actina soporta las protrusiones de la membrana plasmática conocidos como filipodios, si se ensamblan en forma de reticulado, es soportada por protrusiones en forma de hoja llamados lamelipodios y si se encuentran asociados con placas de adhesión, las fibras de estrés de actina pueden transmitir esas fuerzas al sustrato<sup>95,96</sup>.

## 2.7.2 Respuesta celular a la nanotopografía

Un elemento crucial en la bioingeniería de tejido es crear un nanoambiente favorable, principalmente para la MEC debido a que guía la diferenciación celular y la regeneración tisular. Las células se encuentran naturalmente rodeadas de nanoestructuras, en contacto con otras células y con la MEC, estas estructuras están formadas por biomoléculas configuradas en diferentes arreglos geométricos (nanoporos, nanofibras, nanocristales)<sup>100</sup>.

La capacidad de algunas células de presentar cambios en su orientación, migración y organización del citoesqueleto por influencia de los sustratos, fue

observada por primera vez en 1911<sup>101</sup>, después en 1952 Weiss fue el primero en proponer el término punto de contacto para describir la alineación celular con respecto a la topografía<sup>102</sup>, en 1964 se propuso que las células podían responder a la topografía o a su ambiente<sup>103</sup>. Desde entonces y gracias al desarrollo de técnicas que permiten la fabricación de micro y nanomateriales<sup>103</sup>, numerosos estudios han mostrado que muchas células son capaces de reaccionar a la micro y nanotopografía<sup>103,104</sup>, mediante cambios en la adhesión celular<sup>105</sup>, alineamiento<sup>106</sup>, morfología y organización del citoesqueleto<sup>107,108</sup>, proliferación celular<sup>109</sup>, viabilidad<sup>110</sup>, expresión de genes y diferenciación celular<sup>111</sup> (Figura 9).



**Figura 9. Esquema de la respuesta celular en superficies en escala nanométrica.**

Fuente: <http://www.ordoneardentistrylibrary.org/Data/pdfs/IJRID/IJRID1.pdf>

El comportamiento celular es determinado intrínsecamente por medio de la señalización celular y extrínsecamente mediante los contactos célula-célula y de la célula-componentes de MEC, estas señales pueden ser químicas como factores de crecimiento o citocinas y mecánicas como fuerzas ténsiles causadas por las interacciones con micro o nanoestructuras de la superficie<sup>100</sup>. Los haces de filamentos de actina del citoesqueleto dirigen a los filopodios mediante señalización, se estabilizan por el reclutamiento de microtúbulos y acumulación de actina, lo que permite la formación de las adhesiones focales<sup>43</sup>.

En la interfase célula-matriz, se llevan a cabo las interacciones de fuerza mecánica a través de adhesiones focales, las cuales vinculan la MEC al citoesqueleto<sup>100</sup>, de esta manera se da la activación de las vías de señalización de las adhesiones focales<sup>112</sup>. La MEC transmite una gran cantidad de señales bioquímicas y biomecánicas, las señales biomecánicas pueden manifestarse con cambios en la nanotopografía, que proveen estímulos que activan la señalización de células anclaje dependientes mediante una respuesta que se manifiesta como la rigidez local de la MEC<sup>112,44</sup>.

Los filopodios se encuentran en diversos tipos de células y les permiten sentir y alinearse en nanotopografías, los lamelipodios se forman cuando la célula migra al sitio requerido (Figura 10), para que esto suceda se requiere la señalización de la proteína G, el citoesqueleto y otras proteínas como<sup>112</sup>:

- Rho: Induce el ensamble de las fibras de actina de estrés a la contracción a la superficie del sustrato, lo que genera tensión en la célula
- Rac: Induce la formación de lamelipodios
- Cdc42: Debe activarse para permitir el ensamble de los filopodios

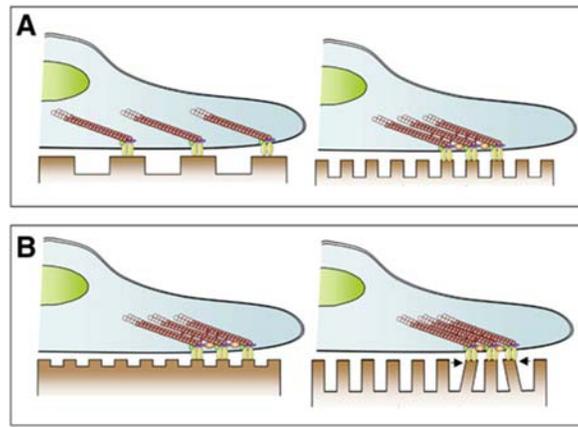


Figura 10. **Esquema del efecto de la topografía superficial del biomaterial en la orientación y morfología de filipodios y lamelipodios A) efecto de patrones repetitivos con distinta separación espacial. B) efecto de los cambios en la orientación de los patrones.**

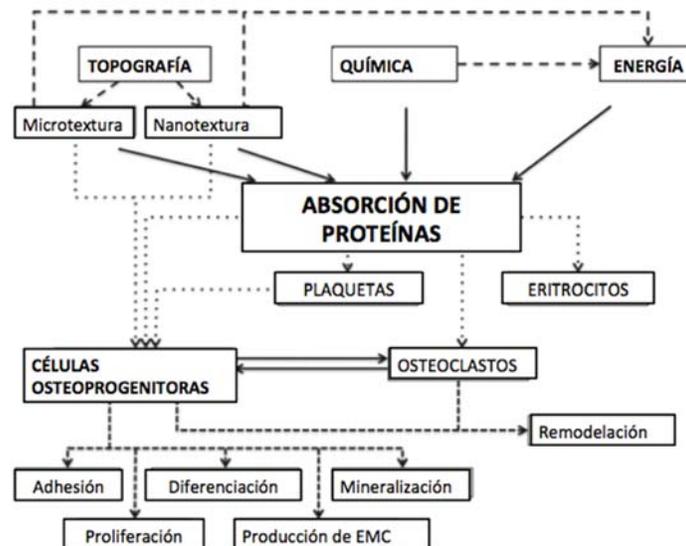
Fuente: Guilak, Farshid, et al. "Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix." Cell stem cell 5.1 (2009): 20.

La señalización mecánica de la MEC también puede ser transmitida mediante receptores de integrinas del citoesqueleto al núcleo celular<sup>112</sup>; se ha demostrado que la morfología y orientación celular están relacionadas con la expresión de algunos genes. Los cambios en la morfología celular que se dan después de la adhesión de la célula a la superficie del material debido a las alteraciones que sufren las adhesiones focales de la matriz extracelular, se manifiestan con cambios en el proceso de diferenciación celular, que se ve reflejado en su fenotipo; una de las vías más activadas que puede mediar la mecanotransducción; es la señalización de las quinasas de adhesiones focales, que permite responder a la rigidez del sustrato y a la tensión del citoesqueleto<sup>112</sup>.

El proceso de interacción célula-material es altamente dinámico y en gran medida depende de la respuesta celular<sup>44</sup>, también involucra una interacción físico-química entre la célula y el material que se da mediante fuerzas iónicas, fuerzas de Van Der Waals, que permiten la fijación celular al material<sup>112</sup>.

Las propiedades superficiales de los biomateriales; como las diferencias en la topografía superficial, composición química y energía superficial, determinan en gran medida el éxito de la interacción entre un biomaterial y los tejidos del

huésped, debido al aumento de la tasa de regeneración, tiempo de cicatrización y osteointegración que conlleva a una mayor estabilidad y por lo tanto funcionalidad<sup>97</sup>. (Figura 11).



**Figura 11. Esquema de las propiedades de los biomateriales que intervienen en el comportamiento celular y respuesta celular que se presenta posterior a la implantación.**

Fuente: Ramazanoglu, Mustafa, and Yoshiki Oshida. Osseointegration and Bioscience of Implant Surfaces- Current Concepts at Bone-Implant Interface. INTECH Open Access Publisher, 2011.63

Diversos estudios *in vivo e in vitro* respaldan la importancia de la topografía superficial para mejorar la respuesta biológica. Los osteoblastos son capaces de sentir, diferenciar y responder a las diferentes morfologías tridimensionales del material, que puede definirse como la forma, tamaño, textura y orientación superficial del material, o la sucesión de crestas y valles que se pueden cuantificar mediante la altura de crestas, perfiles de 2 dimensiones o parámetros tridimensionales (Tabla 5)<sup>113</sup>. Estos cambios en la superficie del biomaterial presentan un efecto importante en la absorción de biomoléculas y cambios en los arreglos de moléculas de agua y iones<sup>107</sup>.

Los biomateriales a nanoescala presentan una superficie con una topografía más texturizada, que se manifiesta como un aumento del área superficial, el aumento de la energía superficial que a su vez mejora la mojabilidad del biomaterial con la sangre, la unión y difusión de fibrina y proteínas de la matriz, lo que favorece la adhesión celular y la regeneración tisular, estos eventos son determinados principalmente en la primera fase post implantación que tiene implicación en el éxito de la osteointegración. Los patrones de la nanotopografía superficial también intervienen en la modulación de procesos de proliferación y diferenciación celular<sup>112,113</sup>.

Todos los materiales presentan en su superficie una topografía, pero no todas presentan nanoestructuras significantes, una nanoestructura posee un tamaño intermedio entre el rango molecular y nanométrico (de 1- 100 nm). Para

caracterizar un biomaterial nanoestructurado es necesario diferenciar el número de dimensiones que se encuentran en nanoescala<sup>112,113</sup>.

- Superficies nanotexturadas: Presentan una sola dimensión en nanoescala como la altura de una cresta, la cual puede estar presente de manera continua y homogénea en forma de nanorugosidad superficial.
- Nanopatrones superficiales: Presentan dos dimensiones, los patrones repetitivos son en escala nanométrica.
- Nanopartículas: Presentan tres dimensiones espaciales en nanoescala<sup>113</sup>.

La repetitividad y homogeneidad, son parámetros claves que definen la superficie nanoestructura de un material, aunque son difíciles de cuantificar y se consideran parámetros morfológicos cualitativos; si estos parámetros nanoestructurales no son claramente visibles, es considerado como un biomaterial nanoliso<sup>113</sup> (Figura 12).

**Tabla 5. PARÁMETROS PARA CALCULAR LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL DE UN BIOMATERIAL**

---

## 2D EVALUACIÓN DEL PERFIL

**Ra:** Rugosidad promedio de perfil (parámetro de amplitud), se define como la media aritmética de las desviaciones de la curva del perfil con respecto a la línea media de la longitud básica o línea de referencia.

**Rz:** Parámetro vertical, altura promedio de pico a valle a lo largo de la rugosidad del perfil.

**Rzjis:** Parámetro de la industria japonesa para Rz, basado en los 5 picos más altos y los 5 valles más bajos en la longitud total de la muestra.

**Rsm:** Parámetro horizontal, distancia promedio interpicos a lo largo de la rugosidad del perfil.

**Sa:** Parámetro de amplitud, desviación promedio de la altura de amplitud de la superficie, calculados en parámetros de 2D, extendiéndose a parámetros de 3D

**Sds:** Parámetro espacial, es la densidad de crestas, es decir el número de picos por área

**Sdr:** Se define como el desarrollo de la relación de área interfacial, que expresa el incremento del área superficial interfacial con relación a una línea de base a un plano liso

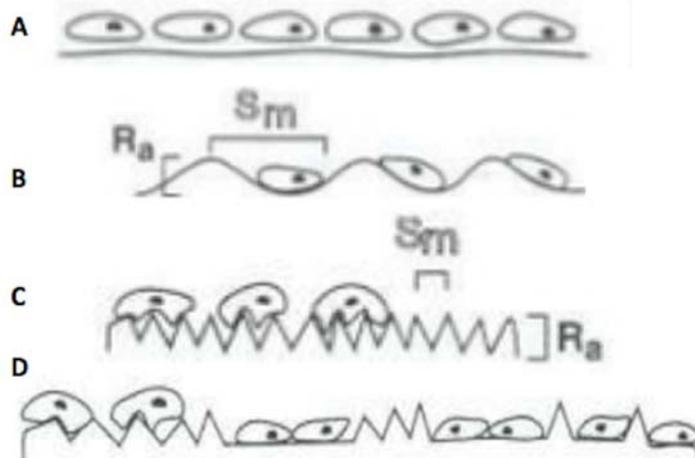
**% Sdr:** Parámetro híbrido, está integrado por el número y altura de las crestas en una superficie determinada y expresa la densidad espacial.

**Sdr= 0%** es igual a una superficie plana

**Sdr=100%** es igual al aumento de la rugosidad al doble

---

Fuente: Ehrenfest, David M. Dohan, et al. "Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography." Trends in biotechnology 28.4 (2010): 202.



**Figura 12. Esquema de los diferentes tipos de nanotopografía. A y B son sensadas por la células como superficies nanolisas, C como rugosas y D como mixtas.**

Fuente: <http://es.slideshare.net/drduarteg/superficie-de-los-implantes-orales-revision-enfocada-a-la-topografia-y-a-las-propiedades-quimicas-1>

Existe suficiente evidencia clínica que soporta el efecto positivo del aumento de la rugosidad en la osteointegración; sugiere que la rugosidad moderada y homogénea es óptima para la interacción del hueso con el implante<sup>98</sup>, sin embargo no se ha llegado a un consenso sobre la nanorugosidad superficial ideal, lo anterior contrasta con que la rugosidad del hueso es de aproximadamente  $R_a = 32 \text{ nm}$ <sup>98</sup>.

### 2.7.3 Osteointegración

La formación de tejido mineralizado en la superficie del biomaterial, es la última etapa de reacción osteoblástica<sup>51,98</sup>.

Para lograr las adecuadas condiciones biológicas y biomecánicas durante un tiempo prolongado, es necesaria la osteointegración del material; en este proceso se requiere la intervención de la respuesta de los biomateriales sobre el hueso y las células óseas. Podemos definir osteointegración clínicamente como la estabilidad total y fijación funcional entre el hueso y el biomaterial y experimentalmente como el íntimo contacto entre el hueso y el implante en cortes histológicos<sup>113</sup>.

Se considera que un biomaterial está clínicamente osteointegrado cuando no hay movilidad entre el biomaterial y el hueso bajo condiciones normales de carga posterior a un periodo definido de cicatrización<sup>113</sup>. Las condiciones en que se encuentra el tejido óseo del huésped determina en gran medida los mecanismos de osificación que se dan después de su implantación, considerando que el proceso de regeneración presenta una distinta cascada de eventos en el hueso cortical comparado con el hueso trabecular<sup>98</sup>.

En el hueso cortical, tras el trauma quirúrgico de la implantación de un biomaterial, el daño vascular de la corteza da como resultado necrosis del hueso cortical que se encuentra en la periferia del implante, seguido por un proceso de remodelación lenta que llevan a cabo los osteoclastos, que implica la remoción del tejido dañado y la formación de nuevo tejido óseo<sup>51</sup>, sin embargo la regeneración en el hueso cortical presenta osteogénesis a cierta distancia del biomaterial implantado; aunque esta fase de remodelación proporciona una temprana estabilidad que conlleva a una menor tasa de fracaso, aún es un reto para la ciencia de los materiales, crear superficies que permitan la osteointegración a nivel histológico<sup>51,98</sup>.

En el hueso trabecular existe migración de células osteogénicas debido a su composición medular, la colonización de diversas células progenitoras diferenciadas en la superficie del biomaterial permiten la formación de nuevo tejido óseo, por lo que la osteogénesis se lleva a cabo entre el biomaterial y el hueso trabecular del huésped<sup>98</sup>.

Los mecanismos de osificación posterior a la implantación del material son sumamente importantes para el entendimiento de la respuesta biológica a implantes endóseos, sin embargo la calidad de tejido formado por el huésped, así como la interfase entre el implante se ve afectada por características del material<sup>98</sup>.

En 1979 se categorizó la respuesta biológica en tres grupos:

1. Biotolerante: Presenta osteogénesis a cierta distancia del biomaterial, el cual no es rechazado por los tejidos pero es rodeado por tejido fibroso.
2. Bioinerte: Presenta osteogénesis con el biomaterial, las células osteogénicas migran directamente a la superficie del biomaterial, donde se establecerá la formación de nuevo tejido óseo.
3. Bioactivo; Este tipo de biomaterial permite la formación de hueso en su periferia, de este modo se da un intercambio de iones que permite una unión química con el hueso <sup>114</sup>.

## CAPÍTULO 3.

### 3.1 MÉTODOS DE SÍNTESIS DE MATERIALES NANOESTRUCTURADOS CERÁMICOS

Las técnicas de caracterización de nanopartículas han permitido identificar sus propiedades físicas y relacionarlas con la forma, tamaño y estructura atómica del sistema; las nanopartículas han permitido el desarrollo de técnicas que favorecen un proceso de síntesis controlada y reproducible en cuanto a forma, tamaño, composición y distribución de partículas, la determinación de sus propiedades ópticas, eléctricas, magnéticas, térmicas, elásticas, entre otras, también ha permitido diferenciar entre los métodos de obtención<sup>115</sup>.

Existen diferentes métodos de síntesis de nanopartículas, los cuales podemos clasificar en:

1. Ascendentes
2. Descendentes

Los métodos ascendentes involucran principalmente procesos químicos de síntesis, los componentes se encuentran a nivel atómico o molecular para promover su autoensamblado para la formación de nanoestructuras, durante esta fase de autoensamblaje se efectúan fuerzas a nanoescala que favorecen la organización de las partículas en estructuras más complejas y estables, entre estos tenemos<sup>115</sup>.

- Método Sol-Gel
- Método de dispersión coloidal
- Reducción fotoquímica y radioquímica de partículas
- Irradiación con microondas
- Dendrímeros
- Método solvotermal <sup>115</sup>

Los métodos descendentes son efectuados principalmente por métodos físicos, se basan en el uso de componentes macroscópicos, los cuales pueden ser controlados durante la etapa de síntesis para la obtención de nanoestructuras (87). Los utilizados son:

- Evaporación térmica
- Molienda
- Depósito químico en fase gaseosa
- Método de nanocúmulos gaseosos
- Implantación de iones<sup>115</sup>.

### 3.1.2 Técnica de rocío pirolítico ultrasónico

La técnica de rocío pirolítico ultrasónico se lleva a cabo por un método de síntesis descendente que se basa en la evaporación térmica de una disolución de un compuesto precursor soluble y estable en el soluto que fué disuelto y que no sufrirá descomposición durante el proceso de síntesis. La disolución es convertida en vapor por la acción de vibración sónica; el cual es transportado mediante un gas. Este gas portador es dirigido hacia un colector para que posteriormente se deposite mediante un atomizador ultrasónico que genera un flujo ultrafino y constante. Cabe destacar que este vapor contiene el precursor condensado, que es depositado sobre un sustrato que se encuentra en una superficie caliente a la cual puede controlarse la temperatura y por medio de la evaporación del solvente y la nucleación de las partículas sólidas, las cuáles se obtienen en un rango de tamaño que va desde nanómetros hasta algunos micrómetros dependiendo del tamaño de la gota y la concentración de la disolución<sup>116</sup> (Figura 13).

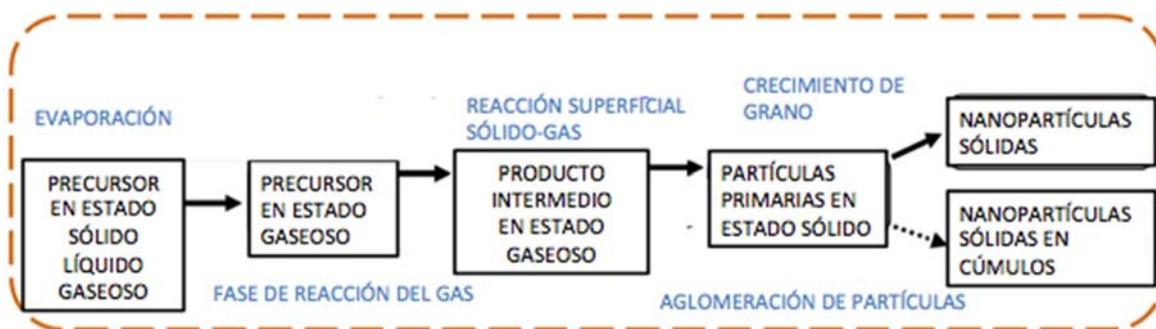


Figura 13. Esquema del proceso de síntesis mediante la técnica de rocío pirolítico ultrasónico.

Existen diversas condiciones como: Las propiedades de los precursores, la concentración a la que se encuentran, las propiedades del solvente, el pH, la temperatura, viscosidad, tensión superficial, las propiedades del gas portador, el tiempo de síntesis, la presión a la que son eyectadas las gotas, el tipo de atomizador y la temperatura de la superficie reactiva que afectan directamente las propiedades de las partículas sintetizadas<sup>117,118</sup>.

La manipulación de las condiciones de síntesis permite el control de propiedades de las partículas. Mediante la técnica de rocío pirolítico se han obtenido excelentes resultados en cuanto a morfología, tamaño, composición química, distribución de partículas y estabilización, de tal manera que se pueda mantener sus propiedades<sup>116</sup>.

Entre las principales ventajas de la técnica de rocío pirolítico se encuentran:

- Formación de partículas de tamaño nanométrico
- Permite mantener la pureza de la disolución

- Se pueden obtener partículas homogéneas con composición estequiométrica
- Distribución homogénea de partículas y con mínima distancia entre ellas
- Control de la morfología de las partículas en función de la naturaleza del precursor y condiciones de síntesis
- Obtención de partículas densas, compactas o huecas
- Partículas esféricas
- Facilidad para la síntesis de materiales multicomponentes con alta homogeneidad en su composición
- Alta velocidad de producción
- Sistemas de producción continua del material<sup>118</sup>.

## CAPÍTULO 4.

### 4.1 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS NANOMATERIALES

En gran medida los avances en nanociencia se deben a la mejoría en las técnicas de caracterización de nanomateriales que permite estudiarlos no sólo a nivel molecular, sino también a escala atómica o subatómica<sup>120</sup>.

La caracterización de los biomateriales puede efectuarse a diferentes niveles, algunos métodos de caracterización son empleados para estudiar las formas, tamaños y morfologías de dichas nanoestructuras; sin embargo otras técnicas son empleadas para obtener información estructural de manera detallada<sup>120</sup>.

La caracterización de la estructura puede llevarse a cabo a diferentes grados como: estructura cristalina, microestructura, estructura atómica y estructura electrónica.

#### 4.1.1 Difracción de Rayos X (XDR).

Es una técnica esencial para la caracterización de estructuras cristalinas, la determinación de la estructura cristalina es importante incluso para los materiales a nanoescala; debido a que sus propiedades pueden ser afectadas en su forma, tamaño, orientación y distancia intercristalina, estas propiedades se deben a la disposición atómica y a la distancia en el arreglo atómico que es de aproximadamente 0.1nm<sup>120</sup>.

El descubrimiento de los rayos X en 1885 por Röntgen permitió que en 1912 Max Von Laue postulara que los materiales poseen una estructura que consiste en la repetición periódica de los átomos o moléculas que forman este sólido en las tres direcciones del espacio.

La difracción de rayos X se basa en la interferencia constructiva de los rayos X monocromáticos y una muestra cristalina.

Los rayos x son generados por un tubo de rayos catódicos, filtrados para producir una radiación monocromática colimada para concentrarse y dirigirse hacia la muestra. La interacción de los rayos incidentes con la muestra produce una interferencia constructiva y un rayo difractado, cuando las condiciones cumplen la ley de Bragg ( $n\lambda=2d \sin \theta$ ). Esta ley relaciona la longitud de onda de la radiación electromagnética para el ángulo de difracción y el parámetro de red en una muestra cristalina.

Estos rayos X difractados son detectados, se procesan y son cuantificados, mediante la exploración de la muestra a través de distintos  $2\theta$  en todas las posibles direcciones de la red cristalina son analizadas debido a que los cristales presentan una orientación aleatoria en el material en polvo. El detector registra y procesa esta señal de rayos X y convierte la señal a una velocidad de recuento

que luego es enviada a un dispositivo, como una impresora o un monitor de computadora.

La conversión de los picos de difracción a distancias interplanares, permite la identificación del material cristalino, ya que cada uno presenta distancias interplanares únicas y esto finalmente se logra con la comparación de dichas distancias interplanares con patrones de referencia estándar y el posterior análisis mediante una base de datos para la identificación de la estructura cristalina; el más usado comúnmente es el Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD)<sup>120</sup>.

#### **4.1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).**

Es una técnica que proporciona información morfológica, topográfica y composicional de las superficies de los materiales inorgánicos y orgánicos, mediante sus detectores de electrones secundarios que permiten obtener imágenes de alta resolución y los detectores de electrones retrodispersados que permiten la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie<sup>120</sup>.

Esta técnica consiste en hacer incidir sobre la muestra un haz de electrones enfocado finamente que emite una señal que puede registrarse en una pantalla mediante un tubo de rayos catódicos.

La microscopía electrónica emplea electrones en lugar de fotones para la observación de los nanomateriales a nivel atómico, esto se debe a que los electrones poseen una longitud de onda más corta que es inversamente proporcional a la velocidad de su aceleración<sup>120</sup> (Figura 14).

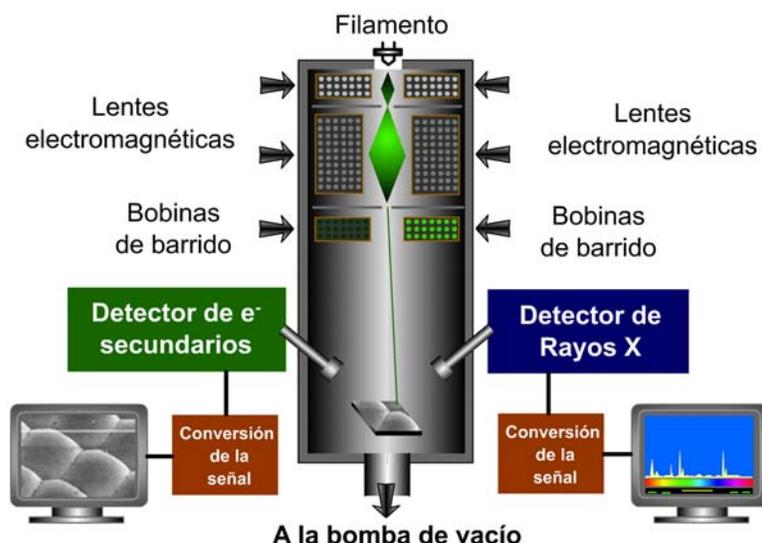
Estos electrones acelerados poseen grandes cantidades de energía cinética, ésta energía es disipada en forma de diferentes señales producidas por la interacción muestras- electrones cuando los electrones acelerados frenan en la superficie del material. Estas señales pueden ser producidas por:

- **Electrones Secundarios:** Son los encargados de producir las imágenes en SEM, son capaces de aportar información sobre la morfología y la topografía de las muestras.
- **Electrones Retrodispersados:** Aportan contrastes entre diferentes elementos en muestras multifase.
- **Electrones Retodispersados difractados:** Son capaces de determinar las estructuras cristalinas y orientaciones de minerales.

El análisis SEM se considera una técnica no destructiva; es decir, los rayos X generados por la interacción de electrones no conducen a la pérdida de volumen de la muestra, por lo que es posible analizar los mismos materiales repetidamente.

Las señales que provienen de las interacciones electrón-muestra aportan información acerca de la morfología externa (textura), composición química, la estructura cristalina y la orientación de los materiales que componen la muestra.

En la mayoría de las aplicaciones, los datos se obtienen en un área seleccionada de la superficie de la muestra, y se genera una imagen bidimensional que muestra las modificaciones espaciales en estas propiedades. Se pueden obtener imágenes de áreas que van desde aproximadamente 5 micras hasta 1 cm de anchura, con una amplificación mayor a 100,000X y con una resolución de 3 a 20 nm, esto puede variar dependiendo del microscopio<sup>120</sup>; esta técnica también es capaz de realizar análisis de ubicaciones de puntos seleccionados en la muestra; este enfoque es especialmente útil en la determinación cualitativa o semi-cuantitativa de composición química mediante espectroscopia de energía dispersiva (EDS), o la obtención de la estructura cristalina, y orientaciones de cristal por medio de Difracción de electrones retro-proyectados (EBSD).



**Figura 14. Esquema del funcionamiento de SEM.**

Fuente: <http://quimica.unab.cl/laboratorio-de-analisis-de-solidos-las/informacion/fundamentos-teoricos/microscopia-electronica-de-barrido-con-detector-eds-sem-eds/>

### 4.1.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Es una técnica que favorece la exploración superficial de un nanomaterial; permite obtener perfiles de la superficie de la imagen, con una resolución comparable con la microscopía electrónica de transmisión, ya que proporciona imágenes reales de la topografía del material (Figura 15).

El microscopio de fuerza atómica sondea la superficie de la muestra con una punta de aproximadamente 100 Å de diámetro, la punta se localiza en el extremo

libre de un cantiléver, la cantidad de fuerza entre la punta y el cantiléver depende de la distancia de la punta y la superficie de la muestra, esto puede describirse mediante la ley de Hooke  $F=-k \cdot x$

La deflexión de la sonda se mide mediante un láser diodo semiconductor que es emitido en la parte posterior del cantiléver sobre un detector fotodiodo sensible a la posición. Las deflexiones medidas en el cantiléver se utilizan para generar un mapa de la topografía de la superficie por medio de una computadora<sup>120</sup>.

## **Modos de operación**

Existen tres modos primarios de imagen en AFM:

1. Contacto: Existe una separación  $< 0.5$  nm entre el explorador y la superficie de la muestra.
2. Contacto intermitente o tapping: Existe una separación de  $0.5-2$  nm entre el explorador y la superficie de la muestra.
3. No contacto: Existe una separación de  $0.1-10$  nm entre el explorador y la superficie de la muestra.

## **Contacto**

La fuerza entre punta y muestra se conserva persistente y se mantiene una constante de deflexión; cuando la constante del explorador del cantiléver es menor que la superficie, el cantiléver se curva, la fuerza es repulsiva, al mantener una deflexión constante en el cantiléver, la fuerza entre el explorador y la muestra permite obtener la imagen de la superficie de la muestra.

## **Ventajas**

- Escaneo rápido
- Adecuado para muestras rugosas

## **Desventajas**

- Puede dañar muestras de poca dureza

## **Contacto intermitente**

El proceso de formación de imágenes es similar al modo de contacto pero el cantiléver vibra a su frecuencia de resonancia por medio del piezoeléctrico.

El explorador contacta ligeramente con la superficie de la muestra durante escaneado. Al mantener una amplitud de vibración constante así como una interacción constante entre la muestra y el explorador permite la obtención de la imagen.

### Ventajas

- Permite alta resolución de muestras de bajo grado de dureza
- Ideal para muestras biológicas

### Desventajas

- Proceso más lento
- Más complicado

### No contacto

El explorador no contacta con la superficie de la muestra, pero vibra por encima de la capa de líquido absorbido durante la exploración. Mediante el uso de un circuito de retroalimentación para monitorear los cambios en la amplitud debido a la fuerza de atracción VdW permite medir la topografía de la superficie.

### Ventajas

- Ejerce poca fuerza sobre las muestras ( $10^{-12}$  N)
- Permite reutilizar muestras

### Desventajas

- Baja resolución
- Requiere ultra alto vacío.

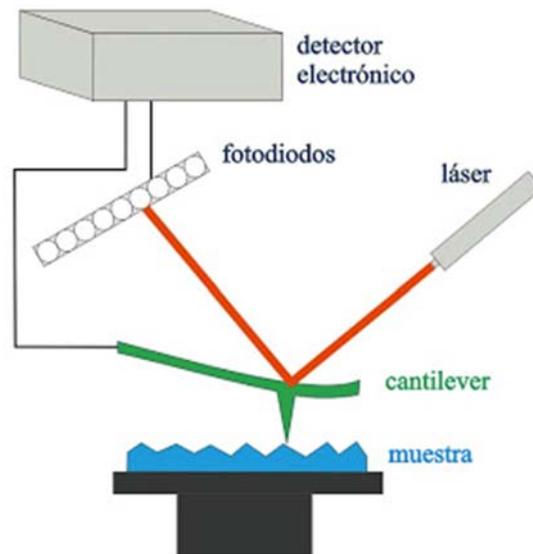


Figura 15. Esquema de AFM, se observa el mecanismo mediante el cual se producen las imágenes.

Fuente: [http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20203/historia\\_1999\\_3.html](http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20203/historia_1999_3.html)

## CAPÍTULO 5.

### 5.1 JUSTIFICACIÓN

Con la tendencia mundial de una mayor expectativa de vida y en consecuencia el aumento de la población adulta tanto en países desarrollados como del tercer mundo, los sustitutos biológicos han tomado una gran relevancia en los últimos años en el área de la biomedicina, debido al alto costo, implicaciones éticas y alto índice de fracaso de aloinjertos e injertos autólogos.

Por lo anterior se propone un biomaterial bioactivo capaz de mimetizar las características biológicas superficiales de la MEC ósea; como una estrategia eficaz para identificar y posteriormente modificar las respuestas celulares.

En años recientes, con los avances en la tecnología, las investigaciones enfocadas a la regeneración del tejido óseo se han centrado con gran interés en explorar la aplicación biomédica de los nanomateriales. En especial, en las nuevas propiedades físico-químicas y de topografía superficial que pueden presentar los nanomateriales de implante, cuando se comparan con los materiales convencionales. Lo anterior contrasta con la consideración de que el hueso es visualizado como un material nanoestructurado, compuesto por entidades biológicas como proteínas colágenas y no colágenas y cristales de hidroxiapatita que poseen dimensiones nanométricas en su matriz extracelular.

Esto ha llevado a estudiar las nuevas propiedades de los nanomateriales, principalmente las nanocerámicas de alúmina, titanio e hidroxiapatita; haciendo uso de los cultivos celulares *in vitro*. Los estudios realizados hasta la fecha, reportan que los osteoblastos son células capaces de percibir, sensar y de utilizar la nanotopografía para orientarse y migrar a través de ella. Sin embargo, estos estudios no aportan información sobre el papel de la nanotextura superficial en la biocompatibilidad o sobre el efecto biológico de la nanotextura superficial.

Con esta interrogante, se propone el desarrollo de la nanocerámica de aluminato de magnesio ( $MgAl_2O_4$ ). Estas cerámicas en su fase convencional han estado utilizándose en el área dental y ortopédica, debido a que son biomateriales que presentan ventajas en cuanto a su alta resistencia mecánica, su alta resistencia a la fractura y estructura cristalográfica dependiente de la temperatura.

La técnica que será utilizada en el desarrollo de la nanocerámica será por medio de rocío pirolítico en fase de vapor de las sustancias constitutivas de la cerámicas, lo cual nos permitirá controlar en función de la temperatura del sustrato, la distribución de la altura y el diámetro de la partícula depositada sobre sustratos de vidrio. A través de controlar y variar la temperatura de depósito de la película nanoestructurada podemos producir diferentes topografías con diferentes escalas de rugosidad. La caracterización de estas morfologías superficiales y determinar el comportamiento celular en respuesta a las propiedades superficiales del

biomaterial, podría ser de gran impacto en la implantología biomédica. Con esta perspectiva, nosotros llevamos a cabo estudios preliminares de la biocompatibilidad y biomineralización de las células osteoblásticas en contacto con las cerámicas nanoestructuradas de  $MgAl_2O_4$ .

## 5.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de las diferentes topografías superficiales de cerámicas nanoestructuradas de aluminato de magnesio ( $MgAl_2O_4$ ), sintetizadas por la técnica de rocío pirolítico en términos de biocompatibilidad y bioactividad celular.

## 5.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar las cerámicas de aluminato de magnesio ( $MgAl_2O_4$ )
2. Obtener diferentes tipos de nanotopografías de las cerámicas nanoestructuradas ( $MgAl_2O_4$ ), en función de la temperatura de síntesis mediante la técnica de rocío pirolítico.
3. Caracterizar las propiedades de morfología superficial y de composición química de la nanocerámica por técnicas microscópicas (SEM, AFM, XDR), para determinar cuál de estas cerámicas nanoestructuradas presenta una mejor respuesta biológica.
4. Establecer el efecto de la nanotopografía superficial de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  en la biocompatibilidad y biomineralización de las células osteoblásticas en cultivos celulares *in vitro*.

## 5.4 HIPÓTESIS

Las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  sintetizadas por la técnica de rocío pirolítico con diferentes nanotopografías superficiales permiten identificar las condiciones superficiales capaces de favorecer la biocompatibilidad y biomineralización celular.

## CAPÍTULO 6.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1 DISEÑO DEL BIOMATERIAL

El diseño del biomaterial requiere la previa elección de sus componentes y la técnica de síntesis que permitirá obtener los mejores resultados y posteriormente la estandarización de las concentraciones óptimas de los componentes, así como las condiciones de síntesis (Figura 16).



Figura 16. Esquema del proceso de diseño de un biomaterial.

#### 6.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

##### 6.2.1 Depósito de cerámicas nanoestructuradas

El proceso de elaboración de las cerámicas en película delgada de  $MgAl_2O_4$ , se llevó a cabo por la técnica de rocío pirolítico ultrasónico, utilizando soluciones a base de los componentes químicos que son cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ); que se encuentran en una proporción 0.05 molar. En la elaboración de las cerámicas se controló la temperatura del sustrato (Vidrio coring 7059) desde  $400^{\circ}C$  hasta  $600^{\circ}C$ , así como la frecuencia del atomizador a 2.5 MHz y una velocidad de flujo de gas 5 L/min; lo cual permitió controlar la distribución, altura, el ancho y la fase cristalina de las partículas depositadas.

## **6.3 CARACTERIZACIÓN**

### **6.3.1 Difracción de Rayos X**

Para determinar la cristalinidad estructural de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  se llevó a cabo la técnica de XDR utilizando el equipo Siemens D-5000 con una longitud de onda de radiación de 1.5406 Å (Cu  $K\alpha$ ) utilizando un intervalo de ángulo en  $2\theta$  de 10-80° a una temperatura de 25°C para identificar las fases cristalinas.

### **6.3.2 Microscopía electrónica de barrido**

Los estudios por microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo en un microscopio SEM Leica-Cambridge Stereoscan 440, para observar la morfología superficial de las películas delgadas de  $MgAl_2O_4$  que nos permitió obtener información respecto a la forma, tamaño, distribución de partículas así como la homogeneidad composicional debido a que el SEM está equipado con un detector de espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS).

### **6.3.3 Microscopía de fuerza atómica**

Para evaluar la topografía superficial de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  en función de la temperatura se utilizó el microscopio de fuerza atómica Jeol JSPM-4210 en modalidad de contacto y modo constante de fuerza de 5 nN con una punta de silicio CSC15/25 Ultrasharp.

## **6.4 ESTERILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las cerámicas previo a los estudios biológicos fueron colocadas en las cajas de cultivo de 6 pozos donde se agregaron 2 mL de etanol a una concentración del 70%, se retiró el etanol y después se agregaron antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y fungizona (0.3 µg/ml) incubándose 1 h. Posteriormente se retiró la mezcla de antibióticos y se dejaron secar bajo la campana de flujo laminar con luz UV por 30 min. Una vez realizado este procedimiento, se dejaron en la campana hasta su empleo en la caracterización de la respuesta celular.

## **6.5 CULTIVO CELULAR**

Para el trabajo experimental se utilizaron utilizaron osteoblastos fetales humanos (hFOB 1.19 ATCC® CRL-11372™), los cuales se encontraban entre el 2<sup>do</sup> y 5<sup>to</sup> pasaje, se mantuvieron en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y fungizona (0.3 µg/ml), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100mM de piruvato de sodio. Los cultivos se mantuvieron a una

temperatura de 37°C y en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en un ambiente con 100% de humedad.

## **6.6 BIOCMPATIBILIDAD CELULAR**

La caracterización de la biocompatibilidad de los osteoblastos al ser cultivados sobre la superficie de las cerámicas nanoestructuradas se evaluó por medio del ensayo de adhesión celular y ensayo de proliferación celular.

### **6.6.1 Ensayo de adhesión celular**

Para establecer el efecto de la nanotopografía de las cerámicas sobre la adhesión celular, los osteoblastos fueron cultivados sobre las cerámicas nanoestructuradas de MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 1x10<sup>3</sup> cel/mL y se cultivaron durante 4 y 24 horas. Pasado el tiempo de incubación; las células que no se adherieron a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos).

Las células adheridas a las cerámicas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído e incubadas con una solución al 0.01% de cristal violeta por 15 minutos. Posteriormente se lavaron con agua bidestilada para quitar el exceso de colorante o hasta que el agua bidestilada no tuviera presencia de color. Una vez logrado lo anterior se extrajo el colorante de las muestras con 200µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. La solución resultante fué sometida a lectura para obtener la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre vidrio coring 7059.

### **6.6.2 Ensayo de proliferación celular**

Para determinar la influencia de la nanotopografía de las cerámicas de MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> sobre la proliferación celular, se evaluó por medio del ensayo de azul de triazol (MTT) basado en la habilidad de la enzima deshidrogenada mitocondrial para oxidar una sal de tetrazolio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-y]-2-5 bromuro difeniltetrazolio) a un producto insoluble de color azul. Las células osteoblásticas fueron cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas en placas de cultivo de 24 pozos a una densidad celular de 2x10<sup>3</sup> cel/mL por triplicado por 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días de cultivo utilizando medio completo y medio osteogénico, que contiene (50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerofosfato, 10<sup>-7</sup> M de dexametasona). Después de cada periodo de incubación experimental, las células fueron incubadas con MTT (5 mg/ml) a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo, el sobrenadante fué removido y a cada pozo de cultivo se le adicionó 400 µL de una solución de dimetil sulfoxido (DMSO) e incubados durante 30 minutos para disolver los cristales de formazan formados. Una vez logrado que se disolvieran los cristales la placa fué llevada a un lector de ELISA, para obtenerse la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm. Debido a que la generación del producto azul es directamente

proporcional a la actividad oxidativa de la enzima deshidrogenasa, una disminución en los valores que se obtengan en la absorbancia a 570 nm nos indica una medida de la viabilidad celular. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre vidrio corning 7059.

### **6.6.3 Morfología celular**

Para determinar la influencia de la nanotopografía de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  sobre la morfología celular, se evaluó la interacción de los osteoblastos sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $MgAl_2O_4$  a una densidad celular de  $1 \times 10^3$  cel/mL durante 24 horas. Pasado el tiempo post-siembra; las células que no se adhirieron a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con PBS. Las células adheridas a las cerámicas fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y posteriormente analizadas mediante SEM.

## **6.7 BIOACTIVIDAD CELULAR**

Los estudios de bioactividad celular fueron evaluados a través de un medio osteogénico el cual consta de medio DMEM suplementado con 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato,  $10^{-7}$  M de dexametasona. En los estudios de bioactividad celular se utilizó la actividad de la fosfatasa alcalina y se evaluó la formación de tejido mineral mediante Alizarina Roja S.

### **6.7.1 Fosfatasa alcalina**

Para determinar la bioactividad celular de los osteoblastos sobre las diferentes nanocerámicas se llevó a cabo el ensayo enzimático de la fosfatasa alcalina (ALP). La ALP es una enzima que cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que liberó fosfato al medio. Para evaluar la presencia de la ALP las células osteoblásticas fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^3$  células/mL por triplicado en las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  durante 3, 5, 14 y 21 días de cultivo celular. Al término de cada periodo experimental de incubación, las células fueron lavadas con PBS y se sometieron a sonicación para extraer las capas celulares en una solución amortiguadora con 10mM de Tris-HCL pH 7.4 más 0.1% de tritón X-100 con la finalidad facilitar el desprendimiento de las células sobre las cerámicas. Los ensayos de actividad enzimática se llevaron a cabo por transferir 50  $\mu$ L de cada muestra a una placa de cultivo de 96 pozos adicionándole 30  $\mu$ L de la solución activadora de la enzima que contenía 2mM de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) en una solución amortiguadora con 10mM de tris-HCl pH 9.8 y enseguida se agregó 50  $\mu$ L de la solución p-nitrofenilfosfato (pNPP) en cada pozo de las muestras a una concentración de 8mM e incubándose para que se llevara a cabo la reacción enzimática a 37°C por 60 minutos. La reacción enzimática se detuvo adicionando 20 $\mu$ L de 0.05 N de hidróxido de sodio (NaOH) y se realizaron mediciones de la absorbancia a una

longitud de onda de 405 nm para medir la cantidad de producto formado p-Nitrofenol, compuesto que cambió a color amarillo en solución alcalina.

### 6.7.2 Caracterización del material mineral depositado por tinción de Alizarina Roja S.

Para determinar la formación del material mineral sobre las superficies de las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  se utilizó el kit de osteogénesis que se basa en la tinción de Alizarina Roja S (Millipore). Para ello; las células osteoblásticas fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^3$  células/mL por triplicado en las cerámicas de  $MgAl_2O_4$  durante 5 y 21 días de cultivo celular. A los cultivos se les dividió en grupo control, las cuales son las cerámicas en presencia de medio normal y grupo experimental cerámicas incubadas en presencia del medio osteogénico. Una vez pasado el tiempo, se retiró el sobrenadante; se lavaron las células sobre las cerámicas y se fijan con 10% de paraformaldehído por 15 minutos. Se retiró el fijador y se lavaron con agua bidestilada evitando no disturbar la monocapa superficial sobre las cerámicas. Se retiró el agua y se incubaron con la solución de Alizarina Roja S por 20 minutos, se retiró la solución y se lavó con agua bidestilada para quitar el exceso de colorante. Una vez realizado esto; las cerámicas son fotografiadas para su fotodocumentación. Por otro lado; para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la tinción de Alizarina Roja S; las cerámicas son incubadas con 400  $\mu$ L de ácido acético por 30 minutos; posteriormente se pasaron a un tubo eppendorf y se calentaron a 85°C por 10 minutos y rápidamente se enfriaron en hielo por 5 minutos, se centrifugaron a 20,000xg por 15 minutos y se neutralizó el pH con 150  $\mu$ L de 10% de hidróxido de amonio y se llevó a lectura en un espectrofotómetro a 405 nm. Los datos de absorbancia son convertidos a  $\mu$ M de alizarina utilizando una curva estándar del colorante lo que permitió obtener la cuantificación directamente proporcional a los nódulos de tejido mineralizado formados por los cultivos celulares.

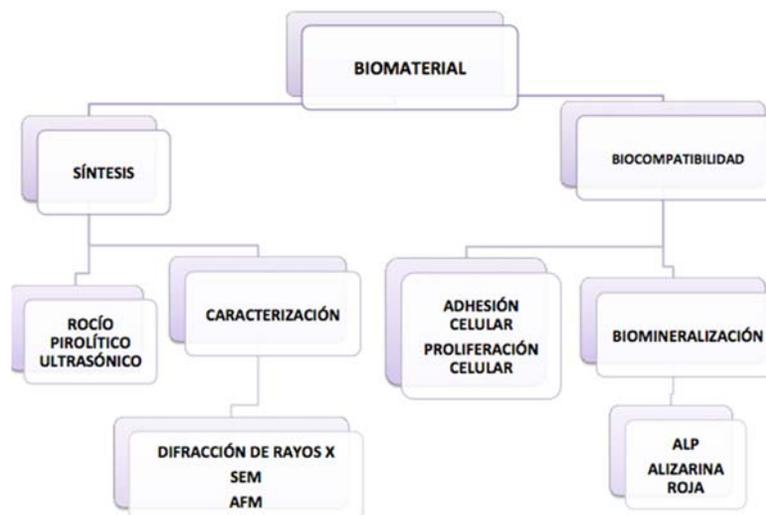


Figura 17. Esquema de las fases que comprenden la metodología.

## 6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante la identificación de las variables; se definió como variable dependiente la absorbancia y como variables independientes la temperatura de síntesis y los días de cultivo, todos los experimentos se realizaron por triplicado; para el análisis estadístico se introdujeron los valores absolutos de las muestras replicadas por triplicado, se calculó la desviación estándar y el error estándar, después mediante SPSS 22 se realizó ANOVA de 2 vías, para determinar las diferencias entre un grupo control y 5 experimentales en dos condiciones, con medio normal y medio osteogénico, finalmente se realizó la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples, la significancia estadística se consideró con  $p < 0.05$ .

## CAPÍTULO 7.

### 7.1 RESULTADOS

Por la técnica de rocío pirolítico se logró sintetizar cerámicas de  $MgAl_2O_4$  con diferentes temperaturas de depósito. Las cuales se caracterizaron por técnicas de XDR, SEM y AFM, para obtener datos sobre la topografía, cristalinidad y organización estructural de las mismas.

#### 7.1.1 Caracterización mediante difracción de rayos X.

En los difractogramas que se muestran a continuación (Figura 18A-18D) que corresponden a las cerámicas depositadas a  $400^\circ$ ,  $450^\circ$ ,  $500^\circ$  y  $550^\circ C$ ; se obtuvo la fase hidrotalcita, que presenta las reflexiones características de este material, de acuerdo con los datos indexados en las tablas reportadas en el JCPDS 22-0700, en especial la reflexión (003), que todas las cerámicas presentan a  $11.5^\circ$ ; debido a que en esta etapa de transformación de fase no conlleva una alteración en la estructura cristalina y la presencia de estos planos característicos confirma la estructura laminar.

Las reflexiones (003) y (006) proporcionan información respecto a la distancia interplanar y la (110) está asociada a la densidad de carga de las láminas (Tabla 6).

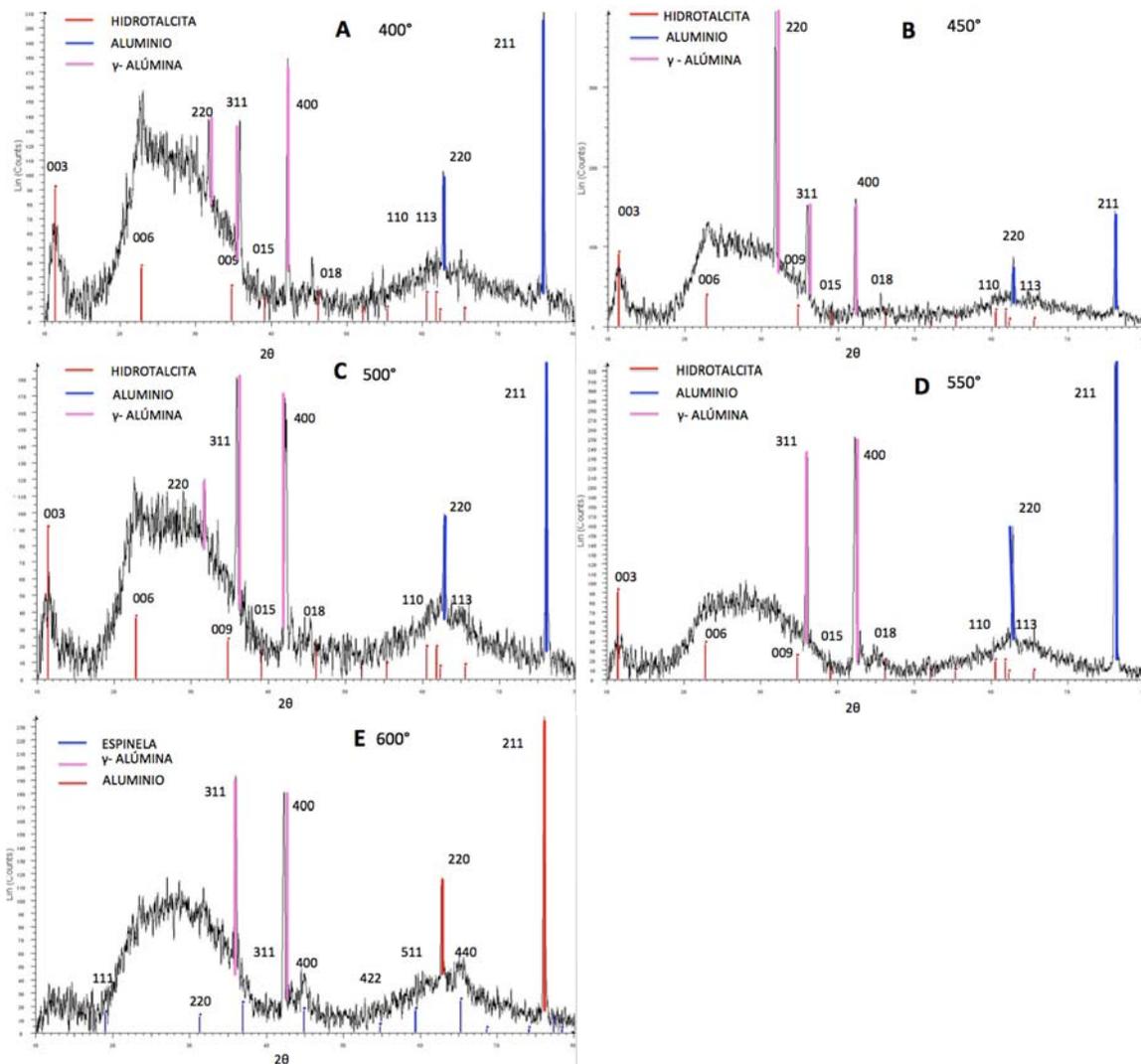
Las reflexiones (003), (006), (009), (110) y (113) son anchas y asimétricas, mientras que las (015) y (018) son reflexiones características de los hidróxidos dobles con estructura laminar, las reflexiones (220) a  $31.1^\circ$ , (311) a  $34.1^\circ$ , (400) a  $42.2^\circ$  y (440) a  $57.5^\circ$  que de acuerdo a JCPDS 010-425 corresponden a  $\gamma Al_2O_3$ ; son delgadas, bien definidas y simétricas así como las reflexiones (220) a  $64^\circ$  y (211) a  $77^\circ$  que corresponden al aluminio de acuerdo a JCPDS 004-787.

Las reflexiones (015) y (018) son imperceptibles aproximadamente a  $600^\circ C$  cuando se lleva a cabo la transformación de fase y se pierde la estructura laminar característica de la hidrotalcita.

En cada muestra se puede observar un diferente grado de cristalinidad y tamaño de cristal que se ve reflejado en el ancho, tamaño, definición y simetría de las reflexiones características. El grado de cristalinidad es muy bajo en todas las muestras ya que se observan picos muy anchos que presentan poca definición, esto puede deberse a una mayor proporción de aluminio en la relación  $Mg^{2+}/Al^{3+}$ , especialmente de  $\gamma Al_2O_3$  que presenta un gran grado de amorficidad.

**Tabla 6. CAMBIOS EN LA DISTANCIA INTERPLANAR**

<b>MUESTRA</b>	<b>REFLEXIÓN</b>	<b>dI Å</b>	<b>INTENSIDAD</b>
<b>400</b>	(003)	7.46	90
	(006)	3.31	40
	(009)	2.90	26
<b>450</b>	(003)	7.90	98
	(006)	3.89	38
	(009)	2.82	24
<b>500</b>	(003)	7.78	95
	(006)	3.60	37
	(009)	2.70	22
<b>550</b>	(003)	7.80	92
	(006)	3.80	34
	(009)	2.80	23



**Figura 18. Difractogramas de las muestras sintetizadas de  $Mg_2AlO_4$  A-D) muestras sintetizada a 400, 450, 500 y 550°C, que presentan las reflexiones características de u material tipo hidrotalcita (003), (006) y (009), donde se observan picos anchos y poco definidos, debido a un mayor grado de amorficidad asociado a una mayor proporción  $\gamma Al_2O_3$ . E) muestra sintetizada a 600°C, donde se observan las reflexiones (400) y (440)características de la espinela de aluminato de magnesio.**

Mediante el programa Kristal Shaper se pudo obtener la estructura cristalina; la hidrotalcita posee una estructura análoga de la Brucita  $Mg(OH)_2$ , que consiste en un arreglo hexagonal de iones hidroxilo alternados con sitios octaedrales ocupados por  $Mg^{2+}$ , estos sitios octaedrales se unen mediante aristas para formar láminas, el  $Mg^{2+}$  del arreglo laminar puede ser sustituido parcialmente isomórficamente por  $Al^{3+}$  y formar un hidróxido doble laminar, que adquiere una carga neta positiva, que es neutralizada por el anión  $CO_3^{2-}$  que se encuentra almacenado en la zona interlaminar, la cual también contiene moléculas de agua que estabilizan la estructura cristalina.

En este caso presenta un arreglo de estructura romboedral de 3 láminas, (3R politipo) (Figuras 19, 20), posee un sistema cristalino trigonal o romboédrico y una estructura cristalina hexagonal-escalenoedra (Figura 21), que de acuerdo a la clasificación de Hermann Mauguin se simboliza  $3\ 2/m$ , sus parámetros de red son  $a = 3.05\text{Å}$ ,  $c = 23.40\text{Å}$  los cuales concuerdan con la información indexada en las tablas de JCPDS 22-0700  $a = 3.102\text{Å}$  y  $c = 23.404\text{Å}$ , los cambios en  $a$  se atribuyen al aumento de  $Al^{3+}$  en la proporción  $Mg^{2+}/Al^{3+}$  y los cambios en  $c$  se atribuyen a un diferente grado de hidratación.

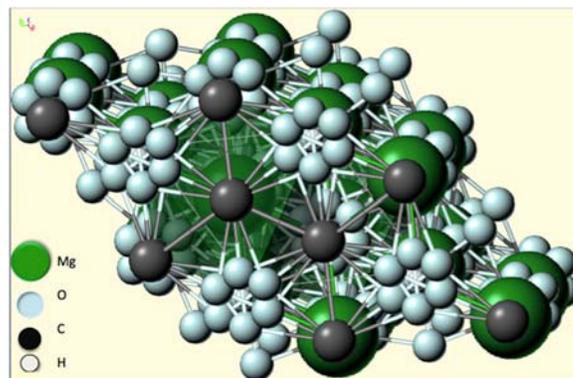


Figura 19. Esquema de la estructura cristalina de la hidrotalcita, en la dirección [001] donde se observa un arreglo estructural romboedral.

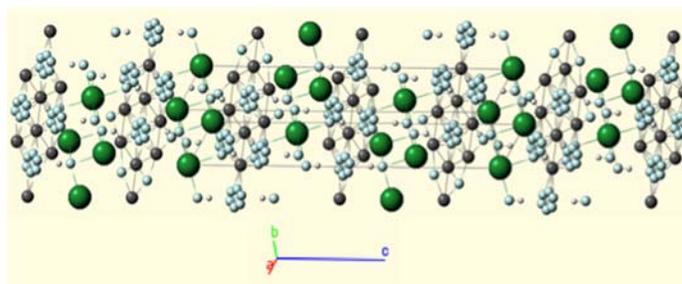
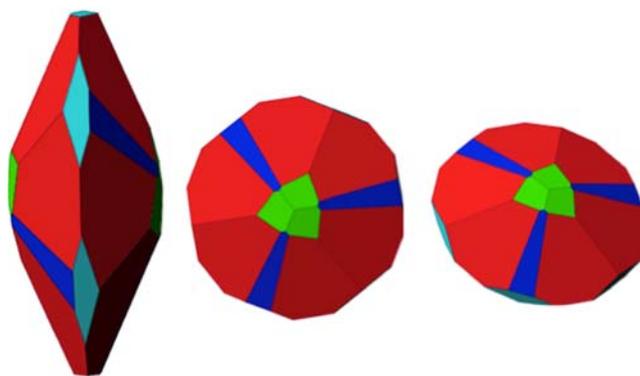


Figura 20. Esquema de la estructura cristalina de la hidrotalcita, en la dirección [110].



**Figura 21. Esquema de la estructura cristalina hexagonal-escalenoedra de hidrotalcita, vista lateral, superior.**

El depósito de la cerámica con una temperatura de 600°C dió como resultado la fase espinela correspondiente al aluminato de magnesio debido a que presenta las reflexiones características de este material de acuerdo a las indexadas en las tablas del JCPDS 21- 1152, (111) a 19°, (220) a 31.1°, (311) a 36.87°, (400) a 45°, (511) a 54° y (440) a 65° (Figura 18E). En esta etapa de transformación de fase conlleva una alteración en la estructura cristalina; se pierde el arreglo laminar de la hidrotalcita por lo que existe un cambio en las reflexiones obtenidas en las muestras anteriores.

Como se puede observar en la figura 18E, se obtuvieron reflexiones poco definidas, anchas y no simétricas, también posiblemente asociadas a una mayor proporción de  $\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$  que posee un alto grado de amorficidad y es isoestructural a la espinela por lo que presentan las mismas reflexiones características (220) a 31.1°, (311) a 34.1°, (400) a 42.2° y (440) a 57.5° indexadas en JCPDS 010-425; así como las reflexiones (220) a 64° y (211) a 77° correspondientes al aluminio indexadas en JCPDS 004-787.

Mediante el programa Kristal Shaper se pudo obtener la estructura del sistema cristalino y la estructura cristalina; la espinela de Aluminato de Magnesio; es un óxido binario con fórmula general  $\text{AB}_2\text{O}_4$ , donde A representa al catión divalente que ocupa los sitios tetraedrales y B ocupa los sitios octaedrales, posee una estructura de la celda unitaria consiste en 8 moléculas de  $\text{Mg}_2\text{AlO}_4$  y 32 iones de oxígeno para 64 sitios tetraedrales y 32 sitios octaedrales, los cuales son ocupados por 8 iones de  $\text{Mg}^{2+}$  y 16 de  $\text{Al}^{3+}$ .

Posee un sistema cristalino isométrico o cúbico centrado en las caras (Figura 22) y una estructura cristalina hexooctaedral (Figura 23) que de acuerdo a la clasificación de Hermann Mauguin se simboliza  $4/m\ 3\ 2/m$ , sus parámetros de red son  $a = 8.07\text{Å}$   $c = 8.07\text{Å}$  los cuales concuerdan con la información indexada en JCPDS 21-1152  $a = 8.089\text{Å}$  y  $c = 8.089\text{Å}$ , la disminución de los valores obtenidos se atribuyen al aumento de  $\text{Al}^{3+}$  en la proporción ( $\text{Mg}^{2+}/\text{Al}^{3+}$ ) o a la presencia de impurezas.

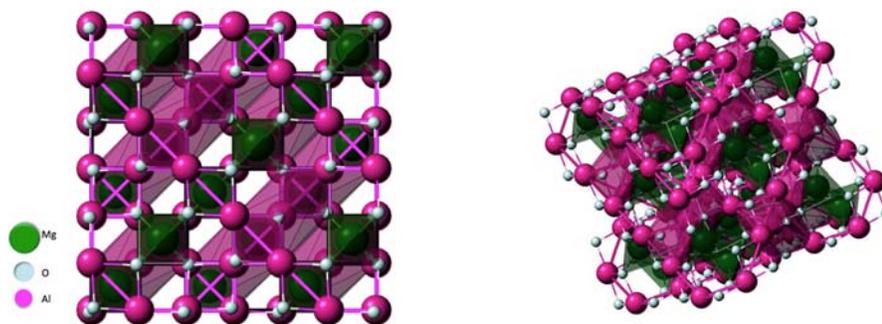


Figura 22. Esquema del sistema cristalino cúbico centrado en las caras de la espinela de aluminato de magnesio, vista superior y lateral.

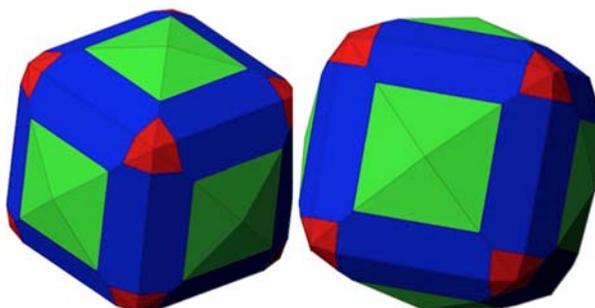


Figura 23. Esquema de la estructura cristalina hexooctaedral de la espinela de aluminato de magnesio.

### 7.1.2 Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido.

En las muestras sintetizadas a 400° C (Figura 24A), se puede observar una base laminar con grietas que suelen ser perpendiculares al plano de clivaje; formadas por la eliminación de óxidos de magnesio y aluminio; también observamos la formación de núcleos de cristalización, en esta etapa inicial de nucleación se requiere la sobresaturación de los componentes para formar partículas de composición heterogénea, los núcleos que están en contacto con la estructura laminar presentan morfología más irregular, las partículas más superficiales presentan morfología semiesférica con diámetro que va desde 800-1400 nm, con distribución no uniforme en cuanto a tamaño donde predominan las partículas de 1000- 1300nm de diámetro (Figura 25A), asimismo; se pudieron observar partículas con morfología romboédrica de característica de la  $\gamma\text{Al}_2\text{O}_3$  o bohemita, este hallazgo permite corroborar la información obtenida mediante difracción de rayos X (Figura 24B ).

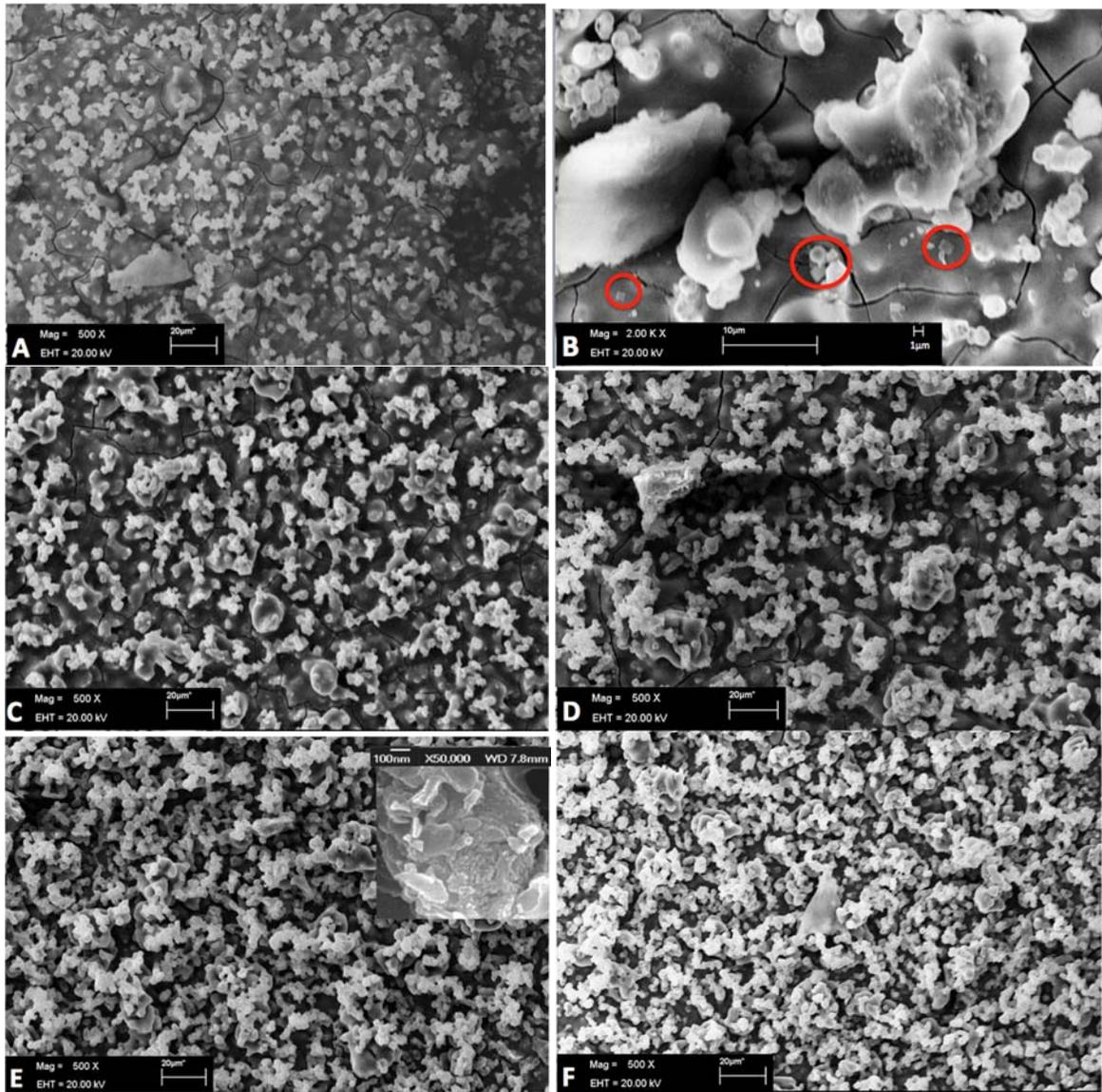
En las muestras sintetizadas a 450°C (Figura 24C), se puede observar una estructura basal y tres tipos de aglomerados; con morfología plaquetaria, irregular y vermicular, cuasiesférica, las cuales poseen un diámetro de 1400-2100 nm

(Figura 25B), lo que representa un aumento en su diámetro respecto a las muestras sintetizadas a 400° C, esto puede ser causado por el aumento de la temperatura durante el tratamiento térmico que favorece la agregación atómica a las partículas amorfas y la formación de cuellos.

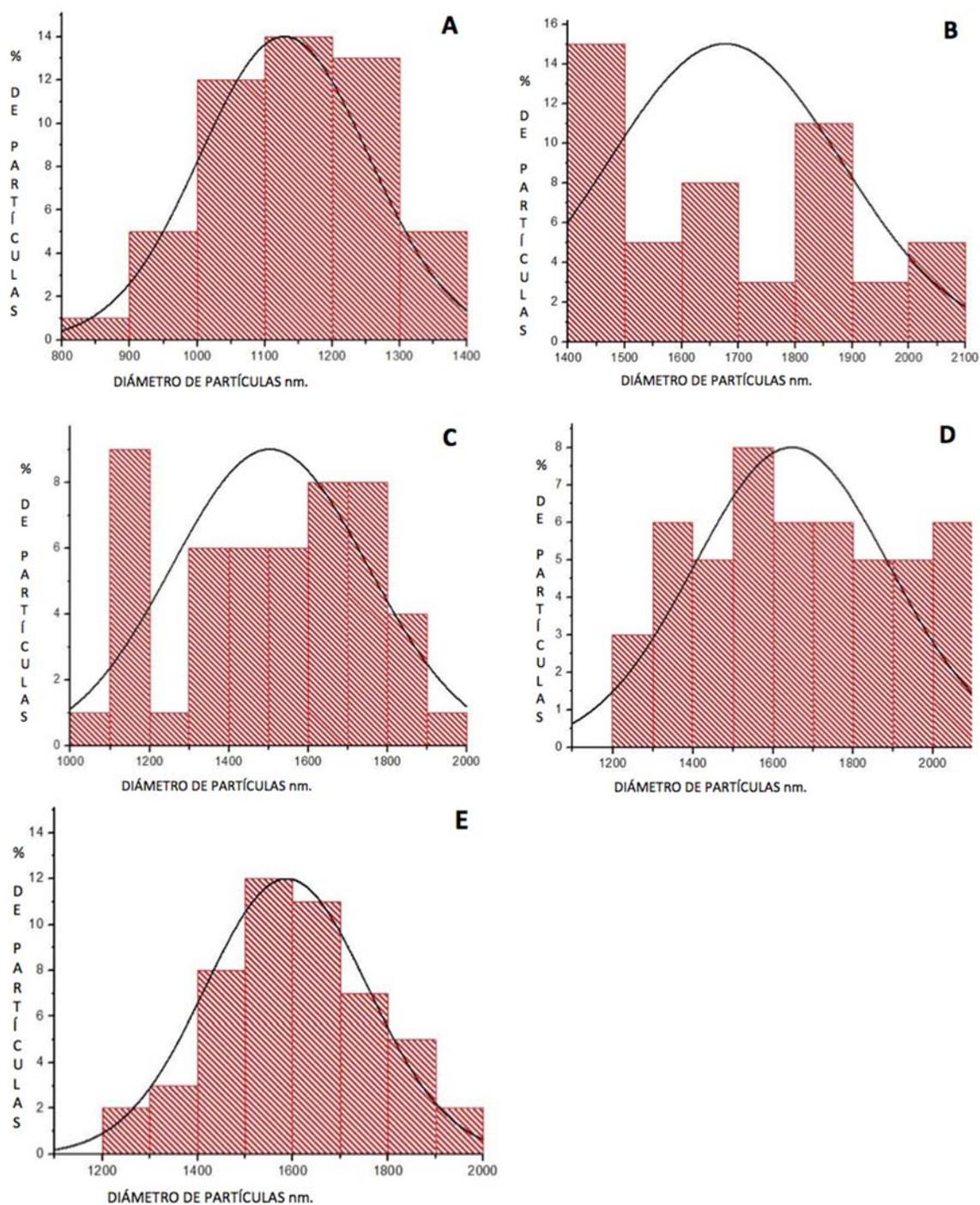
En las muestras sintetizadas a 500°C (Figura 24D ) se puede observar en menor grado la estructura basal, las partículas forman dos tipos de aglomerados, uno con morfología irregular que presenta mayor volumen y otro con morfología vermicular donde se observan las partículas con morfología cuasiesférica con diámetro de 1000-2000 nm (Figura 25C), lo que representa una disminución en su diámetro respecto a las muestras sintetizadas a 450°C, esto puede ser causado por el aumento de la temperatura durante el tratamiento térmico que favorece la eliminación de los cuellos de partículas.

En las muestras sintetizadas a 550°C (Figura 24E) es menos visible la estructura basal, esto puede estar asociado a los cambios en la difracción de rayos X donde la reflexión (018) asociada con la estructura laminar característica de las hidrotalcitas, las partículas a su vez; forman dos tipos de aglomerados uno con morfología irregular que presenta mayor volumen y otro con morfología vermicular donde se pueden observar las partículas de morfología cuasiesférica con diámetro de 1200-2000 nm (Figura 25D), en un acercamiento a las partículas en una magnitud de 50000X, se pueden observar que están conformadas por nanopartículas irregulares y cuasiesféricas, que van de los 50- 5 nm de diámetro.

En las muestras sintetizadas a 600°C (Figura 24F) ya no es perceptible la estructura basal, esto está asociado a los cambios en la difracción de rayos X donde las reflexión (018) asociada con la estructura laminar y la transformación de fase asociada al tratamiento térmico; las grietas tampoco son visibles en esta fase final de la descomposición térmica de la hidrotalcita, las partículas forman dos tipos de aglomerados uno con morfología irregular y otro con morfología vermicular donde se pueden observar partículas de morfología cuasiesférica con diámetro de 1200-2000 nm (Figura 25E), las cuales se encuentran distribuidas a lo largo de toda la muestra.



**Figura 24.** Imágenes obtenidas por SEM de cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  a un voltaje de 2000 kV y una amplificación de 500X mediante electrones retrodispersados que permite obtener un contraste en escala de grises en materiales multicomponente A)muestra sintetizada a 400° C, donde se observa la estructura basal con grietas y la iniciación de la etapa de nucleación. B)muestra sintetizada a 400° C, donde se observan partículas con morfología romboédrica, la cual es característica de la  $\gamma Al_2O_3$ . C) muestra sintetizada a 450° C, donde se observan núcleos de cristalización y en menor grado la estructura basal. D)muestra sintetizada a 500° C, se observan mayor número de partículas y aglomerados. E) muestra sintetizada a 550° C, a mayor amplificación podemos observar que las partículas micrométricas están conformadas por nanopartículas cuasiesféricas y de morfología irregular. F) muestra sintetizada a 600° C, se observan partículas y aglomerados en rango micrométrico y ya no se observa la estructura basal de  $Al_2O_3$ .



**Figura 25.** Histogramas de tamaño de partículas; donde se observa el porcentaje por diámetro A- E) muestras sintetizadas a 400°, 450°, 500°, 550° y 600° C donde se observa la variabilidad en el tamaño de partículas que va de 800-2000 nm.

### 7.1.3 Caracterización mediante microscopía de fuerza atómica.

Mediante el programa WinSPM e ImageJ se analizaron los resultados de microscopía de fuerza atómica se evaluaron los cambios en la rugosidad y área superficial de las muestras sintetizadas a 400°, 450°, 500°, 550° y 600°C, todas las muestras se analizaron a una longitud de 1 µm.

A 400°C observamos la formación de crestas de altura variable de 10-33.4 nm, su distribución no es uniforme existe una distancia de aproximadamente 28.10 nm entre cada una (Figura 26A).

En la figura 26B de la muestra sinterizada a 450°C observamos una formación de crestas más agudas con una altura entre 40-82.4 nm, con una distribución no uniforme, con una distancia promedio de 36.45 nm entre cada una.

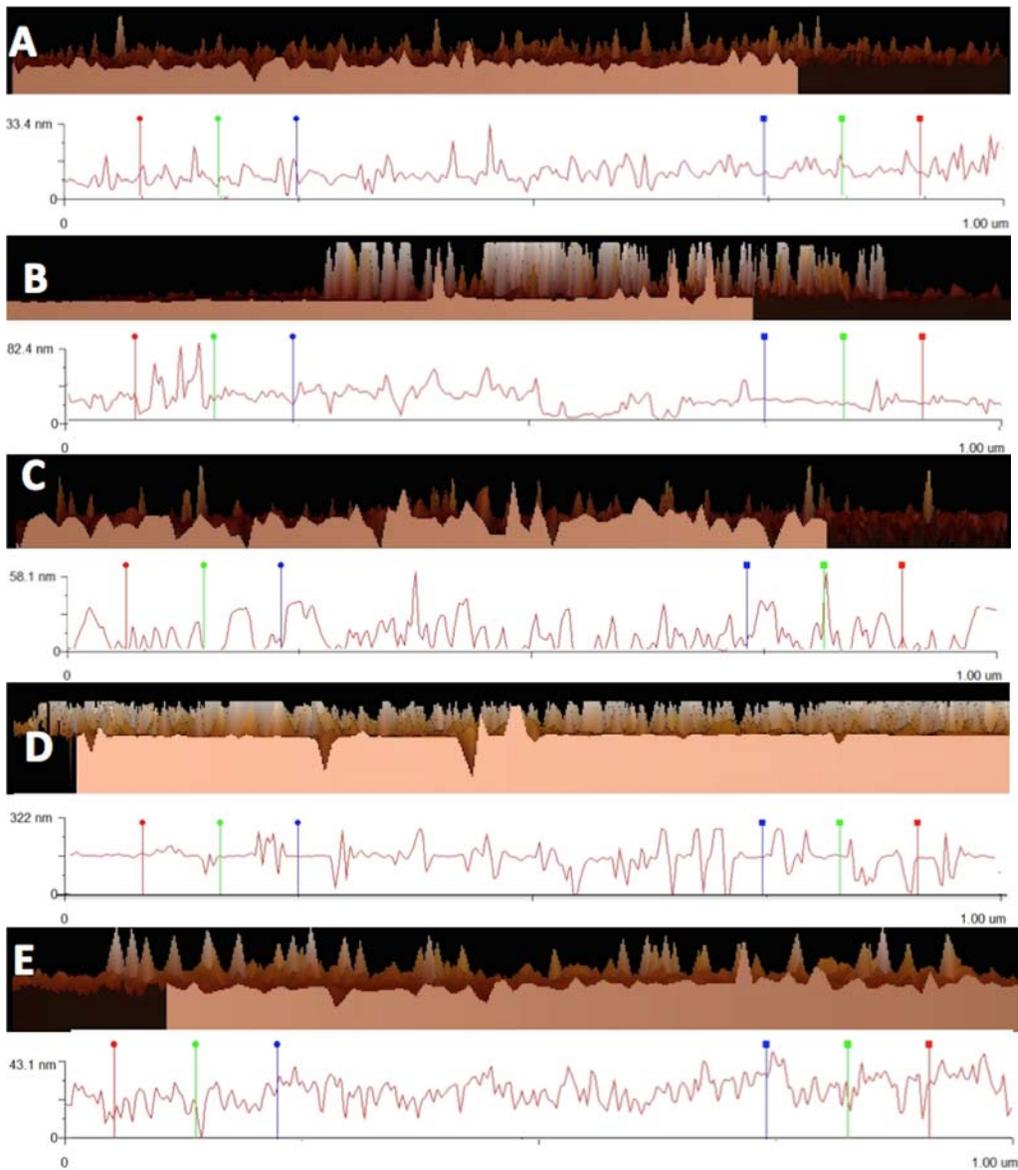
Mientras que a 500°C observamos un cambio superficial muy evidente con respecto a las muestras anteriores, ya que hay una distribución más homogénea de crestas y valles; las crestas se encuentran a una distancia aproximada de 33.82 nm y una altura que va desde los 20-58.1 nm pero bastante heterogeneidad respecto a la morfología y ancho de las crestas (Figura 26C).

En la muestra sintetizada a 550°C observamos un aumento en el grosor de la muestra 322 nm, podemos observar dos tipos de superficies una casi lisa y otra con crestas y valles con distribución no homogénea, la distancia entre crestas es de 66.55 nm aproximadamente y las crestas también presentan cambios en su morfología (Figura 26D).

La nanotopografía rugosa más homogénea se obtuvo a 600°C, el grosor de la película disminuye drásticamente respecto a la sintetizada a 550; las crestas se encuentran a una distancia aproximada de 21.38 nm y las crestas y valles presentan mayor homogeneidad en cuanto a su distribución y morfología (Figura 26E).

**Tabla 7. RESULTADOS DE RUGOSIDAD SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS**

MUESTRA	Ra	Rz	Rzjis	Sdm
400	6.47 nm	33.4 nm	20.1 nm	28.10 nm
450	19.9 nm	82.4 nm	47.0 nm	36.45 nm
500	11.5 nm	58.1 nm	33.9 nm	33.82 nm
550	71.6 nm	322nm	141 nm	66.55 nm
600	14.89 nm	43.1 nm	27.7 nm	21.38 nm



**Figura 26. Imágenes obtenidas mediante AFM y analizadas mediante el programa WinSPM en modo topografía de las muestras de  $Mg_2AlO_4$ ; que se analizaron a  $1\mu m$  de longitud A) muestras sintetizadas a  $400^\circ C$ , donde podemos observar su perfil y una distribución no uniforme de crestas y valles. B) muestras sintetizadas a  $450^\circ C$ , donde podemos observar su perfil y una distribución no uniforme de crestas y valles en aproximadamente  $2/3$  de la muestra y en la superficie restante se observa un bajo grado de rugosidad. C) muestras sintetizadas a  $500^\circ C$  donde se observa un aumento no uniforme de la rugosidad. D) muestras sintetizadas a  $550^\circ C$  donde se observa un considerable aumento en el grosor de las muestras y que presentan rugosidad con distribución no uniforme. E) muestras sintetizadas a  $600^\circ C$  donde se observa un patrón más homogéneo en el tamaño y distribución de la rugosidad superficial de las muestras.**

### 7.1.4 Adhesión celular

El proceso de adhesión celular se efectuó más lento en las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  respecto al control (vidrio corning 7059) ya que se observó una adhesión celular que va de 30-67% a 4 horas, respecto al 100% del control, pero a 24 horas todos los grupos experimentales presentaron resultados mayores al 100%; estos resultados sugieren que todas las muestras poseen mayor afinidad y superficie de contacto para las células osteoblásticas respecto al control.

Obtuvimos una diferencia significativa para las muestras sintetizadas a  $600^\circ C$  respecto a las demás muestras experimentales en el ensayo a 4 horas, pero no respecto al control, a 24 horas obtuvimos diferencias respecto a todas las muestras y también sobre el control; excepto para las muestras sintetizadas a  $550^\circ C$  (Ver tabla 8 en el anexo); estos resultados sugieren que el material no presenta efectos citotóxico y que las propiedades superficiales las muestras sintetizadas a  $600^\circ C$  favorecen la adsorción de proteínas de adhesión celular.

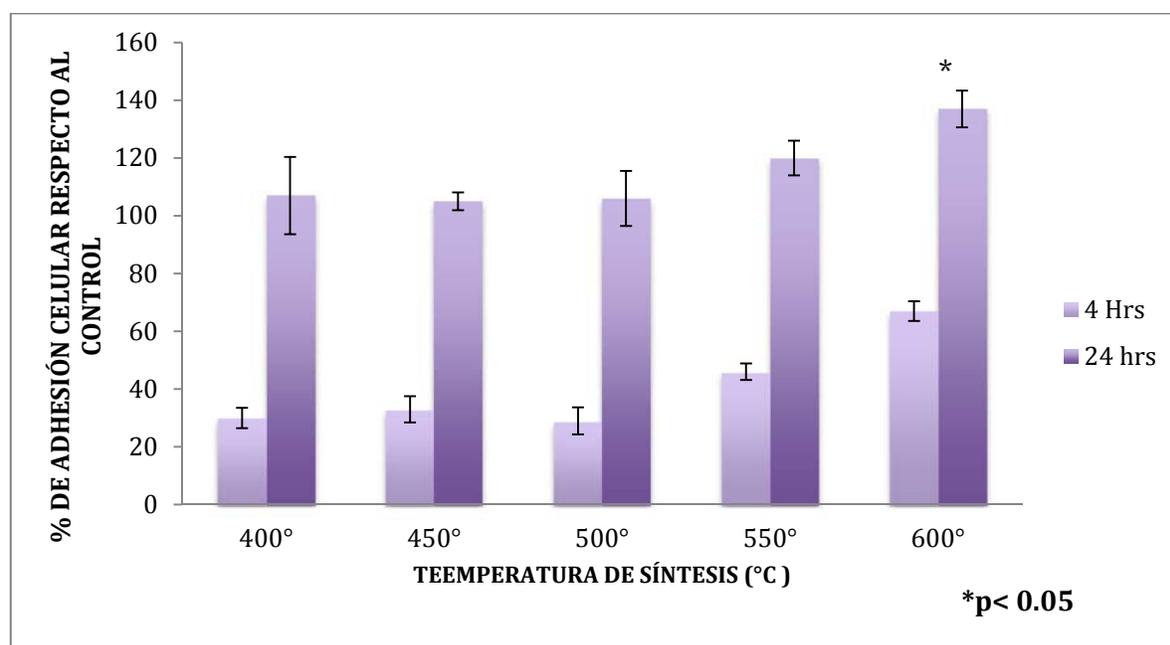


Figura 27. Gráfica de porcentaje adhesión de células osteoblásticas en contacto con las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  a 4 y 24 horas respecto al control (vidrio Corning 7059).

### 7.1.5 Proliferación celular

En la figura 28 podemos observar que al día 1 sólo las muestras sintetizadas a 450° C con medio osteogénico presentan resultados significativos respecto al control, al día 3 las muestras sintetizadas a 500 y 550° C con medio osteogénico, al día 5 las muestras sintetizadas a 450, 500 y 550° C, al día 7 ninguna muestra presenta resultados significativos, al día 14 todas las muestras presentan resultados significativos y a 21 días todas las muestras presentan resultados significativos respecto al control tanto con medio normal como osteogénico (Ver tabla 9 en el anexo).

Al día 1 todos los grupos presentan resultados que van del 90-101% con medio normal y de 93-107% con medio osteogénico, al día 3; los porcentajes disminuyen en todos los grupos con medio control con resultados que van de 71-96% y con medio osteogénico sólo aumenta en 500 y 550°C, los resultados varían de 73-123%.

A los 5 días con medio control los porcentajes varían de 79-96% y con medio osteogénico de 86-114%, a los 7 días con medio control de 84-91% y con medio osteogénico de 83-96%, a los 14 días con medio control de 97-101% y con medio osteogénico de 135-145% y finalmente a los 21 días de 115-140% con medio control y de 128-149% con medio osteogénico; estos resultados indican una disminución respecto al control en algunos grupos del día 3-7, después del día 7 que es cuando comienza el proceso de diferenciación se observa un aumento en el porcentaje de células respecto al control, este aumento de la densidad celular es mayor para los grupos con medio osteogénico a 14 y 21 días, pero no se observa ninguna tendencia con respecto a la temperatura del tratamiento térmico, sin embargo si existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control que pueden indicar que la nanotopografía juega un papel importante en la bioactividad de los osteoblastos.

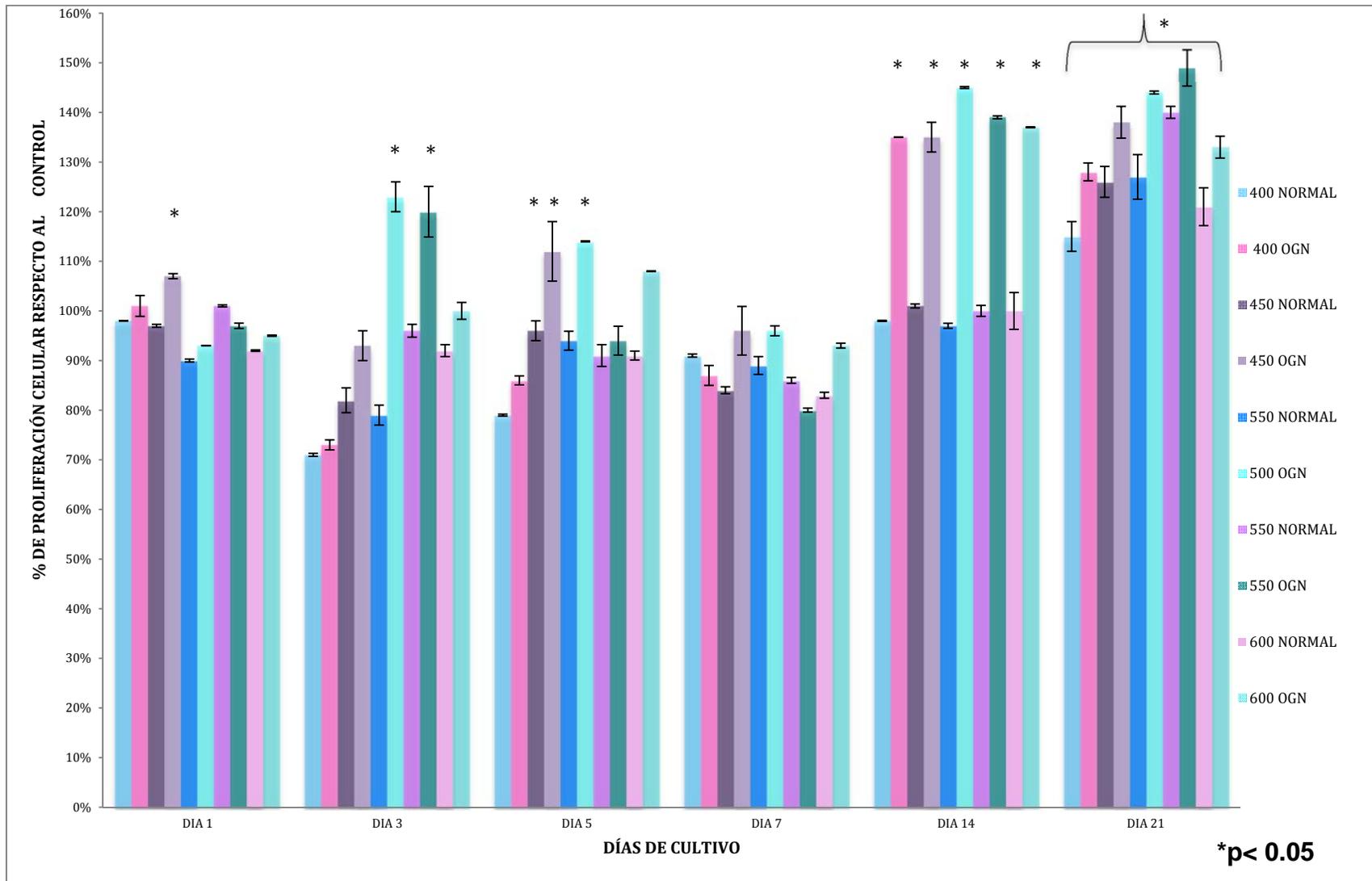


Figura 28. Porcentaje de proliferación de células osteoblásticas en contacto con cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$ , respecto al control (vidrio coring 7059).

### 7.1.6 Morfología celular

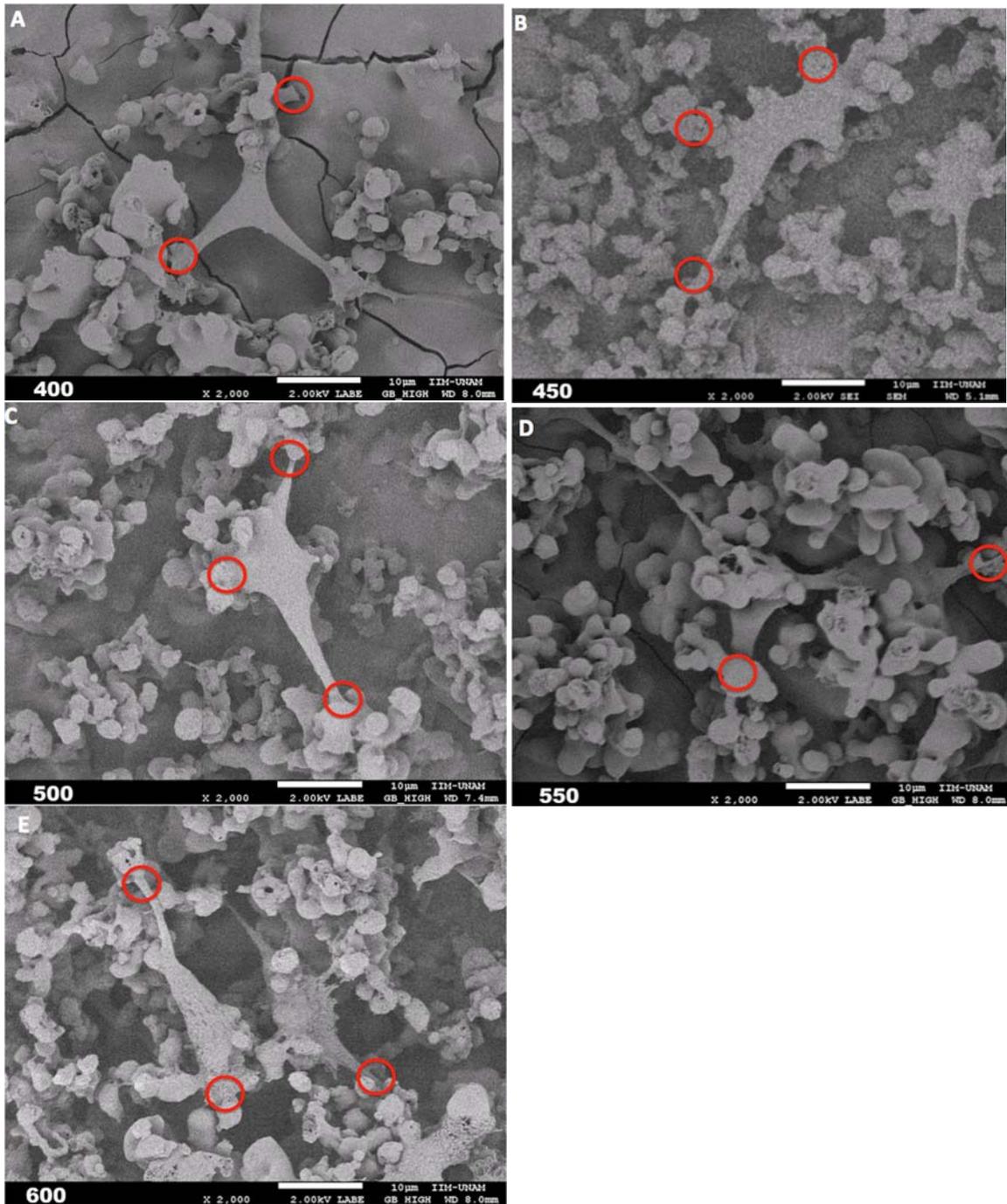
A 400° C se observa un osteoblasto muy plano y elongado que mide aproximadamente 47  $\mu\text{m}$  de longitud, este tipo de morfología es más común en osteoblastos adheridos en superficies planas; el cuerpo tiene poco contacto con la estructura laminar basal, pero los filipodios y lamelipodios presentan adhesiones focales que se observan fusionados con los aglomerados de partículas que forman parte de la nanotopografía de la cerámica de  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$  (Figura 29A).

Los osteoblastos presentan una longitud aproximada de 41  $\mu\text{m}$  de longitud en las muestras sintetizadas a 450° C (Figura 29B); esto se debe a que hay una distancia menor entre los aglomerados de partículas, hay una mayor interacción de las células osteoblásticas con las nanopartículas así como los lamelipodios y filipodos de morfología más densa y adhesiones focales fusionadas con los aglomerados de partículas.

En la muestra sintetizada a 500° C (Figura 29C) se observa un osteoblasto con una longitud aproximada de 32  $\mu\text{m}$  con fusión lateral a un aglomerado, se observan menor cantidad de filipodios y lamelipodios pero un aumento en el área de contacto de las adhesiones focales.

A 550° C podemos observar 2 osteoblastos de aproximadamente 40  $\mu\text{m}$  unidos mediante desmosomas con morfología plana, filipodios y lamelipodios muy elongados que crecieron en interacción con los aglomerados de partículas (Figura 29D), este cambio morfológico respecto a los osteoblastos adheridos a 450 y 500° C puede estar asociado a los cambios nanotopográficos de las muestras sintetizadas a 550° C que presentan zonas con una mayor área superficial de contacto debido a que las nanoesferas en comparación con las cerámicas anteriores presentan topografías más lisas.

A 600° C podemos observar dos osteoblastos de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  unidos mediante desmosomas, con una estructura más densa y fibrilar. Los osteoblastos son células anclaje dependientes por lo que primero requieren adherirse, por medio de la extensión de filipodios y lamelipodios (Figura 29E), estos resultados sugieren que los osteoblastos tienden a crecer a lo largo de los aglomerados de nanopartículas que forman las cerámicas y es claro que entre mayor sea el número de partículas existe un aumento en la porosidad del material el cual promueve la formación de puntos focales densos; por lo que los patrones nanotopográficos pueden ser capaces de controlar la alineación celular y el fenotipo celular.



**Figura 29.** Imágenes obtenidas mediante SEM de cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  en contacto con las células osteoblásticas a las 24 horas de cultivo, a un voltaje de 2000 kV y una amplificación de 2000X A) muestras sintetizadas a 400°C, se observa la interacción entre las células y los aglomerados de partículas y filipodios elongados. B) muestras sintetizadas a 450°C, se observa la interacción entre las células y los aglomerados de partículas y la formación de adhesiones focales. C) muestras sintetizadas a 500°C, se observa la interacción entre las células y los aglomerados de partículas y la formación de adhesiones focales de mayor densidad. D-E) muestras sintetizadas a 550° y 600° C se observa la interacción entre las células y los aglomerados de partículas y célula célula, que muestra mayor área de interacción en ambos casos en las muestras sintetizadas a 600° C

### 7.1.7 Fosfatasa alcalina

La expresión de fosfatasa alcalina se considera un marcador temprano de diferenciación celular, en la gráfica podemos observar que su expresión aumenta a partir del día 3 alcanzando su máxima expresión a los 14 días con medio osteogénico y a los 21 días con medio normal, lo que podría ser un incativo de la influencia de la nanotopografía y que el medio osteogénico es capaz de acelerar el proceso, pese que el aumento en el porcentaje sólo es significativo contra el control en las muestras sintetizadas a 600° C en el día 5 y 14 con medio osteogénico, el 80% de los resultados presentan valores  $\geq 100\%$ , y a los 21 días se observa un descenso en todos los grupos experimentales con medio osteogénico.

En la gráfica (Figura 30) podemos observar que los mejores resultados se obtuvieron en las muestras sintetizadas a 600°C, se observa un resultado significativo respecto al control a los 5 y 14 días con medio osteogénico (Ver tabla 10 en el anexo), lo cual sugiere un inicio temprano de la diferenciación celular y el mantenimiento del genotipo osteogénico.

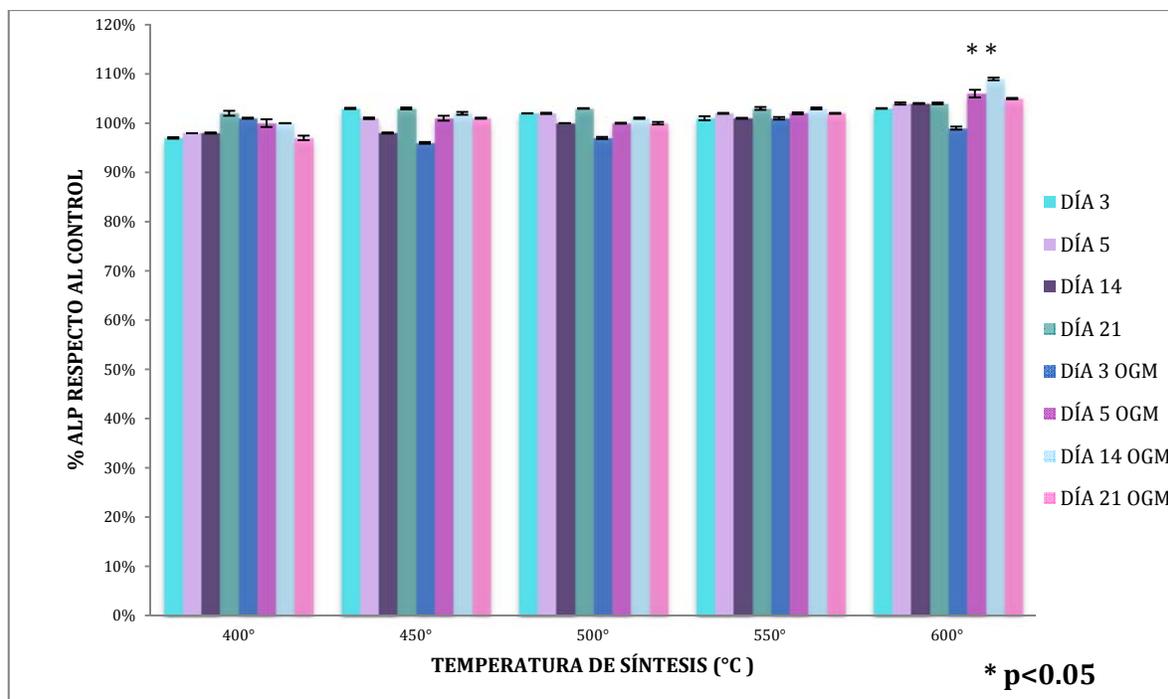


Figura 30. Porcentaje de expresión de fosfatasa alcalina de las células osteoblásticas cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$ , durante 3, 5, 14 y 21 días con medio normal y con medio osteogénico.

### 7.1.8 Caracterización del material mineral

La caracterización del tejido mineral se llevó a cabo mediante la técnica histoquímica de alizarina roja, que permite la identificación de depósitos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Nuestros resultados indican que la nanotopografía juega un papel importante ya que aun sin presencia de medio inductor los osteoblastos fueron capaces de depositar material mineral como podemos observar en la (Figura 31 incisos A y C). Sin embargo es evidente que el medio osteogénico incrementa el deposito de nódulos de tejido mineral (Figura 31 inciso B y D). Esta técnica permite el análisis cualitativo para poder obtener imágenes que son representativas de la detección de depósitos de clacio y al mismo tiempo poder ser una técnica cuantitativa al extraerse el colorante unido fuertemente al calcio y con ello poder determinar y cuantificar el material mineral depositado por los osteoblastos durante el transcurso del cultivo celular.

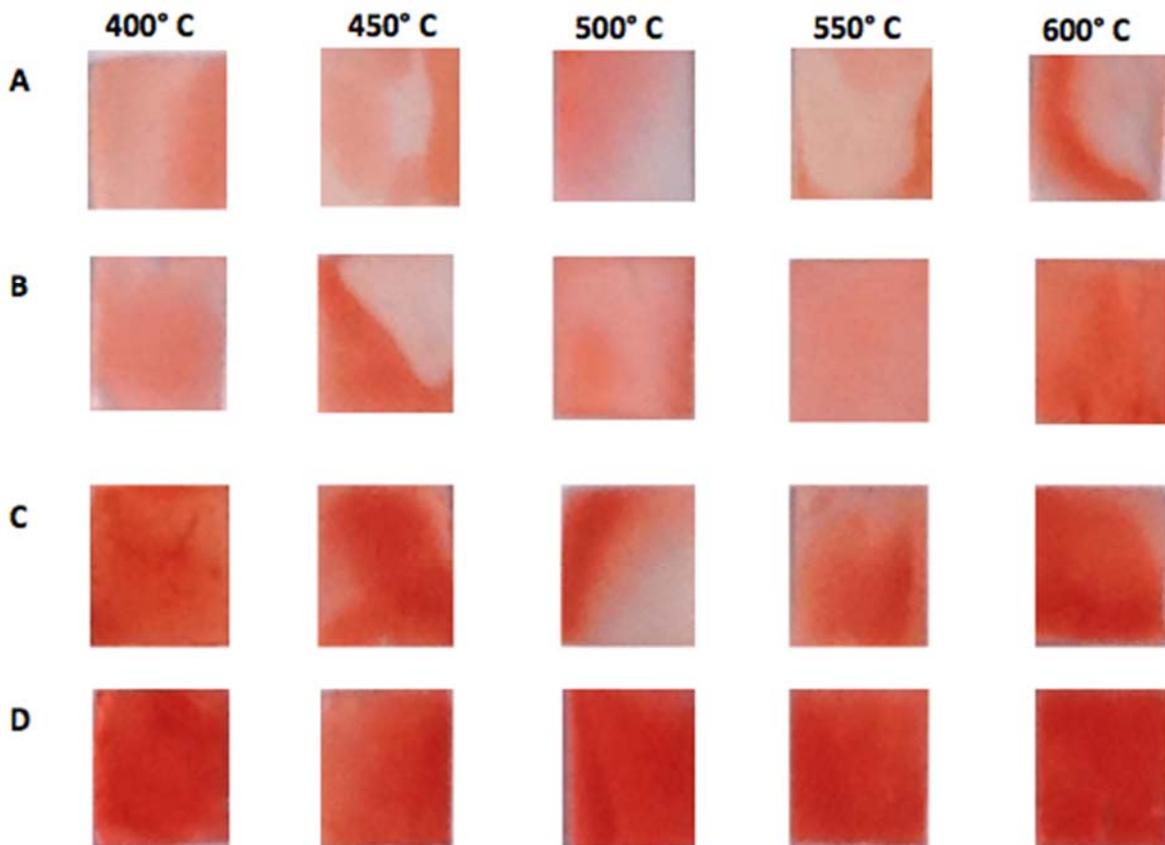
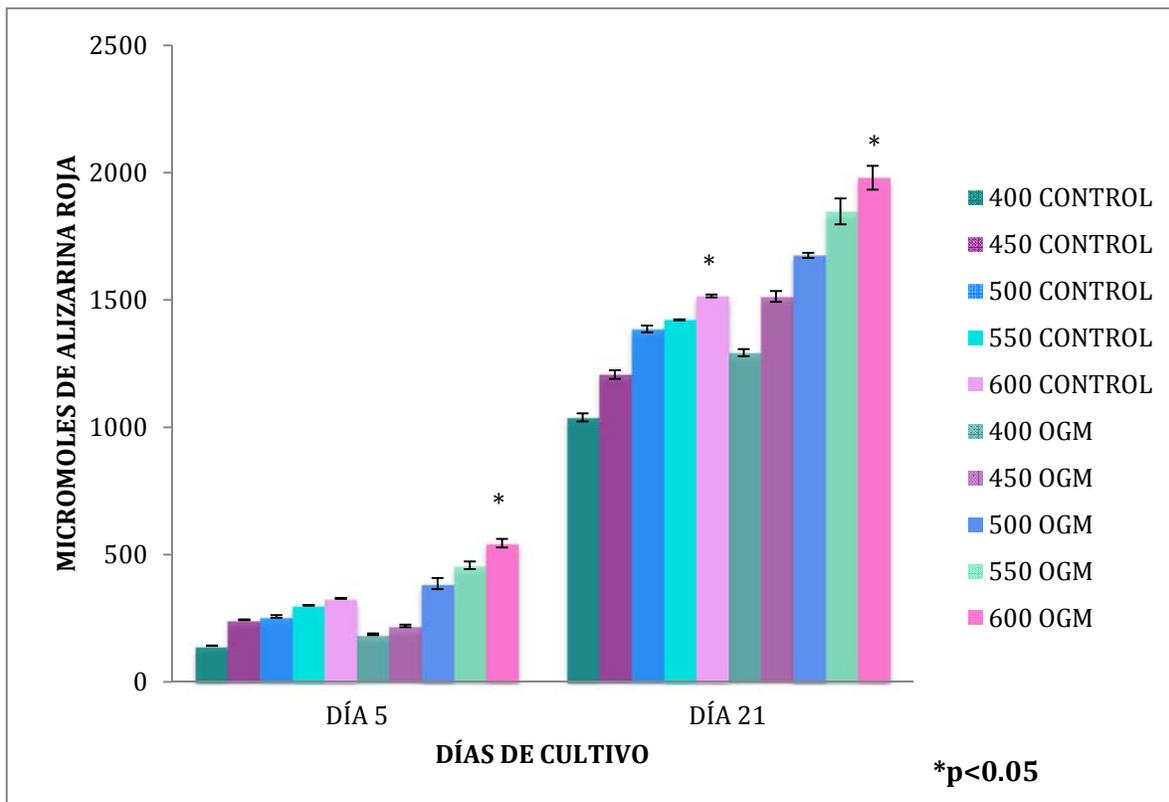


Figura 31. Fotografías de muestras de  $\text{Mg}_2\text{AlO}_4$  donde se cultivaron osteoblastos humanos y posteriormente se realizó la tinción de Alizarina roja S. A) Resultado a 5 días con medio normal, B) 5 días con medio osteogénico, C) 21 días con medio normal y D) 21 días con medio osteogénico.

La gráfica de la cuantificación de alizarina roja nos indica que existe una correlación con los valores obtenidos de la deposición de matriz extracelular mineralizada con las imágenes de microscopía óptica. Como se muestra en la (Figura 32) el contenido de de nódulos mineralizados que son teñidos por la alizarina roja S reveló una mayor cantidad de calcio en los cultivos experimentales en todas las cerámicas de aluminato de magnesio con respecto a los cultivo control. Sin embargo estos datos aportan información importante ya que las cerámicas al estar en contacto con las células pueden tener un carácter osteoinductor y osteoconductor debido a los valores obtenidos.

Podemos observar el aumento de micromoles de Alizarina Roja S. dependiente del tiempo y la influencia del medio osteogénico en el aumento de depósitos de calcio, obtuvimos resultados significativos para las muestras sintetizadas a 600° C a 5 días con medio osteogénico y a 21 días con medio control y osteogénico (Ver tabla 11 en anexo).



**Figura 32. Micromoles de alizarina roja, los cuales están asociados a depósitos de calcio formados por las células osteoblásticas cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas de Mg<sub>2</sub>AlO<sub>4</sub>, durante 5 y 21 días con medio normal y con medio osteogénico.**

## CAPÍTULO 8.

### DISCUSIÓN

Los objetivos de este proyecto fueron sintetizar cerámicas de  $Mg_2AlO_4$  a distintas temperaturas con el fin de obtener diferentes topografías superficiales y evaluar las respuestas biológicas y morfológicas de los osteoblastos *in vitro*, estas investigaciones son indispensables para determinar las propiedades físicas y químicas más favorables de un material, así como también obtener una aproximación de la posible respuesta de estos materiales en contacto con tejidos del huésped.

La técnica de rocío pirolítico permitió exitosamente la obtención de 5 diferentes nanotopografías superficiales que logramos clasificar como rugosas y mixtas<sup>11,107,112,113</sup>; esto de acuerdo a los parámetros de topografía superficial que fueron propuestos por varios autores inicialmente en implantes de titanio<sup>14,25,49,108</sup>.

Las técnicas de caracterización de las cerámicas de  $Mg_2AlO_4$  permitieron identificar aglomerados de morfología vermicular, partículas cuasiesféricas y romboédricas lo cual, coincide con lo reportado en estudios previos<sup>136,137,142</sup>, el tamaño micrométrico de los aglomerados contrasta con los experimentos realizados por Wang<sup>142,152</sup>, donde se utilizó una proporción Mg/Al de 3:1 y se obtuvieron cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  con un alto grado de cristalinidad en todas sus fases<sup>142,152</sup>.

La desigualdad de resultados se atribuye a una relación no estequiométrica entre Mg/Al, ya que en este estudio se utilizó una proporción 1:2 de Mg/Al; lo que provocó un proceso más lento de nucleación; lo anterior se relaciona con que se ha reportado que una mayor proporción de aluminio retarda el grado de saturación necesario para la nucleación<sup>137</sup>, esto también generó un cambio en las reflexiones características; ya que obtuvimos reflexiones anchas y de menor intensidad lo cual Nebot<sup>136</sup> y Martínez<sup>137</sup> lo han asociado con disminución en la cristalización de la fase y por lo tanto con la obtención de un material con mayor grado de amorficidad. Lo que hace evidente que las condiciones experimentales y el método de síntesis influyeron en las propiedades nanotopográficas superficiales y de composición química de las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$ .

De acuerdo con el análisis realizado por Swihart<sup>153</sup>, la técnica de rocío pirolítico presenta versatilidad y múltiples ventajas frente a otras técnicas para la obtención de nanopartículas mediante métodos de vapor, entre las que se pueden destacar; la capacidad de obtener variabilidad de materiales con propiedades físicas y químicas, materiales multicomponentes con distribución homogénea y la capacidad de dopaje para mejorar sus propiedades; por lo tanto, todo lo anterior da la pauta para la producción de un biomaterial que represente una alternativa viable y costeable para la regeneración de tejido óseo.

Los procesos de interacción célula material son altamente dinámicos y dependen de diversos factores que afectan directamente la respuesta celular entre ellos se encuentran principalmente los que se relacionan con las propiedades superficiales del biomaterial como la rugosidad, composición química y energía superficial<sup>10,16,31,80,140,141,145</sup>.

Los osteoblastos humanos han sido un modelo celular ampliamente utilizado con éxito en estudios que buscan evaluar las propiedades superficiales de los materiales cerámicos en bioingeniería de tejido óseo<sup>1-4,6-22,130-132</sup>; mediante la información reportada por Van Kooten y Von Recum se determinaron los tiempos del ensayo de adhesión celular de 4 y 24 horas ya que en sus estudios identificaron que el tiempo óptimo para una fuerte adherencia celular al sustrato y formación de adhesiones focales es de 24 horas. Aunque el proceso inicial de adhesión se da en los primeros 30-60 minutos, después de este tiempo transcurrido las células no adheridas mueren; esto se debe a que los osteoblastos son células anclaje dependientes por lo que primero requieren adherirse a la superficie del biomaterial, para posteriormente generar una extensión de filopodios y lamelipodios para finalmente formar MEC y ser capaces de mineralizarla<sup>1,12-16</sup>.

Por lo tanto, numerosos estudios en condiciones *in vivo* e *in vitro* se han enfocado en la adhesión celular y en la interacción célula material; comparando diversas cerámicas con la misma composición química en fase convencional y en nanofase; se ha encontrado suficiente evidencia que sustenta que las cerámicas en nanofase aumentan la adhesión de osteoblastos y disminuyen la adhesión de fibroblastos, hallazgo que clínicamente han atribuido varios autores a una disminución en el porcentaje de fracaso por causas asépticas<sup>57,93,95,96,125</sup>.

En estudios previos a este con materiales en nanofase como alúmina, hidroxiapatita, titanio y aleaciones de titanio, se observó un aumento de hasta el 50% de adhesión de osteoblastos en materiales en nanofase respecto a las fases convencionales<sup>11</sup>, la variabilidad de lo reportado anteriormente respecto a los resultados obtenidos en este estudio pueden deberse a las considerables diferencias en cuanto a la naturaleza química de los materiales, el diseño experimental y su duración.

A pesar de que 4 de las 5 cerámicas que fueron analizadas presentan la misma composición química y que todas las cerámicas presentan una topografía superficial en rango nanométrico, existen diferencias evidentes respecto a la homogeneidad en el tamaño y la distribución de la rugosidad, estas diferencias se ven reflejadas en los resultados de adhesión celular, donde se observa un aumento significativo del 37% respecto al control en la fase espinela de aluminato de magnesio; la cual fue sintetizada a 600° C y que presenta mayor homogeneidad en el tamaño y distribución de la rugosidad, esto concuerda con resultados obtenidos anteriormente por diversos autores en biomateriales como alúmina, titanio, aleaciones de titanio y polímeros en los que se observó mejores resultados en superficies de rugosidad moderada y con un patrón repetitivo espacial y dimensionalmente<sup>8,11,14,16,43</sup>.

La mayor adhesión de las células osteoblásticas en la fase espinela de aluminato de magnesio también puede estar asociada a las propiedades químicas del biomaterial, ya que de acuerdo a lo reportado por Bodhak<sup>144</sup> la espinela de aluminato de magnesio presenta una mayor energía superficial que la fase hidrotalcita, lo que se traduce en mayor mojabilidad en la superficie del material que favorece la adsorción de proteínas de adhesión, estos mecanismos han sido ampliamente descritos por Anselme<sup>154</sup> y finalmente la adhesión de células osteoblásticas y la absorción de proteínas en la superficie del biomaterial están relacionadas con una exitosa osteointegración<sup>84-86</sup>.

La proliferación celular mostró resultados significativos respecto al control pero sin una tendencia hacia un grupo, este suceso se ha reportado anteriormente en diversos biomateriales, sin ser un parámetro determinante en su efectividad<sup>148-149</sup>, ya que aunque la proliferación se considera un método de cuantificar la eficacia de un biomaterial en la bioingeniería de tejidos, se han descrito tres etapas características en condiciones *in vitro*<sup>148</sup>, las cuales coinciden con los resultados reportados en la gráfica de proliferación celular.

Del día 1 al 5 se observa un aumento del número de células, que está asociado al proceso de expansión; en el cual se presenta una mayor tasa de división celular, aproximadamente a los 7 días comienza la fase de diferenciación celular, en esta fase disminuye la tasa de división celular, en este estudio se mantienen aproximadamente el mismo número de células hasta el día 14, con un ligero aumento hacia el día 21, donde se espera que las células se mantengan en su estado de diferenciación en la interfase<sup>148</sup>.

Se evaluó la morfología de las células osteoblásticas en contacto con las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$  con distinto tratamiento térmico; esto con el fin de identificar posibles cambios en la morfología celular asociados a las diferentes nanotopografías y a la composición química, debido a que se ha reportado que un aumento de nanorugosidades superficiales promedio de 13 a 100 nm con distribución homogénea y partículas esféricas facilita la unión de fibrina y otras proteínas de la MEC; lo cual se ve reflejado como un aumento de adhesiones focales, filipodios y lamelipodios<sup>100-113</sup>, éstas condiciones superficiales ideales de los biomateriales propuestas por diversos autores muestran mayor similitud con las muestras sintetizadas a 600° C.

Webster<sup>13,18,27</sup>, ha descrito anteriormente cambios en la morfología celular asociados a topografías lisas, mixtas y rugosas en alúmina y magnesio, mientras que Geiger<sup>96</sup> ha asociado la morfología celular con el grado de adhesión celular al sustrato y ambos coinciden con los resultados obtenidos durante este estudio; los osteoblastos en contacto con las muestras sintetizadas a 400° C presentan una morfología elongada; y menor grado de asociación con las partículas, estas características están relacionadas a una topografía lisa, los osteoblastos que se encuentran en contacto con las muestras sintetizadas a 450 y 500° C presentan

una estructura densa y un aumento en el número de filipodios que se ven claramente asociados a los aglomerados de partículas, estas características están asociadas a superficies de topografías mixtas, mientras que los osteoblastos que están en contacto con las muestras sintetizadas a 550 y 600° C presentan un cuerpo más compacto con actividad dorsal y filipodios muy densos asociados a los aglomerados de partículas y desmosomas que permiten la interacción célula-célula. Este último hallazgo Hansen<sup>113</sup> lo ha reportado como un indicativo de expresión de integrinas y biocompatibilidad, lo anterior coincide con que los mejores resultados de adhesión celular se obtuvieron con las muestras sintetizadas a 600° C.

Los resultados en la expresión de fosfatasa alcalina permitieron demostrar la influencia de las propiedades físicas y químicas superficiales en la diferenciación celular; puesto que observamos un incremento en la expresión de fosfatasa alcalina a los días 5 y 14; alcanzando la máxima expresión al día 14 estos resultados contrastan con los datos obtenidos por Storrie<sup>67</sup> en un recubrimiento para implantes de titanio de organoapatita de zinc; ya que en ese estudio se observa un incremento en la expresión a los días 4 y 8; alcanzando la máxima expresión al día 8; aunque estos resultados podrían sugerir que en aquel estudio se obtuvo un proceso de diferenciación más rápido; contrastando los diseños experimentales podemos atribuir las diferencias a que nosotros realizamos mediciones a los días 3,5,14 y 21, ya que Schwartz y Boyan<sup>14,108,143</sup> han identificado previamente 3 fases que coinciden con los días en que se realizaron mediciones en este estudio; de los 3-6 días comienza el proceso de diferenciación, de los 6-14 días se da la calcificación de la matriz y a partir de los 21 días comienza el proceso de remodelación ósea; mientras que en el estudio de Storrie las mediciones se realizaron a los días 4,8,12,16,20 y 28 y las diferencias en los aparentes resultados tardíos puede deberse a que no realizamos una medición más cercana al día 7, que es el momento que Rice y otros autores han reportado la máxima expresión de fosfatasa alcalina, posterior a ese día se ha observado una disminución de hasta el 10%.

En este estudio obtuvimos resultados similares desde el día 3 hasta el día 21; lo anterior es una evidencia de que a partir de este momento inició de la diferenciación celular en todos los grupos, con medio inductor y sin medio inductor manteniendo los niveles de expresión hasta el día 21 con medio normal, lo cual es un indicador de la diferenciación celular y de el mantenimiento del fenotipo osteoblástico<sup>148</sup>. y con una ligera disminución en el grupo con medio osteogénico en el día 21, esta disminución la ha reportado previamente Hoemann<sup>150</sup> y está asociada a la presencia de dexametasona en el medio osteogénico, que es un glucocorticoide sintético, que se ha observado que en concentraciones de 100 nM es capaz de inducir la diferenciación hacia un linaje adipogénico después de 3 semanas de cultivo en condiciones *in vitro*<sup>150</sup>.

La capacidad de las células de producir una matriz mineralizada y nódulos de calcio es un factor clave para la regeneración ósea, la cual es dependiente de una buena adhesión al material o sustrato<sup>151</sup>, la técnica histoquímica de Alizarina Roja S. es un método estándar que ha sido utilizado durante décadas para caracterizar el potencial osteogénico de algunos linajes celulares, así como para evaluar los depósitos ricos en calcio de la matriz extracelular mineralizada por las células en cultivo.

Mediante esta técnica se identificaron los depósitos de calcio cualitativamente y cuantitativamente a través de una tinción roja y la extracción del colorante para determinar los micromoles de alizarina unidos a los nódulos de calcio sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $Mg_2AlO_4$ , estos resultados demuestran la capacidad de diferenciación y mineralización de los osteoblastos inducida por las propiedades superficiales del material, ya que estos fenómenos se presentan incluso en ausencia de medio inductor y este suceso coincide con lo que se ha reportado anteriormente en biomateriales bioactivos bajo condiciones *in vitro* como el biovidrio 45S5<sup>7</sup>, recubrimientos de Organoapatita de Zinc (ZnOA) sobre implantes de titanio<sup>67</sup> y compositos<sup>69</sup>.

Hansen<sup>113</sup> y Anselme<sup>8</sup> reportaron en estudios anteriores la importancia de la topografía superficial en el comportamiento celular, la señalización y diferenciación así como la relación de la composición química en la respuesta de las células osteoblásticas, principalmente en la modificación de un material bioinerte a uno bioactivo que se manifiesta con el depósito de una capa superficial en el biomaterial de hidroxiapatita<sup>7</sup>, la cual es rica en calcio, a pesar de que este estudio confirmar el depósito de iones calcio, no se realizó la caracterización química del material mineralizado.

De acuerdo a los resultados del estudio y en contraste con lo reportado anteriormente podemos observar una diversidad y complejidad en las variables a considerar previamente al diseño de un biomaterial. Las cerámicas nanoestructuradas bioactivas de  $Mg_2AlO_4$  son materiales prometedores en la biongeniería de tejido óseo debido a toda la información anteriormente descrita que aporta sustento acerca de sus propiedades físicas, químicas, biológicas y que pueden ser sintetizadas como una película delgada, podrían utilizarse como recubrimiento en implantes dentales y ortopédicos; principalmente en titanio y alúmina que son los materiales actualmente más empleados en implantología; los cuales presentan algunas deficiencias relacionadas a sus propiedades superficiales que podrían ser resueltas mediante un recubrimiento como el de  $Mg_2AlO_4$ .

## **CAPÍTULO 9.**

### **CONCLUSIONES**

1. Se logro la síntesis y caracterización de cerámicas nanoestructuradas de aluminato de magnesio  $Mg_2AlO_4$ .
2. Las cerámicas sintetizadas mostraron que la topografía es dependiente de la temperatura de depósito.
3. El análisis de la respuesta de biocompatibilidad de las células osteoblásticas en contacto con las cerámicas nanoestructuradas no mostró indicios de citotoxicidad.
4. La adhesión celular confirma que es un proceso dependiente de la topografía del material; ya que los mejores resultados se obtuvieron en las cerámicas sintetizadas a  $600^\circ C$ , las cuales presentan una rugosidad moderada de 33.6 nm y con un patrón repetitivo.
5. Los resultados del análisis de la proliferación nos indican que la nanopografía superficial y la composición química poseen una influencia positiva en la proliferación celular; debido a que se logró la misma tasa de proliferación en ausencia de un medio de cultivo inductor.
6. Los ensayos de la bioactividad celular mediante la enzima fosfatasa alcalina y la tinción de alizarina roja confirman la influencia de la nanotopografía en la respuesta de diferenciación de los osteoblastos debido a que en los ensayos de fosfatasa alcalina obtuvimos resultados similares para todos los grupos; así como una expresión temprana de altos niveles de fosfatasa alcalina a partir del día 3 y pudimos determinar que la máxima expresión se dio al día 14, mientras que en los ensayos de alizarina roja al día 21 pudimos observar resultados significativos en las cerámicas sintetizadas a  $600^\circ C$  respecto a las otras muestras con medio de cultivo inductor y en ausencia de medio inductor.
7. La técnica de rocío pirolítico es una técnica costeable y reproducible con aplicación prometedora en la regeneración tisular ósea; ya que representa una buena opción para la obtención de recubrimientos bioactivos para implantes que presentan adecuadas propiedades físicas y mecánicas pero poseen deficiencias asociadas a sus propiedades superficiales.

## REFERENCIAS

1. Schroeder, Josh E., and Rami Mosheiff. Tissue engineering approaches for bone repair: concepts and evidence. *Injury* 42.6, 2011: 609-613.
2. Vitale-Brovarone, Chiara, et al. Development of glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation. *Acta Biomaterialia* 3.2, 2007: 199-208.
3. Keller, John C., et al. In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials. *Dental Materials* 13.1, 1997: 62-68.
4. Burg, Karen JL, Scott Porter, and James F. Kellam. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21.23, 2000: 2347-2359.
5. Williams, David F. On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30.30, 2009: 5897-5909.
6. Best, S. M., et al. Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society* 28.7,2008: 1319-1327.
7. Tsigkou, Olga, et al. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass® conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* 30.21, 2009: 3542-3550.
8. Anselme, K., et al. The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 21.15,2000: 1567-1577.
9. Alvarez-Pérez, Marco Antonio, et al. In vitro studies of osteoblasts response onto zinc aluminate ceramic films. *Materials Research* 12.4, 2009: 509-515.
10. Rice, J. M., Hunt, J. A., Gallagher, J. A., Hanarp, P., Sutherland, D. S., & Gold, J. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model in vitro. *Biomaterials*, 24.26, 2003: 4799-4818.
11. Gutwein, Luke G., and Thomas J. Webster. Increased viable osteoblast density in the presence of nanophase compared to conventional alumina and titania particles. *Biomaterials* 25.18, 2004: 4175-4183.
12. Lenhert, S., Meier, M. B., Meyer, U., Chi, L., & Wiesmann, H. P. Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir–Blodgett lithography. *Biomaterials*, 26.5, 2005: 563-570.

13. Webster, Thomas J., Elaine L. Hellenmeyer, and Rachel L. Price. Increased osteoblast functions on theta+ delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 26.9, 2005: 953-960.
14. Lincks, J., Boyan, B. D., Blanchard, C. R., Lohmann, C. H., Liu, Y., Cochran, D. L., ... & Schwartz, Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19.23, 1998: 2219-2232.
15. Brunski, John B., David A. Puleo, and Antonio Nanci. "Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments." *The International journal of oral & maxillofacial implants* 15.1, 1999: 15-46.
16. Dalby, M. J., Di Silvio, L., Davies, G. W., & Bonfield, W. Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11.12, 2000: 805-810.
17. Stevens, Molly M., and Julian H. George. Exploring and engineering the cell surface interface." *Science* 310.5751, 2005: 1135-1138.
18. Liu, Huinan, and Thomas Jay Webster. Nanomedicine for implants: a review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 28.2, 2007: 354-369.
19. Wang, J. H., Yao, C. H., Chuang, W. Y., & Young, T. H. Development of biodegradable polyesterurethane membranes with different surface morphologies for the culture of osteoblasts. *Journal of biomedical materials research*, 51.4, 2000: 761-770.
20. Liu, Y., Cooper, P. R., Barralet, J. E., & Shelton, R. M. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 28.7, 2007: 1393-1403.
21. Pandey, Ajoy Kumar, et al. In vitro evaluation of osteoconductivity and cellular response of zirconia and alumina based ceramics. *Materials Science and Engineering: C* 33.7, 2013: 3923-3930.
22. Zhang, E., Xu, L., Yu, G., Pan, F., & Yang, K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 90.3, 2009: 882-893.

23. Chen, Z., Mao, X., Tan, L., Friis, T., Wu, C., Crawford, R., & Xiao, Y. Osteoimmunomodulatory properties of magnesium scaffolds coated with  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 35.30, 2014: 8553-8565.
24. Patel, M. K., Ali, M. A., Zafaryab, M., Agrawal, V. V., Rizvi, M. M. A., Ansari, Z. A., & Malhotra, B. D. Biocompatible nanostructured magnesium oxide-chitosan platform for genosensing application. *Biosensors and Bioelectronics*, 45, 2013:181-188.
25. Shin, H. J., Park, C. J., Lee, H. S., & Jeong, Y. S. Initial response of osteoblast-like cells on magnesium ion implanted titanium surface. *조직공학과 재생의□*, 7.3, 2010:330-337.
26. Silva, Ivo Ribeiro da, et al. "Protective effect of divalent cations against aluminum toxicity in soybean." *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32.5, 2008: 2061-2071.
27. Weng, Lucy, and Thomas J. Webster. Nanostructured magnesium increases bone cell density. *Nanotechnology* 23.48, 2012: 485105.
28. Saberi, A., Golestani-Fard, F., Sarpoolaky, H., Willert-Porada, M., Gerdes, T., & Simon, R. Chemical synthesis of nanocrystalline magnesium aluminate spinel via nitrate–citrate combustion route. *Journal of Alloys and Compounds*, 462.1, 2008: 142-146.
29. Keaveny T, Morgan E, and Yeh O, Bone Mechanics, in *Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design*, 1st ed., McGraw-Hill, 2002, Chapter 8.
30. Barreré F., Van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine* 2006; 1: 317-320.
31. Salinas A. J., Esbrit P. and Vallet-Regi M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair *Biomater. Sci.*, 2013; 1, 40–51.
32. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3: S131–9.
33. Carreira A.C, Lojudice F.H., Halcsik E., Navarro R.D., Sogayar M.C., Granjeiro J.M. Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives *J. Dent. Res.* 2014, 93: 335–345
34. Meyer U, Büchter A, Wiesmann H, Joos U, Jones D. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cells Mater* 2005: 9: 39–49

35. Gong, J. K., Arnold, J. S., and Cohn, S. H. 1964, Composition of trabecular and cortical bone, *Anat. Rec.* 1964;149:325–332.
36. Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ. Bone mineral: an update on chemical composition and structure. *Osteoporos Int* 2009;20:1013–1021.
37. Carter DR, Orr TE. Skeletal development and bone functional adaption. *J Bone Miner Res* 1992;7:389S–395S.
38. Meyer U, Joos U, Wiesmann HP. Biological and biophysical principles in extra corporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:323-333.
39. Sáenz A, Brostow W, Rivera E, Castaño VM. Ceramic biomaterials: an introductory overview. *J Mater Ed* 1999;21(5/6):267–276.
40. Hing KA. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? *Philos Transact A Math Phys Eng Sci.* 2004;362:2821–50.
41. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224:1329–43.
42. Bonewald, L. F. Generation and function of osteocyte dendritic processes. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2005; 5:321-324.
43. Dalby, M. J.; Riehle, M. O.; Johnstone, H. J.; Affrossman, S.; Curtis, A. S. Polymer-Demixed Nanotopography: Control of Fibroblast Spreading and Proliferation *Tissue Eng.* 2002, 8, 1099– 1108
44. Meyer U, Kruse-Losler B, Wiesmann HP Principles of bone formation driven by biophysical forces in craniofacial surgery. *Brit J Oral Max Surg* 2006; 44: 289–295.
45. Fernyhough JC, Schimandle JJ, Weigel MC. Chronic donor site pain complicating bone graft harvesting from the posterior iliac crest for spinal fusion. *Spine* 1992; 17: 1474–80.
46. Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L. & Greengield, M. L. V. H. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin. Orthop.* 1997; 339, 76–81.
47. Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell JA. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface* 2008;5:1137–58.

48. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(3):454–464.
49. Ducheyne, P., Radin, S. & Heughbaert, C. Calcium phosphate ceramic coating on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution. *Biomaterials* 1990;11, 244–254.
50. Giannoudis P, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 Suppl 3: S20–7.
51. Song, Y., Ju, Y., Morita, Y., & Song, G. Effect of the nanostructure of porous alumina on growth behavior of MG63 osteoblast-like cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013;116:4, 509–515.
52. Lanza R P, Langer R S, Chick W L. *Principles of Tissue Engineering.* Academic, Austin, TX 3rd Edition. Elsevier 2004.
53. Williams, D. F. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery. *Sadhana*, 2003; 28(3-4), 563-574.
54. Oladeji.O. Ige, L.E. Umoru, S. Aribo, Natural products: a minefield of biomaterials, *ISRN Mater. Sci.* (2012) 1–20.
55. Hermawan, H., Ramdan, D., & Djuansjah, J. R.. *Metals for biomedical applications.* INTECH Open Access Publisher 2011;411-430.
56. Punt I.M, Visser V.M, van Rhijn L.W, Kurtz S.M, Antonis J, Schurink G.W.H, van Ooij A 2008 Complications and reoperations of the SB Charité lumbar disc prosthesis: experience in 75 patients. *Eur. Spine J.* 17, 36–43.
57. Kao WJ, Hubbell JA, Anderson JM. Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: a model for modulating cell behavior. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine.* 1999;10:601–605.
58. de Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. *Biomaterials* 1980;1:47–50.
59. El Gannham A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Exp. Rev. Med. Dev.* 2005. 2, 87–101.
60. Jarcho M, Bolen C.H, Thomas M.B, Bobick J, Kay J.F, Doremus R.H 1976 Hydroxylapatite synthesis and characterization in dense polycrystalline form. *J. Mater. Sci.* 11, 2027–2035.

61. Alkao M, Aoki H, Kato K 1981 Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prosthetic applications. *J. Mater. Sci.* 1976;16, 809.
62. Vogel M, Voigt C, Gross U, Müller-Mai C. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials.* 2001;22, 357–362.
63. Hench L. , Polak J. M. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002; 295, 1014-1017.
64. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2005; 26, 3587–3596.
65. Ginebra M.P, Traykova T, Planell J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J. Control. Release.* 2006; 113, 102–110
66. Peroglio M, Gremillard L, Chevalier J, Chazeau L, Gauthier C, Hamaide T 2007 Toughening of bio-ceramics scaffolds by polymer coating. *J. Eur. Ceram. Soc.* 27, 2679–2685
67. Storrie H, Stupp SI. Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization *Biomaterials.* 2005;26:5492-5499.
68. Kim HM. Bioactive ceramics: challenges and perspectives. *J Ceram Soc Jpn* 2001;109:S49–57.
69. Tanner, K. E. Bioactive composites for bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers Part H-Journal of Engineering in Medicine*, 2010;224:12:1359-1372.
70. Parida P., Behera A. and Mishra S. C. Classification of Biomaterials used in Medicine, *Inter. Journal of Advances in Applied Sciences.* 2012;1:3: 31-35.
71. Brunski J B, Puleo D A and Nanci A. Biomaterials and Biomechanics of Oral Maxillofacial Implants: Current Status and Future Developments *Int. J. Oral Maxillofac Implants.* 2000;15:1:15-46.
72. Liu, X., Ma, L., Mao, Z., & Gao, C. Chitosan-based biomaterials for tissue repair and regeneration. In *Chitosan for Biomaterials II.* Springer Berlin Heidelberg. 2011, 81-127.
73. Burg KJL, Porters S, Kellam J. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2000;21: 2347-2359.
74. Urist MR, Silverman MF, Buring K, Dubuc FL, Rosenberg JM. The bone induction principle. *Clin Orthop Rel Res* 1967;53:243-283.

75. Urist MR, Strates BS. Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 1971;50:1392-406.
76. Urist MR. The search for and discovery of bone morphogenetic protein. In: Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG, editors. *Bone grafts, derivatives and substitutes*. 1994;315-362.
77. Bostrom RD, Mikos AG. Tissue engineering of bone. In: Atala A, Mooney D, Vacanti JP, Langer R, editors. *Synthetic biodegradable polymer scaffolds*. Boston: Birkhauser, 1997: 215-234.
78. Chiara G., Letizia F., Lorenzo F., Edoardo S., Diego S., Stefano S., Erierto B., Barbara Z. Nanostructured biomaterials for tissue engineered bone tissue reconstruction. *Int. J. Mol. Sci.*: 2012; 13: 737–757.
79. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extra corporal bone tissue engineering. Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33:523–30.
80. Lamers E., van Horssen R., te Riet J., van Delft F. C., Luttge R., Walboomers X. F., Jansen J. A. The influence of nanoscale topographical cues on initial osteoblast morphology and migration. *Eur. Cell Mater.* 2010; 20, 329–343.
81. A. Rezanian, and K.E. Healy, The Effect of Peptide Surface Density on the Kinetics of Mineralization of the Matrix Synthesized by Osteogenic Cells, *J. Biomedical Materials Res.* 2000;52, 595-600.
82. Meyer U, Meyer T, Jones DB. Attachment kinetics, proliferation rates and vinculin assembly of bovine osteoblasts cultured on different pre-coated artificial substrates. *J Mat Sci: Mat Med* 1998;9: 301-307.
83. Moursi AM, Globus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Sci* 110: 1997;2187-2196.
84. Meyer, U., U. Joos, and H. P. Wiesmann. "Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering: Part I." *International journal of oral and maxillofacial surgery* 33.4;2004: 325-332.
85. Drosse I, Wolkmen E, .Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach. *Injury* 39: 2008;S9–S20.
86. Capanna R., Campanacci D.A., De Biase P., Cuomo P., and Lorenzoni A. Bone-derived growth factors. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2010; 7:3:193.

87. Vo, Tiffany N., F. Kurtis Kasper, and Antonios G. Mikos. "Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration." *Advanced drug delivery reviews* 64.12;2012:1292-1309.
88. Miron, Richard J., et al. "Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts." *Clinical implant dentistry and related research* 15.4;2013:481-489.
89. Mark Fisher, Daniel, et al. "Preclinical and clinical studies on the use of growth factors for bone repair: a systematic review." *Current stem cell research & therapy* 8.3;2013:260-268.
90. Champagne C. M., Takebe J., Offenbacher S. And Cooper L. F., Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2 *Bone*, 2002, 30, 26.
91. Lehmann W., Edgar C. M., Wang K., Cho T. J., Barnes G. L., Kakar S., Graves D. T., Rueger J. M., Gerstenfeld L. C. and Einhorn T. A., Tumor necrosis factor  $\alpha$  coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases and angiogenic factors during fracture healing *Bone*, 2005, 36, 300.
92. Mendonça, G., Mendonça D., Simões L., Araújo E. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials* 2009;30, 4053–4062
93. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692: 103-119
94. Arnold M, Cavalcanti-Adam EA, Glass R, Blummel J, Eck W, Kantlehner M, Kessler H, Spatz JP. Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem* 2004;5: 383-388.
95. Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys J.* 2007;92: 2964-2974.
96. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev* 2009;10: 21-33
97. Zhao, J. H., Reiske, H. and Guan, J. L. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* 1998;143,1997 -2008.
98. Ramazanoglu M, Oshida Y. Ilser Turkyilmaz. Osseointegration and Bioscience of Implant Surfaces - Current Concepts at Bone-Implant

- Interface, Implant Dentistry — A Rapidly Evolving Practice. 2011;658-4,53-82.
99. Heldin, C.H. & Westermark, B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological Reviews*, 1999;79,4,1283-1316.
  100. Martinez E, Engel E, Planell JA, Samitier J. Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Ann Anat*. 2009;191:1:126–35.
  101. Harrison, R.G. On the Stereotropism of embryonic cells. *Science* 1911; 34, 279–281.
  102. Weiss P, Garber B. Shape and movement of mesenchyme cells as functions of the physical structure of the medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1952; 38:264–80.
  103. Curtis A., Varde M. Control of cell behaviour: topological factors. *J Natl Cancer Inst* 1964;33: 15-26
  104. Chen Y., Pépin A. Nanofabrication: conventional and non conventional methods. *Electrophoresis* 2001;22:187–207.
  105. Hasirci V., Kenar, H. Novel surface patterning approaches for tissue engineering and their effect on cell behavior. *Nanomedicine* 2006;1,73–90.
  106. Wojciak-Stothard, Madeja Z., Korohoda W., Curtis, A., Wilkinson C. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata. Topographical control of cell behavior. *Cell Biol. Int.* 1995;19,485–490.
  107. Flemming R.G., Murphy, C.J., Abrams, G.A., Goodman, S.L., Nealey, P.F. Effects of synthetic micro and nanostructured surfaces on cell behaviour. *Biomaterials*, 1999; 20,573–588.
  108. Keselowsky B.G., Wang, L., Schwartz, Z., Garcia, A.J., Boyan, B.D. Integrin  $\alpha 5$  controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner. *J. Biomed. Mater. Res.* 2007;A80A:3,700–710.
  109. Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276,1425–1428.
  110. Bruinink A., Wintermantel E. Grooves affect primary bone marrow but not osteoblastic MC3T3-E1 cell cultures. *Biomaterials* 2001;22,2465–2473.

111. Watt F.M., Jordan P.W., O'Neill C.H., .Cell shape controls terminal differentiation on human epidermal keratinocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1988;85, 5576–5580.
112. Yim FKE, Pang WS and Leong KW. Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage. Experimental Cell Research. 2007; 313:9:1820-1829.
113. Hansen JC, Lim JY, Xu LC, Siedlecki CA, Mauger DT, Donahue HJ. Effect of surface nanoscale topography on elastic modulus of individual osteoblasts cells as determined by atomic force microscopy J Biomech. 2007;40:2865.
114. Ehrenfest Dohan D.M., Coelho P.G., Kang B.S., Sul Y.T., Albrektsson T. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. Trends Biotechnol. 2010;28(4), 198-206.
115. Overney René. Nanothermodynamics and Nanoparticle Synthesis. [http://courses.washington.edu/overney/NME498\\_Material/NME498\\_Lectures/Lecture4-Overney-NP-Synthesis.pdf](http://courses.washington.edu/overney/NME498_Material/NME498_Lectures/Lecture4-Overney-NP-Synthesis.pdf)
116. Milosevic O., Mancic L., Rabanal M.E., Gómez L., Torralba J.M. Nanoscale particle processing through aerosol routes Characterization and control of interfaces for high quality advanced materials II, Ceramic Transactions 2007;198:345-352.
117. Messing G., Zhang S.Ch., Jayanthi G. Ceramic powder synthesis by spray pyrolysis. Journal of American Ceramic Society 1993;76:11:2707-2726.
118. Gurav A., Kodas T., Pluym T., Xiong Yun. Aerosol processing of Materials. Aerosol Science and Technology 1993;19: 411-452.
119. Saravanan P., Gopalan R., Chandrasekaran V. Synthesis and Characterisation of Nanomaterials Def. Sci. J. 2008; 58:504-516.
120. Rao CNR, Biswas K. Characterization of Nanomaterials by Physical Methods Annu Rev Anal Chem. 2009;2:435
121. YinY., Rioux R. M, Erdonmez C., Hughes S., Somorjai G. A., Alivisatos A. P., Colloidal nanocrystal synthesis and the organic–inorganic interface Science 2004; 304: 644-711.
122. Lim J.Y., Hansen J.C., Siedlecki C.A., Hengstebeck R.W., Cheng J., Winograd N., Donahue H.J. Cell sensing and response to micro-and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning Biomacromolecules. 2005; 6:1879-1890.

123. Webster T.J., Hellenmeyer E., Price R. Increased osteoblast functions on theta+delta nanofiber alumina. *Int. J. Nanomed.* 2005;26:953–960.
124. Venugopal J, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008;84:34–48.
125. Maheshwari G., Brown G, Lauffenburger D. A., Wells A., Griffith L. G, J. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *Cell Sci.* 2000;113:1677
126. Zamir, E., Katz, B.-Z., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B. and Kam, Z. Molecular diversity of cell-matrix interactions. *J. Cell Sci.* 1999;112, 1655-1669.
127. Dunlevy, J. R. and Couchman, J. R. (). Controlled induction of focal adhesion disassembly and migration in primary fibroblasts. *J. Cell Sci.* 1993;105,489-500.
128. Angers-Loustau, A., Cote, J.-F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L. A. and Tremblay, M. L. Protein tyrosine phosphorylation-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *J.Cell Biol.* 1999;144, 1019-1031.
129. Rude RK, Singer FR, Gruber HE. Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency. *J. Am. Coll. Nutr.* 2009; 28:131Y41.
130. Qi G, Zhang S, Khor KA, Lye SW, Zeng X, Weng W, Liu C, Venkatraman SS, Ma L. Osteoblastic cell response on magnesium-incorporated apatite coatings. *Appl Surf Sci.* 2008;255:304–307.
131. Sader M, LeGeros R, Soares G. Human osteoblasts adhesion and proliferation on magnesium-substituted tricalcium phosphate dense tablets. *J Mater Sci Mater Med.* 2009;20:521–7.
132. Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 2002;60:420–33.
133. Moya JS, Tomsia AP, Pazo A, Santos C, Guitian F. In vitro formation of hydroxylapatite layer in a MgO-containing glass. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:529–32.

134. Oliveira JM, Correia RN, Fernandes MHV. Formation of convoluted silica precipitates during amorphous phase separation in the  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{SiO}_2$ - $\text{MgO}$  system. *JAm Ceram Soc* 2000;83:5:1296-1298.
135. Bertazzo S, Zambuzzi WF, da Silva HA, Ferreira CV, Bertran CA. 2009. Bioactivation of alumina by surface modification: A possibility for improving the applicability of alumina in bone and oral repair. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:288-293
136. Nebot D. I., Rives V., Rocha J., Carda J. B., Estudio de la descomposición térmica de compuestos tipo hidrotalcita. *Boletín de la sociedad española de cerámica y vidrio*. 2002;41: 411-414.
137. Martínez, D. R., Carbajal G. G. 2012. Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. *Avances en Química*2012; 7:1: 87-99.
138. Khattab R., Wahsh M. M., Khalil N. M., Gouraud F., Huger M., Chotard T. Effect of Nanospinel Additions on the Sintering of Magnesia-Zirconia Ceramic Composites. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014; 6, 3320-3324.
139. Choy J., Kwak S., Park S., Jeong Y. Cellular uptake behavior of  $\gamma$ -32P labeled ATP-LDH nanohybrids. *J. Mater. Chem.* 2001;11:1671-1674.
140. Stratakis, E., A. Ranella, and C. Fotakis. Biomimetic micro/nanostructured functional surfaces for microfluidic and tissue engineering applications. *Biomicrofluidics* 5.1,2011: 013411.
141. Meyer, U., Buchter, A., Wiesmann, H. P., Joos, U., & Jones, D. B. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cell Mater*, 9, 2005:39-49.
142. Oh, Jae-Min, Sung-Ho Hwang, and Jin-Ho Choy. "The effect of synthetic conditions on tailoring the size of hydroxycalcite particles." *Solid State Ionics* 151.1,2002: 285-291.
143. Zhao, G., Raines, A. L., Wieland, M., Schwartz, Z., & Boyan, B. D. Requirement for both micron-and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*, 28.18, 2007: 2821-2829.
144. Bodhak, S., Balla, V. K., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Kashalikar, U., Jha, S. K., & Sastri, S. In vitro biological and tribological properties of transparent magnesium aluminate (Spinel) and aluminum oxynitride (ALON®). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 22.6, 2011: 1511-1519.

145. Radha, A. V., and Alex Navrotsky. Thermodynamics of carbonates. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 77.1, 2013: 73-121.
146. Webster, Thomas J., Richard W. Siegel, and Rena Bizios. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials* 20.13, 1999: 1221-1227.
147. Kinraide, Thomas B., and David R. Parker. Cation amelioration of aluminum toxicity in wheat. *Plant Physiology* 83.3, 1987: 546-551.
148. Strehl, R., Schumacher, K., de Vries, U., & Minuth, W. W. Proliferating cells versus differentiated cells in tissue engineering. *Tissue engineering*, 8.1, 2002: 37-42.
149. Mohamadreza B., Fathemeh B., Mojgan Z., Elham N., Elham Z., Comparison of proliferation and osteoblast differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells on nano- and micro-hydroxyapatite contained composite scaffolds. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8.4, 2010: 234-242.
150. Hoemann, C. D., H. El-Gabalawy, and M. D. McKee. "In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization." *Pathologie Biologie* 57.4, 2009: 318-323.
151. Vitale-Brovarone, Chiara, et al. "Development of glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering: characterisation, proliferation of human osteoblasts and nodule formation." *Acta Biomaterialia* 3.2; 2007: 199-208.
152. Wang, R. T., Liang, X. P., Peng, Y., Fan, X. W., & Li, J. X. (2009, December). Effect of the reaction temperature on nanocrystallites MgAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel ceramic precursor. In *J. Ceram. Proc. Res* (Vol. 10, pp. 780-782).
153. Swihart, M. T. Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2003: 8(1), 127-133.
154. Anselme, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 21.7 2000: 667-681.
155. Jones, Julian R. Observing cell response to biomaterials. *Materials Today* 9.12, 2006: 34-43.
156. Kooten, T. G. V., & Recum, A. F. V. Cell adhesion to textured silicone surfaces: the influence of time of adhesion and texture on focal contact and fibronectin fibril formation. *Tissue engineering*, 5(3), 1999: 223-240.

## ANEXO

**Tabla 8. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR**

TIEMPO	VALOR DE P
<b>4 horas</b>	
Control Vs 600° C	>0.99 ns
400 Vs 600° C	< .001
450 Vs 600° C	< .001
500 Vs 600° C	< .0001
550 Vs 600° C	.071
<b>24 horas</b>	
Control Vs 600° C	.004
400 Vs 600° C	.008
450 Vs 600° C	.020
500 Vs 600° C	.023
550 Vs 600° C	>0.99 ns

**Tabla 9. RESULTADOS ESTADÍSTICOS DEL ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

MEDIO	MUESTRA	DÍA	VALOR DE P
NORMAL	400° C	21	< 0.001
NORMAL	450° C	21	< 0.001
NORMAL	500° C	21	< 0.001
NORMAL	550° C	21	< 0.001
NORMAL	600° C	21	< 0.001
OGM	450° C	1	0.041
OGM	500° C	3	0.001
OGM	550° C	3	0.011
OGM	450° C	5	< 0.001
OGM	500° C	5	0.001
OGM	600° C	5	< 0.001
OGM	400° C	14	< 0.001
OGM	450° C	14	< 0.001
OGM	500° C	14	< 0.001
OGM	550° C	14	< 0.001
OGM	600° C	14	< 0.001
OGM	400° C	21	< 0.001
OGM	450° C	21	< 0.001
OGM	500° C	21	< 0.001
OGM	550° C	21	< 0.001
OGM	600° C	21	< 0.001

**Tabla 10. RESULTADOS ESTADÍSTICOS EN ENSAYOS DE FOSFATASA ALCALINA**

MEDIO	MUESTRA	DÍA	VALOR DE P
OGM	600° C	5	.049
OGM	600° C	14	.047

**Tabla 11. RESULTADOS ESTADÍSTICOS EN ESAYOS DE ALIZARINA ROJA**

MEDIO	MUESTRA	DÍA	VALOR DE P
OGM	400 Vs 600° C	5	.039
OGM	450 Vs 600 ° C	5	.041
OGM	500 Vs 600 ° C	5	.044
OGM	550 Vs 600 ° C	5	.047
NORMAL	400 Vs 600° C	21	.031
NORMAL	450 Vs 600 ° C	21	.035
NORMAL	500 Vs 600 ° C	21	.038
NORMAL	550 Vs 600 ° C	21	.039
OGM	400 Vs 600° C	21	.017
OGM	450 Vs 600 ° C	21	.025
OGM	500 Vs 600 ° C	21	.035
OGM	550 Vs 600 ° C	21	.037