



TESIS DOCTORAL

OBTENCIÓN POR FREEZE CASTING DE COMPOSITES BIOACTIVOS PARA REGENERACIÓN ÓSEA

David Don López

INSTITUTO DE CERÁMICA DE GALICIA
PROGRAMA DE DOCTORAMIENTO EN
CIENCIA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2016





D. Francisco Guitián Rivera, director del Instituto de Cerámica de Galicia y profesor titular del departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidade de Santiago de Compostela.

D. Antoni Pawel Tomsia, US NIH member and Senior Scientist and Principal Investigator at the Material Science Division at the Lawrence Berkeley National Laboratory.

Certifican:

Que la presente tesis titulada "Obtención por *freeze casting* de composites bioactivos para regeneración ósea", realizada para aspirar al título de Doctor en Ingeniería Química por la Universidade de Santiago de Compostela por D. David Don López, con DNI 47.380.783-R, ha sido realizada en el Lawrence Berkeley National Laboratory (Berkeley, California, Estados Unidos) y en el Instituto de Cerámica de Galicia (Santiago de Compostela, Galicia, España) bajo nuestra dirección.

Considerando el trabajo de investigación realizado, autorizamos su lectura y defensa pública en la Universidade de Santiago de Compostela, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctoramiento y que no incurre en ninguna de las causas de abstención establecidas en la ley 30/1992.

Para que así conste, firmamos el presente certificado en Santiago de Compostela, junio de 2016.

Prof. Dr. F. Guitián Rivera

Prof. Dr. A. P. Tomsia



Dedicatoria

Esta investigación se la quiero dedicar a un tipo especial de personas.
A todos aquellos que alguna vez se han planteado el mundo en el que viven.
A todos aquellos que se han preguntado, que han explorado, que han buscado respuestas.
A todos aquellos que han podido hacer un camino en el medio de la oscuridad.

A todos los que han venido antes, porque han hecho posible el momento actual.
A todos los que vendrán en el futuro, porque llevarán los límites del saber a lugares increíbles.
Y sobre todo, a todos los que lo hacen en el momento presente.
A esa gente que nos permite seguir en movimiento día a día.







**“Knowing is not enough; we must apply.
Being willing is not enough; we must do.”**

**"Saber no es suficiente; debemos aplicar.
Estar dispuesto no es suficiente; debemos hacer."**

**"Saber non é suficiente; debemos aplicar.
Estar disposto non é suficiente; debemos facer."**

Leonardo Da Vinci.



Agradecimientos.

Han sido cuatro años de doctorado, a medio camino entre Santiago y Berkeley y hay mucha gente a la que tengo que agradecer su ayuda para conseguir sacar adelante este trabajo.

Para empezar, tengo que agradecer la confianza que la Fundación Barrié de la Maza depositó en mí hace cuatro años. Gracias a la ayuda económica, logística y motivadora a través de su beca pude comenzar mis estudios de doctorado en uno de los mejores laboratorios al otro lado del mundo. Una gran experiencia que no sólo me ha facilitado llegar a ser doctor, ha sido una experiencia a nivel vital y personal igualable a muy pocas cosas en la vida.

Haber conseguido contactar con el Berkeley Lab fue gracias a mi profesor, director de tesis y mentor, Francisco Guitián. Aún recuerdo la primera clase que él me dio hace ocho años, en la carrera de ingeniería química. Desde aquel día, supe que quería continuar en el campo de investigación de materiales. Él es sin duda el mayor artífice de esta tesis.

Y el segundo mayor artífice es mi profesor en Berkeley, Tony Tomsia. Un gran investigador reconocido a nivel mundial y aún mejor persona. Nunca podré dejar de agradecerle la oportunidad que me ha brindado abriéndome las puertas de su grupo de investigación. Un grupo formado por magníficas personas y profesionales: Alessandro, Grace, Hao y Benjamin.

Aunque tengo que decir, que para gran grupo de profesionales de investigación los que están en el Instituto de Cerámica de Galicia. El hecho de haber vuelto a casa se hizo todavía más intenso gracias a la gente que hay aquí, en Santiago. Alfredo y Rubén me han ayudado mucho, sobre todo en lo personal, especialmente en la terraza de la cafetería de Matemáticas. Después de años en California, ¿qué más se puede pedir que volver a sentirse en casa? Mónica me ha ayudado mucho con los experimentos que he hecho al volver y Álvaro me ayudó con la redacción de los papers y a plantear futuros trabajos que podemos realizar. Mar siempre hace especial una mañana aburrida. Y gracias a Arturo he podido llevar a cabo unos experimentos que han puesto la guinda a mi proyecto. También tengo que destacar la ayuda de Iria en esos experimentos.

A pesar de que ya no forman parte oficialmente del Instituto de Cerámica, dos personas me han ayudado extraordinariamente a desarrollar mi investigación. Jaime y Ramiro, que no sólo me apoyaron con los experimentos sino moralmente. Antes de ir a Berkeley, Jaime ya me hizo un magnífico resumen de la ciudad. Y jamás olvidaré los consejos de Ramiro al principio de mi tesis, cuando ya estaba agobiado. ¡Aún no sabía todo lo que me quedaba!

Después de agradecer a todos estos magníficos profesionales tengo que seguir con mi familia. Mi padre, mi hermana y Jose siempre me han apoyado y tampoco puedo olvidarme de mis abuelos: Tati, Pepe, Julio y Julia. Muchas gracias también a mis tíos Jose y Ana y a mis primos Nacho y Adrián. Pero sin duda, la persona a la que más tengo que agradecer es a mi querida madre. No creo que haya nadie en el mundo que crea más en mí que ella. Sé que está muy orgullosa de mí, pero yo también estoy muy orgulloso de ella. Gracias madre.

Siempre digo que si hay una cosa de la que estoy orgulloso es de mis amigos. Y aquí hay mucha gente que me ha ayudado de muchas maneras y que tengo que nombrar.

Tengo que empezar por los dos grandes amigos que hice en Berkeley, Adrián y Alex. Con ellos me recorrí todo Estados Unidos y no me puedo imaginar cómo habría sido haber estado tan lejos de casa sin su ayuda. Volveremos a estar juntos, no sé cuándo ni dónde, pero lo sé. Es lo mejor que lleco después de haber vivido durante más de dos años en California. También tengo que dar las gracias a Agathe, Slava, Paloma, Amy, Charlotte y Stéphanie.

Y de este lado del Atlántico también tengo que hablar de mi pequeño gran pueblo. No sólo Mera es genial, sino que toda la gente del pueblo es genial. Sin ninguna excepción. Es para mí un orgullo enorme poder decir que soy meracho a donde quiera que vaya. Y allí tengo tres amigas muy especiales a las que quiero con locura: Verónica, Lucía y Cecilia. Hay amistades que ni las distancias ni nada en este mundo pueden romper. Y así es y será por muchos años.

Mis compañeros de ingeniería química también me han apoyado mucho. Antón, Ayelén, Carmen Dequidt, Elena, Adela, Alba, Carmen Gómez, Marta, Alexis, Martín, Carballo, Pablo, Fresa, Carlota... Es genial que sigamos manteniendo la amistad como si no hubiera pasado un día desde que terminamos la carrera. Volvería a empezar la carrera con los ojos cerrados. Muchas gracias isótopos. Sois todos unos cracks.

Tengo que nombrar también a mi querida Cristina, que está en Madrid y a mi querida Sara que anda por las Canarias. Es una pena no tenerlas más cerca, pero también es genial cuando unos vamos a ver a los otros y la amistad sigue en el mismo punto que la hemos dejado. Seréis unas magníficas profes.

Y no puedo olvidarme de mi Spanish Guetto, mis compañeros de Erasmus en Gdansk. Cuantos viajes, cuantas noches especiales, cuantos recuerdos imborrables... Carolina, Javi, Marta, Rocío, Minis, Jaime, Sandra, Sergio y todos los demás. Si he dicho que volvería a empezar la carrera con los ojos cerrados, ¿qué puedo decir del Erasmus? Ha sido el mejor año de mi vida, cuánto conocí, cuánto aprendí, fue genial vivir algo como esa experiencia. Aquel año de ensueño, aquel año tan intenso en todos los aspectos de nuestras vidas, aquel año terminó. Pero lo que ha quedado entre nosotros durará décadas.

En este último año en Santiago también he hecho muy buenos amigos que siempre estaban ahí para echar un partido de fútbol o tomar una cerveza, muy necesario para desconectar la mente por un tiempo. Muchas gracias a Adrián Blanco, Manu Miramontes, Javi Cruz, Óscar, Víctor, Rafa, Mauro, Michi, Román, Dani, Pilar, Aurelio y Sara Cid. Siempre nos quedará Compostela...

Y luego tengo amigos especiales que no puedo incluir en ninguno de estos grupos pero que tengo que nombrar. Charo González, una arquitecta con inquietud mental crónica. Javi Pais, un escritor con vocación de cardiólogo. Pablo Brocos, un profesor farmacéutico. Diego López, un viajero ingeniero. Y Pablo Otero, un buen amigo politólogo que me ha ayudado mucho en tantos proyectos... Los tres sois muy diferentes, pero sois de los pocos con los que puedo tener conversaciones con total franqueza en muchos aspectos de nuestra sociedad y del mundo que nos rodea. Gente con la mente abierta y con una gran predisposición crítica que te hacen ver el mundo con otra perspectiva muy diferente a la convencional.

Releyendo todos estos agradecimientos parece que se ha utilizado mucho la palabra "tengo que agradecer". Suena como una obligación. Simplemente deciros que nuestra querida RAE dice que "tener que" es la necesidad o determinación de hacer algo. Bueno, en mi caso es la parte de la determinación. Sois parte de lo que soy, de lo que pienso y de lo que hago y este trabajo es en gran parte mérito vuestro. El mínimo agradecimiento que puedo hacer es nombraros en estas líneas. Muchas gracias de nuevo a todos. No os imagináis lo orgulloso que estoy de que hayáis formado parte de mi vida.

Y después de cuatro años puedo decir que lo he conseguido

...with a little help from my friends.

David.



Resumo da tesis.

Nas derradeiras décadas vense desenrolando un novo tipo de biomateriais que, ademais de ser biocompatibles, tamén son bioactivos e reabsorbibles. A diferenza dos biomateriais inertes, esta nova xeración de materiais establecen ligazóns interfaciais cos tecidos vivos e os implantes son substituídos gradualmente polo tecido vivo do receptor, facendo que a peza implantada desapareza, total ou parcialmente, a longo prazo e de paso ao propio tecido.

Na disciplina da creación de pezas para a rexeneración de tecido óseo, multitude de autores apuntan a que os implantes óseos do futuro seguirán este enfoque, co que se poderá rexenerar o tecido óseo do paciente.

Este traballo centrouse en dous importantes puntos para desenrolar novas pezas que poidan utilizarse para a rexeneración do tecido óseo: os materiais e a técnica de conformación a usar.

Respeto ós materiais, utilizáronse diferentes compostos cerámicos, tales coma o hidroxiapatito ou o fosfato tricálcico, que teñen unha composición química moi parecida ó óso nativo humano. Estes compostos foron mesturados a diferentes proporcións con distintos tipos de vidros bioactivos, que presentan unha maior velocidade de degradación en soro fisiolóxico e precipitan máis tarde como o propio hidroxiapatito.

O primeiro vidro bioactivo inventado, chamado 45S5, tamén foi mesturado con seda para conseguir mellores propiedades biolóxicas.

Todos estes materiais foron conformados por medio da técnica de *freeze casting* que, por medio da conxelación dunha suspensión e o posterior sublimado do xeo formado, permite a creación de pezas cunha característica estrutura lamelar interna ó mesmo tempo que unha gran porosidade e un alto nivel de interconexión entre os poros creados.

De todos os materiais que se conformaron por medio da técnica do *freeze casting* seleccionáronse os que mellores estruturas internas presentaban e os que se consideraron máis innovadores para facer diferentes probas *in vitro* e *in vivo*.

Palabras chave: rexeneración de tecidos óseos; fosfatos cálcicos; vidros bioactivos; seda; *freeze casting*.



Resumen de la tesis.

En las últimas décadas se ha desarrollado un nuevo tipo de biomateriales que, además de ser biocompatibles, también son bioactivos y reabsorbibles. A diferencia de los biomateriales inertes, esta nueva generación de materiales establecen enlaces interfaciales con los tejidos vivos y los implantes son sustituidos gradualmente por tejido vivo del receptor, haciendo que la pieza implantada desaparezca, total o parcialmente, a largo plazo y de paso al propio tejido.

En la disciplina de la creación de piezas para la regeneración de tejido óseo, multitud de autores apuntan a que los implantes óseos del futuro seguirán este enfoque, con el que se podrá regenerar el tejido óseo del propio paciente.

Este trabajo se ha centrado en dos importantes puntos para desarrollar nuevas piezas que puedan ser utilizadas para la regeneración de tejido óseo: los materiales y la técnica de conformación a utilizar.

Respecto a los materiales, se han utilizado diferentes compuestos cerámicos, como el hidroxiapatito o el fosfato tricálcico que tienen una composición química muy parecida al hueso nativo humano. Estos compuestos han sido mezclados a diferentes proporciones con distintos tipos de vidrios bioactivos, que presentan una mayor velocidad de degradación en suero fisiológico y precipitan posteriormente como el propio hidroxiapatito.

El primer vidrio bioactivo inventado, el llamado 45S5, también fue mezclado con seda para conseguir mejores propiedades biológicas.

Todos estos materiales fueron conformados por medio de la técnica de *freeze casting* que, a través de la congelación de una suspensión y el posterior sublimado del hielo formado, permite la creación de piezas con una característica estructura lamelar interna al mismo tiempo que una gran porosidad y un alto nivel de interconexión entre los poros creados.

De todos los materiales que se han conformado por medio de la técnica del *freeze casting* se han seleccionado los que mejores estructuras internas presentaban y los que se han considerado más innovadores para realizar diferentes pruebas *in vitro* e *in vivo*.

Palabras clave: regeneración de tejidos óseos; fosfatos cálcicos; vidrios bioactivos; seda; *freeze casting*.



Thesis summary.

In the last decades a new type of biomaterials has been developed. As well as being biocompatible, these materials are bioactive and resorbable too. Unlike inert biomaterials, this new materials generation establish interphase links with living tissue and the implants are gradually substituted by the patient's living tissue. This phenomena provokes that the implanted sample disappears, totally or only partially, at long term and the living tissue settle in its place.

At the bone tissue regeneration field, many authors claim that the future bone implants will follow this guides, so it will be possible to regenerate the patient's bone tissue.

This work has focused in two main points to develop new samples that can be used as bone tissue regeneration: materials and process technique.

Different ceramic compounds has been used, as hydroxyapatite or tricalcium phosphate, both with a very similar chemical composition to the human natural bone. Both compounds were mixed at different proportions with diverse bioactive glasses, that present a higher degradation rate in body fluid and a later precipitation as hydroxyapatite by itself.

The first developed bioactive glass, called 45S5, also has been mixed with silk in order to improve its biological properties.

All these materials were shaped by the *freeze casting* technique. This technique freezes in a controlled way a suspension and, after sublimating the ice, allows to create samples with a characteristic inner lamellar structure. This structure has big porosity values and a huge interconnection between the created pores.

Among all the materials that have been processed through the *freeze casting* technique in this work, they were selected to continue with *in vitro* and *in vivo* studies the ones with better inner structure and the ones considered the most innovative.

Keywords: bone tissue regeneration; calcium phosphates; bioactive glasses; silk; *freeze casting*



ÍNDICE

I. Justificación y objetivos del proyecto.

1. Justificación del proyecto.....	27
2. Objetivos de la tesis doctoral.....	29

II. Revisión bibliográfica.

3. Introducción teórica.....	35
3.1. Ciencia y tecnología de materiales.....	35
3.1.1. Clasificación de los materiales.	36
3.1.2. Cristal y vidrio. Procesos de cristalización y vitrificación.....	37
3.1.3. Fases de la materia: Diagramas.....	38
3.2. Biomateriales y biocompatibilidad.....	39
3.2.1. Breve contexto histórico de los biomateriales.....	40
3.2.2. Bioactividad y biofuncionalidad.....	41
3.3. El tejido óseo.	44
3.3.1. Tipos de hueso.....	45
3.3.2. Estructura interna y propiedades del hueso.....	46
3.3.3. Regeneración ósea y enfermedades asociadas.....	47
3.4. Biomateriales como implantes óseos.....	50
3.4.1. Principales biomateriales utilizados como repuestos óseos.....	50
3.4.2. Materiales para la regeneración de tejidos óseos.....	57
3.4.3. Técnicas empleadas para la conformación de materiales para la regeneración de tejidos óseos.....	60
3.4.4. Osteogénesis: Osteoconductividad y osteoinductividad.....	61
3.4.5. Ingeniería de tejidos óseos.....	61
3.5. Marcas comerciales en la actualidad.....	63

III. Materiales y métodos.

4. Materias primas.	69
4.1. Fosfatos cálcicos.....	69
4.1.1. Hidroxiapatita (HA).....	69
4.1.2. Beta fosfato tricálcico (β -TCP).....	70
4.1.3. Fosfatos cálcicos bifásicos.....	71
4.2. Vidrio Bioactivos (BG).....	72
4.2.1. Vidrio Bioactivo 45S5.....	72
4.2.2. Vidrio Bioactivo 1393.....	72
4.2.3. Vidrio Bioactivo 1393B1.....	73
4.2.4. Vidrio Bioactivo 2B6Sr.....	73
4.3. Zeolitas ZSM-5.....	74
4.4. Seda.....	76
5. Métodos experimentales utilizados.	79
5.1. Métodos de procesamiento.....	79
5.1.1. <i>Freeze casting</i>	79
5.1.2. Sinterización.....	84
5.1.3. Proceso de disolución de seda.....	85
5.1.4. Reticulación de la disolución de seda.....	87
5.1.5. Cortado de las piezas en discos.....	89
5.1.6. Preparación del suero fisiológico simulado.....	89
5.2. Métodos analíticos.....	93
5.2.1. Densidad real por medio de picnometría.....	93
5.2.2. Tamaño de partícula por sedimentación.....	93
5.2.3. Medición de superficie específica.....	94
5.2.4. Dilatometría.....	95
5.2.5. Difracción de rayos X de polvo.....	95
5.2.6. Microscopía electrónica de barrido.....	98
5.2.7. Tamaño de poro y estructura lamelar: Software ImageJ.....	100
5.2.8. Determinación de la porosidad de las piezas.....	101
5.2.9. Propiedades mecánicas.....	102
5.2.10. Determinación de la concentración de seda en la disolución.....	103

5.2.11. Disolución en suero fisiológico simulado estático.....	103
5.2.12. Disolución en suero fisiológico simulado dinámico.....	105
5.2.13. Medida de pH.....	107
5.2.14. Análisis <i>in vitro</i> : Interleucina 6.....	107
5.2.15. Análisis <i>in vitro</i> : Método colorimétrico MTT.....	107
5.2.16. Análisis <i>in vitro</i> : Microscopía confocal con fluorescencia.....	108
5.2.17. Análisis <i>in vivo</i> : Implantación de piezas en la calota de un conejo.....	109
5.2.18. Radiografía por medio de rayos X.....	113
5.2.19. Análisis <i>in vivo</i> : Análisis histológico.....	113
5.2.20. Microscopía óptica.....	115

IV. Resultados obtenidos y discusión.

6. Caracterización de las materias primas.....	119
6.1. Medición de la densidad real.....	119
6.2. Estudio por difracción de rayos X.....	119
6.3. Estudio de dilatometría.....	122
6.4. Medición de superficie específica.....	123
6.5. Medición del tamaño de partículas.....	124
6.6. Resumen y discusión del capítulo.....	124
6.6.1. Densidad real.....	124
6.6.2. Difracción de rayos X.....	124
6.6.3. Dilatometría.....	125
6.6.4. Superficie específica.....	125
6.6.5. Tamaño de partículas.....	126
7. Estudio de la conformación de piezas de HA/β-TCP + BG 45S5.....	127
7.1. Estudio del proceso térmico.....	127
7.2. Resumen y discusión del capítulo.....	129

9.1.3.1. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.	173
9.2. HA/ β -TCP + Vidrio Bioactivo BG 1393B1.....	179
9.2.1. Estudio del proceso térmico.....	179
9.2.2. Conformado.....	181
9.2.2.1. <i>Freeze casting</i>	181
9.2.2.2. Sinterización.....	181
9.3.2. Caracterización física.....	182
9.3.2.1. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.	182
9.3. HA/ β -TCP + Vidrio Bioactivo BG 2B6Sr.....	184
9.2.1. Estudio del proceso térmico.....	184
9.3.2. Conformado.....	186
9.3.2.1. <i>Freeze casting</i>	186
9.3.2.2. Sinterización.....	186
9.3.3. Caracterización física.....	190
9.3.3.1. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura..	190
9.4. Resumen y discusión del capítulo.....	191
9.4.1. Piezas de HA/ β -TCP + ZSM-5.....	191
9.4.2. Piezas de HA/ β -TCP + BG 1393B1.....	193
9.4.3. Piezas de HA/ β -TCP + BG 2B6Sr.....	193
10. Estudio de la conformación de piezas de composite BG 45S5 y seda.....	195
10.1. Conformado.....	195
10.1.1. Preparación de las disoluciones.....	195
10.1.2. <i>Freeze casting</i>	197
10.1.3. Reticulación de la seda.....	199
10.2. Caracterización fisicoquímica.....	199
10.2.1. Propiedades mecánicas.....	199
10.2.2. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.....	200
10.2.3. Determinación del contenido de seda y BG 45S5.....	204
10.2.4. Porosidad.....	205
10.2.5. Solubilidad en suero fisiológico simulado estático.....	206

10.3. Caracterización biológica.....	207
10.3.1. Pruebas <i>in vitro</i>	207
10.3.1.1. Interleucina-6.....	207
10.3.1.2. MTT.....	208
10.3.2. Pruebas <i>in vivo</i>	208
10.3.2.1. Operación a conejo.....	209
10.3.2.2. Radiografía de rayos X.....	211
10.3.2.3. Análisis histológico.....	212
10.4. Resumen y discusión del capítulo.....	214
10.4.1. Conformado.....	214
10.4.2. Propiedades fisicoquímicas.....	215
10.4.3. Propiedades biológicas.....	216
V. Conclusiones.	
11. Resumen y conclusiones.....	221
VI. Fuentes consultadas.	
12. Bibliografía y referencias.....	227
VII. Anexos.	
Congresos asistidos como oyente.....	247
Comunicaciones orales.....	247
Comunicaciones escritas.....	253
D. Don López, A. Polini, H. Bai, A.P. Tomsia. <i>Nuevas aplicaciones dentales de vidrio bioactivo nanoestructurado y sus composites</i> . Mundo Nano, Vol. 6, No 11 (2013). P.13-28.....	253
S. Reed, G. Lau, B. Delattre, D. Don Lopez, A. P. Tomsia, B. M. Wu. <i>Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing</i> . Biofabrication 8 (2016).....	273



I. Justificación y objetivos del proyecto.



1. Justificación del proyecto.

El Instituto de Cerámica de Galicia tiene su origen en el Grupo de Cerámica del Departamento de Edafología de la Universidade de Santiago de Compostela, en el año 1974. El estudio en biocerámicas comenzó en 1986 con el proyecto "*Biocompatibilidad y diseño de biomateriales cerámicos para su aplicación a la clínica ortopédica*" y desde entonces lleva 30 años trabajando en diversos proyectos relacionados con diferentes compuestos cerámicos y técnicas para el diseño y la caracterización de biomateriales para regeneración ósea.

Dentro de todos los logros que el Instituto de Cerámica de Galicia lleva acumulado en estas tres décadas hay que destacar los 51 trabajos publicados, 7 tesis doctorales presentadas, 3 patentes de procedimiento, 16 proyectos de I+D nacionales y autonómicos, y un proyecto CENIT otorgado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico e Industrial, dependiente del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España. Todos estos datos son referidos únicamente al campo de biomateriales.

Además, a partir de las investigaciones llevadas a cabo en el campo de los biomateriales óseos y el estudio de las biocerámicas en el Instituto de Cerámica de Galicia se creó Keramat S.L., una empresa de base tecnológica del tipo spin-off que fue establecida en el año 1999 y que se centra en el diseño, desarrollo, fabricación y comercialización de biomateriales cerámicos para la regeneración ósea con aplicaciones en los campos de la veterinaria, odontología, traumatología, neurocirugía y cirugía maxilofacial [1].

Keramat es la única empresa española que se dedica a la fabricación y comercialización de compuestos biocerámicos y tiene un convenio con la Universidade de Santiago de Compostela, en concreto con el Instituto de Cerámica de Galicia, para la transferencia de tecnologías y conocimientos que se desarrollan en este centro investigador.

Por otro lado, el Lawrence Berkeley National Laboratory es uno de los referentes mundiales a todos los niveles de investigación, contando con un total de 13 premios Nobel desde que fue fundado en 1931 como Laboratorio de Radiación, debido a la construcción de uno de los primeros ciclotrones a nivel mundial. Pronto este laboratorio empezó a contar con diferentes tipos de investigaciones, destacando su participación en el Proyecto Manhattan durante la Segunda Guerra Mundial, en donde se colaboró para desarrollar las primeras bombas atómicas en la Historia de la Humanidad. Actualmente, el complejo es operado a medias entre la Universidad de California en Berkeley, y el Departamento de Energía de Estados Unidos (DOE, *Department of Energy*).

De los múltiples proyectos en todos los ámbitos de la ciencia, destaca la gran apuesta llevada a cabo donde confluyen dos campos tan decisivos para el avance de la sociedad tecnológica humana como son la ciencia de materiales y la ingeniería biomédica. De ellos surge la ingeniería de biomateriales, en donde el Berkeley Laboratory también es un destacado laboratorio de referencia a nivel mundial.

Esta tesis doctoral intenta aunar, compaginar y continuar los esfuerzos científicos llevados a cabo por dos centros de investigación referentes a nivel mundial en la ciencia de biomateriales en la búsqueda de encontrar nuevos y mejores materiales y técnicas para la regeneración ósea.



2. Objetivos de la tesis doctoral.

En los últimas décadas la investigación sobre biomateriales está alcanzando unas cotas sobresalientes a nivel mundial. La gran variedad de biomateriales que existen en la actualidad pueden desempeñar multitud de funciones en el cuerpo humano que permiten tener una mejor calidad de vida y, también, una vida más longeva. Millones de personas en todo el mundo se sirven de una gran cantidad de biomateriales que conforman diversos artilugios: marcapasos, lentillas, suturas, sonotones auditivos, prótesis de caderas... Los ejemplos de artilugios diseñados por el ser humano y que tienen la capacidad de ejercer alguna función en el interior del propio cuerpo humano son múltiples.

El constante crecimiento de la esperanza de vida en nuestro país en las últimas décadas, como se puede observar en la figura 2.1, provoca un mayor envejecimiento de la población y la ingeniería de biomateriales puede resolver muchos de los problemas sanitarios que presenta una población que cada vez tiene una edad más avanzada.



Fig. 2.1. Evolución de la esperanza de vida en España durante los últimos cien años. Datos obtenidos de la Revista Española de Investigaciones Sociológicas [2].

Por otro lado, cabe destacar que el mercado de los biomateriales se encuentra en continuo crecimiento. En la actualidad genera 62 mil millones de dólares mundialmente y se prevé que genere más de 130 mil millones en el año 2020 [3,4]. Aunque puede parecer una cifra exageradamente alta, hay que tener en cuenta la gran variedad de productos que se engloban en el sector de los biomateriales, los cuales ya se han mencionado brevemente en los párrafos anteriores.

De esta manera, los biomateriales se presentan como una innovadora corriente investigadora que puede desarrollar multitud de soluciones médicas que alarguen aún más la esperanza de vida y, sobre todo, aumenten la calidad de vida de una gran cantidad de personas en todo el mundo. Además, todo apunta a que también tiene una gran viabilidad económica que permita que las investigaciones en este campo puedan seguir desarrollándose por mucho tiempo.

En la actualidad se intentan desarrollar materiales que no sólo sean biocompatibles sino que, además, también sean bioactivos. Esto quiere decir que en lugar de centrarse en diseñar biomateriales que sean inertes con el cuerpo humano, se está intentando crear materiales que provoquen una respuesta determinada en el tejido vivo.

Un ejemplo claro de esto que aquí se expone, enfocado al campo de los tejidos óseos en el que se va a desarrollar el trabajo de esta tesis, es la comparación entre prótesis óseas inertes y piezas que fomenten el crecimiento y la colonización de las células óseas en el propio injerto. En el primer caso, en el que se suelen utilizar metales o materiales cerámicos, el propio cuerpo humano suele crear una capa de tejido fibroso alrededor del biomaterial, sin mayor interacción biológica que ésta.

En el segundo caso, el propio biomaterial será activo, de manera que el material interactúe con el tejido vivo y fomente que las células óseas colonicen la pieza y den paso al tejido óseo como tal.

En el presente trabajo se intentará combinar varios tipos de materiales bioactivos, de los que, por un lado, una parte de ellos serán muy degradables mientras que otros lo serán muy poco, de manera que se creará una dualidad de materiales en el que los segundos se mantendrán como una base estable para la colonización mientras que la mayor degradabilidad de los primeros darán paso a una mayor porosidad y se espera que fomenten la proliferación de las células óseas que crearán el tejido como tal.

Este planteamiento puede ser igualmente extrapolado a muchos tipos diferentes de tejidos del cuerpo humano. Por ejemplo, en la actualidad, si alguien necesita un trasplante de corazón, dicha persona tiene que esperar a que otra persona muera en unas determinadas condiciones que no afecten al propio órgano cardíaco. Además, dicho corazón debe poseer unas propiedades establecidas, como tamaño o compatibilidad con el futuro receptor. Y aún teniendo una compatibilidad similar, el receptor tiene que medicarse durante toda la vida para evitar que sus anticuerpos rechacen el trasplante.

En lugar de tener que pasar por todo este complicado proceso, la regeneración de tejido cardíaco podría facilitar mucho. Se podría crear la matriz del corazón o de la parte que falla en el paciente y, en ella, hacer crecer células extraídas del propio paciente, de manera que dichas células colonizarían esta matriz y se crearía un nuevo órgano con las propias células del paciente. De esta manera no existiría la necesidad de esperar el fallecimiento de otra persona para poder encontrar el órgano y el receptor no necesitaría estar medicado de por vida por el problema de compatibilidad de órganos.

Desde luego este planteamiento suena muy bien, pero la ciencia aún tiene que avanzar mucho para poder hacer realidad estos avances.

Sin embargo, no cabe duda de que la ciencia y la tecnología se encuentran en el buen camino.

El trabajo desarrollado en esta tesis tiene como objetivos el diseño, y la caracterización por medio de ensayos físicos, químicos y biológicos (tanto *in vitro* como

in vivo) de un nuevo tipo de piezas que sean capaces de hacer crecer y fomentar el tejido óseo.

Para ello, este estudio se ha centrado en dos puntos principales para conseguir llevar a cabo dichos objetivos:

-Materiales. Se utilizarán materiales que no sólo sean biocompatibles, sino que además sean bioactivos, de manera que dichos materiales interactúen y fomenten el crecimiento del propio tejido óseo. También deben cumplir otros requisitos, como que posean una química de superficie que provoque la proliferación celular y la osteogénesis (la capacidad de estimular la creación de nuevo tejido óseo a partir de las propias células) y que tengan estabilidad mecánica (por lo menos unas propiedades mecánicas mínimas que permitan que el material sea manipulado). Por otro lado, este estudio también se centrará en la biodegradabilidad que presentan dichos compuestos. Para ello se han seleccionado compuestos biocerámicos como el hidroxiapatito, el fosfato tricálcico y diferentes vidrios bioactivos, además de un polímero biocompatible como es la fibroína obtenida de la seda natural. De entre todos estos materiales, se comenzará el estudio con diversos tipos de ellos y se analizarán diferentes propiedades fisicoquímicas de ellos para, una vez que se hayan obtenido diferentes parámetros de ellos, seleccionar los que se consideren más apropiados para continuar con experimentos *in vitro* y *in vivo*.

-Técnica de conformación. No sólo es muy importante los materiales que son utilizados a lo largo de este estudio, sino también, la manera en la que se les da forma y estructura final. Es muy importante que dicha estructuración del material tenga una gran porosidad interconectada que permita a las células óseas la colonización y propagación a través de la pieza para que se desarrolle tejido óseo, propiamente dicho, además de tener unos tamaños de poros correctos para la supervivencia celular. De esta manera, como técnica para fabricar las piezas se ha elegido el *freeze casting*, que reúne todas las características que previamente se han enunciado para conseguir una buena colonización celular de la pieza. En el presente trabajo se estudiarán diferentes materiales para ser conformados a través de esta técnica, con el objetivo de cerciorarse de que esta técnica es válida para diferentes tipos de compuestos.

Una vez que los materiales hayan sido conformados a través de las técnicas seleccionadas, las piezas resultantes serán analizadas química y físicamente. De todas las piezas obtenidas con diferentes materiales se seleccionarán las que presenten mejores propiedades físicas (propiedades mecánicas y estructura interna entre otras) para continuar con estudios *in vitro* (ensayos del comportamiento biológico del material en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo). De la misma manera, de este último grupo de piezas se seleccionará la que se considera más adecuada e innovadora para la regeneración del tejido óseo y se llevará a cabo un estudio *in vivo* (experimentación realizada en el tejido de un organismo vivo).





II. Revisión bibliográfica.



3. Introducción teórica.

En las siguientes páginas se hace una revisión teórica sobre los diferentes conceptos que es necesario conocer para comprender su contexto.

3.1. Ciencia y tecnología de materiales.

Cuando se habla de materiales en el campo de la ciencia y la tecnología se habla de multitud de elementos sólidos que se utilizan a diario. La ropa, las casas, los muebles, los medios de transporte, los envases de los alimentos, los aparatos electrónicos... La cantidad de ejemplos de materiales de uso cotidiano que se podría citar es enorme y todos estos materiales son utilizados en cada uno de sus usos debido a las propiedades que presentan cada uno de ellos.

La ciencia y tecnología de materiales es una de las disciplinas transversales más importantes de la ciencia humana. Dentro de la definición de ciencia de materiales se incluye el estudio de la relación de las propiedades con la estructura del material y el procesamiento de dichos materiales. Y por otro lado, la tecnología de materiales diseña la estructura, conformación y desarrollo del material basándose en las relaciones establecidas entre la estructura, las propiedades, el procesamiento y su funcionamiento. El fin último de la ciencia y tecnología de los materiales es aplicar estos materiales para que puedan ser de utilidad a la sociedad. Ambas disciplinas juntas promueven el progreso del conocimiento científico y la aplicación del avance tecnológico sobre la gran variedad de materiales que están a disposición de la sociedad en la actualidad y, al mismo tiempo, desarrollando nuevos tipos de materiales para su futura aplicación [5-10].

Se denomina ciencia transversal porque es el fruto de la combinación de otras ciencias básicas, siendo necesarios conceptos y conocimientos de física, química, geología, medicina y diversas índoles de ingenierías, como química, mecánica, civil o eléctrica, al mismo tiempo que los propios materiales son de aplicación útil en una gran variedad de tecnologías e ingenierías [11, 12].

La importancia de la ciencia y tecnología de materiales a lo largo de la historia de la Humanidad es enorme. Un ejemplo muy recurrente es como a ciertas edades de la Historia Humana se las denomina en función de los materiales que eran utilizados en aquel momento por los seres humanos: Edad de Piedra, Edad del Cobre, Edad del Bronce y Edad del Hierro, nombradas cronológicamente.

En la actualidad, la importancia de la Ciencia y Tecnología de los materiales no ha decrecido en absoluto. La NSF (*National Science Foundation*) es la agencia gubernamental de los Estados Unidos que fomenta la investigación y el desarrollo en todos los campos de la ciencia y la ingeniería. Para poder hacerse una idea de la magnitud de la agencia basta con decir que cuenta con 1700 empleados y un presupuesto anual de 7000 millones de dólares (2012) [13]. Con esa cantidad de dinero financia proyectos de investigación, centrándose en 6 líneas de investigación principales:

- Computación de alto rendimiento y programa de comunicaciones.
- Investigación sobre el medioambiente y cambios globales.
- Sistemas de infraestructuras civiles.
- Ciencias, matemáticas, ingeniería y tecnología en la educación.
- Biotecnología.
- Materiales avanzados y procesamiento.

Como se puede apreciar, la ciencia y tecnología de los materiales está considerada uno de los campos de investigación en el que más se centran las principales agencias gubernamentales enfocadas a la investigación, también conocidas como tecnologías emergentes. A mayores, también puede ser transversal con alguno otro de los campos más destacados, como ocurre con el campo de la biotecnología, haciendo de la ciencia de biomateriales una de las principales y más importantes disciplinas de la investigación actual a nivel mundial [11-13].

3.1.1. Clasificación de los materiales.

La mayoría de autores suele coincidir a la hora de clasificar todos los materiales en cuatro grandes bloques que engloban todos los materiales sólidos [5-9]:

1. Metales: Están compuestos por uno o más elementos metálicos (entonces el material es conocido como aleación), aunque también pueden contener en su interior algún elemento no metálico en pequeñas concentraciones, como ocurre con el carbono en el acero. Se caracterizan por tener electrones no localizados y que se mueven a través de todo el material, haciendo que tengan una enorme conductividad eléctrica y térmica. Además no son transparentes a la luz visible y tienen un brillo característico. Aunque sus valores varían, los metales ofrecen altas resistencias mecánicas y, al mismo tiempo, una gran ductilidad. Ejemplos de los materiales metálicos son el hierro, el bronce, el titanio, el oro o el plomo.

2. Cerámicas: Materiales inorgánicos compuestos por elementos metálicos y no metálicos que han establecido un enlace químico entre sí. Se caracterizan por tener una gran dureza y una gran resistencia a altas temperaturas y a corrosiones, además de ser bastante aislantes a la temperatura y a la electricidad. A pesar de su dureza, también suelen ser materiales frágiles entre los que se pueden destacar los cementos, las porcelanas, los minerales o los vidrios.

3. Polímeros: Compuestos orgánicos que se suelen establecer en largas cadenas o redes formadas por monómeros, en donde se repite una o unas pocas unidades estructurales que están basados, principalmente, en carbono, hidrógeno y otros elementos no metálicos. Es un campo muy diverso, por lo que las propiedades pueden variar mucho, aunque la mayoría de materiales poliméricos suelen tener muy baja conductividad térmica y eléctrica y unas propiedades mecánicas muy variables. Dentro de este grupo se engloban muchos materiales, tanto naturales como artificiales que incluyen todos los plásticos (el poliestireno, el PVC o el nylon), la madera, el colágeno, la seda o el algodón.

4. Composites: Estos son los materiales formados por al menos dos fases o constituyentes integrados de los anteriores tipos de materiales. Al estar integrados, cada uno de los componentes pierde sus características específicas para otorgar unas nuevas propiedades al composite final. También existen múltiples ejemplos de este tipo de materiales, como el hormigón armado (formado por acero, cemento y áridos), adobe (barro y paja) o paneles de fibras de vidrio o carbono (que, además de las propias fibras también están formados por una matriz polimérica que los mantiene unidos).

Todos estos materiales poseen unas propiedades características que los hacen útiles para cada uno de sus propósitos. Entre todas estas propiedades destacan las propiedades mecánicas, ópticas, acústicas, magnéticas, eléctricas, biológicas, térmicas y físico-químicas [5-7].

3.1.2. Cristal y vidrio. Procesos de cristalización y vitrificación.

Los conceptos de cristal y vidrio son muy importantes dentro de la ciencia de materiales y, para entender ciertas discusiones y conclusiones del trabajo llevado a cabo es importante conocer y diferenciar ambos conceptos.

Se denomina cristal a aquel material que presenta una estructura cristalina, esto es, en el que los átomos se encuentran situados en una secuencia repetida o periódica a lo largo de toda su estructura. Dentro de los materiales cristalinos podemos diferenciar la llamada celda unidad, que es el patrón que se va a repetir por todo el material en las tres dimensiones. Casi todos los metales además de muchos compuestos cerámicos y poliméricos presentan esta estructura cristalina [5, 6, 14].

Por otro lado, los materiales denominados vidrios son compuestos sin una estructura definida que se repita en un largo alcance en el seno del propio material, sino que se encuentra de una forma aleatoria, por lo que reciben el nombre de estructuras no cristalinas, también llamadas amorfas [5, 6, 14].

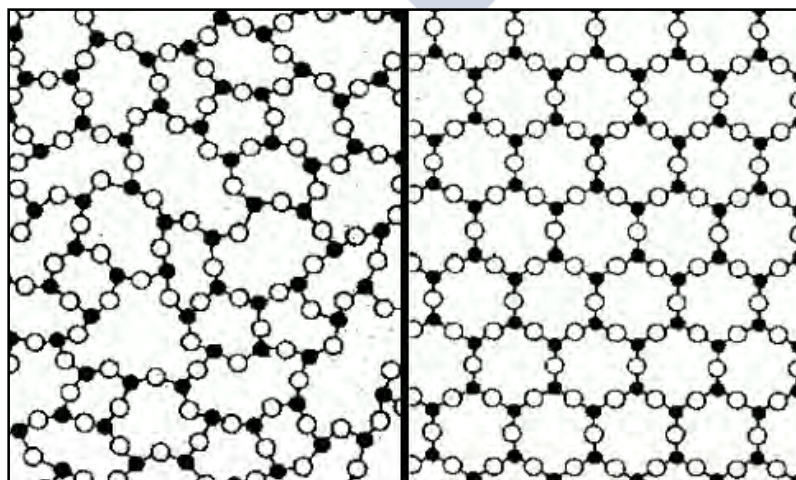


Fig. 3.1. Representación de la estructura molecular del SiO₂ en estado vítreo (izquierda) y cristalino como cuarzo (derecha) [15].

Con la diferenciación establecida entre un vidrio y un cristal, los procesos de vitrificación y cristalización únicamente corresponden al transcurso de un tipo de estructura a la otra, en concreto se pasa a un estado de estructura amorfa (vidrio) con la vitrificación y a una estructura cristalina con la cristalización.

3.1.3. Fases de la materia: Diagramas.

En un material, una fase es una región con determinadas condiciones que se diferencia en su microestructura y/o composición de otra región. Los diagramas de fase son representaciones gráficas de las diferentes fases que existen en un sistema con diferentes variables como la temperatura, presión o composición [5]. Estos diagramas de fases también pueden corresponder a sustancias puras, como el caso del agua. La figura 3.2 a continuación muestra el diagrama de fases del sistema P_2O_5 y CaO , en donde se engloban la mayoría de fosfatos cálcicos.

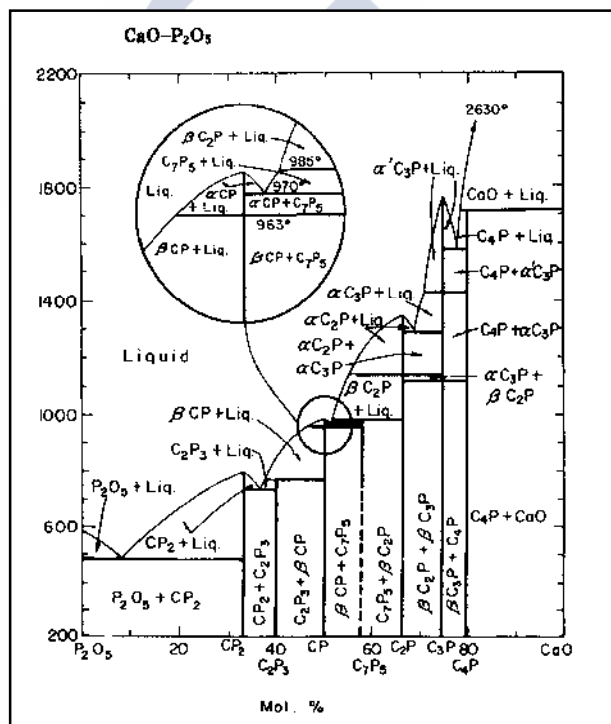


Fig. 3.2. Diagrama de fases del sistema P_2O_5 y CaO (fosfatos cálcicos) en función de la composición (eje horizontal) y de la temperatura (eje vertical) [16].

3.2. Biomateriales y biocompatibilidad.

Dentro del gran espectro que engloba a todos los materiales, en las últimas décadas destaca una subcategoría muy específica, los biomateriales. El hecho de que en las últimas décadas haya aumentado considerablemente la esperanza de vida de la población, provoca que sea necesario un mayor gasto sanitario en los países desarrollados a medida que la población envejece cada vez más [17-20]. Biomaterial es un término utilizado para indicar que un material formado por una sustancia o una combinación de varias, de origen natural o sintético, puede ser utilizado por un determinado periodo de tiempo como un todo o una parte de un sistema que trata, aumenta o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [21, 22]. Esta definición es la más ampliamente aceptada, aunque diferentes autores y congresos aportan distintas descripciones, como la que se presenta desde la reunión Internacional de las Sociedades Científicas de Biomateriales, que tuvo lugar en Chester (Reino Unido) en 1986 [23]:

"Un biomaterial es un material no vivo utilizado en aparatos médicos y desarrollado para interactuar en sistemas biológicos".

En el año 1987 la Conferencia Internacional sobre Biomateriales definió de una forma más sencilla el concepto de biomaterial [23, 24]:

"Un biomaterial es un material diseñado para una función biológica específica".

Y la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) lo define como [25]:

"Biomaterial es un material utilizado para aplicaciones en contacto con tejido vivo, organismos o microorganismos".

A pesar de estas pequeñas diferencias de matices entre los expertos del campo para la definición global de lo qué es un biomaterial, esto es, por lo menos, un punto de partida y de referencia. En este punto, todos los autores están de acuerdo en que dicho biomaterial tiene que poseer la propiedad de ser biocompatible, para lo que también es necesario encontrar una definición para el término biocompatibilidad. En este punto se suele tener más consenso y aceptar más globalmente la definición aportada en la Conferencia Internacional sobre Biomateriales de 1987, citado unas líneas más arriba [21, 23, 24].

"La biocompatibilidad es la habilidad de un material para provocar la respuesta adecuada del tejido en una aplicación específica".

Y, aunque más simple, también es relevante la definición que es dada por la IUPAC [25]:

"La biocompatibilidad es la habilidad de estar en contacto con un sistema vivo sin producir ningún efecto adverso".

En este apartado también cabe destacar la clasificación propuesta por diferentes autores que establece las propiedades que presentan lo que se denomina por parte de ciertos autores "las generaciones de los biomateriales", clasificación basada en el nivel de interacción entre el propio biomaterial y el tejido vivo. La primera generación que surgió en los años 1960-70 utilizaba compuestos que, aunque eran biocompatibles, también eran bioinertes, como puede ser la alúmina. De hecho, la intención era que fueran lo más bioinertes posible, para así minimizar la formación de tejido cicatrizante alrededor del propio implante en contacto con el tejido [26-28].

La segunda generación de biomateriales sí que son bioactivos y reabsorbibles, con lo que el propio material va dejando paso progresivamente al propio tejido mientras el material se disuelve. En este tipo de materiales están incluidos el hidroxapatito o el ácido poliláctico [28, 29].

Por último, la tercera generación induce la regeneración del tejido por medio de la estimulación de la respuesta de las células relacionadas con el proceso de recuperación natural del hueso [29, 30]. Ciertos autores afirman que los vidrios bioactivos se encuentran en esta tercera generación [27, 28, 31] mientras que otros afirman que para tener un material de tercera generación es necesario tener una base funcional compuesta por un material con una gran porosidad y, por otro lado, que se encuentre dopado con modificadores biológicos que aumenten la bioactividad, como factores de crecimiento, hormonas o células [26].

3.2.1. Breve contexto histórico de los biomateriales.

Desde hace miles de años, el ser humano ha utilizado diferentes materiales para darles aplicaciones médicas en los propios cuerpos humanos, de esta manera siendo utilizados como biomateriales, aunque en aquel momento aún ni siquiera existiera el concepto de biomaterial como tal. En el interior de algunos sarcófagos egipcios se han encontrado momias con cavidades dentales rellenas por compuestos cerámicos, datados con una antigüedad de alrededor de unos 8000 años [23, 32]. Por otro lado, los etruscos tallaban huesos de bueyes para prótesis dentales en los últimos siglos antes de nuestra era y los mayas creaban dientes a partir de las conchas marinas alrededor del año 600 d.C. [24, 33]. Leonardo da Vinci ya introdujo el concepto de lentes de contacto a finales de la Edad Media y, de acuerdo con un libro de odontología europea de finales del siglo XVIII, las implantaciones y trasplantes dentales eran muy comunes en la época, utilizando piezas de porcelana como sustitutos dentales, siendo el primer presidente de los Estados Unidos, George Washington, uno de los personajes más famosos en utilizar algo parecido a una dentadura postiza. Este hecho explica esa extraña mueca que luce en el billete de un dólar americano [24, 32, 34-36].

Sin embargo, no sería hasta el siglo XX cuando se empezaron a entender los mecanismos por los cuales el tejido vivo responde a los materiales que interactúan con él. Este proceso conllevó el inicio de la investigación y el desarrollo de los biomateriales como tales, que se acentuó de forma especial después de la Segunda Guerra Mundial, con el inicio de los años 50 del pasado siglo [24, 34].

De esta manera, la ciencia y la tecnología han conseguido desarrollar la gran multitud de biomateriales que existen en la actualidad, entre los que se pueden destacar las lentes de contacto, los implantes dentales, los marcapasos, las caderas y repuestos óseos, los puntos de sutura, las prótesis cardíacas, etc. En los siguientes apartados, este estudio se centrará más profundamente en las prótesis óseas.

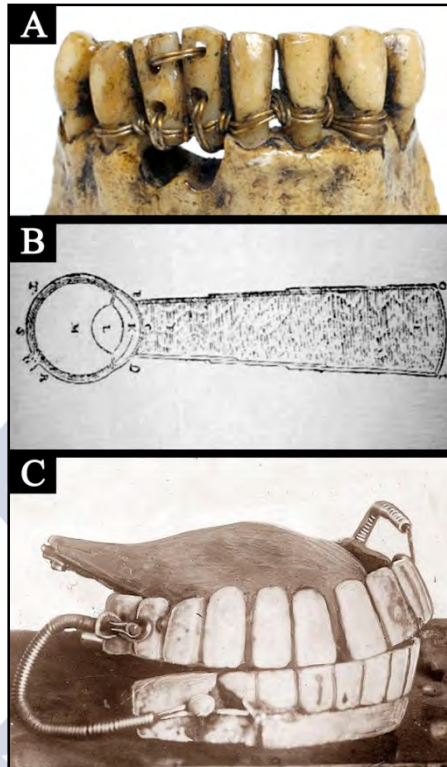


Fig. 3.3. Imágenes de la Historia de los biomateriales.

- A. Implantes dentales por medio de hilos de cobre y piezas dentales de fallecidos que los etruscos utilizaban.
- B. Boceto del funcionamiento de una lente de contacto según Leonardo da Vinci.
- C. Dentadura postiza del presidente George Washington en el siglo XVIII [35].

3.2.2. Bioactividad y biofuncionalidad.

Estos dos conceptos son muy importantes para entender el funcionamiento de los biomateriales y las interacciones que éstos establecen con los tejidos vivos que se encuentran en contacto con ellos.

La bioactividad de un material es la capacidad de una sustancia de provocar una reacción determinada en un tejido vivo [25]. Los biomateriales pueden ser clasificados en función del tipo de respuesta que el tejido huésped produce en respuesta a ellos. De esta manera según Hench y otros autores, la bioactividad de los biomateriales se divide en cuatro niveles diferentes [21, 24, 37-39]:

1. Tóxico: El tejido alrededor del material muere.

2. No tóxico y biológicamente inactivo (bioinerte): Únicamente se produce la formación de tejido fibroso alrededor del implante de grosor variable.

3. No tóxico y biológicamente activo (bioactivo): El material establece enlace interfacial con el tejido.

4. Reabsorbible: El implante es sustituido gradualmente por el propio tejido, haciendo que el implante desaparezca a largo plazo y da paso al propio tejido vivo.

El profesor Hench también definió el índice de bioactividad (I_B), como inversamente proporcional al tiempo que tiene que transcurrir para que el 50% de la superficie del material implantado haya establecido enlaces con el hueso nativo ($t_{0,5}$). La fórmula que relaciona estos conceptos es la siguiente [23, 40]:

$$I_B = \frac{100}{t_{0,5}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

La tabla 3.1. nos muestra los índices de bioactividad de algunos materiales cerámicos utilizados para regeneración de tejido óseo:

Tabla 3.1. Propiedades Índice de bioactividad de diferentes compuestos cerámicos [38, 40].

Biomaterial	BG 45S5	BG 5254.6	BG 55S4.3	HA	Al ₂ O ₃
I_B	12,5	10,5	3,7	3,1	0

Cabe destacar al respecto de estos índices de actividad definidos por L. Hench [38, 40] que únicamente miden la cantidad de dichos enlaces con el hueso, aunque no mide la resistencia ni otras propiedades de dichos enlaces.

Por otro lado, la biofuncionalidad de un material es la función que dicho material va a ejercer dentro del ser vivo. Esta función puede ser de mucho tipos, desde generación de impulsos eléctricos (marcapasos), transmisión del sonido (reconstrucción interna del oído) o distribución de fármacos en el interior del cuerpo, entre otras muchas posibles funciones. Sin embargo, al referirse al apartado de prótesis óseas, los requisitos funcionales de los biomateriales se inscriben dentro de tres grandes grupos:

-Articulación. Uno de los logros más complicados en la regeneración de tejidos óseos es reproducir las articulaciones, para lo que es necesario utilizar superficies de baja fricción y con un desgaste muy bajo para conseguir el movimiento natural de una articulación.

-Relleno de huecos. Piezas que rellenan espacios dejados por la eliminación de tejido óseo por operaciones de cirugía, tanto estética como interventiva. Aunque en este caso son

piezas que no necesitan de muchos requerimientos funcionales, sí que se busca una buena colonización de la pieza por parte de las células óseas.

-Soporte de carga y distribución de las tensiones. Otro de los principales cometidos de los huesos naturales dentro del cuerpo humano es estructural. Sin embargo, no todas las piezas de regeneración de tejido óseo la tienen a corto plazo, sino que la van adquiriendo a medida que el tejido óseo comienza a crecer en la propia pieza.



3.3. El tejido óseo.

El hueso es un tejido presente en todos los animales vertebrados y que ejerce varias funciones dentro del organismo [23, 25, 41, 42]: dar estructura al cuerpo, dar soporte y resistencia mecánica, ofrecer protección a los órganos más importantes, permitir la sujeción muscular al mismo tiempo que actuar como palanca y la formación de células sanguíneas en el interior del propio tejido óseo. El hueso natural está compuesto por tres partes principales y diferenciadas, la primera y más voluminosa (está considerada entre el 65 y el 75% del hueso) es la estructura inorgánica, formada por fosfatos cálcicos mayoritariamente (principalmente hidroxapatito); entre el 10 y el 20% es agua, otro 15-20% se corresponde con diferentes tipos de compuestos orgánicos, como lípidos, polisacáridos, proteínas y, sobre todo, colágeno tipo I. Dentro de este porcentaje también se encuentran varios tipos de células, entre las que se encuentra las propias células del tejido óseo [23, 39, 43-45].

Todo este tejido óseo inorgánico está compuesto por diversos elementos químicos que conforman el hueso, como se muestra en la tabla 3.2:

Tabla 3.2. Composición inorgánica por peso del hueso sin agua
(el agua representa entre el 10 y el 20% peso total) [39]

Compuesto	Ca ²⁺	P	CO ₃ ²⁻	Na ⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	P ₂ O ₇ ⁴⁻	F ⁻	K ⁺
% en peso	34,8	15,2	7,4	0,90	0,72	0,13	0,07	0,03	0,03

Además de trazas de Sr²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺

Este tejido óseo natural encierra una compleja estructura compuesta de cuatro diferentes tipos de células de origen mesenquimal [25, 43, 44]:

-Osteoblastos: Son los responsables del crecimiento óseo y forman la matriz ósea. Están muy involucrados en el crecimiento y desarrollo de los huesos y son los principales encargados de la creación de nuevo tejido óseo. Los osteoblastos son capaces de replicarse hasta el momento en el que se encuentran completamente rodeados por matriz ósea, cuando se transforman en osteocitos.

-Osteoclastos: Responsables de la reabsorción ósea, degradan y remodelan la estructura ósea, dando paso a los osteoblastos para que vuelvan a regenerar el propio hueso. Por ello también se les conoce como macrófagos óseos. Cuando existe un número excesivo de osteoclastos da lugar a una mayor absorción de tejido óseo que su generación, lo que se conoce como osteoporosis, y que conlleva una disminución importante de la densidad del tejido óseo.

-Osteocitos: Son células que se encuentran en el interior del hueso completamente formado, en espacios entre las laminae que componen el sistema de Havers, también conocidas como lagunas. Por medio de estas lagunas los osteocitos se encuentran conectados a través de toda la matriz ósea, intercambiando iones y hormonas. Los osteocitos son los principales responsables del mantenimiento de la matriz ósea, una vez que ya se encuentra completamente formada.

-Células madre: Células osteogénicas, esto es, que se encuentran almacenadas y preparadas para diferenciarse. Dicha diferenciación depende de las condiciones del medio, en especial de la presión parcial del oxígeno. Cuando ésta es alta, se desarrollarán en osteoblastos. [17, 33, 34].

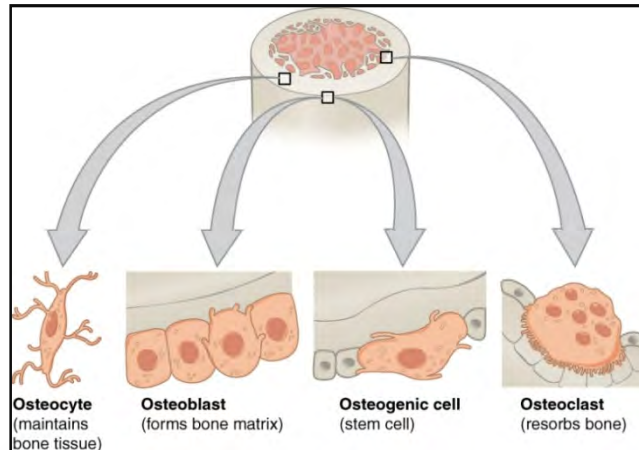


Fig. 3.4. Esquema de los diferentes tipos de células presentes en el interior del tejido óseo. De izquierda a derecha: osteocitos (mantiene el tejido óseo), osteoblastos (forma la matriz ósea), células osteogénicas (células madre) y osteoclastos (reabsorbe el hueso) [42].

3.3.1. Tipos de hueso.

Los huesos que existen en el cuerpo humano pueden ser clasificados en tres grandes grupos [17, 23, 42]:

1. Huesos planos. Son huesos con una dimensión mucho más corta que las otras dos, siendo, de esta manera, mucho más largos y anchos que gruesos. La mayoría de ellos, se ensamblan entre sí para realizar la función de protección de otros órganos. Pueden tener forma completamente plana, cóncava o convexa, como los omoplatos o los huesos craneales.

2. Huesos largos. Presentan una forma cilíndrica, predominando la dimensión de la longitud sobre las otras dos. Tienen en los extremos partes más voluminosas que sirven para insertar las articulaciones. Están presentes en las extremidades del cuerpo como lo son el fémur, el radio o el cúbito.

3. Huesos cortos. Tienen las tres dimensiones con longitudes similares y tienen diversas funciones en el sistema óseo, desde los huesos del carpo y el tarso hasta los pequeños huesos en el interior del oído.

Ciertos autores consideran que también se podrían hacer dos grupos más, el cuarto incluyendo huesos neumáticos (que encierran cavidades con aire o senos, como los de la cavidad nasal) y un quinto grupo denominado huesos irregulares, que combinan propiedades

de dos o más tipos de los diferentes huesos de la clasificación previa y no presentan una forma o dimensión predominante (como las vértebras, o el hueso occipital) [25, 45].

3.3.2. Estructura interna y propiedades del hueso.

La estructura interna del hueso es bastante compleja ya que cuenta con muchos niveles de organización [17, 39, 46]. El hueso está compuesto por una capa externa, conocida como hueso compacto o cortical [25]. El hueso de tipo cortical es el 80% de la masa ósea total en los humanos adultos y es extremadamente denso, con una baja porosidad (~20%), una alta resistencia mecánica (130-190 MPa) y un módulo de Young muy elevado (15-25 GPa) [47]. Mientras, la capa interna se conoce como hueso trabecular o esponjoso. El hueso trabecular representa el otro 20% de la masa ósea y tiene una porosidad mucho mayor (entre el 50 y el 90%) con, aproximadamente, solo una décima parte de las propiedades mecánicas que posee el hueso compacto, con el módulo de Young alrededor de 0,1 y 2 GPa [47]. En la parte exterior del hueso compacto se encuentra el periostio, una membrana de tejido conectivo que recubre todo el hueso, excepto en articulaciones o en el lugar de inserción de ligamentos o tendones. Por debajo de esta capa se encuentra el hueso compacto que cuenta con multitud de laminillas cilíndricas concéntricas llamadas osteonas o sistema de Havers, unidades funcionales básicas del hueso alrededor de los canales vasculares por los que circula la sangre, que se conocen como canales de Havers [48].

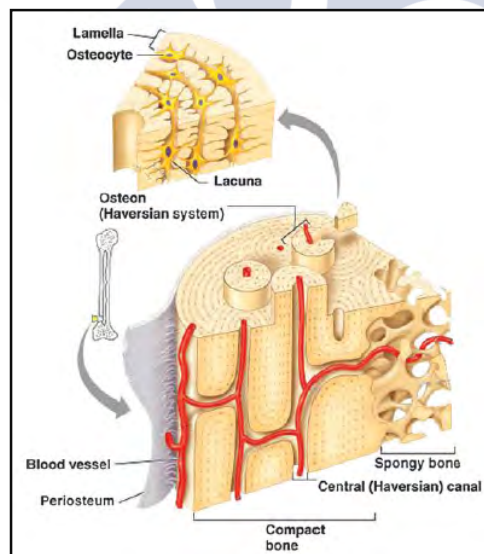


Fig. 3.5. Esquema de la estructura interna de un hueso largo.

Cabe destacar la disposición de los vasos sanguíneos a través de todo el tejido y la presencia de hueso compacto en la parte externa y de hueso esponjoso en el interior [49].

Por otro lado, el hueso esponjoso no tiene estas osteonas, presenta una mayor porosidad que permite una mayor vascularización del tejido. En muchos de los huesos donde se encuentra este tejido esponjoso con una gran cantidad de vasos sanguíneos también se halla la médula ósea, encargada de reproducir las diferentes células sanguíneas: leucocitos, hematíes y plaquetas [49].

También es necesario destacar las propiedades mecánicas del hueso compacto humano, que muestra valores muy altos, tal y como se puede apreciar en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Propiedades mecánicas del hueso compacto humano[27, 39, 50]

	Dirección de la medición	
	Paralela	Perpendicular
Resistencia a tracción (MPa)	124-174	49
Resistencia a compresión (MPa)	170-193	133
Resistencia a flexión (MPa)*	160	
Resistencia a cizalla (MPa)	54	
Módulo de Young (GPa)	17-18,9	11,5
Trabajo de la fractura (J/m²)	98-6000	
K_{IC} (MPa·m^{1/2})*	2-12	
Deformación última a tracción (%)	1,4-3,1	0,7
Deformación última a compresión (%)	1,85-2,6	2,8

*Dirección de la medición no especificada.

3.3.3. Regeneración ósea y enfermedades asociadas.

La regeneración ósea es un complicado proceso natural que precisa de muchos elementos diferentes como la interacción entre el soporte y el tejido celular o la presencia de diversas moléculas solubles en el medio (citoquinas, factores de crecimiento, hormonas, iones, vitaminas) [51, 52]

La principal parte de este complicado proceso de regeneración ósea lo llevan a cabo al mismo tiempo los osteoclastos y los osteoblastos en la regeneración ósea. Es importante diferenciar entre dos tipos de procesos, por un lado el proceso de remodelación, que es cuando ambos tipos de células ejercen sus funciones en el mismo sitio, de manera prácticamente instantánea, absorben el hueso y generan nuevo tejido. Este proceso reemplaza la misma cantidad de hueso viejo en la matriz ósea. En este caso de remodelación, las células óseas actúan juntas, aunque con procesos ligeramente diferentes en el hueso trabecular que en el cortical. Es bastante llamativo el proceso de remodelación que ocurre en el hueso cortical, donde los diferentes tipos de células óseas se combinan para crear una especie de tuneladoras (conocidas como Unidades Remodeladoras óseas), en las que los osteoclastos van al frente de la agrupación disolviendo el hueso y, por detrás, las células precursoras y los osteoclastos van generando tejido óseo nuevo. Las unidades remodeladoras óseas están conectadas a un vaso

sanguíneo, por lo que tienen suministro de nutrientes en todo momento. Este vaso sanguíneo dará lugar a los canales de Haver en el hueso cortical completamente formado [53, 54].

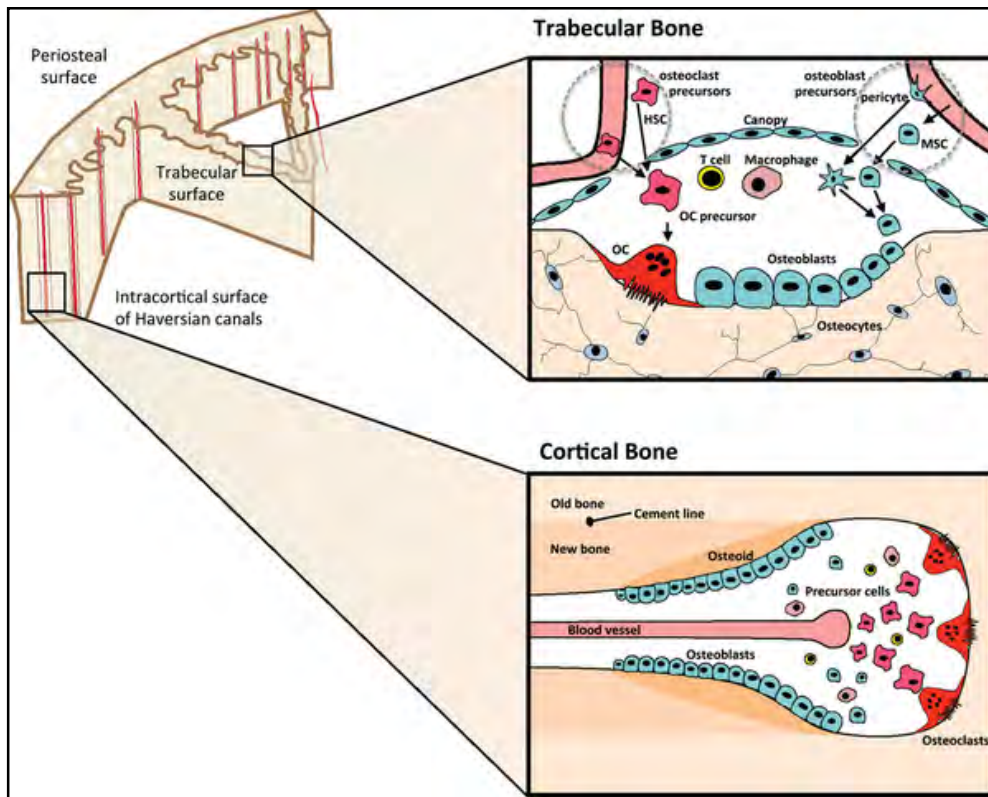


Fig. 3.6. Esquema del proceso de remodelación ósea en hueso trabecular (arriba) y en hueso cortical (abajo) [54].

Por otro lado, el proceso de modelación es muy parecido, sólo que los osteoclastos absorben hueso en un lugar determinado y, al mismo tiempo, los osteoblastos están generando hueso nuevo en otro lugar diferente, con lo que el resultado final será la alteración de la forma original del tejido óseo. Esta transformación permite al tejido óseo crecer y redistribuir la matriz ósea [53].

Existe una relación directa entre el crecimiento de los vasos sanguíneos y la regeneración del tejido óseo. En el momento en el que se produce una fractura, los vasos sanguíneos dañados inducen una cascada de eventos, empezando por la generación de un hematoma y continuando con el reclutamiento de células madre (que se diferenciarán en las subsecuentes células específicas) y fibroblastos en el lugar del daño y que pondrá en funcionamiento el proceso de curación del propio hueso. La regeneración del hueso necesita una adecuada vascularización y la falta de angiogénesis provoca una pérdida importante de la masa ósea [23, 55].

La osteoporosis es una enfermedad degenerativa frecuentemente causada por la edad. Su principal causa es la falta de equilibrio entre osteoblastos (que generan nuevo hueso) y los osteoclastos (que degradan y reabsorben el hueso). Esta enfermedad también suele estar directamente relacionada con los efectos de la menstruación en mujeres de cierta edad y es

inducida por la falta de estrógenos. La osteoporosis provoca una reducción en la masa ósea que conlleva una peor resistencia mecánica y un deterioro de la microestructura ósea que, a su vez, desemboca en una mayor fragilidad y que produce un mayor número de fracturas y roturas óseas. Se estima que en el mundo existen 200 millones de personas sufren de osteoporosis, de las cuales cerca de un 80% son mujeres. Es más, alrededor del 50% de mujeres mayores de 65 años postmenopáusicas sufren, por lo menos, una fractura ósea en su vida con origen osteoporético [18, 30, 31, 56, 57]

Además de la osteoporosis, también existen otras enfermedades que afectan a los tejidos óseos, tales como osteoartritis, osteogénesis imperfecta, tumores óseos o defectos óseos de nacimiento [48, 58]. A pesar de que no son efecto de enfermedades, los procesos traumáticos derivados de accidentes, caídas o impactos también afectan al conformado del tejido óseo, así como otros sucesos que se pueden producir por intervenciones quirúrgicas [43, 59].



3.4. Biomateriales como implantes óseos.

Para intentar sustituir tejidos óseos dañados, tanto por enfermedad, por cirugía o por traumas generados por accidentes, hace ya muchos años que se emplean diferentes técnicas y materiales. Por muchas décadas se han utilizado metales como principales materiales para el diseño y conformación de prótesis óseas, gracias a sus buenas propiedades mecánicas, principalmente, actuando como pieza de alta responsabilidad de carga en diferentes partes del cuerpo humano: vástagos de cadera, rodillas, codos, etc.

Sin embargo, en los últimos años se está desarrollando un mayor estudio en otro tipo de tácticas para acometer la regeneración del tejido óseo, utilizando materiales más bioactivos y que induzcan al propio tejido óseo a crecer y reproducirse dentro de la prótesis, sustituyendo progresivamente el material implantado por tejido óseo, propiamente dicho.

En los siguientes apartados se hará un estudio más detallado de los materiales que regeneran el tejido óseo, mientras que el presente apartado es general sobre todo tipo de materiales utilizados como prótesis óseas.

3.4.1. Principales biomateriales utilizados como repuestos óseos.

Los biomateriales usados para la regeneración en la actualidad se pueden dividir en cuatro grandes grupos: polímeros (tanto sintéticos como naturales), metales, cerámicas y composites (mezclas de los tres anteriores grupos) [33].

El primer grupo de biomateriales corresponde con los polímeros, formados por cadenas de carbonos y con la presencia de otros elementos químicos, como oxígeno, hidrógeno, nitrógeno... Para que un polímero sea utilizado como biomaterial óseo debe poseer ciertas características que lo hagan válido para este cometido, como ser biocompatible y tener ciertas propiedades mecánicas [60].

Tabla 3.4. Propiedades mecánicas de los polímeros más comúnmente utilizados como biomateriales sustitutos de tejidos óseos [21, 24].

Polímero	Módulo de Young, E (GPa)	Resistencia a la Tracción, σ_{UTS} (MPa)	% Alargamiento
Polimetil metacrilato (PMMA)	2,2	30	1,4
Nylon 6/6	2,8	76	90
Tereftalato de polietileno (PET)	2,14	53	300
Ácido poliláctico (PLA)	1,2-3	28-50	2-6
Polipropileno (PP)	1,1-1,55	28-36	400-900
Teflón (PTFE)	0,5	17-28	120-350
Goma de silicona	Hasta 10	2,8	160
Polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE)	4-12	≥ 35	≥ 300
Hueso humano Compacto	15-30	70-150	

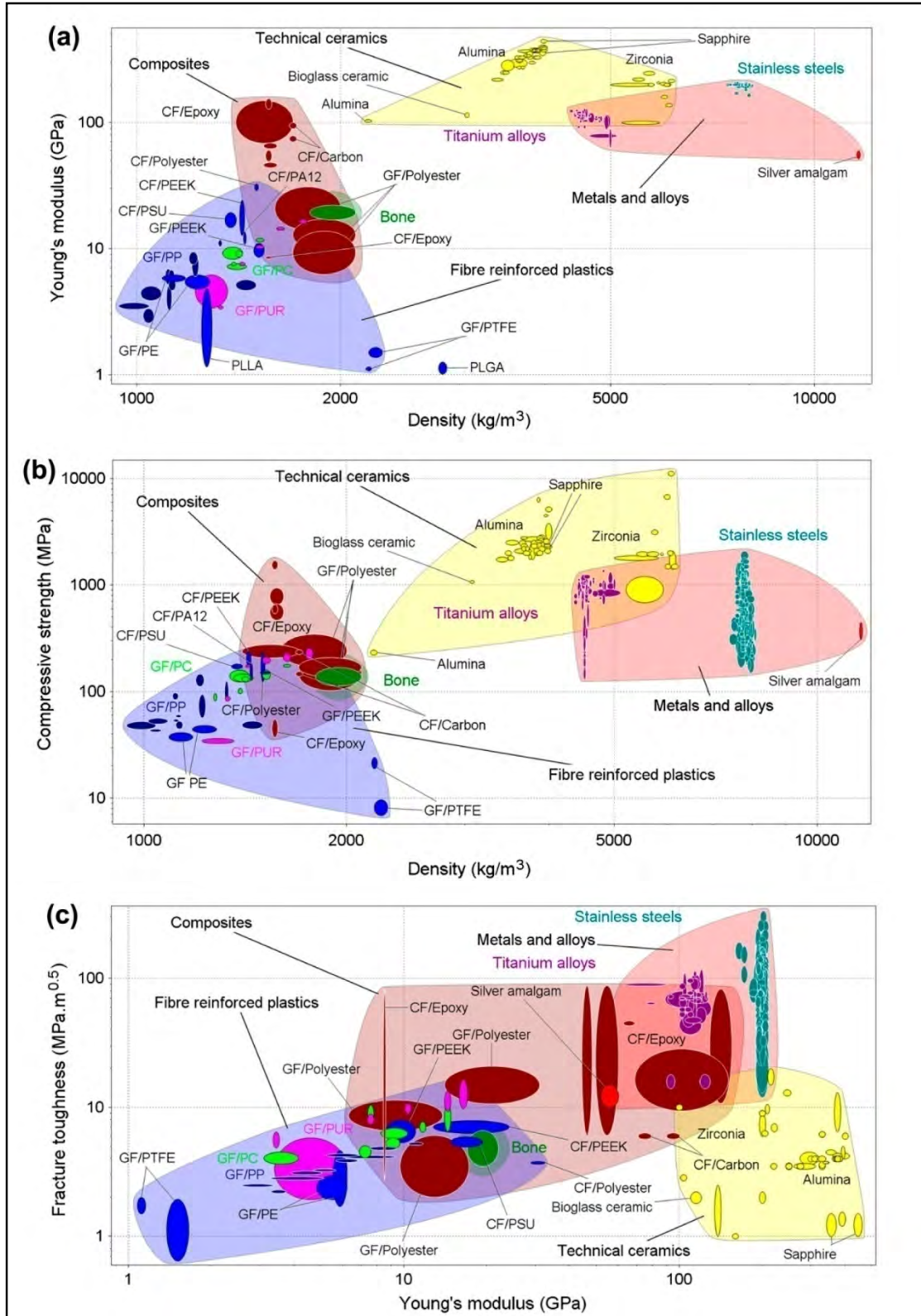


Fig. 3.6. Comparación de (a) la rigidez, (b) la resistencia a la compresión y (c) resistencia a la fractura de diferentes cerámicas (en amarillo), metales y aleaciones (en rosa), plásticos reforzados con fibra (en azul) y composites (en rojo), además del propio hueso humano (en verde).

CF: fibra de carbono. GF: fibra de vidrio. PA12: poliamida 12. PC: policarbonato. PE: polietileno. PEEK: polieteretercetona. PLGA: poliácido láctico-glicólico. PLLA: poliácido láctido. PP: polipropileno. PSU: polisulfona. PTFE: politetrafluoroetileno. PUR: Poliuretano. [61].

El segundo grupo de biomateriales usados como sustitutos del tejido óseo es el grupo mayormente utilizado en la actualidad: los metales. Esto es debido, principalmente, a sus mejores propiedades mecánicas, aunque, al mismo tiempo, también es el grupo de materiales que presenta menor grado de interacción biológica con el cuerpo y pueden presentar problemas de corrosión [33, 39]. Los ejemplos más recurrentes son el acero inoxidable 316L, aleaciones cromo-cobalto o el titanio y aleaciones de éste [21, 33]. El cuerpo humano responde a prácticamente todos los implantes metálicos con un encapsulamiento fibroso de tejido que puede provocar disfunciones en las propiedades mecánicas y biocompatibles de la pieza [17]. Gracias a las propiedades mecánicas tan elevadas que presentan estos materiales son especialmente utilizados para piezas que necesitan soportar cargas, como son los implantes de cadera y rodilla, así como tornillos, alambres, clavos o chapas [21]

Tabla 3.5. Propiedades mecánicas de los metales más comúnmente utilizados como biomateriales sustitutos de tejidos óseos [21, 24].

Material	Módulo de Young, E (GPa)	Límite Elástico, σ_y (MPa)	Resistencia a la Tracción, σ_{UTS} (MPa)	Límite de Fatiga, σ_{end} (MPa)
Acero Inoxidable	190	221-1213	586-1351	241-820
Aleaciones Cromo-Cobalto	210-253	448-1606	655-1896	207-950
Titanio	110	485	760	300
Ti-6Al-4V	116	896-1034	965-1103	620
Hueso humano Compacto	15-30	30-70	70-150	

El tercer grupo de materiales utilizados como biomateriales óseos son los compuestos cerámicos, los que mejores propiedades mecánicas presentan son la alúmina (Al_2O_3) y la zircona (ZrO_2) y aunque son biocompatibles, también son bioinertes [39, 62].

Por otro lado, dentro de las cerámicas utilizadas como repuestos óseos se encuentran los fosfatos cálcicos, donde se engloban tanto el hidroxiapatito como el fosfato tricálcico, ambos compuestos bioactivos, ya que establecen enlaces con el tejido que los rodea.

Tabla 3.6. Propiedades mecánicas de las cerámicas más comúnmente utilizadas como biomateriales sustitutos de tejidos óseos [21, 24].

Material	Módulo de Young, E (GPa)	Resistencia a Compresión, σ_{UCS} (MPa)	Resistencia a la Tracción, σ_{UTS} (MPa)
Alúmina (Al ₂ O)	380	4500	350
Vidrios bioactivos	22	500	56-83
Fosfatos Cálcidos	40-117	510-896	69-193
Hueso humano Compacto	15-30		70-150

Los fosfatos cálcicos son una familia de compuestos cerámicos que incluyen, a su vez, diversas combinaciones químicas, todas ellas formadas por fosfatos y calcio y que, además, pueden incluir agua o hidrógeno [22]. Los diferentes compuestos tienen composiciones muy parecidas pero diferentes estructuras cristalográficas, lo que les otorga propiedades diferentes. Según la bibliografía, es necesario que tengan un ratio Ca:P de 1 o mayor para que puedan ser utilizados como material para regeneración ósea [24]. Estos compuestos llevan siendo utilizados como materiales para regeneración ósea desde hace más de 80 años, siendo dos compuestos los más utilizados: el hidroxiapatito y el fosfato tricálcico en sus dos polimorfos más comunes, el α y el β [63, 64].

Tabla 3.7. Fosfatos cálcicos utilizados para la regeneración ósea [24].

Ca:P ratio	Nombre del mineral	Fórmula química	Nombre químico
1	Monetita	CaHPO ₄	Fosfato dicálcico (DCP)
1	Brushita	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	Fosfato dicálcico dihidratado (DCPD)
1,33		Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ ·5H ₂ O	Fosfato ostocálcico (OCP)
1,43	Whitlockita	Ca ₁₀ (HPO ₄)(PO ₄) ₆	
1,5		Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato tricálcico (TCP)
1,67	Hidroxiapatita	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	
2		Ca ₄ P ₂ O ₉	Fosfato tetracálcico

Finalmente, en el grupo de materiales cerámicos utilizados como sustitutos del tejido óseo también se encuentran los vidrios bioactivos que, además de establecer enlaces con el tejido que los rodea, tienen velocidades de degradabilidad mucho mayores. Se van disolviendo y van dejando paso a que el propio tejido vivo ocupe el lugar que previamente ocupaba este compuesto, a medida que los osteoblastos van reabsorbiendo este material y los osteoclastos crean tejido óseo, propiamente dicho [21]. Estos compuestos cerámicos, los vidrios bioactivos, están considerados como los materiales más bioactivos para la regeneración de tejidos óseos según ciertos autores, entre los que se encuentra su propio creador [26, 34].

La invención del primer vidrio bioactivo ocurrió en 1969 cuando el profesor Larry Hench fue animado por un coronel del ejército de Estados a encontrar un material que fuera capaz de producir el mismo hidroxiapatito que se encuentra en los huesos en lugar de utilizar materiales bioinertes que no interactúan con el tejido vivo más que para crear cápsulas fibrosas [19, 27, 65, 66]. El profesor Hench aceptó el encargo y comenzó a trabajar en el sistema ternario $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$ con un 6% de peso fijo de P_2O_5 , escogiendo una composición muy próxima a un eutéctico terciario, lo que además permitía una fácil producción de la mezcla seleccionada. Y así fue inventado el primer vidrio bioactivo de la historia, denominado 45S5 o *BioGlass*. Los primeros experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostraron que este nuevo material se disolvía y precipitaba posteriormente como capas de hidroxiapatito, permitiendo la unión de este compuesto al tejido óseo [27, 66,-68].

Los vidrios bioactivos pueden establecer enlaces tanto al tejido duro como el blando y promueve la migración (osteoconducción) y diferenciación celular que favorecen el proceso de regeneración natural del hueso. Existen algunas ventajas al utilizar vidrios bioactivos respecto a otros fosfatos cálcicos, como la estimulación de la expresión génica de las células osteoblásticas que modula la osteogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* [60, 69-73]. Aunque también muestran otras desventajas, especialmente hablando respecto de sus propiedades mecánicas, ya que presentan unos valores muy bajos en comparación con las propiedades del hueso humano y que destacan por su fragilidad [70, 74].

La liberación de iones Na^+ y Ca^{2+} y la consecuente deposición de capas de hidroxiapatito carbonatado forma un fuerte enlace químico entre el hueso y el propio vidrio, estimulando el crecimiento óseo [31, 60, 71, 74, 75]. Además de estos iones, ciertos vidrios bioactivos también han sido dopados con otro tipo de iones que ayudan a ejercer diferentes efectos, como mejorar la bioactividad (Ca^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Na^+ , K^+), mejorar las propiedades mecánicas (Al^{3+} , Ga^{3+}), desarrollar el sistema vascular (Cu^{2+}) o fomentar la actividad antibacteriana (Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ga^{3+}) [60, 69, 71, 72, 76, 77].

El proceso químico detallado que ocurre en el proceso de disolución de la mayoría de los vidrios bioactivos con presencia de silicio y la posterior formación de las diferentes capas de hidroxiapatito se puede resumir en cinco fases [66, 71, 78]:

1) Incremento del pH debido al rápido intercambio iónico entre los cationes de la red del vidrio bioactivo y los protones H^+ del medio acuoso, lo que conlleva la hidrólisis de los grupos de sílice que pasan a ser grupos silanoles ($\text{Si}-\text{OH}$).

2) El incremento del pH provoca el ataque de la red vítrea de SiO_2 por los $(\text{OH})^-$, rompiendo los enlaces $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$.

3) Condensación y polimerización de una capa amorfa de SiO_2 de 1 ó 2 μm de espesor sin la presencia de ningún ion Na^+ ni Ca^{2+} .

4) Continúa la disolución del vidrio bioactivo y la migración de los iones Ca^{2+} y $(\text{PO}_4)^{3-}$ a la capa amorfa de SiO_2 creando una capa de fosfato cálcico amorfa.

5) Mientras el vidrio se continúa disolviendo, la capa de fosfato cálcico integra los iones $(\text{OH})^-$ y $(\text{CO}_3)^{2-}$ de la disolución, cristalizando como una capa de apatito hidroxicarbonatado (hidroxiapatito).

Tabla 3.8: Composiciones de los vidrios bioactivos más utilizados (% en peso)
[24, 60, 68, 70, 74, 78, 79, 80]

Vidrio	SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5	B_2O_3	K_2O	MgO	SrO	CuO
45S5	45	24,5	24,5	6					
45S5B1	30	24,5	24,5	6	15				
45S5B2	15	24,5	24,5	6	30				
45S5B3		24,5	24,5	6	45				
1393	53	6	20	4		12	5		
1393B1	34,4	5,8	19,5	3,9	20	11,6	4,9		
1393B2	16,5	5,7	18,8	4,3	38,2	11,5	4,9		
1393B3		5,5	18,5	3,7	56,6	11,1	4,6		
1393B2Sr	15,6	5,4	18,7	4,1	36,1	10	1,2	9	
1393B3Cu		6	19,9	4	52,8	12	5		0,4
2B6Sr		5,7	28,6	4,4	38,8	11,7	1,2	9,6	
6P53B	52,7	10,3	18	6		2,8	10,2		
58S	58,2		32,6	9,2					
70S30C	71,4		28,6						

En la actualidad, una gran mayoría de los diferentes tipos de vidrios bioactivos que existen tienen aplicaciones clínicas prácticas reales, que van desde piezas sólidas (repuestos de piezas del oído medio, defectos de mandíbula, órbitas oculares) a granulados (tratamientos de enfermedades periodontales) [19].

En el año 2005 se introdujo el concepto de vidrio bioactivo mesoporoso, que posee canales mesoporosos y una mayor superficie específica [81], similar al nano-vidrio bioactivo, con un tamaño de partículas menor al vidrio bioactivo común [82].

Además de esta división entre tres tipos diferentes de biomateriales con aplicaciones para la regeneración de tejidos óseos, también existen los compuestos formados por varios elementos de cada uno de los grupos, conocidos como composites, entre los que destacan fosfatos cálcicos bifásicos con PLLA o PLGA [83]; hidroxiapatito con poliamidas [84],

poliuretano [85] o quitosán [86]; o vidrios bioactivos con PDLLA [87], grafeno [88, 89], gelatina [83], PEG [90] o poliuretano [60]. También se han utilizado diversas mezclas de compuestos cerámicos con metales como porcelana dental con oro, platino o plata [34]. Los materiales composites presentan propiedades diferentes a las que tienen cada uno de sus componentes por separado.

A pesar de las buenas propiedades bioactivas, de la gran variedad de vidrios bioactivos que existe en la actualidad y de las múltiples utilidades que, a priori, se les podría dar, es muy llamativa la falta de utilización de este tipo de compuestos a nivel clínico.

3.4.2. Materiales para la regeneración de tejidos óseos.

A partir de este apartado el presente estudio se centrará en los materiales para la regeneración de tejido óseo. Es importante diferenciar este término, que hace referencia a los materiales que promueven el crecimiento del tejido óseo, en contraposición con el término referido a los repuestos o sustitutos óseos. Este es un concepto que se aplica a cualquier biomaterial que pueda sustituir alguna de las funciones del tejido óseo, entre los que también se encuentran los materiales inertes, que no promueven el crecimiento del tejido óseo.

Ya hace muchos años que existen diferentes técnicas para sustituir y regenerar el tejido óseo. Las primeras soluciones se basaban en xenoinjertos, cuando el donante del tejido óseo no es de especie humana, utilizando especialmente tejido proveniente de vacas o cerdos [72, 82]. Otra posibilidad son los aloinjertos, que son los injertos que provienen de otro individuo de la especie humana. En ambos métodos, después de obtener el tejido, se esterilizan y tratan para eliminar todo rastro de células y otros componentes orgánicas de los donantes. Estos dos tipos de aloinjertos suelen ser rechazados por muchos autores debido a los problemas de compatibilidad con el paciente receptor y por la posible transmisión de enfermedades desde el donante al receptor [39, 58, 72].

En cambio, si el paciente es al mismo tiempo donante y receptor (se toma de una parte de su cuerpo para otra parte diferente) este proceso sería considerado un autoinjerto, con lo que se evitarían los problemas previamente mencionados y que afectan tanto a los xenoinjertos como a los aloinjertos. Sin embargo, los autoinjertos también presentan múltiples desventajas, como la reducida disponibilidad del tejido, el coste y el dolor que produce al paciente [39, 90-92].

En las últimas décadas se viene desarrollando en el mundo médico-científico la disciplina de regeneración de tejidos. Se trata de un campo multidisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen y mejoran la función de un tejido o de un órgano completo [26, 33, 37, 93]. Estos es, intentar producir artificialmente, parte o por completo, muchos de los diferentes tejidos del cuerpo humano y, para ello, las estrategias para conseguirlo son muy diferentes en cada uno de los tejidos. Mientras que para reproducir tejido celular cutáneo no es necesario ningún tipo de estructura inicial, no ocurre lo mismo con otros tejidos como el pancreático [94].

La posibilidad de poder crear artificialmente un tejido o de fomentar la regeneración de éste en el interior del cuerpo podría desembocar en la creación de órganos completos partiendo de las propias células del paciente. Este proceso acarrearía grandes ventajas, ya que se reduciría drásticamente la necesidad de donantes de órganos. En la actualidad, en Estados Unidos solamente hay alrededor de 3000 donantes para 30000 pacientes que necesitan un trasplante de hígado [37]. Además, uno de los mayores inconvenientes del trasplante de órganos, que es el rechazo, sería eliminado. En la actualidad, la gran mayoría de los pacientes con órganos trasplantados tienen que ser medicados de por vida para evitar que su cuerpo rechace el órgano trasplantado de otro donante. Si el órgano se construye a partir de las células del propio receptor este problema sería completamente superado.

A diferencia de lo que ocurre con muchos otros tejidos, el tejido óseo es capaz de regenerarse por sí mismo en la mayoría de las fracturas que ocurren diariamente, siendo posible curar el tejido y recuperar las propiedades que tenían antes de las lesiones [51]. Sin embargo, aún existen muchos casos en los que el proceso natural de recuperación del hueso no es suficiente, tales como los denominados defectos críticos. Este término se refiere a aquellos defectos que superen el tamaño máximo de agujero en el que el tejido sano puede recuperar el dañado por medio del proceso natural de recuperación [94].

A pesar de todos estos problemas, el hueso es el segundo tejido más trasplantado en todo el mundo, sólo superado por la sangre [46, 66] con más de 2 millones de trasplantes óseos al año mundialmente [77]. Aunque no hay ningún material en la actualidad comparable al propio hueso natural, hablando en términos de comportamiento biológico o mecánico, se siguen haciendo grandes avances en el campo [94].

En la actualidad, una de las grandes limitaciones de la regeneración de tejidos óseos que se ha detectado en los estudios *in vivo* es que el crecimiento de los vasos sanguíneos en el nuevo tejido suele ser demasiado lento como para permitir la supervivencia del tejido recién creado y seguir el proceso de creación de nuevo hueso [49, 55, 95, 96].

La capacidad de producir angiogénesis es una propiedad que algunos materiales presentan y que se refiere a la inducción de la formación del sistema vascular dentro de la nueva pieza. La angiogénesis puede ser inducida a través de la arquitectura de la propia pieza o incluyendo compuestos químicos o factores de crecimiento con comportamiento angiogénico [51, 97]. Este es un proceso muy importante, ya que el sistema vascular no solamente transporta un flujo compuesto de diversas proteínas y nutrientes, sino que además se encarga de la eliminación de los restos de la respiración celular y, sobre todo, la entrega del alimento fundamental de las células, el oxígeno [51, 93, 98]. El proceso de angiogénesis es un proceso muy complejo en el que se implica la proliferación, maduración y organización de las células endoteliales en capilares que se desarrollarán hasta formar el sistema vascular [21].

A pesar de todos estos inconvenientes y las limitaciones que la regeneración de tejidos óseos muestran en el momento presente y que aún tienen que ser investigadas y superadas, en la actualidad ya se pueden encontrar múltiples aplicaciones en el campo, tales como el rellenado de defectos óseos, fijaciones de fracturas, diversos traumas, tumores, cirugía maxilofacial y espinal o sistemas de liberación de fármacos [99]. También se ha utilizado el óxido de itrio (Y_2O_3) como compuesto en el medio de la red vítrea que se activa en el medio

de un campo magnético, creando energía térmica que puede destruir tejido canceroso en sus proximidades [34, 48].

Prácticamente todos los autores de artículos científicos están de acuerdo en las características y propiedades que una pieza para regeneración de tejidos óseos debe poseer para que sea capaz de regenerar hueso propio:

-Gran porosidad interconectada. Esta propiedad permite a las células desplazarse a lo largo de la pieza y colonizarla, es uno de los requisitos indispensables para muchos autores [62, 78, 100-104]. Poros del tamaño adecuado permiten una buena vascularización de la pieza [105], aunque existe una gran discusión entre los autores sobre cuál es el tamaño adecuado de los poros: mayor que 400 μm [38], mayores de 350 μm para una correcta migración celular [55, 106], mayor que 100 μm como requerimiento mínimo [107], entre 100 y 800 μm y una porosidad abierta mayor del 50% [92], entre 100 y 500 μm [99], mayores que 50 μm , aunque el ideal es de 150 μm [108] y otros autores que afirman que no hace falta que sean mayores que 100 μm [109].

-Bioactividad. En lugar de buscar materiales inertes que no interactúen con el tejido vivo, se intenta encontrar materiales que establezcan enlaces con el propio tejido. Además, se hace especial hincapié en que el material sea osteoinductivo y fomente que las células óseas colonicen toda la pieza [30, 101, 102, 104].

-Superficie química y físicamente apropiada. Existen numerosos estudios que demuestran la importancia de tener una superficie que fomente y permita la adhesión celular. Estos estudios demuestran que no es sólo importante la porosidad en toda la pieza para la colonización celular, sino que también es muy importante la rugosidad, una adecuada topografía y la microporosidad de la pieza [110-115]. Además, cuanto mayor sea la superficie específica de las piezas, mayor biocompatibilidad y mejor colonización celular se obtendrá [116].

-Propiedades mecánicas. A pesar de que no todas las piezas para regeneración de tejidos óseos tienen como función principal la de soportar cargas (por ejemplo, prótesis craneales), una gran mayoría de los autores creen que este también debe ser uno de los principales requisitos para las piezas de sustitución ósea y que, por lo menos, cuenten con una resistencia mínima para poder ser manipulados [62, 100, 101, 107]. Sin embargo, es fácil comprender que existe un problema claro entre las propiedades mecánicas y los grandes valores de porosidad necesarios para estas piezas [117].

-Biodegradable. Esta propiedad de alguno de los biomateriales utilizados para la regeneración ósea es señalado por multitud de diferentes autores como una de las propiedades que deberían tener los materiales destinados a albergar la generación del tejido óseo [52, 62, 78, 102, 104]. Muchos autores también apuntan que es interesante intentar utilizar material se degraden al mismo ritmo que el propio hueso crece dentro de la pieza [38, 78, 100, 107].

Sin embargo, es bastante llamativo que la gran mayoría de productos utilizados a nivel comercial no son degradables o cuentan con un grado de degradación muy lento, como ocurre con compuestos cerámicos como el HA o el β -TCP. Si se utilizan materiales que se degrada

sostenidamente en el tiempo, éstos son fácilmente funcionalizables con la adicción de moléculas o medicamentos que ayuden a la creación de tejido óseo y que son liberados al mismo tiempo que el material se va degradando [26, 58, 102].

Por otro lado, también es destacable que muchos científicos insisten en la necesidad de copiar el diseño de la naturaleza para crear nuevos dispositivos que se asemejen lo máximo posible al diseño de la estructura ósea natural. La complicada estructura intrínseca del hueso con una ordenación jerárquicamente distribuida ha dado un lugar a un material muy ligero al mismo tiempo que con unas propiedades mecánicas muy difícilmente igualables a por ningún invento fabricado o ideado por el ser humano. Los millones de años de la evolución de la vida han permitido la existencia de máquinas naturales con unas propiedades excepcionales [100, 101, 118, 119]. El hueso destaca por la alta porosidad que presenta al tiempo que mantiene muy buenas propiedades mecánicas. Es evidente la relación entre el aumento de la porosidad en material y el correspondiente descenso de sus propiedades mecánicas.

3.4.3. Técnicas empleadas para la conformación de materiales para la regeneración de tejidos óseos.

Para poder contar con una plataforma adecuada para la colonización celular ósea de toda la pieza es necesario poder crear estructuras que cuenten con una gran porosidad e interconexión entre estos poros [120]. Sin embargo, es complicado encontrar un equilibrio entre el valor de la porosidad de la pieza y una buenas propiedades mecánicas al mismo tiempo [77, 100].

De esta manera, existen multitud de técnicas aplicables a la regeneración de tejidos óseos, aunque las principales técnicas empleadas para la creación de las estructuras para para este fin son:

-Método de esponjas poliméricas. Se realizan a partir de la creación de una esponja hecha de polímero con una gran porosidad, esta es sumergida en la suspensión del material cerámico del que se quiere obtener una pieza porosa. La esponja absorbe el material, quedando especialmente impregnado en los poros de la esponja. El proceso de impregnación se repite varias veces para que cale bien. Una vez terminado, la esponja, impregnada de la suspensión, es sometida a un tratamiento térmico en el que el polímero que conformaba la esponja es quemado y el material cerámico que se encontraba en la suspensión inicial es sinterizado, dejando una pieza con una gran porosidad como resultado [20, 83, 99, 116].

-Método de replicación de espuma. De manera parecida al método de las esponjas, en este proceso a la suspensión inicial se le añade un compuesto espumante polimérico, que producirá burbujas de aire en el interior de la suspensión cerámica inicial. Con las susodichas burbujas formadas en el interior de la suspensión, ésta es sometida a tratamiento térmico, durante el cual el espumante polimérico combustiona y el compuesto cerámico se sinteriza [75, 84, 85, 121].

-Congelamiento aleatorio y sublimación (*freeze drying*). Este proceso congela la suspensión inicial de manera aleatoria, con lo que solidifica el hielo con diferentes núcleos de

congelación y se repelen las partículas que se encontraban en el seno de la suspensión, expeliéndolas del hielo recién formado. El momento en el que la pieza se encuentre congelada por completo, se comenzará a sublimar el hielo a vapor, dejando poros en los lugares en los que se encontraba el hielo. Finalmente se obtiene una estructura con una gran porosidad que puede ser sinterizada [62, 86, 87, 101].

-*Robocasting*. Por medio de una punta de jeringuilla, la suspensión es extruida como una especie de tinta con volumen que puede conformar piezas en tres dimensiones, a modo de impresora 3D. Esta técnica puede ser utilizada para compuestos cerámicos o para composites con polímeros (de esta manera la pieza no sería sinterizada) [63, 70, 122, 123].

Además de estos métodos, existen muchos más, entre los que también destacan la sinterización por laser [108, 124], el método sol-gel [19, 29, 83] y el *freeze casting*, el cual se describe de una manera mucho más detallada en el apartado de Métodos experimentales, ya que este es el método que se ha elegido para conformar todas las piezas de este estudio.

3.4.4. Osteogénesis: Osteoconductividad y osteoinductividad.

Osteogénesis es un término que se refiere al proceso por el cual el tejido óseo es inducido a crecer y colonizar una pieza [106]. Sin embargo, dentro de la osteogénesis existen dos niveles diferentes y que es muy importante diferenciar. Por un lado, la osteoconductividad se refiere a la propiedad que tienen ciertos materiales para permitir el crecimiento de los osteoblastos a lo largo de la superficie entre el implante y el tejido. Se considera un material osteoconductor aquel que permite la generación de tejido óseo en la misma superficie del implante y en el interior de sus poros o canales. Están considerados materiales osteoconductivos tanto el hidroxapatito como el fosfato tricálcico [78, 125].

Por otro lado, la osteoinductividad se utiliza para definir materiales que no sólo promueven el crecimiento óseo en la interfase entre el implante el tejido óseo, sino que promueven el crecimiento de hueso nuevo en la totalidad del implante, incluyendo sus partes más internas, como ocurre con el caso del vidrio bioactivo 45S5. Esto significa que las células madre primitivas aún sin diferenciar son, de alguna manera, estimuladas para diferenciarse en células óseas [78, 125].

3.4.5. Ingeniería de tejidos óseos.

Hasta el momento, se ha evitado por completo el término de ingeniería de tejidos óseos. Este concepto acarrea bastantes disputas en el mundo científico y para no entrar en la discusión de si el estudio que se plantea en esta tesis corresponde a la ingeniería de tejidos óseos o no, no se ha utilizado dicho término en este trabajo, hablando en todo momento de la regeneración de tejidos óseos. Sin embargo, para dar un amplio punto de vista sobre este debate, en las siguientes líneas se exponen cuáles son las definiciones que la comunidad científica utiliza al respecto de este término tan de moda como es "ingeniería de tejidos".

La definición más aceptada de ingeniería de tejidos es el campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida hacia el desarrollo de substitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función del propio tejido [37, 126]. El problema de esta definición es que no especifica cuánto hace falta de cada una de estas especialidades para que un trabajo sea considerado parte de la ingeniería de tejidos.

Muchos los autores están de acuerdo en que los materiales para llevar a cabo ingeniería de tejidos óseos tienen que tener las mismas propiedades que los que se utilizan para la regeneración del tejido, tales como un material bioactivo y biodegradable, gran porosidad para la colonización celular y apropiadas propiedades fisicoquímicas en la superficie del material para fomentar el crecimiento del tejido en la pieza [107, 110, 120, 127]. Sin embargo, existe un punto en el que la definición del concepto da lugar a diferentes interpretaciones, y éstas son relativas a la aportación del campo de ciencias de la vida.

Mientras que para algunos autores esto implica que las piezas destinadas a ingeniería de tejidos óseos deben poseer células óseas del propio paciente o de otras fuentes [128] otros consideran que la aportación biológica puede reducirse a factores de crecimiento [120], aunque la mayoría de definiciones incluyen la aportación de tejido ya creado *ex vivo* antes de la implementación en el sujeto, ya sea por medio de células ya maduras o por medio de células madre mesenquimales que aún tienen que diferenciarse [37, 97, 126, 128]. Es decir, la ingeniería de tejidos óseos es un concepto que no es aplicable al diseño o creación de un biomaterial que sea destinado a regeneración de tejido, sino que es necesario que el tejido ya se encuentre desarrollado como tal tejido, con células vivas que un tejido vivo como tal.

Dentro de estas definiciones, el presente trabajo no podría ser considerado como ingeniería de tejidos óseos, ya que no se inserta ningún tipo de células a las piezas antes de ser implantadas *in vivo*. Sin embargo, de toda la bibliografía que se cita en este trabajo, existen multitud de estudios bastante similares al presente, en los que se desarrollan piezas cerámicas de porosidades y degradabilidades similares a las piezas que se diseñaron a lo largo de este estudio. Dichos artículos científicos tienen como título piezas para ingeniería de tejidos óseos [62, 85, 91, 100, 105, 129-132]. Probablemente el presente trabajo podría considerarse, de la misma manera, como ingeniería de tejidos óseos, pero puesto que no se lleva a cabo la inclusión de ningún tipo de células la creación de tejido *ex vivo*, se ha utilizado en todo momento el término "piezas como biocomposites destinados a la regeneración de tejido óseo".

3.5. Marcas comerciales en la actualidad.

En todo el mundo, el tejido óseo es uno de los más trasplantados, como se ha apuntado previamente, y existen multitud de productos comerciales que se encuentran a la venta en el mercado como regeneradores de dicho tejido. En las siguientes líneas se enumeran algunas de las compañías que venden sus productos a nivel internacional y se comentará, brevemente, algunos aspectos de dichas compañías y de sus productos.



IsoTis OrthoBiologics es una compañía estadounidense-neerlandesa que desarrolla productos tecnológicos para la reparación y regeneración ósea y que, ahora mismo se encuentra integrada dentro del consorcio Integra. Su principal producto en el campo es el *OsSatura*, piezas macroporosas sin células integradas que inducen la regeneración del tejido óseo cuando son implantadas en un animal vivo gracias a sus propiedades osteoconductoras y osteoinductivas. Su uso fue aprobado por la Unión Europea en el año 2003 [133, 134].



Co.don es una empresa con base en Teltow, cerca de Berlín (Alemania). Desde el año 1997 lleva manufacturando autoinjertos con osteoblastos bajo el nombre comercial *co.don osteotransplant*. Este producto se utiliza, especialmente, para fracturas complicadas, daños óseos producidos por tumores, pseudoartrosis o para cirugía reconstructiva, como la plástica o recuperación de discos de la columna vertebral [133, 135, 136].



Osiris Therapeutics es una de las empresas líderes en el mercado estadounidense de medicina regenerativa de tejidos, con presencia en el mercado de valores NASDAQ. Tiene su base en Columbia (Maryland, Estados Unidos) y su principal producto para la regeneración

ósea es el *Bio*⁴, una matriz inorgánica que contiene diferentes células y factores de crecimiento. La propia compañía *Osiris* define este producto como osteoconductor, osteoinductor, osteogénico y angiogénico [133, 137, 138].



Zimmer Biomet es una compañía de capital internacional (Estados Unidos, Países Bajos y Alemania) que resultó de las fusiones de diferentes compañías de biotecnología, entre las que destacan *Biomet*, *Merck* y *Zimmer*, aunque además de estas, otra decena de compañías fueron adquiridas por la matriz comercial. Este fabricante dispone de diferentes productos que ayudan a la regeneración del tejido óseo, tales como distintos tipos de cementos óseos (*Refobacin* y *Biomet Bone Cement*), rellenos de huecos por medio de sustitutos óseos basados en fosfatos cálcicos (*Calcibon* líquido y sólido, que deben ser mezclados), piezas porosas de hidroxapatito (*Endobon*) o placas de colágeno reabsorbible (*Septocoll E*) [23, 133, 139-141].



Geistlich Biomaterials es una de las compañías mundiales más importante del campo de los biomateriales, contando con un área específica de cuidados terapéuticos y otra de productos a la venta. En este último apartado destaca el *Bio-Oss*, el producto de regeneración ósea más vendido a nivel mundial y que puede ser comprado en diferentes formatos, como granulado o como compuesto inyectable en el defecto óseo a tratar. La compañía también cuenta con otro tipo de productos aplicables a la regeneración de tejidos, como las membranas *Geistlich Bio* o las matrices celulares *Geistlich Mucograft* [23, 142].



Keramat es la única empresa en España que se dedica al diseño, desarrollo, fabricación y comercialización de biomateriales cerámicos para la regeneración del tejido óseo. Con base en Santiago de Compostela, surgió como un spin off de la universidad en 1999. Tienen diferentes productos enfocados a cada una de las divisiones que engloban: KeraOs para la división dental, Keramedic como producto del departamento de ortotrauma, Cidemerc enfocado al campo de la veterinaria, división de fabricación de piezas a medida y, por último, diferentes servicios que la compañía ofrece a profesionales del campo de los biomateriales [1, 23].







III. Materiales y métodos.



4. Materias primas.

En el presente apartado se hace una pequeña introducción teórica y una descripción de las materias primas utilizadas en esta investigación para la creación de piezas para regeneración de tejido óseo.

4.1. Fosfatos cálcicos.

Entre todos los compuestos cerámicos empleados durante este trabajo hay que destacar los diferentes fosfatos cálcicos utilizados.

4.1.1. Hidroxiapatito (HA).

El hidroxiapatito es un mineral que se puede encontrar en la naturaleza y es especialmente conocido por ser el principal componente de los huesos humanos, siendo de entre todos los fosfatos cálcicos que forman el hueso, el más común [22, 35, 143]. Su fórmula química es $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, con un ratio Ca/P de 1,67. Como mineral se puede encontrar muy fácilmente en minas de fosfatos, apareciendo como mineral secundario en zonas de actividad hidrotermal en vetas de pegmatitas. Suele encontrarse con otros minerales como el talco y la titanita [44, 92].

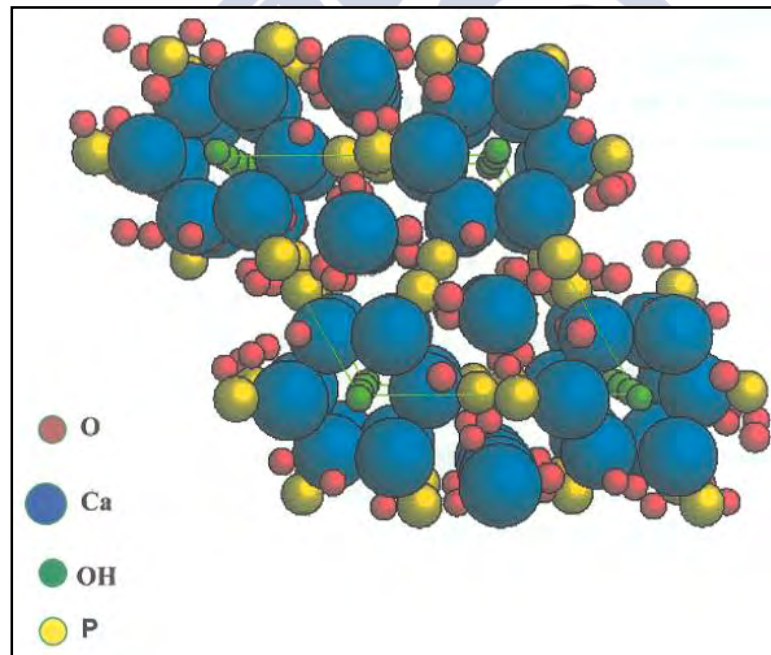


Fig. 4.1. Representación de la estructura y de la celda unitaria del hidroxiapatito [144].

Al tratarse del principal componente de los huesos es uno de los compuestos cerámicos más utilizados en la regeneración de tejidos óseos, aunque también se utiliza como compuesto adsorbente a nivel industrial [22]. A pesar de ser biocompatible e incluso ser

osteointuctivo es muy poco osteogénico y de muy lenta o prácticamente nula disolución y reabsorción en el propio cuerpo humano [39, 84, 86, 91, 108, 128, 145, 146].

En cuanto a sus propiedades físicas, cabe destacar su temperatura de sinterización, proceso necesario para dotar a la pieza de propiedades mecánicas mínimas. Esta temperatura se encuentra en el intervalo entre 1000 °C y 1200 °C aunque puede empezar a transformarse en TCP alrededor de los 1150 °C [39, 147]. Aún así, aunque sea sometido a un proceso de sinterización, el hidroxiapatito sigue siendo un material con unas pobres propiedades mecánicas, siendo especialmente frágil [148].

4.1.2. Beta fosfato tricálcico (β -TCP).

El fosfato tricálcicos es uno de los primeros materiales en ser utilizado en para la regeneración de tejidos óseos *in vivo* gracias a su gran similitud con el hueso nativo [44, 64]. Su fórmula química es $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y es muy usado en la industria como aditivo alimentario, conocido como E341, utilizado como corrector de la acidez y como antioxidante. También se añade a algunas pastas de dientes como abrillantador de dientes [149, 150].

Desde el punto de vista de material para la regeneración de tejidos óseos, el β -TCP se ha identificado como un material biocompatible y osteointuctivo [22, 44, 86], muy similar al HA, aunque con diferente ratio Ca/P. Presenta unas propiedades bioactivas mayores que el HA, haciendo que el tejido vivo interactúe mejor con él y siendo más soluble en agua y biodegradable, aunque bastante por debajo de otros compuestos cerámicos, como los vidrios bioactivos [63, 86, 146]. En cuanto a su estabilidad térmica, el β -TCP se transforma en α -TCP alrededor de los 1180 °C y éste se transforma a α' -TCP a los 1480 °C [151]. Respecto a la fase α de TCP cabe destacar que existen autores que afirman que no es útil para la ingeniería de tejidos óseos por la aparición de fracturas en la microestructura, ya que este compuesto es metaestable a temperatura ambiente e irá transformándose paulatinamente en el compuesto β con las consecuentes tensiones internas que puede generar en el interior del propio material [152]. Mientras otros autores mantienen que es un material biocompatible y perfectamente válido para regenerar hueso que además se disuelve más rápido que la fase β [153, 154].

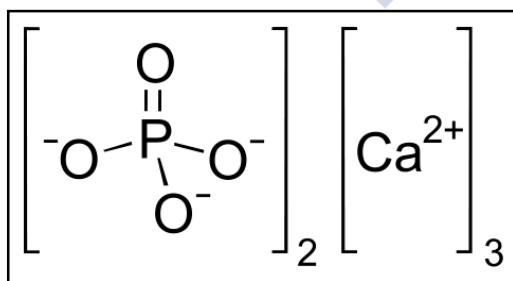


Fig. 4.2. Representación del fosfato tricálcico[150].

En cuanto a las propiedades mecánicas del β -TCP, éstas son bastante pobres, especialmente si se comparan con las del hueso natural. También se han realizado estudios

sobre la mejora de propiedades mecánicas que presenta el β -TCP con la inclusión de otros compuestos, tales como el SiO_2 , LiCl o el SrO [152, 155].

4.1.3. Fosfatos cálcicos bifásicos.

Cuando se habla de compuestos fosfatos cálcicos bifásicos se entiende que es la mezcla de hidroxiapatito con beta fosfato tricálcico [156]. El HA y el β -TCP tienen propiedades diferentes, resumiéndose en que el HA tiene mejores propiedades estructurales y mecánicas como soporte para la colonización celular mientras que el β -TCP es más biocompatible e induce a la proliferación y diferenciación celular, por lo que las diferentes proporciones utilizadas de cada uno de los dos compuestos determinarán las propiedades del fosfato cálcico bifásico final [146, 157]. Puesto que ambos compuestos tienen diferentes temperaturas de sinterización, la temperatura para la mezcla es proporcional a las cantidades utilizadas de cada componente aunque también hay que tener en cuenta las transformaciones cristalográficas que se producen [158]. La proporción más utilizada es 60/40 (HA/ β -TCP) en volumen [156].

Para realizar esta investigación se utilizó la mezcla de HA y β -TCP (60/40) ya preparada en esta proporción y suministrada por la compañía *Trans-Tech* (Adamstown, Maryland, Estados Unidos). También se ha utilizado tanto HA como β -TCP por separado para algunos experimentos de caracterización previa de las materias primas, siendo ambos componentes obtenidos a través del mismo suministrador que la mezcla de HA/ β -TCP.

4.2. Vidrios Bioactivos (BG).

Durante todo el estudio que se presenta, se ha trabajado con cuatro tipos de vidrios bioactivos.

4.2.1. Vidrio Bioactivo 45S5 (BG 45S5).

Como se ha dicho previamente, este fue el primer vidrio bioactivo inventado y también el primer material artificial capaz de establecer un enlace químico con el propio hueso [66]. En uso clínico está aprobado por el gobierno federal de Estados Unidos desde 1985 [27, 89] y es el vidrio bioactivo más estudiado, tanto *in vitro* como *in vivo* [65, 78, 108]. Entre sus principales ventajas cabe destacar el poder osteoinductivo y osteoconductor [76, 78]. Además, ha sido descrito como el más bioactivo de todos los vidrios gracias a su gran velocidad de disolución y posterior precipitado como hidroxiapatito carbonatado [66, 89, 159]. En la actualidad se utiliza en implantes dentales y del oído medio [66, 159]. Además de como 45S5 está registrado comercialmente por sus descubridores con el nombre de *BioGlass* [22].

Además de los problemas de resistencia mecánica que afectan a toda la gama de vidrios bioactivos, otra de las mayores desventajas que conlleva el uso del vidrio bioactivo 45S5 está relacionada con el tratamiento térmico que necesita para pasar de estado granulado a conformarse como una pieza sólida por medio de la sinterización. Al llevar a cabo este proceso, antes de llegar a la temperatura de sinterización (~1000°C) se llega a la temperatura de cristalización del vidrio (~600°C), con lo que deja de ser un vidrio y parte del compuesto pasa a tener una estructura cristalina [66, 122]. Este hecho provoca que sus propiedades biocompatibles sean mucho menores y un descenso muy pronunciado de la velocidad de disolución y posterior precipitado como hidroxiapatito [78, 104, 122, 160, 161]. Comúnmente se identifica estas magníficas propiedades biocompatibles como material del BG 45S5 con la rápida velocidad de formación de hidroxiapatito como precipitado [159]. A pesar de esto, en muchos experimentos se sigue sinterizando y cristalizando el compuesto a pesar de estos inconvenientes [89, 108]. Para evitar que se produzca esta cristalización se han propuesto diferentes mecanismos para dotar al vidrio de robustez, como la sinterización sol-gel, la adición de polímeros o la modificación de la composición del propio vidrio, dando lugar a otros tipos diferentes de vidrios bioactivos que no cristalizan hasta alcanzar temperaturas mucho más elevadas [24, 78].

Como ya se ha apuntado anteriormente, la composición del *Bioglass* 45S5 es, en porcentaje en peso, SiO₂ (45%), Na₂O (24,5%), CaO (24,5%) y P₂O₅ (6%) [78].

4.2.2. Vidrio Bioactivo 1393 (BG 1393).

Partiendo del problema de cristalización que el BG 45S5 presentaba al ser sometido al proceso de sinterización, se decidió modificar la composición de éste para intentar solventar este inconveniente. De esta manera se inventó el vidrio bioactivo 1393, con un mayor contenido de SiO₂ y con la presencia modificadores de la red vítrea como K₂O y MgO. Estas

modificaciones permiten que exista un intervalo de temperaturas entre la temperatura de sinterización y de cristalización, con lo que este compuesto sigue siendo un compuesto vítreo después de ser sinterizado. Sin embargo, las propiedades biocompatibles no son tan buenas como en el caso del 45S5, además de que se disuelve y precipita como hidroxiapatito de una manera más lenta. [74, 75, 78]. Al igual que el vidrio bioactivo 45S5, los productos del 1393 han sido aprobados por la administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*US Food and Drugs Administration*) [161].

El vidrio bioactivo 1393 está compuesto por SiO₂ (53%), Na₂O (6%), CaO (20%), P₂O₅ (4%), K₂O (12%) y MgO (5%) en peso [78].

4.2.3. Vidrio Bioactivo 1393B1 (BG 1393B1).

Ciertos autores sostienen que los vidrios bioactivos borados se convierten más rápidamente en hidroxiapatito y de una manera más completa que los vidrios silicatados, además de aportar angiogénesis para la creación del nuevo sistema vascular [72, 162]. Este tipo de compuestos parten tanto del vidrio bioactivo 45S5 como del 1393 y sustituyen parte del SiO₂ por B₂O₃ [74, 75, 78]. De esta manera el 1393B1 reemplaza un tercio del SiO₂ del 1393 original, el 1393B2 sustituye dos terceras partes y el 1393B3 intercambia todo el dióxido de silicio por el trióxido de diboro [74, 78]. Por otro lado, algunos autores también transmiten sus inquietudes al respecto de introducir en un organismo vivo concentraciones tan grandes de boro, un elemento que no se encuentra presente en grandes cantidades en nuestro cuerpo y que puede producir toxicidad [78, 80, 163].

La composición del vidrio 1393B1 es en porcentaje en peso: SiO₂ (34,4%), Na₂O (5,8%), CaO (19,5%), P₂O₅ (3,8%), K₂O (11,7%), MgO (4,9%) y B₂O₃ (19,9%) [78].

4.2.4. Vidrio Bioactivo 2B6Sr (BG 2B6Sr).

Los vidrios bioactivos con presencia de estroncio intentan combinar el poder regenerativo óseo de los vidrios bioactivos junto con las propiedades metabólicas del estroncio: es anabólico (fomenta la creación de estructuras moleculares complejas a partir de otras más sencillas) y anti-catabólico (que inhibe la descomposición de las moléculas complejas en otras más sencillas). También se han obtenido resultados que indican que el estroncio provoca la mejor actividad metabólica de los osteoblastos, con mayor proliferación y actividad de fosfatasa alcalina *in vitro* [30, 77, 79].

El vidrio bioactivo 2B6Sr aúna las propiedades que presentan los compuestos borados y las de los iones de estroncio, ya que su composición es B₂O₃ (38,8%), CaO (28,6%), K₂O (11,7%), SrO (9,6%), Na₂O (5,7%), P₂O₅ (4,4%), MgO (1,7%), porcentajes en peso [79].

Todos los vidrios bioactivos utilizados en la realización de esta investigación fueron suministrados por la compañía *SEM-COM Inc.* (Toledo, Ohio, Estados Unidos).

4.3. Zeolitas ZSM-5.

Las zeolitas son aluminosilicatos que poseen una estructura microporosa cristalina muy conocidos por su capacidad para hidratarse y deshidratarse fácilmente [22, 145]. De hecho, el propio nombre zeolita proviene del griego hervir (zeo, ζέω) y piedra (lithos, λίθος), al observarse como este mineral desprendía vapor de agua al calentarse. Hasta octubre de 2015 habían sido identificados 206 tipos de zeolitas en función de su estructura, siendo posible encontrar 40 de ellos en la naturaleza. Las restantes zeolitas son creadas artificialmente [164, 165].

Aunque la mayor parte de la producción mundial de zeolitas se dedica a la venta como absorbente comercial [22, 166], la investigación está demostrando que pueden ser utilizados para otros usos, como catalizador (en el refinado de petróleo o la producción de naftas) o como detergente sin productos fosfatados [167-169]. Además, también se ha demostrado la biocompatibilidad de alguna especie de zeolitas, como ocurre con el ZSM-5 [170, 171].

El hecho de que presenten una estructura microporosa provoca que las zeolitas ZSM-5 posean una superficie específica muy grande en comparación con otros compuestos cerámicos. Este hecho ha permitido que se investiguen los usos de este aluminosilicato como portador de medicamentos [170] y como material apto para la regeneración de tejidos óseos [171, 172].

Este último aspecto se ve reforzado por su buena estabilidad térmica, química y mecánica [173, 174]. Diversas publicaciones hablan de su buen comportamiento como recubrimiento de prótesis para actuar como fase intermedia entre el metal y el tejido humano [145, 175] afirmándose incluso que se trata de un material osteoconductor y osteoinductor [173]. Otros usos muy interesantes son como portador de oxígeno a través de zeolitas fluoradas [129] o funcionalizadas con nanopartículas de plata y zinc para actuar como agentes antimicrobiales [171].

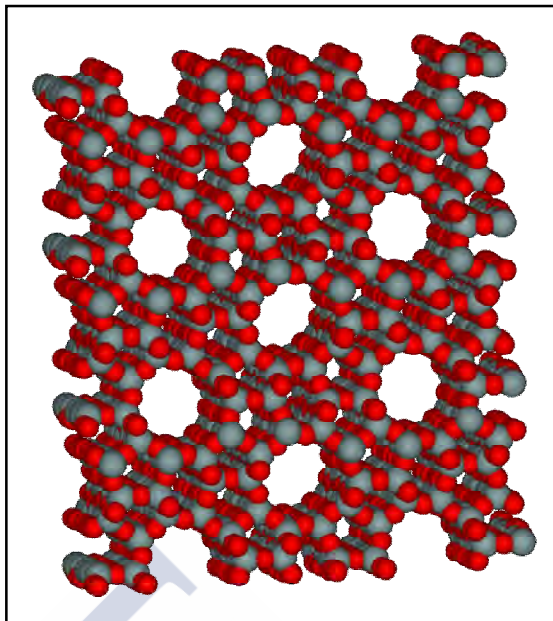


Fig. 4.3. Representación de la estructura molecular de una zeolita tipo ZSM-5 [176].

Para la realización de esta investigación se adquirieron zeolitas tipo ZSM-5 a la compañía *Zeolyst International* (Valley Forge, PA, Estados Unidos). El tipo concreto que se adquirió es el que la compañía denomina CBV 5524G, con un ratio $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ de 50, forma nominal del catión de amonio y un contenido en peso de 0,05% de Na_2O .



4.4. Seda.

La seda es una fibra compuesta de diferentes tipos de aminoácidos que se produce de manera natural por una gran variedad de especies de insectos y arácnidos, incluyendo hormigas, pulgas y grillos [52, 177]. Hasta el momento se han identificado 7 tipos diferentes de fibra de seda [24]. Lleva siendo utilizada como biomaterial desde hace miles de años en China, especialmente como elemento para suturar heridas, y en la actualidad también se está utilizando como tal, especialmente como liberador de medicamentos y para la regeneración de tejidos óseos, aunque también es utilizado para otros tejidos, como el cutáneo, el cartilaginoso o como ligamentos [24, 101, 177]. A pesar de que la seda producida por las arañas suele tener mejores propiedades mecánicas, es muy complicada su obtención, ya que no es nada fácil tener granjas de arañas para su recolección: unas se matan a las otras [177, 178].



Fig. 4.4. Esquema del ciclo de vida de un gusano de seda. Empezando por la parte superior:

1. La polilla hembra pone varios huevos pequeños.
2. Una pequeña oruga negra sale de su huevo.
3. La oruga come hojas de morera y crece. Este proceso dura 4 meses.
4. La oruga teje un capullo de seda alrededor de sí misma.
5. En el interior del capullo, la oruga se transforma en una crisálida.
6. Para su posterior uso como hilo de seda, es necesario deshacer el capullo.
7. La crisálida se transforma en una mariposa, que sale fuera del capullo.
8. Las mariposas adultas se aparean, y el ciclo vuelve al número 1 [179].

El tipo de seda más utilizado por el ser humano es el que se obtiene del conocido vulgarmente como "gusano de la seda", científicamente identificado como el *Bombyx mori*, una especie de insecto lepidóptero originaria del norte de Asia y que es mucho más fácil de criar que las arañas [22, 52, 177]. Este gusano de seda (aunque propiamente se debería de hablar de una oruga) produce seda compuesta de dos tipos de proteínas: la fibroína y la sericina. En el momento en el que la oruga crea su capullo lo hace con un sólo hilo de fibroína

(de hasta 1 km de longitud), que en el momento de ser expulsado del cuerpo es recubierto por la sericina, que permite compactar las dos proteínas en el capullo. Sin embargo, si se deja que la oruga termine su ciclo, romperá una parte del capullo para salir, fragmentando este único hilo. Por ello, cuando se quiere obtener la seda, el capullo es hervido con la oruga en su interior. El proceso de hervir también provoca la eliminación de la sericina, que es soluble en agua. De esta manera se obtiene un único y largo hilo de fibroína de seda. Este es el tipo de proceso utilizado en la industria textil [103, 180].

Como ya se ha dicho previamente, desde el punto de vista químico-estructural, la seda consiste principalmente en dos tipos de proteínas. Por un lado se encuentra la sericina, que es hidrofílica y soluble en agua y actúa como el pegamento que mantiene las proteínas juntas. Corresponde al 25-30% del peso inicial del capullo [43, 103]



Fig. 4.5. Estructura interior de la seda, con la diferenciación entre la sericina y la fibroína, que forma pequeñas fibras en el interior de las vainas de sericina. A la izquierda, imágenes SEM de la fibroína [181].

Por otro lado, el segundo tipo de proteína que compone la seda es la fibroína, que es la parte estructural y que consiste en cadena de polipéptidos pesados (~ 350 kDa) y ligeros (~25 kDa) conectadas por un enlace disulfuro [22, 103]. Esta fibroína está compuesta por más de 15 variedades diferentes de aminoácidos, pero son tres los mayoritarios: glicina (~43%), alanina (~30%) y serina (~12%) [43].

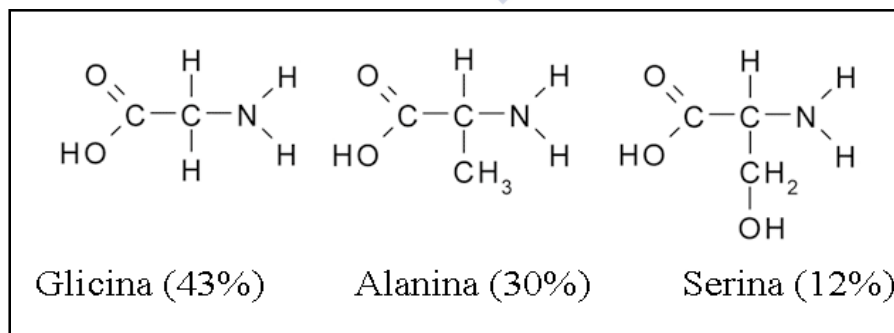


Fig. 4.6. Principales aminoácidos que conforman la fibroína de la seda. Entre paréntesis el porcentaje de presencia aproximado de cada aminoácido en la fibroína de la seda.

La presencia de regiones predominantemente hidrofóbicas en la propia seda con secuencias que se repiten son las responsables de la formación de estructuras secundarias de láminas β cristalinas que controlan las propiedades mecánicas de la seda, al mismo tiempo tenaz y elástica. La resistencia de las fibras de seda es mayor que el Kevlar. La resistencia última de tensión es de 740MPa [52, 103, 177]. Por otro lado, la fibroína de seda puede ser transformada en diversas formas: gel, películas, fibras o esponjas, haciendo de la seda un material altamente versátil [52, 55].

En cuanto al comportamiento biocompatible de la seda, cabe destacar que ha sido muy estudiada a lo largo de los años. Según las conclusiones obtenidas es importante remarcar que no sólo es un material biocompatible óptimo [31] sino que además es bioactivo, haciendo que el organismo responda e interactúe con ella, con una degradación controlada y muy bajas respuestas inmunogénicas e inflamatorias [31, 43, 101]. A mayores de permitir la adhesión celular a su estructura o inducir a la mineralización de las células óseas, también se sospecha que es un material angiogénico, con lo que fomenta el desarrollo del sistema vascular en los tejidos, uno de los mayores problemas que los implantes óseos degradables actuales presentan [101, 177].

Un punto muy importante del proceso de degradación de la seda es que se produce de forma proteolítica, a diferencia de otros polímeros como el PLA o el PGA, que lo hacen hidrolíticamente, generando subproductos acidificantes del medio. La seda no produce ningún tipo de subproducto tóxico en su proceso de degradación en el medio corporal [43].

Para la realización de este estudio se adquirieron capullos de gusanos de seda convencionales, de la especie *Bombyx mori* enviados desde China.

5. Métodos experimentales.

En este apartado se detallan los métodos y procedimientos que se han utilizado durante el presente trabajo. Se describe la manera a proceder y se divide en dos grandes grupos. En el primer apartado se encuentran las técnicas del procesamiento y conformación de los materiales para darles nuevas propiedades. Por otro lado, la segunda parte de este apartado está dedicado a las técnicas analíticas que se han utilizado para la caracterización de los materiales.

5.1. Métodos de procesamiento.

Los métodos de procesamiento que se han utilizado durante la realización de este estudio son aquellos que han servido para conformar los materiales, así como la preparación de disoluciones para ser utilizadas en otras pruebas analíticas.

5.1.1. Freeze casting.

El *freeze casting* es un proceso por el cual se puede transformar una suspensión de materias primas en una estructura lamelar vertical, con un grosor de paredes y espacio entre ellas variable, pero de magnitud de decenas o centenares de micras. Además de mostrar una gran porosidad, los materiales conformados a través del proceso de *freeze casting* también presentan una enorme interconectividad entre los poros, propiedades que se adaptan perfectamente a las necesidades de los biomateriales para la regeneración de tejidos óseos para permitir la colonización celular en el interior de la pieza [100, 182, 183].

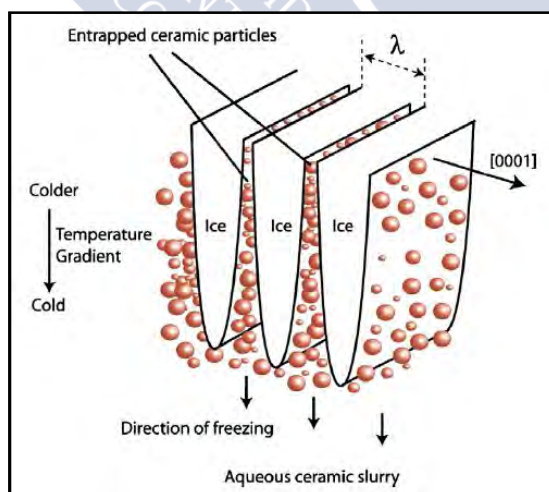


Fig. 5.1. Esquema principal del fenómeno que se produce durante el proceso de *freeze casting*. Las paredes de hielo avanzan en el sentido del gradiente térmico y, a su vez, expelen las partículas, que se van conformando con la estructura lamelar característica de este proceso [121].

Este proceso, relativamente nuevo [100, 182], es bastante simple a la vez que adaptable a una gran variedad de materiales y permite tener control sobre multitud de

parámetros que afectarán a la conformación final de la estructura [100, 182]. En la naturaleza se puede observar este fenómeno en el proceso de congelación del agua del mar, que forma plaquetas hexagonales horizontales de hielo puro, expeliendo cualquier impureza que el agua original pudiera tener: sal, microorganismos, contaminantes, etc. Este mismo principio ocurre en el proceso *freeze casting*. Al aplicar una corriente fría unidireccional se congela el agua y ésta, al solidificarse, crea paredes de cristales de hielo en el sentido del gradiente térmico de decenas de micras de ancho. A la vez que el agua se congela, los sólidos son expelidos y las partículas también crean paredes verticales en el espacio que no ocupa el hielo recién creado. Este proceso otorga a las piezas finales una propiedades mecánicas especiales. Al tratarse de una estructura de paredes verticales, las piezas presentan una resistencia mecánica a la compresión en el eje vertical mucho mayor que la obtenida a través de otros medios de fabricación de implantes óseos con porosidades similares [100, 183].

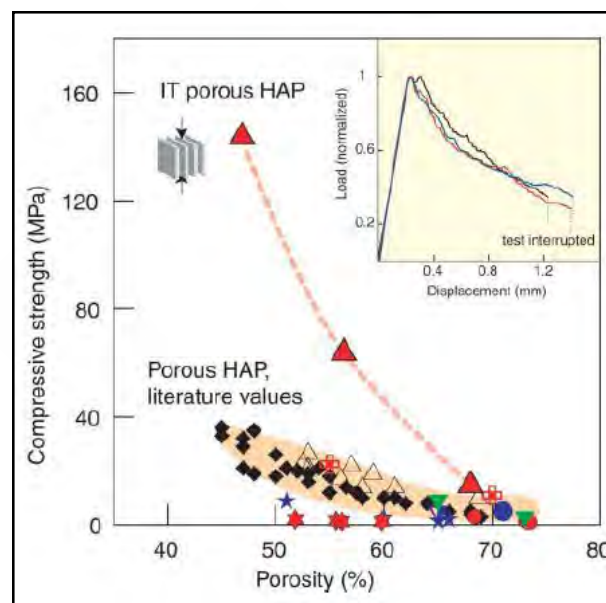


Fig. 5.2. Valores de resistencia mecánica a la compresión en función de la porosidad de piezas fabricadas a partir de diferentes procesos con hidroxiapatito. Los triángulos rojos corresponden a los resultados obtenidos con piezas conformadas a través del proceso de *freeze casting* [100].

Para llevar a cabo el proceso de *freeze casting* se comienza con el vertido de la suspensión dentro de un molde cilíndrico vertical, normalmente hecho de teflón o PVC [184]. En la suspensión se suelen añadir pequeñas cantidades de polímeros como aglutinantes, dispersantes o lubricantes, para dotar, tanto a la suspensión como a las partículas sólidas, de las propiedades físicas ideales para crear las piezas deseadas, como se analizará más adelante [184].

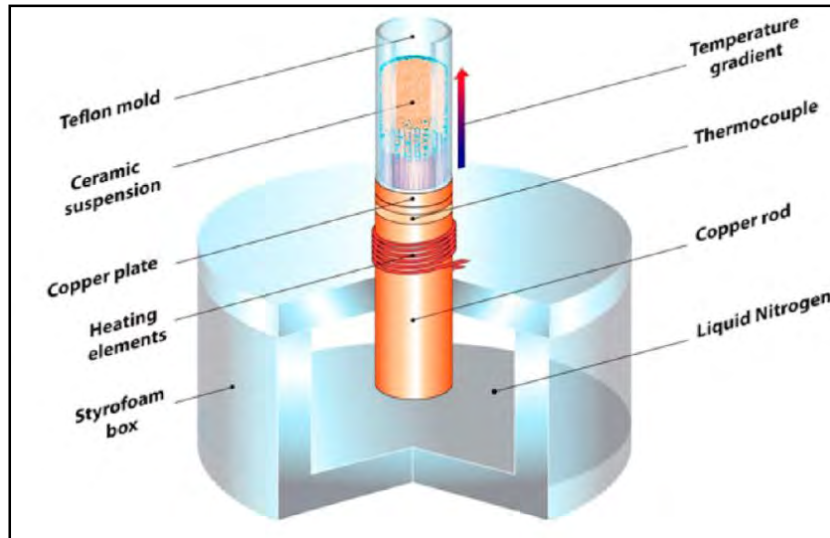


Fig. 5.3. Esquema del montaje para llevar a cabo el proceso de *freeze casting* [185].

Este molde de teflón se encuentra sobre una base de cobre en contacto con nitrógeno líquido, a unos $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, en la parte inferior del dispositivo. Además, entre el molde de teflón y el nitrógeno líquido y en contacto con la base de cobre se encuentra un termopar y una resistencia eléctrica que están conectados a un controlador que regula la velocidad de enfriamiento del proceso.

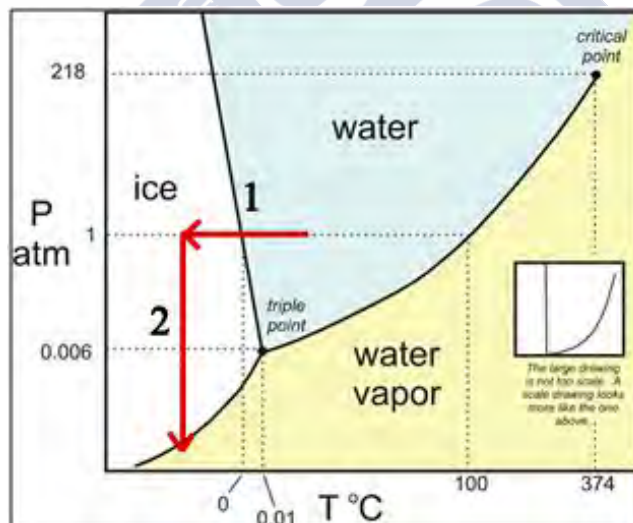


Fig. 5.4. Esquema de los cambios de fases que experimenta el agua durante el proceso de *freeze casting*. 1: congelación por medio de la bajada de la temperatura a presión constante y, 2: sublimación del hielo en vapor por medio de la bajada drástica de la presión manteniendo una baja temperatura [186].

Así, la suspensión se congela y se convierte en una pieza sólida. Una vez que el proceso de congelación ha terminado, la pieza es sacada del molde y se procede a sublimar el hielo producido en condiciones de muy baja presión y temperatura durante más de 72 horas para, de esta manera, evitar la aparición de cualquier tipo de defecto que pueda afectar a las propiedades mecánicas después del proceso de sinterizado de la pieza [66]. Una vez

terminado este proceso se obtiene una pieza con la estructura lamelar descrita previamente. Cuando se utilizan compuestos cerámicos, normalmente suele ser necesario un proceso de sinterización para dotar a la pieza cerámica de las propiedades mecánicas requeridas para su función. Es importante destacar que es necesario desechar la parte inferior de la pieza obtenida por *freeze casting*, ya que el inicio del proceso de congelación en el agua crea primero una pequeña parte más densa que da paso a otra con estructura celular y que finalmente se desarrolla en la estructura lamelar, la parte que corresponde a unos cuatro quintas partes de la pieza final como se puede observar en la figura 5.5 [100].

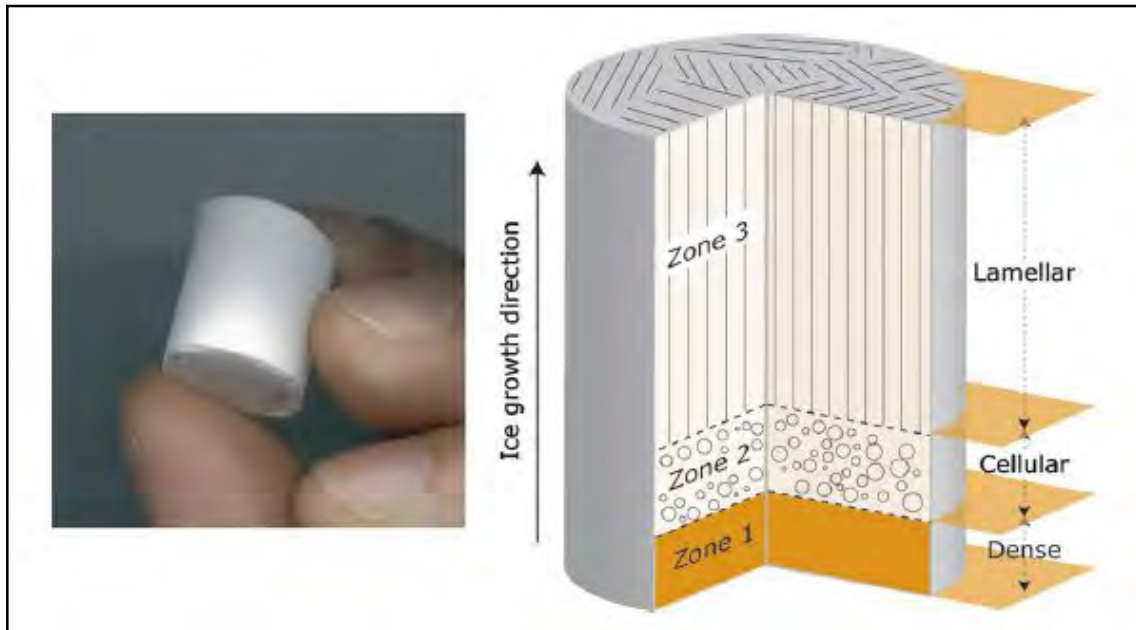


Fig. 5.5. Fotografía (izquierda) y esquema de la estructura interna (derecha) de una pieza obtenida a través de *freeze casting*. En la imagen de la derecha se puede observar que la parte inferior del cilindro no presenta estructura lamelar [100].

Existen diversos estudios sobre como varios parámetros del proceso influyen en las propiedades de las piezas obtenidas, especialmente dos variables muy importantes:

-Contenido sólido inicial de la suspensión: A mayor contenido sólido, la porosidad de la pieza final descenderá, y con ello, también aumentarán las propiedades mecánicas de la pieza final. También, cuanto mayor es el contenido sólido, las paredes lamelares de la estructura final tendrán un mayor grosor y el tamaño de los poros entre dichas paredes será más pequeño [100, 131, 182, 184, 187].

-Velocidad de enfriamiento: Cuanto mayor es la velocidad de enfriamiento, más rápido se crean las paredes de la estructura lamelar, lo que a su vez provoca que éstas tengan un espesor menor y que las propiedades mecánicas finales de la pieza sean mayores, ya que, aunque las paredes sean más estrechas, también habrá un mayor número de paredes para el mismo valor de porosidad. Una mayor velocidad de enfriamiento también hace que la longitud de los canales entre las paredes sea menor [100, 121, 182, 188].

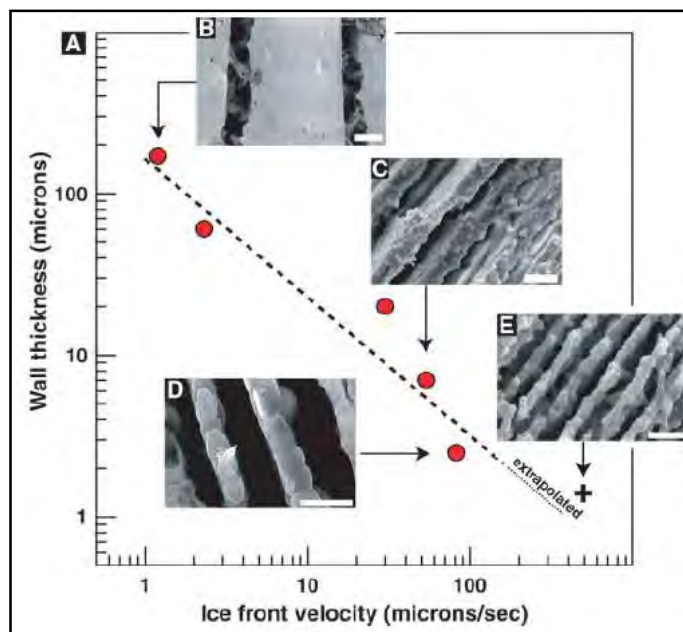


Fig. 5.6. Relación entre la velocidad de enfriamiento y el grosor de las paredes resultantes en el proceso de *freeze casting* [182].

Además de estos dos principales factores, también existen diversos estudios sobre cómo otros parámetros también influyen en la conformación final de las piezas, como la viscosidad inicial de la barbotina, el pH, la dispersión de las partículas o el tamaño de éstas [183, 185, 189].

El disolvente utilizado en la suspensión de materias primas también influye en la conformación de las piezas finales. Mientras que el agua forma una estructura de paredes lamelares, otros disolventes orgánicos crean diferentes tipos de conformaciones como, por ejemplo, el canfeno ($C_{10}H_{16}$), que crea una curiosa estructura dendrítica [131, 161] o la adición de glicerol y dioxano al agua, que crean estructuras rectangulares y celulares, respectivamente [184].

Además, al crear la suspensión de materias primas también es necesario añadir aditivos poliméricos que doten a la suspensión de las propiedades óptimas para la futura creación de la estructura lamelar. En concreto, durante el presente estudio se han utilizado tres diferentes tipos de aditivos en cantidades determinadas en de acuerdo con los datos extraídos de la bibliografía [184, 185, 189, 190]:

-Lubricante. Para la realización de estos experimentos se ha usado polietilenglicol con una masa molecular media de 300 Da (PEG-300), proporcionado por *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). En estos experimentos se ha utilizado el 1% del peso total de los compuestos sólidos de la suspensión inicial. El lubricante tiene como función romper las cadenas alineadas del aglutinante a la vez que desplegar las cadenas de dispersante que se encuentran enrolladas. Además, también confiere a la suspensión la viscosidad deseada para que el frente de hielo producido por el gradiente de temperaturas se desplace a las velocidades deseadas.

-Dispersante. Se ha utilizado como dispersante el compuesto químico conocido comercialmente como Darvan CN, proporcionado por *Vanderbilt Minerals LLC* (Norwalk, Connecticut, Estados Unidos), en un 1% del peso de los materiales sólidos en la suspensión. El dispersante se utiliza para distribuir las partículas de una manera homogénea a lo largo de toda la suspensión. También permite que dicha suspensión mantenga su estabilidad después de un tiempo y que ésta no precipite.

-Aglutinante. Se ha elegido el compuesto Aquazol 50 (al 40% en peso), proporcionado por *Polymer Chemistry Innovations Inc.* (Tucson, Arizona, Estados Unidos) y la cantidad añadida es un 5% en peso del total de los compuestos sólidos de la suspensión. El aglutinante actúa como una especie de pegamento entre las partículas en los momentos entre el final del proceso de sublimado del hielo de las piezas de *freeze casting* recién conformadas y su sinterizado. Cabe recordar que en esos momentos las piezas son simples partículas sin ningún tipo de cohesión de unas entre otras, a excepción del propio aglutinante, por lo que este compuesto polimérico es muy importante para poder manipular las piezas después del proceso de sublimado sin que las piezas colapsen.

Si la suspensión de materias primas del proceso de *freeze casting* está compuesta por materiales cerámicos, estos aditivos poliméricos son quemados durante el proceso de sinterización al que las piezas son sometidas posteriormente, en el que se alcanzan temperaturas muy por encima de los 400 °C, a la que todos estos compuestos orgánicos combustionan.

La estructura interna que se obtiene por medio del proceso de *freeze casting* presenta unos tamaños de poros que pueden resultar adecuados para la proliferación de células óseas en su interior, por lo que diferentes autores ya han propuesto previamente esta técnica para la fabricación de piezas para la regeneración de tejido óseo y para otras aplicaciones, como aislamiento acústico, materiales piezoeléctricos, sensores ultrasensibles o materiales con autorecuperación [100, 188, 189, 191, 192].

El proceso de *freeze casting* ha sido probado con multitud de diferentes materias primas en la suspensión inicial, como alúmina [182, 190], hidroxiapatito [100, 184, 187], vidrios bioactivos [161], zeolitas [166], dióxido de titanio [183], grafeno [192] o incluso mezclas de compuestos cerámicos con polímeros, como la mezcla de fosfatos cálcicos con quitosano y ácido láctico [193].

5.1.2. Sinterización.

La sinterización es el proceso de consolidación de las partículas de un compacto por debajo de su temperatura de fusión. Este proceso térmico permite que las partículas queden unidas a través de la difusión atómica que se produce entre las superficies de contacto de las propias partículas y, de esta manera, presentan unas propiedades mecánicas mucho mejores que las partículas antes de dicho proceso [194, 195].

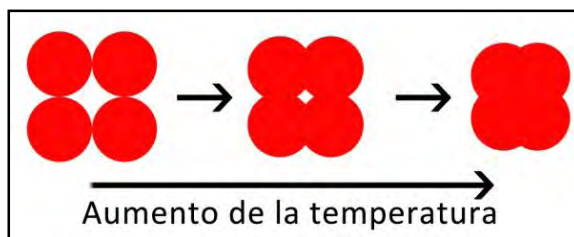


Fig. 5.7. Esquema del proceso de sinterización en las partículas al aumentar la temperatura.

El proceso de sinterización de las piezas fabricadas a través del proceso de *freeze casting* fue llevado a cabo usando un horno de mufla *Thermolyne* (*Thermo Scientific*, Waltham, Maryland, Estados Unidos), aumentando la temperatura desde la temperatura ambiente hasta 400 °C a una velocidad de 5 °C por minuto. Una vez alcanzada esta temperatura, se mantiene durante dos horas y después se vuelve a aumentar la temperatura hasta la temperatura objetivo (determinada para cada diferente composición) a una velocidad de 5 °C por minuto. La temperatura objetivo se mantiene durante cuatro horas para permitir la completa sinterización de las partículas cerámicas.

5.1.3. Proceso de disolución de seda.

El protocolo que se ha seguido para disolver la seda, aunque con pequeñas variaciones, es el descrito por D.N. Rockwook *et al.* [103], y es el mismo proceso seguido por multitud de otras publicaciones que utilizan la seda como biomaterial [18, 31, 52, 59, 101-103, 107, 178, 196-198].

El primer paso es cortar los capullos de seda con unas tijeras convencionales en pequeños trozos de, aproximadamente, 0,5 x 0,5 cm hasta juntar alrededor de 8 gramos de seda. El siguiente paso es la eliminación de la sericina presente en los capullos de seda, para dejar únicamente la fibroína de la seda.

Para ello se calienta un litro de agua y, una vez que esté cerca del punto de ebullición se añade Na_2CO_3 para crear una disolución 0,02M. Se añaden los trozos de los capullos de seda a la disolución de carbonato sódico y se dejan en la disolución mientras hierve durante 30 minutos. La disolución es removida ligeramente con una espátula cada 10 minutos.

Una vez transcurridos los 30 minutos se retira la seda de la disolución, se lava con agua ultrapura y la seda se vuelve a introducir en una nueva disolución 0,02M de carbonato sódico cerca del punto de ebullición durante otros 30 minutos. Una vez que se ha repetido el proceso de sumergir la seda en la disolución de carbonato sódico tres veces en diferentes disoluciones durante 30 minutos en cada ocasión, el material obtenido se retira finalmente, se lava en agua ultrapura de nuevo y se introduce en el interior de una estufa a 60 °C durante 24 horas para que se seque. En este momento solo queda la fibroína de la seda, ya que la sericina se ha eliminado durante este proceso. La fibroína de la seda puede ser almacenada indefinidamente en un lugar seco, aunque se recomienda guardarla en una bolsa plástica o similar, para evitar cualquier tipo de contaminación.

El proceso de disolución de la seda en agua empieza con el pesado de la cantidad de seda que queda después de eliminar la sericina. Se prepara una disolución de LiBr 9,3M en una proporción de 10 ml de disolución por cada gramo de fibroína de seda. Dicha solución de bromuro de litio debe ser vertida sobre la seda y dejar que se disuelva durante 4 horas dentro de una estufa a una temperatura de 60 °C. Una vez transcurrido este tiempo, toda la fibroína de la seda se encuentra disuelta, mostrando un color ámbar característico. Visualmente, debe ser una disolución homogénea y bastante viscosa, pero sin rastros de las fibras de seda.

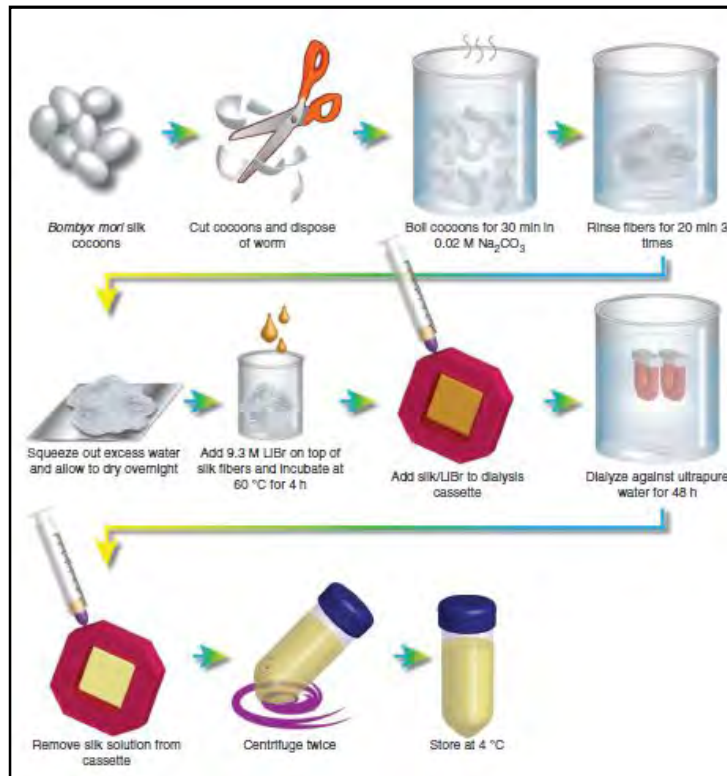


Fig. 5.8. Esquema del protocolo para la disolución de la seda [103].

Una vez que la fibroína se encuentra disuelta en la disolución de bromuro de litio, el siguiente paso es realizar una diálisis para eliminar los iones de bromo y litio y, al mismo tiempo, hidratar la disolución. Para ello se han utilizado tubos dializadores, dentro de los cuales se han introducido, aproximadamente, 10 ml de la disolución de seda con bromuro de litio. Posteriormente, el tubo es cerrado y sumergido en 200 ml de agua ultrapura. Este agua tiene que renovarse cada cierto periodo de tiempo, especialmente al inicio del experimento, cuando el gradiente de concentración de los iones es mayor. Para la realización de nuestro experimento, tomando como el minuto 0 la inmersión de los tubos por primera vez en el agua ultrapura, el agua se cambió a los 10 minutos, 20 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 8 horas y 14 horas.

Como método para comprobar que todos los iones de litio y bromo han sido eliminados de la disolución se añade una pequeña cantidad (0,1-0,2 gramos) de nitrato de plata (AgNO_3) al agua en el que se ha realizado la última diálisis del proceso. Si aún quedan iones de bromuro, al añadir iones de plata, ambos precipitarían como bromuro de plata,

compuesto no soluble en agua, y con lo que sería apreciable una gran turbidez en el agua. Si no se observa turbidez en el agua es porque el nitrato se ha disuelto por completo sin presencia de iones de bromuro en la disolución.



Fig. 5.9 . Fotografía de los tubos dializadores con seda en el interior en proceso de eliminación del bromuro de litio de la disolución de seda.

La disolución de seda obtenida se puede concentrar por medio de otro proceso de diálisis. En este caso, se introduce la disolución de seda en los tubos dializadores y se sumergen en una disolución de PEG 10.000 10% peso durante diferentes periodos de tiempo (en torno a una hora) para obtener diferentes concentraciones.

Una vez finalizado el proceso de diálisis, la seda disuelta en agua se retira del interior de los tubos de diálisis. La disolución de seda debe ser almacenada en frío ($\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) y se recomienda que se utilice en los días siguientes, ya que puede auto polimerizarse y convertirse en gel, especialmente cuando la concentración de seda en la disolución es alta.

5.1.4. Reticulación de la disolución de seda.

Una vez que la fibroína de la seda está disuelta en agua, toda la cadena proteínica que conformaba la fibroína de la propia seda se encuentra rota en pedazos más pequeños que están dispersos en el agua. Para conseguir formar de nuevo una fibra que pueda funcionar como una red que sujete toda la estructura es necesario reticular todos estos pedazos de la fibrina. Este proceso es más conocido por su nombre en inglés, *crosslinking*.

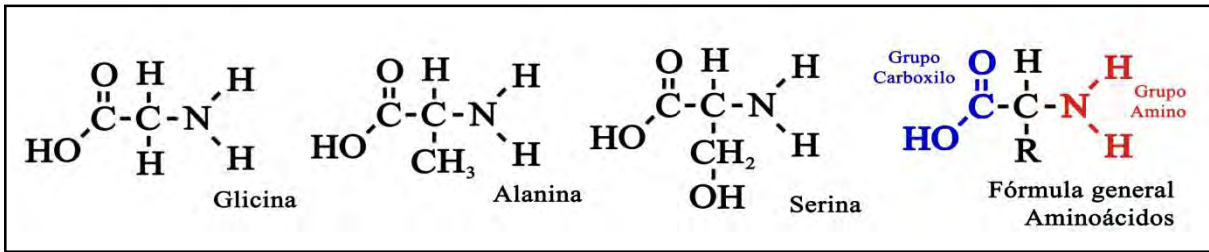


Fig. 5.10. Esquema de los principales aminoácidos presentes en la fibroína de la seda.

Al tratarse de aminoácidos, éstos presentan un grupo amino en un extremo ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) en el otro extremo. Estos grupos carboxílicos son activados por medio de una reacción con NHS (N-hidroxisuccinimida) y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Estos compuestos químicos activan el grupo carboxilo y que reacciona con la amina principal de otro aminoácido, así se establece un enlace amida y se forma una cadena peptídica entre los diferentes aminoácidos [178, 198].

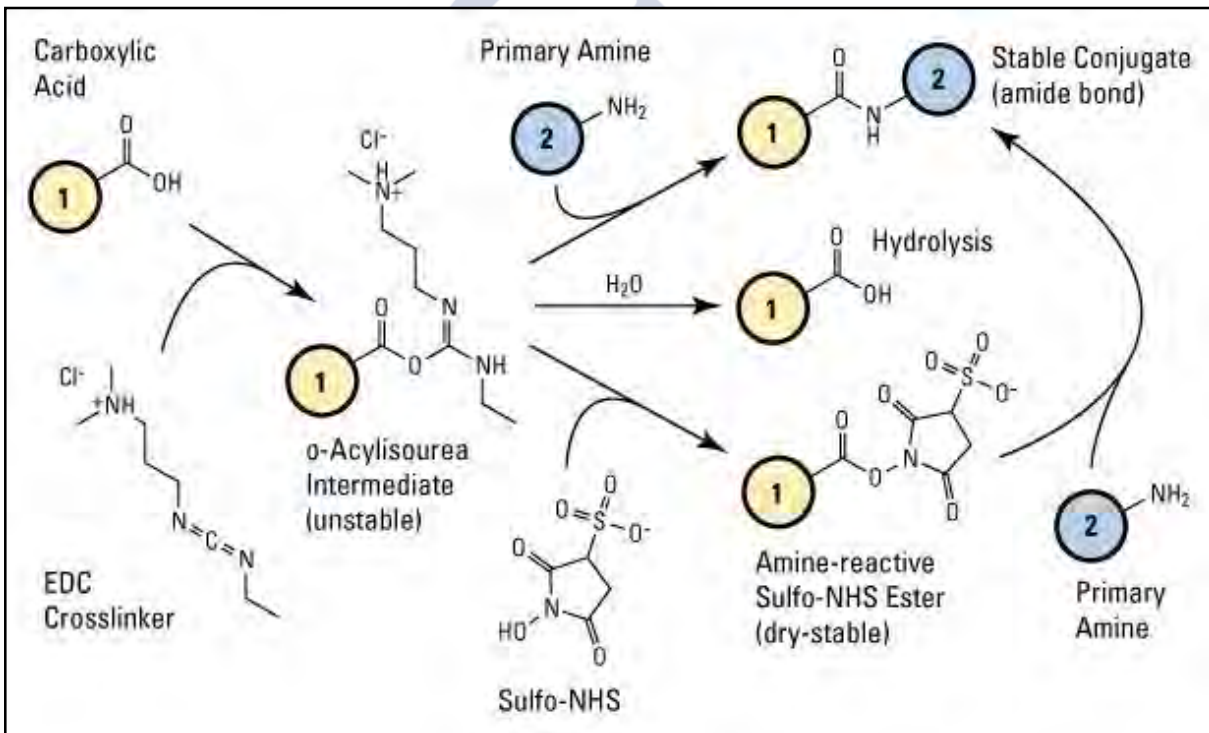


Fig. 5.11. Esquema del proceso de reticulación de los aminoácidos presentes en la seda por medio de la adición de los compuestos químicos EDC y NHS [199].

La disolución para llevar a cabo la reticulación de los aminoácidos obtenidos de la seda se prepara a temperatura ambiente con una concentración de 25mM de EDC y de 5mM de NHS en un disolvente base compuesto de un 90% de etanol y un 10% de agua.

Las piezas que se han obtenido del proceso de *freeze casting* y que contienen fibroína de seda serán reticuladas por medio de este proceso. Una vez que dicho proceso de *freeze casting* ha finalizado (incluyendo la posterior sublimación del hielo), las piezas se sumergen

en la disolución reticuladora y se aplica un ligero vacío para extraer las burbujas de aire que puedan quedar dentro de la estructura lamelar de las piezas. Se deja llevar a cabo la reacción de reticulación durante 15 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, las piezas se retiran de la disolución y se lavan con etanol primero y con agua ultrapura después. Seguidamente se dejan secar en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

5.1.5. Cortado de las piezas en discos.

Una vez que ya se han obtenido las piezas cilíndricas enteras después del proceso de *freeze casting*, para la mayoría de análisis que se van a llevar a cabo es necesario cortar las piezas en discos. Para ello se cortan con una sierra circular en piezas de 4 mm de alto. En este proceso se descarta la cuarta parte inferior de los cilindros originales ya que, como se ha visto en la descripción del proceso de *freeze casting* previamente, esta parte inferior no presenta estructura lamelar. Después de cortarlas, las piezas son pulidas en ambas caras para que sean lo más paralelas posible.



Fig. 5.12. Proceso de cortado de las piezas en discos.
Instalaciones en el Lawrence Berkeley National Laboratory en Berkeley (California, Estados Unidos)

El equipamiento utilizado para este procedimiento es una sierra circular *IsoMet Low Speed Saw* (Buehler, Lake Bluff, Illinois, Estados Unidos).

5.1.6. Preparación del suero fisiológico simulado.

La inmersión en suero fisiológico simulado (también conocido como SBF por sus siglas en inglés: *Simulated Body Fluid*) es una de las técnicas *in vitro* más comúnmente utilizada en los análisis de biomateriales para la regeneración del tejido óseo. Este procedimiento sirve para medir la velocidad de disolución de las piezas y, según diversos autores, también mide la bioactividad de dicho material [68, 200, 201]. Esta técnica fue propuesta por Kokubo *et al.* [200] y ha sido utilizada en multitud de estudios previos [20, 68,

70, 75, 88, 124, 152, 153, 201]. Este suero posee una concentración iónica muy parecida a la del plasma sanguíneo, como su propio nombre indica, e intenta simular el comportamiento que los biomateriales tendrían dentro del cuerpo humano. A través de la formación de apatito producida por medio de este método se puede hacer una estimación de la bioactividad del material en sí, así como de su biodegradabilidad y sus propiedades de unión al hueso nativo [60, 68, 200]. De esta manera, esta bioactividad *in vitro* se toma como un indicador de la futura bioactividad y la capacidad para unirse al tejido vivo que la pieza tendrá *in vivo* [153, 162, 200].

Los vidrios bioactivos, que son biodegradables, forman una capa de apatito sobre su superficie cuando son sumergidos en el suero fisiológico simulado, mientras que la alúmina, que no se degrada, no forma apatita en este SBF [200]. La formación de este apatito se puede observar a través de SEM (microscopía electrónica de barrido), TEM (microscopía electrónica de transmisión), XRD (difracción de rayos X) o a través de FTIR (espectroscopía de la transformada de Fourier).

Tabla 5.1. Concentración iónica en mM y valores del pH del suero fisiológico simulado (SBF) y del plasma sanguíneo [200].

	Na ⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻	pH
SBF	142.0	147.8	4.2	5.0	2.5	1.5	1.0	0.5	7.40
Plasma sanguíneo	142.0	103.0	27.0	5.0	2.5	1.5	1.0	0.5	7.2-7.4

A este método también le han surgido detractores que afirman que la disolución propuesta por Kokubo *et al.* se encuentra supersaturada y que la precipitación de hidroxiapatito es sólo una cuestión de tiempo y que finalmente ocurrirá independientemente del material que sea sumergido en la disolución [202]. El fosfato dicálcico dihidratado precipita apatito en la disolución, aunque no se una al tejido óseo *in vivo* y, justo en lado opuesto, el β -TCP no siempre hace precipitar apatito mientras que sí es capaz de unirse al tejido vivo [78, 200, 202]. Partiendo de las limitaciones que esto plantea, algunos autores han sugerido disoluciones con concentraciones iónicas ligeramente diferentes al SBF original para intentar mejorarlo [200, 203].

Teniendo en cuenta todo esto y tomando los experimentos en SBF como un indicador no definitivo para el futuro comportamiento *in vivo*, se ha seguido el protocolo propuesto por Kokubo *et al.* para la realización de estos experimentos [200].

Para preparar la disolución se empieza con un volumen de, aproximadamente, 700 ml de agua ultrapura que ha sido previamente calentada hasta 36,5 °C en un recipiente de plástico. Durante todo el proceso hay que evitar los recipientes de vidrio y utilizar recipientes de plástico que no tengan arañazos ni grietas, ya que la nucleación del hidroxiapatito puede inducirse en estos lugares y debe evitarse.

Dicho recipiente de plástico se sumerge en un baño de agua a 36,5 °C para que la disolución se mantenga a esta temperatura durante todo el proceso. También se introduce un

agitador para homogeneizar y facilitar la disolución de los compuestos químicos. Además, se introduce dentro del recipiente plástico un electrodo de pH, que nos indicará el pH de la disolución durante el proceso. Una vez que se ha establecido el montaje del equipo, se puede comenzar a añadir los compuestos químicos a la disolución en el recipiente en el orden establecido en la tabla 5.2. Es importante no añadir un compuesto hasta que el anterior haya sido completamente disuelto. De esta manera se adicionan todos los compuestos hasta llegar al noveno, el Tris. Antes de agregar este compuesto, el volumen total de la disolución se lleva a 900 ml con la adición de más agua ultrapura.

Tabla 5.2. Cantidad de reactivos y orden en el que deben ser añadidos a la disolución para la preparación del suero fisiológico simulado. [200].

Orden	Reactivo químico	Cantidad
1°	NaCl	8,035 g
2°	NaHCO ₃	0,355 g
3°	KCl	0,225 g
4°	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,231 g
5°	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,311 g
6°	1.0M HCl	39 ml
7°	CaCl ₂	0,292 g
8°	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9°	Tris [(HOCH ₂) ₃ CNH ₂]	6,118 g
10°	1.0M HCl	0-5 ml

El Tris (abreviatura utilizada comúnmente para el compuesto orgánico tris (hidroximetil) aminometano) provoca un gran cambio en el pH y el pH no puede sobrepasar el valor de 7,45 en ningún momento de la preparación del suero fisiológico. Así, se va añadiendo poco a poco este compuesto químico, esperando a que se disuelva y, al mismo tiempo prestando atención a la lectura del pHmetro. En el momento en que el pH llegue a 7,42, se dejará de añadir Tris y se agregará HCl en pequeñas cantidades sin bajar de 7,40. La disolución se mantendrá en este rango de pH de 7,40-7,45 adicionando Tris y HCl alternativamente y poco a poco, hasta que se haya añadido toda la cantidad de Tris. El valor final del pH tiene que ser 7,40 exacto. Se retira el electrodo del pHmetro y el agitador del recipiente, siendo enjuagados para que no arrastren iones con ellos. Se vierte la disolución en un matraz aforado de 1000 ml, se enjuaga el recipiente plástico y se añade agua ultrapura hasta la marca de volumen. En ese momento el suero fisiológico simulado estará listo para ser utilizado.

Una vez preparado, el suero fisiológico simulado tiene que ser almacenado en un recipiente plástico en el interior de un refrigerador a una temperatura entre 5 y 10 °C. Debe ser utilizado en un periodo que no sobrepase los 30 días contados desde el momento de la preparación

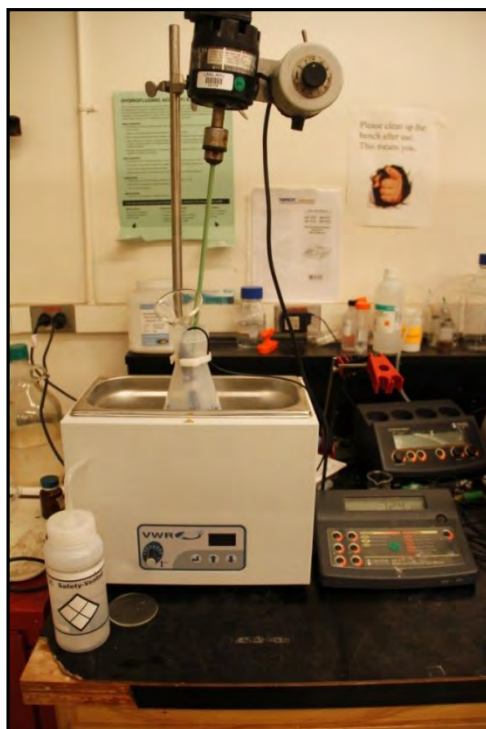


Fig. 5.13. Recipiente plástico de un litro de capacidad sumergido en agua a 36,5 °C y con agitación continua. A la derecha se puede observar el pHmetro que indica el pH de la disolución en todo momento.



5.2. Métodos analíticos.

A continuación se detallan los métodos experimentales que han sido utilizados para medir alguno de los parámetros que se quieren analizar.

5.2.1. Densidad real por medio de picnometría.

Para la medición de la densidad real de las materias primas en polvo se utilizó un picnómetro *AccuPyc 1330* (*Micromeritics*, Atlanta, Georgia, USA) con helio. La muestra inicial se pesa y con ese valor conocido el aparato mide el volumen de helio que se inserta en el interior del picnómetro. Con ello, se puede obtener el volumen que ocupa el polvo y con el valor del peso y el volumen que ocupa la muestra, se calcula fácilmente la densidad real del compuesto [204].



Fig. 5.14. Picnómetro de helio utilizado para la medición de las densidad real de las materias primas utilizadas durante la investigación.

5.2.2. Tamaño de partícula por sedimentación.

La medición del tamaño de partículas se realizó por medio de vía húmeda con el granulómetro *Sedigraph 5100 V. 3.02* (*Micromeritics*, Atlanta, Georgia, Estados Unidos). Este equipo se basa en la ley de Stokes por la que la velocidad de caída de las partículas en la suspensión de un líquido con propiedades conocidas viene determinada por el tamaño de éstas [17, 23]. La ecuación de Stokes determina [205]:

$$\tau = 2 \cdot r^2 \cdot g \cdot \frac{\rho_p - \rho_f}{\eta} \quad (\text{Ecuación 5.1})$$

En donde: V_s : velocidad de sedimentación de la partícula;
 r : radio equivalente de la partícula;
 g : aceleración de la gravedad;
 ρ_p : densidad del sólido en suspensión;
 ρ_f : densidad del fluido;
 η : viscosidad del fluido.

La ley de Stokes indica que las partículas más grandes caen más rápido, siendo fácil calcular el radio equivalente de las partículas (ya que la mayoría de las partículas no son esféricas, este es el radio que tendrían si lo fueran). La velocidad de caída de las partículas se mide con un haz de rayos X de baja energía que se encuentra en una posición fija, al igual que el receptor de rayos X al otro lado de la muestra. La muestra se encuentra dentro de una celda que se mueve para medir la concentración de las partículas en la celda y el tiempo [17, 23]. El equipo determina la distribución a lo largo de la celda y del tamaño de las partículas, entre 100 y 0,5 μm de diámetro esférico equivalente. Si hubiera partículas fuera de este rango, éstas se contarían en el porcentaje acumulado.

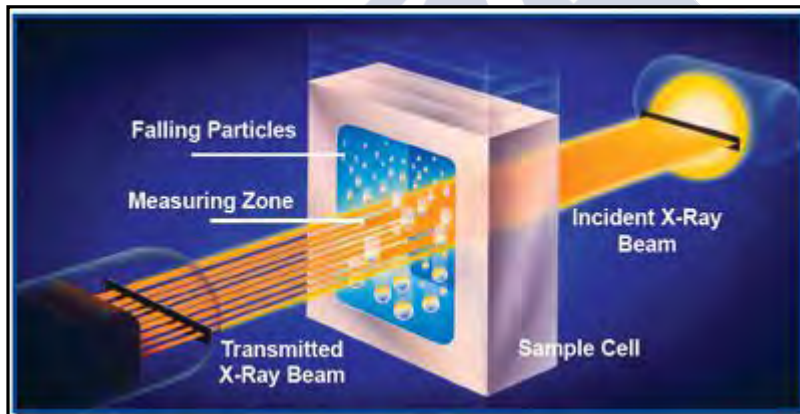


Fig. 5.15. Esquema del funcionamiento de la celda del *Sedigraph 5100* con las partículas en su interior [206].

5.2.3. Medición de superficie específica.

La superficie específica de un compuesto se define como el área de las partículas de dicho compuesto por unidad de masa. Para la realización de este experimento se utilizó el equipo *Gemini 2360* (*Micromeritics*, Atlanta, Georgia, Estados Unidos).

Este aparato calcula la superficie específica de la muestra basándose en el método BET (*Brunauer-Emmett-Teller*) que relaciona área superficial del sólido en cuestión con la cantidad de volumen de N_2 que es adsorbido como monocapa en la superficie de éste, según la ecuación:

$$P_0 - P = 1 - \frac{V}{V_M} - 1 \cdot \frac{V}{V_M} \cdot \frac{P}{P_0} \quad (\text{Ecuación 5.2})$$

En donde:

- P: presión sobre la muestra;
- P_0 : presión de vapor de saturación;
- V: volumen adsorbido;
- V_M : volumen de la monocapa;
- C: constante.

A partir de la ecuación anterior, ésta se puede simplificar en:

$$A_{\text{BET}} = V_M \cdot N \cdot A_M \quad (\text{Ecuación 5.3})$$

En donde:

- A_{BET} : superficie específica BET;
- V_M : volumen de la monocapa adsorbida;
- N: número de Avogadro;
- A_M : área de la sección de la molécula que ejerce como adsorbato. En este caso, para el N_2 se toma $0,162 \text{ nm}^2$ a 77 °K .

5.2.4. Dilatometría.

El estudio de dilatometría de un compuesto indica las dilataciones y contracciones que dicho compuesto experimenta debido al aumento de la temperatura. Entre otros datos, nos permite una aproximación a la temperatura óptima de sinterización de dicho compuesto [195].

Para este experimento se prepararon piezas cilíndricas de 12 mm de diámetro y 25 mm de alto por medio de compresión a 125 kg/cm^2 a partir de los materiales iniciales e polvo. Cada una de dichas piezas estaban compuestas por mezclas con determinadas proporciones de cada uno de los componentes. Las piezas obtenidas se procesaron hasta un máximo de 1250 °C a una razón de 5 °C/min y después se mantuvieron a la temperatura final durante 4 horas. El dilatómetro utilizado es un *L75 Platinum Series (Linseis, Robinsville, New Jersey, Estados Unidos)* y como medida patrón se utilizó un prisma de base cuadrada de alúmina.

5.2.5. Difracción de rayos X de polvo.

La difracción por rayos X es una de las técnicas más utilizadas en la ciencia de materiales. Se utiliza para identificar las fases cristalinas de los sólidos de una manera cualitativa y semicuantitativa. La técnica que se ha utilizado es la conocida como método de polvo *Debye-Scherrer* [23, 207]. Esta es una técnica relativamente rápida y con una sencilla

preparación de la muestra, ya que lo sólo hay que moler la muestra muy finamente y colocarla en el porta muestras del difractor.

Esta técnica se basa en la difracción del haz de rayos X producida por los electrones que rodean los átomos de la muestra, ya que la longitud de onda de los rayos X es del mismo orden de magnitud que el radio atómico. El haz de rayos X, después de ser difractado en la muestra, contiene múltiple información en función de la posición e intensidad de este haz refractado. Dichos rayos X son medidos y se analizan en función del ángulo de refracción y de la intensidad, construyéndose un difractograma con ambos parámetros.

Al analizar un material por medio de esta técnica, en función de cómo se encuentren dispuestos los átomos que conforman la muestra, se pueden observar distintos fenómenos:

-Si el material analizado es de estructura amorfa, el haz de rayos X será reflejado, transmitido o desviado de una manera completamente aleatoria, ya que no existe un patrón interno en la estructura interna del material.

-Si el material tiene estructura interna ordenada, el haz de rayos X que incide en la muestra también será, en parte, transmitido o desviado, pero otra parte de este haz sufrirá el fenómeno de la difracción por el hecho de interactuar con una estructura que se repite a lo largo del interior del material.

Cuando los rayos X son difractados a través de una estructura cristalina se puede aplicar la ley de Bragg, que estudia las direcciones de los rayos X y las interferencias constructivas que se producen a través de la ecuación:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin(\theta) \quad (\text{Ecuación 5.4})$$

En dónde:

n: número entero;
 λ : longitud de onda de los rayos X;
d: distancia entre los planos de la red cristalina;
 θ : ángulo entre el rayo incidente y el plano.

De esta manera, se realiza un barrido a diferentes $2 \cdot \theta$ para intentar encontrar una interferencia constructiva, en donde la onda resultante puede ser medida en intensidad. Si existe un gran número de celdas de un mismo tipo de estructura cristalográfica dentro del mismo material, entonces al ángulo determinado habrá un número de rayos X difractados de manera constructiva muy alta, lo que equivale a que el receptor de rayos X recibirá una gran cantidad de éstos. Existe una gran base de datos que recoge los patrones de rayos X difractados para multitud de estructuras cristalinas, haciendo fácil la comparación y reconocimiento de los patrones obtenidos, así como el análisis cuantitativo de cada compuesto en la muestra analizada.

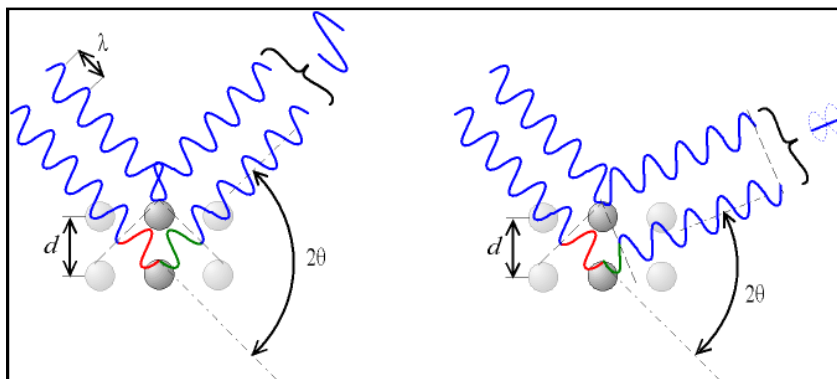


Fig. 5.16. El haz de rayos X es difractado por la estructura cristalina. Dependiendo de si el ángulo de desviación $2\cdot\theta$ el cambio de fase puede producir una interferencia constructiva (izquierda) o destructiva (derecha) [208].

Como se ha apuntado previamente, con esta técnica sólo se pueden encontrar patrones de estructura cristalina en sólidos cristalinos, ya que en un material amorfo no es posible encontrar ningún patrón: todos sus átomos se encuentran en la estructura de una manera aleatoria y sin estructura ninguna [17, 23]. La utilización de la difracción de rayos X permite analizar la evolución de las fases y posibles reacciones químicas que se produzcan en los materiales debido al tratamiento térmico al que son sometidos. También indica la posible presencia de fases secundarias en las muestras.



Fig. 5.17. Difractómetro de rayos X Siemens D500 utilizado durante la experimentación. Instalaciones en el Lawrence Berkeley National Laboratory en Berkeley (California, Estados Unidos).

El uso de esta técnica nos permite detectar cambios de fase de estructura cristalina (como por ejemplo de β -TCP a α -TCP), vitrificaciones o cristalizaciones (transformación en una estructura amorfa o cristalina, respectivamente), entre otros fenómenos [23].

El equipo utilizado en estos experimentos es un difractómetro de rayos X *D500* con geometría *Bragg-Brentano* (*Siemens AG*, Berlín, Alemania) que operaba a 30 mA y a 40 kV en el rango de ángulos 2θ entre 5° y 70° , empleando la radiación $K_{\alpha 1}$ del cobre ($\lambda = 0,15402$ nm).

5.2.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM).

La microscopía electrónica tiene un funcionamiento similar al microscopio óptico, sólo que en lugar de trabajar con fotones, el microscopio electrónico lo hace con electrones. De esta manera, se crea una diferencia de potencial entre la parte superior y la inferior del microscopio. A través de la columna se lanzan electrones, que son acelerados debido a la diferencia de potencial, y al mismo tiempo son concentrados y enfocados gracias a lentes magnéticas condensadoras y objetivas. Estos electrones, finalmente, colisionan con la muestra a observar y los electrones son rebotados y recibidos por los detectores del propio microscopio. En función de estos electrones rebotados se puede formar la imagen microscópica del elemento a analizar [194].



Los electrones que interactúan con la muestra, además, producen diferentes tipos de radiación, principalmente [17]:

-Electrones secundarios: son muy sensibles al relieve de la muestra y a partir de ellos se puede estudiar la superficie del elemento a analizar.

-Electrones retrofundidos: dichos electrones tienen la intensidad proporcional al número atómico del átomo del que han sido desprendidos. Por ello, es posible obtener imágenes con contraste, siendo los átomos más pesados representados de una manera más oscura y los átomos más ligeros más claros.

-Fluorescencia de rayos X: Esta radiación está constituida por los fotones característicos emitidos de cada elemento presente en la muestra cuando los electrones impactan en los átomos de la muestra. Por ello, el análisis de este espectro permite realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de los elementos presentes. Existen dos técnicas analíticas que permiten examinar la muestra en función de la característica de la radiación a medir, por un lado la espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDX) y, por otro lado, la espectroscopía de dispersión de longitud de onda (WDX). La primera técnica mide la energía de los fotones emitidos y se trata de una técnica de análisis cualitativo y semicuantitativo. Mientras tanto, la segunda técnica determina la longitud de onda de los propios fotones emitidos y es válida para un microanálisis cuantitativo sin interferencias espectrales.

Puesto que se está descargando un haz de electrones sobre la muestra, es necesario que dicha muestra no se cargue eléctricamente, ya que los electrones quedarían retenidos en la superficie del espécimen y esto podría ser muy peligroso. Por ello, si la propia muestra no es conductora de electricidad, es necesario recubrirla con una capa de oro a través de un metalizador.

Las muestras analizadas fueron elaboradas a través del proceso de cortado de los cilindros obtenidos a través del proceso de *freeze casting*, con su posterior pulido. En este estudio, las muestras fueron recubiertas por una capa de oro por medio de un *Sputter Coater 108 Auto* (*Cressington Scientific Instruments Inc.*, Watford, Reino Unido) durante 60 segundos.



Fig. 5.19. Microscopio electrónico de barrido utilizado en los experimentos. Instalaciones en el Lawrence Berkeley National Laboratory en Berkeley (California, Estados Unidos)

El microscopio electrónico de barrido utilizado para la realización de estos experimentos era un *Field Emission Scanning Electron Microscope Jeol JSM-7500* (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

5.2.7. Tamaño de poro y estructura lamelar: Software ImageJ.

Una vez obtenidas las imágenes a través de la microscopía electrónica de barrido, se procedió a la medición de los poros por medio de software informático. El software ImageJ es un referente mundial para este tipo de mediciones, ya habiendo sido utilizado para análisis similares a este [31, 63, 101, 161]. En esta investigación se utilizó el *ImageJ versión 1.48*, desarrollado por Wayne Rasband, en el *National Institute of Health* (Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

Tomando como referencia la barra de medida proporcionada por el SEM, el software puede determinar el tamaño de los poros y el espesor de las paredes lamelares (t) de las estructuras obtenidas. También a partir de las imágenes obtenidas por SEM y su posterior tratamiento se pudo obtener la proporción del tamaño de los canales (χ_p) a través del eje largo (a), el eje corto (b) y de la ecuación:

$$\chi_p = \frac{a}{b} \quad (\text{Ecuación 5.5})$$

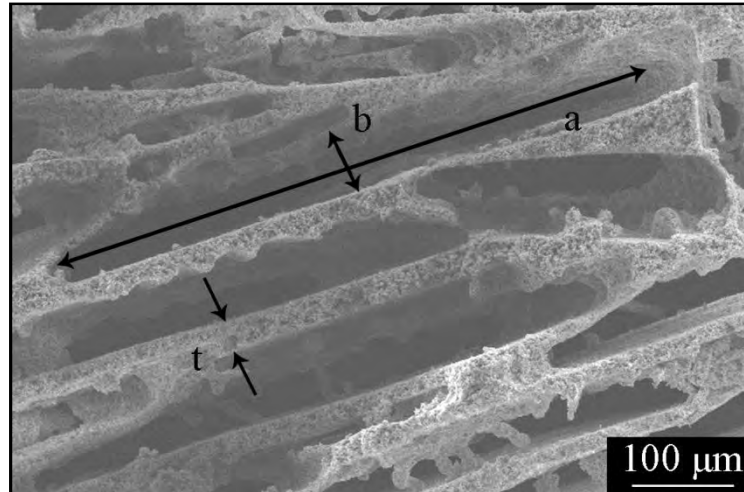


Fig. 5.20. Ejemplo del método de medición de los parámetros principales de los canales y las paredes de la microestructura interna obtenida a través de la técnica de *freeze casting*.

5.2.8. Determinación de la porosidad de las piezas.

La porosidad de las piezas se ha realizado a través de la aplicación del principio de Arquímedes, de manera similar a muchos otros trabajos previos consultados [70, 75, 158, 161, 187].

Teniendo en cuenta que la mayoría de las piezas tratadas en este estudio están formadas por más de un compuesto, la porosidad (ϕ) de cada pieza fue calculada por medio de la densidad resultante (ρ_χ) que, a su vez, fue obtenida a través de la densidad de cada uno de los compuestos (ρ_n) y del porcentaje en volumen de cada compuesto n (χ_n) según la ecuación 5.6:

$$\rho_\chi = \chi_1 \cdot \rho_1 + \chi_2 \cdot \rho_2 + \chi_3 \cdot \rho_3 \quad (\text{Ecuación 5.6})$$

Con la densidad resultante obtenida, se aplica la fórmula del principio de Arquímedes con la masa (m) medida en una balanza y el volumen (V) obtenido a través de sus medidas.

$$1 - \phi = \frac{m}{\rho_\chi \cdot V} \quad (\text{Ecuación 5.7})$$

5.2.9. Propiedades mecánicas.

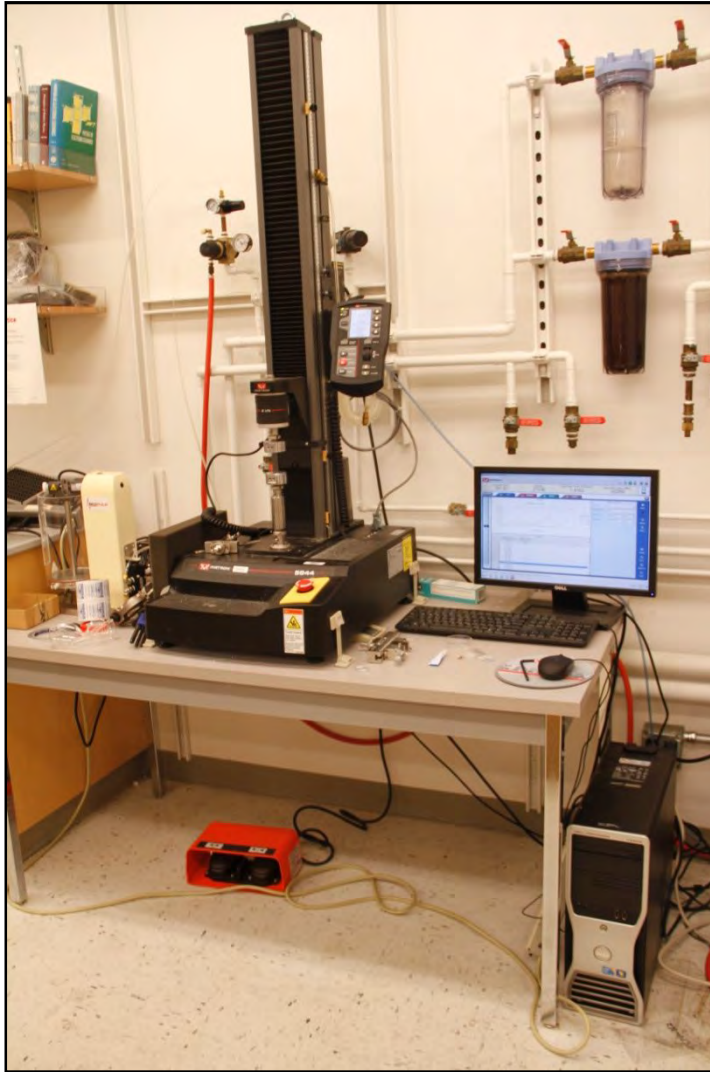


Fig. 5.21. Imagen del Instron 5944 utilizado para medir las propiedades mecánicas de las muestras obtenidas a través del proceso de *freeze casting*. Instalaciones en el Lawrence Berkeley National Laboratory en Berkeley (California, Estados Unidos)

El estudio de la resistencia de las piezas a la compresión permite la identificación de diversos parámetros mecánicos del comportamiento de las piezas a compresión, como la resistencia a compresión máxima que aguantan antes de romperse, la deformación máxima que experimentan o el módulo de Young a la compresión. Para ello, se han utilizado los discos que se han obtenido a partir de cortar las piezas cilíndricas originales obtenidas a través del proceso de *freeze casting*.

Dichos estudios se llevaron a cabo por medio de un aparato *Instron 5944* (*Instron Inc.*, Norwood, Massachusetts, Estados Unidos), que está constituido de una columna con una única pieza móvil que se desplaza en sentido vertical y que consta de una célula de carga en su parte superior, que va midiendo en todo momento la carga que está aplicando sobre la muestra. Es necesario medir manualmente el diámetro de la pieza e insertarlo en el software del dispositivo y éste, automáticamente, proporciona todos los parámetros mecánicos que

hemos indicado en el párrafo anterior. Por otro lado, la columna que ejerce y, al mismo tiempo, mide la fuerza, tiene una velocidad de bajada de 3 mm/min.

5.2.10. Determinación de la concentración de seda en la disolución.

Una vez que se ha obtenido la disolución acuosa de seda es necesario determinar la concentración de ésta. Para ello, se toma una pequeña alícuota de la disolución, que es pesada y, seguidamente, introducida en una estufa a 80 °C durante 24 horas. Una vez que toda el agua ha sido evaporada, solamente quedará la seda que se encontraba en la propia disolución, por lo que es sencillo obtener el porcentaje en peso de seda de la alícuota inicial utilizando la fórmula [71]:

$$\% \text{Seda} = \frac{P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.8})$$

En donde P_{inicial} es el peso de la disolución al introducirla en el horno y P_{final} es el peso de la seda que permanece una vez que todo el contenido de agua se ha evaporado.

5.2.11. Disolución en suero fisiológico simulado estático.

Los discos obtenidos del corte de las piezas cilíndricas originales son sumergidos en suero fisiológico simulado para analizar su comportamiento. A pesar de que muchos autores sólo se centran en la formación de hidroxiapatito sobre su superficie [20, 68, 70, 88, 152], el presente estudio se ha centrado en el proceso de degradación de peso que sufren las piezas a diferentes periodos de tiempo, como también han hecho otros autores previamente [75, 78, 162, 163] para, de esta manera, poder predecir el ritmo de degradación que presentarán *in vivo*. Es importante remarcar que, al igual que ocurría en el proceso de preparación del suero fisiológico simulado, aquí también es necesario utilizar solamente recipientes de plástico que no tengan ningún tipo de arañazo, para evitar la nucleación indeseada de hidroxiapatito sobre la superficie del recipiente.

Para el proceso de disolución, se toman los discos cortados de la pieza cilíndrica. Según la ecuación 5.9 tomada del artículo sobre el suero fisiológico simulado de Kokubo *et al.* [200] es posible calcular el volumen de SBF necesario para cada una de las muestra que vamos a estudiar:

$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (\text{Ecuación 5.9})$$

En donde V_s es el volumen de SBF necesario (en ml) y S_a es la superficie aparente exterior (sin contar la porosidad interna de los poros) de la muestra (en mm²), calculada como:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h + \pi \cdot r \cdot l = \pi \cdot r^2 \cdot h + 2 \cdot \pi \cdot r \cdot h \quad (\text{Ecuación 5.10})$$

En dónde: r: radio del disco;
l: longitud de la circunferencia del disco;
h: altura del cilindro.

Una vez calculado el volumen de SBF necesario para las piezas y vertido en el interior del recipiente, los discos serán colocados como muestra la figura 5.22, en vertical, con la superficie lateral tocando el fondo del recipiente para, así, poder maximizar la cantidad de superficie de los discos en contacto con el suero fisiológico simulado. Los recipientes plásticos son cubiertos por un film plástico para evitar la evaporación del líquido y almacenados durante un periodo de tiempo determinado en el interior de una incubadora a una temperatura constante de 36,5 °C. Una vez transcurrido el tiempo de duración del experimento, las muestras son retiradas de los recipientes plásticos, enjuagadas en agua ultrapura y depositadas en un desecador a 60 °C durante 24 horas. Por último, son nuevamente pesadas y comparadas con el peso inicial.

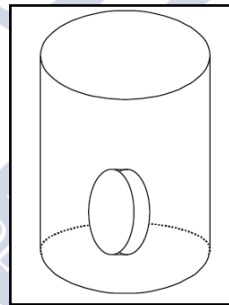


Fig. 5.22. Colocación de los discos en el interior de los recipientes de SBF para poder tener el mayor área posible en contacto con el fluido [200].

La pérdida de peso de los discos se cuantifica a través de la ecuación 5.11:

$$\% \text{ pérdida} = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 5.11})$$

En dónde: P_{inicial} : peso inicial de los discos, antes de sumergirlos en SBF;
 P_{final} : peso final de los discos, después de sumergirlos en SBF

5.2.12. Disolución en suero fisiológico simulado dinámico.

Partiendo del experimento de suero fisiológico simulado en método estático, descrito en el punto inmediatamente anterior y, teniendo en cuenta las críticas de otros autores sobre la imprecisión de este método [78, 202] y tomando como ejemplo otras publicaciones [210] se ha realizado un experimento en condiciones dinámicas de SBF.

La gran mayoría de los experimentos que utilizan el SBF como indicador de la bioactividad de biomateriales lo hacen de una manera estática del fluido, esto es, sumergiendo las piezas en el SBF y simplemente esperar durante diferentes periodos de tiempo.

Esto provoca que el fluido se sature en un determinado momento y que las piezas no sean tan solubles como lo serían en el cuerpo humano, en donde el fluido corporal en contacto con las piezas se encuentra en un estado dinámico continuo. Por ello, se ha diseñado un montaje en el cual se pueda estudiar el proceso de disolución de las piezas en un fluido con un comportamiento dinámico, es decir, con el suero fisiológico simulado en constante movimiento y renovación.

Puesto que el suero fisiológico simulado debe ser almacenado en un refrigerador, a una temperatura alrededor de 6 °C y los experimentos deben ser llevados a cabo a una temperatura de 36,5 °C, se ha diseñado un dispositivo que por medio de una bomba peristáltica toma el SBF del refrigerador y lo lleva a la incubadora. Dicha bomba sólo funciona dos minutos al día, programada a través de un enchufe con temporizador. Durante estos dos minutos bombea un total de 140 ml (70 ml/min) de SBF, lo que es casi un litro de volumen en una semana.

Este líquido es bombeado a una caja plástica dividida en varios compartimentos que se encuentran conectados y que ha sido previamente llenada de SBF. Dicha caja se encuentra en el interior de la incubadora, que además tiene en su interior bolsas de fluido térmico, que ayudan a mantener la temperatura a 36,5 °C en los momentos en que se abra la puerta de la incubadora. En cada uno de estos compartimentos de la caja plástica es colocado uno de los discos cuyo comportamiento en SBF será estudiado. En el compartimento en donde llega el tubo que transporta el SBF se coloca una barra agitadora que se encuentra en funcionamiento continuo, manteniendo el fluido en movimiento en todo momento. La caja está diseñada de manera que al llegar a cierto nivel, desborda por un punto en concreto, que lleva el SBF sobrante a un almacenaje externo, desde donde se retira del sistema.

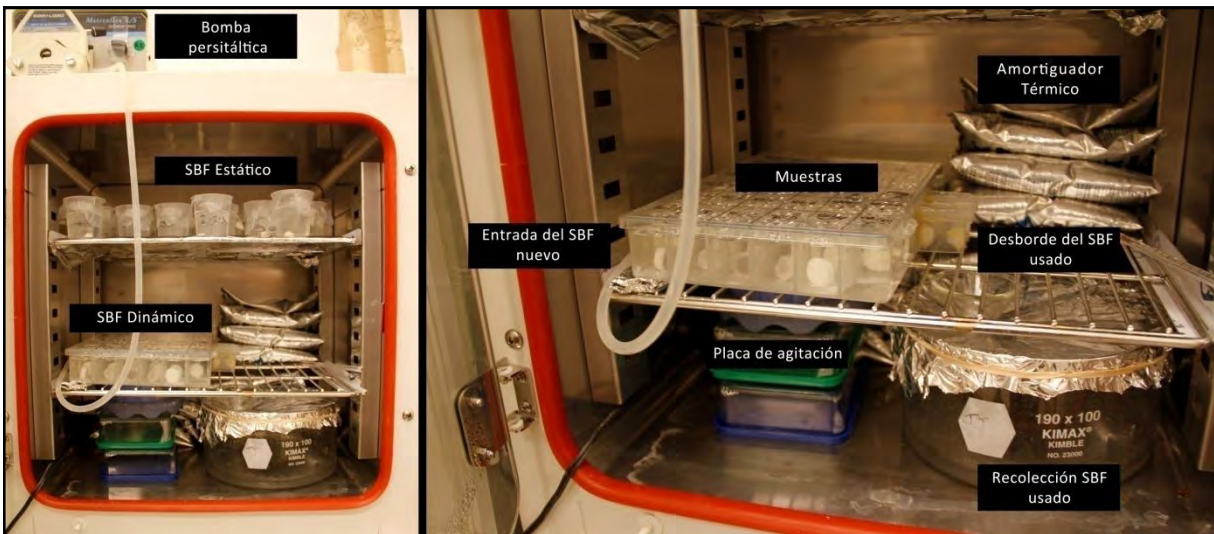


Fig. 5.23. Fotografía del interior de la incubadora, en donde se puede apreciar sobre la parte superior la bomba peristáltica, los experimentos en SBF estático en la parte superior del interior de la incubadora y, abajo, el montaje del experimento con SBF dinámico.

De esta manera, todos los días está entrando SBF nuevo en la caja con las muestras y se retira SBF usado, ya que el volumen que entra en la caja plástica es igual al desalojado, manteniéndose el líquido siempre al mismo nivel.

Al igual que se hizo con las piezas que se estudiaron por medio de la inmersión en suero fisiológico simulado estático, las muestras son pesadas antes y después del proceso de inmersión por un determinado periodo de tiempo. La diferencia entre la diferencia de masa antes y después del proceso es entonces estudiada y comparada con los resultados obtenidos a través del experimento en condiciones estáticas.

Al igual que se hizo en el apartado correspondiente al SBF en modo estático, para cuantificar la pérdida de peso que experimentan las piezas se aplica la ecuación 5.11:

$$\% \text{Pérdida} = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 5.11})$$

En dónde:

- P_{inicial} : peso inicial de los discos, antes de sumergirlos en SBF;
- P_{final} : peso final de los discos, después de sumergirlos en SBF

5.2.13. Medida del pH.

Durante la preparación del suero fisiológico simulado es necesario tener el valor instantáneo del pH de la disolución en el momento de la adición del compuesto químico Tris. Para ello se utilizó un Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, Estados Unidos) que permitía la lectura instantánea del pH de la disolución.

Para la utilización de este equipo es necesario el calibrado previo del aparato con disoluciones patrón de pH 7 y pH 4.

5.2.14. Análisis *in vitro*: Interleucina 6

El efecto de la Interleucina-6 como agente inflamatorio del sistema inmune de un cuerpo es descrito en varios artículos científicos relacionados con la regeneración de tejidos óseos [33, 155, 177, 211]. La interleucina actúa a la vez como citocina (proteínas que regulan la diferentes funciones celulares) pro-inflamatoria y como miocina (un tipo concreto de citocinas) anti-inflamatoria. La respuesta celular a los materiales diseñados ha sido cuantificado por medio por los kits de Elisa de la compañía *eBioscience* (San Diego, California, Estados Unidos) y siguiendo el protocolo que establece dicho fabricante [212], que colorean más de verde cuanto más prolifere la interleucina como citoquina pro-inflamatoria, dando una estimación de este valor cuanto más intenso el verde sea.

Los sobrenadantes de los cultivos celulares sobre las piezas a estudiar fueron recogidos a 1, 2, 5 y 10 días y posteriormente almacenados a -20 °C. Todas las alícuotas fueron estudiadas por medio de un microlector de placas (también conocido como un fotómetro de microplacas) a una longitud de onda de 540 nm (verde).

5.2.15. Análisis *in vitro*: Método colorimétrico MTT.

Los ensayos celulares por medio del compuesto MTT se basan en el cambio químico que se produce por medio de la actividad celular, transformando el compuesto de color amarillo MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) al compuesto de color púrpura conocido como Formazan. Dicha reacción se produce por medio de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, por lo que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas.

Este tipo de experimentos es bastante común para medir la proliferación celular en un biomaterial, lo que, al mismo tiempo, indica su citotoxicidad. Ha sido utilizado en numerosos artículos sobre regeneración de tejido óseo [30, 59, 79, 85, 101, 129, 191].

La supervivencia y proliferación de las células madre mesenquimales humanas (hMNMSCs) sobre los discos obtenidos después de cortar los cilindros creados a través de *freeze casting* se realizó a 1, 2, 5 y 10 días de cultivo siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del MTT, proporcionado por *Sigma-Aldrich* (St. Louis, Missouri, Estados Unidos).

Las hMNMSCs fueron alojadas en los discos de muestra con una densidad de 25103 células por pocillo en placas de 24 pocillos cada una.

Las células madres mesenquimales humanas fueron obtenidas a través del Departamento de Cirugía Ortopédica del Hospital Clínico del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela durante una operación rutinaria de prótesis de cadera por medio de protocolos aprobados éticamente.

Una vez extraídas de un paciente, las células madre fueron almacenadas en tubos con recubrimiento de heparina y llevadas al laboratorio de cultivos celulares donde fueron aisladas, siguiendo el protocolo descrito por Yeo *et al.* [213] y separadas por medio de gradiente de densidad con una centrifugación a 2000 revoluciones por minuto. Una vez finalizado el centrifugado, se extrae la franja en la que se encuentran las células y es lavada con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), un medio de cultivo celular desarrollado por H. Eagle y modificado por R. Dulbecco que contiene multitud de aminoácidos, sales, glucosa y diversas vitaminas. Dicho medio de cultivo fue suministrado por *Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Maryland, Estados Unidos)*. Después, las células son centrifugadas por una segunda vez y cultivadas en matraces de 75 cm² de superficie. Los cultivos son mantenidos a una temperatura de 37 °C con una atmósfera con un 5% de CO₂ en un incubador hasta que es alcanzada una confluencia del 90%.

5.2.16. Análisis *in vitro*: Microscopia confocal con fluorescencia.

Las células mesenquimales han sido cultivadas de la misma manera que en las pruebas de proliferación celular MTT descritas previamente. El método de la fluorescencia se basa en teñir el medio donde se supone que proliferan las células por medio de calceína, suministrada por *Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos)* y con yoduro de propidio. Estos compuestos se unen a las células vivas y a las que han muerto, de manera que emiten luz verde en las que se encuentran vivas y en luz roja en las que se encuentran muertas, siendo, de esta manera, muy fácil estudiar el efecto que un material tiene sobre la proliferación y la supervivencia de células en dicho material.

Por otro lado, una vez que las células que se han depositado sobre los materiales han sido teñidas por medio de estos dos compuestos, dichas piezas son analizadas a través de un microscopio confocal. La microscopía confocal utiliza un microscopio óptico que posee diferentes lentes para aumentar el contraste y reconstruir imágenes tridimensionales por medio de un colimador de orificio delimitante. Es muy utilizado para imágenes con bastante emisión de luz, como son los casos de fluorescencia, ya que gracias al colimador se evitan las emisiones de luz que no provengan de la parte de la muestra que está en el foco del propio microscopio. Para el análisis de fluorescencia se ha utilizado un microscopio confocal Leica SP-5 (*Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania*).

5.2.17. Análisis *in vivo*: Implantación de piezas en la calota de un conejo.

El experimento más fidedigno y realista para la comprobación de la biocompatibilidad y la bioactividad de un material es el propio estudio *in vivo*, la implantación de dicho material en un animal vivo. Entre todos los artículos científicos consultados podemos encontrar este tipo de experimentos en diferentes animales, como ratones [43, 214], cobayas [37, 58, 95], perros [106, 215], ovejas [18, 177], cerdos [170, 177] o monos [27, 215]. Sin embargo, para el presente trabajo *in vivo* se ha decidido llevar a cabo este tipo de estudio en cráneos de conejos, ya que es un animal de tamaño medio al mismo tiempo que el coste del propio animal y de su mantenimiento no es de tan elevado como el de otros. La experimentación *in vivo* en conejos también aparece en multitud de publicaciones científicas relacionadas con la regeneración de tejidos óseos [49, 109, 154, 177, 213, 215, 216].

Para ello se ha adquirido un conejo de la raza New Zealand de color blanco al proveedor *Charles River Laboratories* (Cedex, Francia).



Fig. 5.24. Cortado del pelo del conejo de raza New Zealand en el preoperatorio, en el mismo lugar en el que se implantarán las piezas de regeneración ósea.

Antes de la operación se pesa el animal. Se procede a suministrarle por vía intravenosa 0,20 ml de *Domtor* (1 mg de medetomidina clorhidrato por ml de medicamento, sedante de animales para operaciones producido por *Orion Pharma*, Espoo, Finlandia), a 0,1 ml por kg de peso del conejo, y 0,6 ml de *Imalgene 1000 inyectable* (100 mg de hidrocloreuro de ketamina por ml, agente analgésico-anestésico, y 5 mg de clorobutanol por ml; fabricado por *Merial Laboratorios*, Barcelona, España), correspondiente a 0,3 ml de medicamento por kg de peso del animal.

Una vez que el conejo se encuentra sedado, al mismo tiempo que se controlan las constantes vitales del animal, primero se le corta el pelo en el área a operar y, seguidamente,

se le inyecta debajo de la dermis de la cabeza pequeñas dosis de solución inyectable *Ultracain* con 40 mg de Epinefrina por cada 0,05 ml (*Laboratorios Normon S.A.*, Madrid, España) como anestésico local. Posteriormente se procede a la desinfección de la piel por medio de *Betadine* (*Meda Pharma*, San Fernando de Henares, Madrid, España) con povidona yodada como principio activo que actúa como antiséptico; y, seguidamente se lleva a cabo la disección de la piel y el periostio del cráneo del animal por medio de un bisturí quirúrgico desechable.

Seguidamente se realizan dos agujeros con una fresa con motor *Intrasurg 300 plus* (*KaVo Dental GmbH*, Biberach an der Riß, Alemania), traspasando la calota, en el cráneo del animal. Todo el material quirúrgico utilizado durante la operación fue previamente esterilizado por medio de un *Autoclave Clase B Autester ST Dry PV 18L*. (*J.P. Selecta*, Barcelona, España) a excepción del material de un sólo uso (telas en donde colocar al animal, bisturí, agujas).

Las piezas de regeneración ósea que le fueron colocadas en el cráneo también fueron previamente esterilizadas por medio de óxido de etileno. Este proceso consigue esterilizar materiales a una temperatura por debajo de 60 °C, bastante menor que otros procesos de esterilización que podrían dañar la estructura polimérica que tenían las piezas que le fueron colocadas al animal. El óxido de etileno es un gas inflamable que se disuelve en agua y que, a la vez, es muy tóxico, por lo que se utiliza para matar cualquier tipo de presencia bacteriana y biológica en el material.

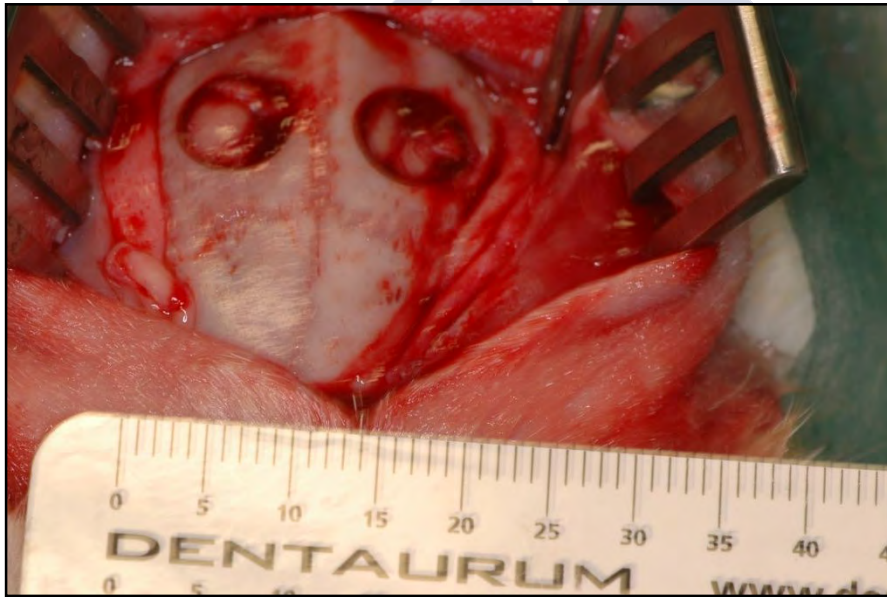


Fig. 5.25. Par de agujeros realizados por medio de la fresa en la calota del animal.
La regla muestra las medidas en mm.

Una vez que los orificios han sido realizados, se colocan las piezas en dichos agujeros y se procede al cierre de la herida colocando una capa de celulosa oxidizada trenzada *Surgicel* (material que induce a la coagulación de la sangre), fabricada por *Johnson & Johnson* (New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos), doblada en cinco capas, y se procede a la suturación de la herida con *Monocryl*, un monofilamento sintético de sutura quirúrgica

absorbible y producto de la compañía *Ethicon Inc.* (*Johnson & Johnson*, New Brunswick, New Jersey, Estados Unidos).



Fig. 5.26. Suturado de la herida al finalizar la intervención quirúrgica por medio del filamento sintético *Monocryl*.

Como medicamentos postoperatorios, se le inyectan al animal 0,1 ml de *Urbason* 40 mg polvo y disolvente para solución inyectable, con metilprednisolona como principio activo, un medicamento corticosteroide (actúa a nivel celular disminuyendo la producción de sustancias que producen inflamación o alergia), producido por *Sanofi-Aventis* (Barcelona, España). Además de suministrárselo en el momento justo después de la operación, también se le inyectaron al animal 0,15 ml a las 24 horas de la operación, 0,1 ml a las 48 horas, 0,008 ml a las 72 horas y 0,004 ml a las 96 horas.

También como medicamento postoperatorio se le suministró 0,1 ml de *Genta-Gobens* 40x2, viales inyectables de 80 mg de sulfato de gentamicina (como agente antibacteriano) en 2 ml de disolución. Dicho medicamento es producido por *Laboratorios Normon S.A.* (Madrid, España). Además de suministrarse en el momento de finalización de la operación, también se le inyectaron 0,1 ml del medicamento los cuatro días siguientes.

Por último, al finalizar la operación también se le inyectaron 0,15 ml de *Nolotil* ampollas, con 2 g de metamizol magnésico (un potente analgésico, antipirético y espasmolítico) por cada 5 ml que contiene cada ampolla. El titular y responsable de la fabricación del medicamento es *Boehringer Ingelheim España S.A.* (Barcelona, España). Además se le suministraron 0,1 ml en los cuatro días siguientes.

Diez semanas después de la intervención quirúrgica por la cual se le implantaron las piezas de regeneración ósea se procede a la eutanasia del animal por medio de sedación. Para ello se le suministran por vía intravenosa 0,3 ml de Domtor y 0,7 ml de *Valium*, con 10 mg de diazepam (tranquilizante benzodiacepínico con propiedades ansiolíticas, sedantes, miorrelajantes y anticonvulsivas) por cada 2 ml de medicamento. El medicamento es producido por *F. Hoffmann-La Roche AG* (Basilea, Suiza). Después de que el animal dejó de tener constantes vitales se procedió a la separación y limpieza de su cráneo para el posterior análisis de estado de evolución de los implantes para regeneración ósea que se le habían colocado.

Una vez extraído el cráneo, este fue sumergido en formaldehído 3,7 al 4% tamponado a pH 7 y estabilizado con metanol, suministrado por la compañía *Panreac (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallés, Barcelona, España)*.

5.2.18. Radiografía por medio de rayos X.

Los rayos X, al ser una fuente de radiación de alta energía, son capaces de atravesar ciertos materiales y tejidos que las ondas electromagnéticas que podemos percibir a través de la vista humana, no son capaces [217]. De esta manera, se hace incidir el haz de rayos X sobre una placa fotográfica con la muestra a analizar en el medio. En nuestro caso, hemos analizado el cráneo del conejo, una vez que ha sido extraído del animal para hacer una previsualización del estado de los implantes.

Para la obtención de estas imágenes se utilizó un aparato de rayos X Gendex Densomat de 65 kVp y 7,5 mA (Dental System, Milán, Italia).

5.2.19: Análisis *in vivo*: Análisis histológico.

Una semana después de que el cráneo fuera extraído del animal y teniendo en cuenta la parte de la calota en la que se encontraban los implantes, el cráneo es cortado para disminuir su tamaño y, a la vez, disminuir el tiempo de tratamiento y mejorar su eficacia. Así, la pieza ya cortada se sumerge en un bote plástico que contiene alcohol etílico de 60° durante dos días. Transcurridas las 48 horas, la piezas se sumergen en soluciones progresivamente más concentradas de alcohol para eliminar por completo el agua de la muestra, sustituyendo dicha agua en las células del tejido vivo por alcohol que, más adelante será sustituido por un compuesto polimérico. La graduación del alcohol va aumentando cada dos días de 60°, 70°, 80°, 96° y finalmente, dos pases de alcohol puro 100°.

Una vez terminado el proceso de inmersión en alcohol comienza la inmersión en disoluciones mezcla alcohol-resina Technovit 7200 VLC para la infiltración de dicha resina en el interior del tejido, comenzando con una proporción 1:1 alcohol-resina. Transcurridos dos días se cambia la disolución por una proporción 1:2 alcohol:resina y, transcurridos de nuevo otras 48 horas, la disolución es 100% resina.

El siguiente paso es la polimerización de la muestra. Para ello, este proceso se realizará por iluminación por lámpara (con una longitud de onda de 400-500 nm) en dos etapas diferentes:

Etapa I: Polimerización previa, que se lleva a cabo con una intensidad de luz reducida para evitar la aparición de grietas por tensiones en el material plástico, utilizando, para ello, luz amarilla durante dos horas.

Etapa II: Polimerización final, por medio de una intensidad de luz elevada, usando luz azul durante 4 horas. Este segundo proceso completa la polimerización de la muestra y hace que la muestra sea un bloque sólido.

Una vez que toda la pieza se encuentra polimerizada, es el momento de iniciar el corte de dicha muestra. Primero, la pieza se fija sobre un portaobjeto de vidrio y se procede a descubrir la zona de interés por medio de un corte y, a continuación, se procede al pulido de la zona de donde se quiere empezar a obtener láminas. Seguidamente se pega la zona en donde se ha realizado el pulido y se coloca otro portaobjetos, haciendo de esta manera una especie de "sandwich" con la muestra en el medio de dos portaobjetos.

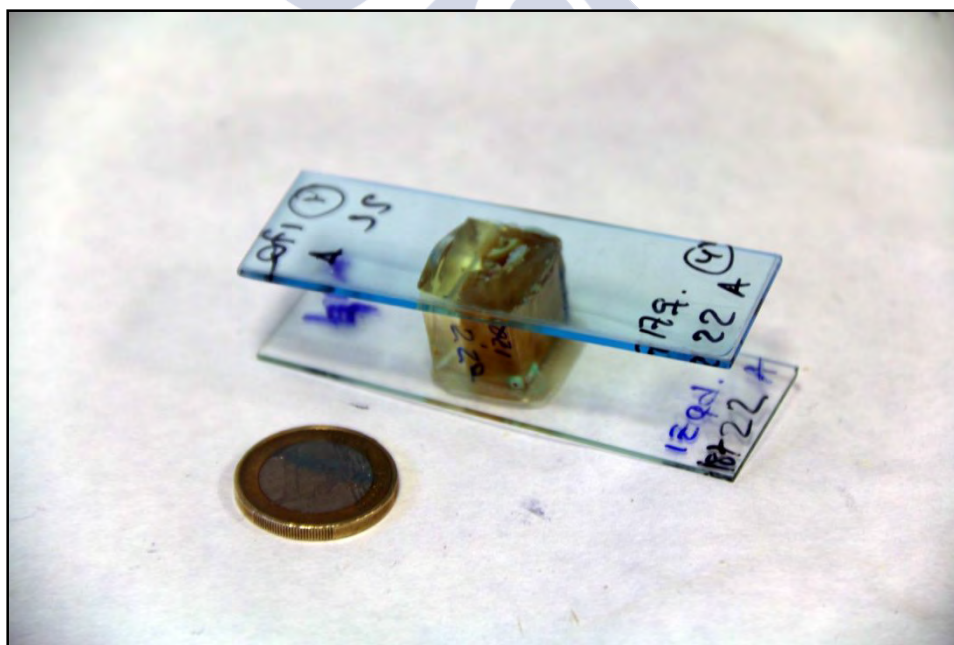


Fig. 5.27. "Sandwich" de los portaobjetos con la muestra a analizar en el medio de ambos. Tamaño comparativo con una moneda de 1 Euro.

Una vez que se ha hecho este "sandwich" se procede al corte de una lámina de aproximadamente 300 μm de espesor respecto del segundo portaobjetos colocado sobre la muestra. Entonces, mediante pulido se procede a reducir el espesor de esta muestra hasta obtener una lámina de alrededor de 30 μm . Este es un proceso delicado en el que un micrómetro se encuentra acoplado al pulidor que, por medio de abrasión, va reduciendo el espesor de la muestra.

Esta operación se repite con la muestra obteniendo láminas de cerca de 300 μm y que posteriormente se pulen para reducir su espesor. Se intenta obtener el mayor número de láminas posibles para poder realizar un estudio histológico posterior lo más detallado posible. El siguiente paso es el teñido de dichas láminas delgadas para realizar el estudio histológico en sí.

La tinción de las láminas se realiza con la inmersión de las diferentes muestras obtenidas en *hematoxilina de Harris* (*Solución de Papanicolaou 1a*, suministrada por *Merck Life Science*, Darmstadt, Alemania) primero y después en tinción tricrómica (*Chromotrope 2R Strain Aqueous Solution*, suministrada por *Newcomer Supply Inc.*, Middleton, Wisconsin, Estados Unidos), con ambos compuestos químicos a una temperatura de 37 °C. Posteriormente, se procede al lavado con agua destilada de las muestras, que se dejan secar y son después cubiertas con bálsamo de Canadá y un cubreobjetos de vidrio. Este proceso de tinción permitirá el estudio detallado de la parte del cráneo que se ha extraído del animal. [23, 218, 219].

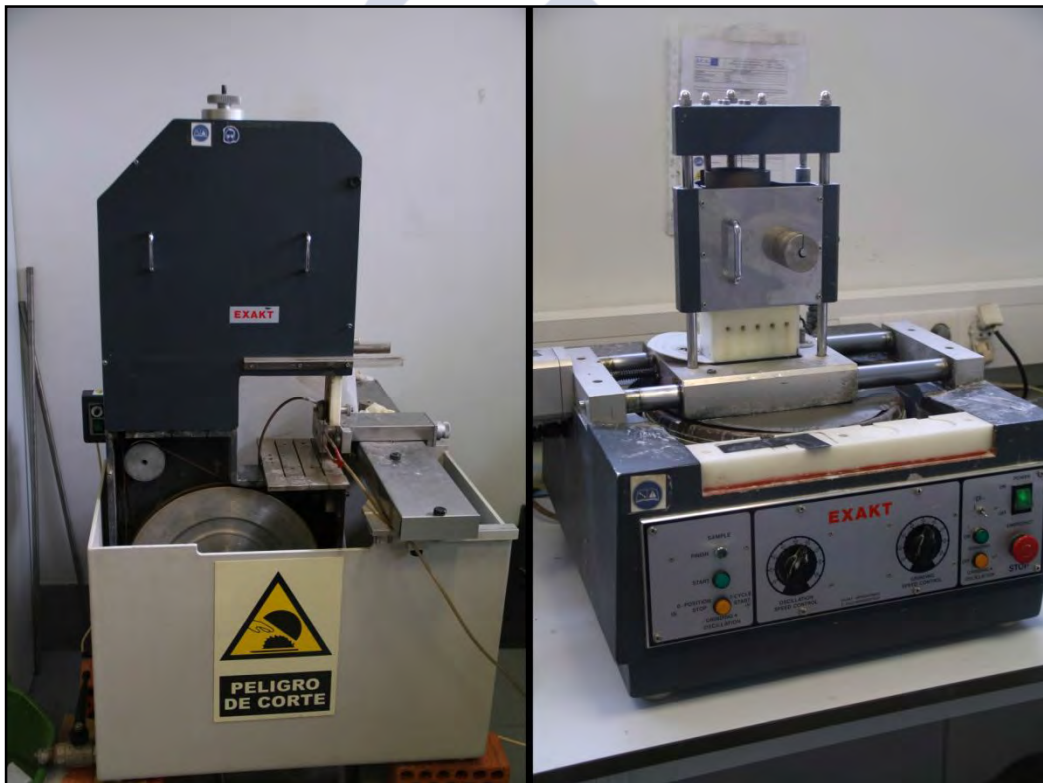


Fig. 5.28. Cortadora (izquierda) y pulidora (derecha) de las láminas de análisis histológico. Instalaciones del Instituto de Cerámica de Galicia (Santiago de Compostela, España).

En ese momento las láminas están preparadas para ser analizadas por medio de microscopía óptica, como se verá en el siguiente apartado. La tinción permite que los tejidos poco calcificados aparezcan con un tono fucsia pálido, mientras que las zonas muy calcificadas tendrán un aspecto azulado intenso. Este proceso de tinción también otorga un

buen contraste a diferentes tipos de tejidos, como los conjuntivos, cartilagosos o musculares.

5.2.20: Microscopía óptica.

Para el análisis de las láminas obtenidas a partir del análisis histológico del cráneo del animal se ha utilizado un equipo de microscopía óptica de luz transmitida. Por medio de la tinción de los diferentes tejidos que se ha llevado a cabo en el análisis histológico se pueden distinguir los tipos de tejidos que se han desarrollado en la muestra.

Para ello se ha empleado un microscopio polarizador *Nikon OPTIPHOT2-PQL* (*Nikon Corporation*, Tokyo, Japón) conectado a un equipo de microfotografía digital con una cámara *Olympus DP-12* de 3,3 MPixels (*Olympus Corporation*, Tokyo, Japón).



Fig. 5.29. Equipo de microscopía óptica conformado por el microscopio polarizador *Nikon OPTIPHOT2-PQL* y el equipo de microfotografía digital *Olympus DP-12*.





IV. Resultados obtenidos y discusión.



6. Caracterización de las materias primas.

En este apartado se estudian las materias primas que serán utilizadas para la fabricación de piezas que puedan ser utilizadas para la regeneración de tejido óseo.

6.1. Medición de la densidad real.

La medición de la densidad real a través de picnometría de los diferentes compuestos cerámicos en su forma original (polvo) ha mostrado los siguientes resultados:

Tabla 6.1. Densidades obtenidas de los compuestos cerámicos a utilizar

Compuesto cerámico	Densidad (g/cm ³)
HA/ β -TCP 60/40	3,062
BG 45S5	2,711
BG 2B6Sr	2,728
BG 1393	2,673
BG 1393B1	2,668
Zeolita ZSM-5	2,345

Además, también se ha medido la densidad de los capullos de seda, que fueron cortados en pequeñas piezas, y de la fibroína de seda, obtenida después del primer paso del proceso de disolución de seda, en el que se elimina la sericina al hacer hervir los trozos de los capullos de seda en una disolución 0,02M de carbonato sódico de la manera descrita en el apartado de Métodos experimentales.

Tabla 6.2. Densidades obtenidas de los compuestos a utilizar

Compuesto	Densidad (g/cm ³)
Capullos de seda	1,462
Fibroína de la seda	1,555

6.2. Estudio por difracción de rayos X.

Cada uno de los materiales cerámicos que se utilizaron en esta investigación son estudiados por medio de difracción de rayos X antes de ser sometidos a cualquier tipo de tratamiento térmico. Las gráficas obtenidas a través de la difracción de rayos X se han estandarizado para que en todas las gráficas el mayor pico observado corresponda con el 100% de cada gráfica y los otros picos obtenidos sean proporcionales a éste.

Por un lado, se realiza el estudio de fases de la mezcla HA/ β -TCP 60/40 en comparación con ambos compuestos que conforman dicha mezcla por separado, tal y como se aprecia en la figura 6.1.

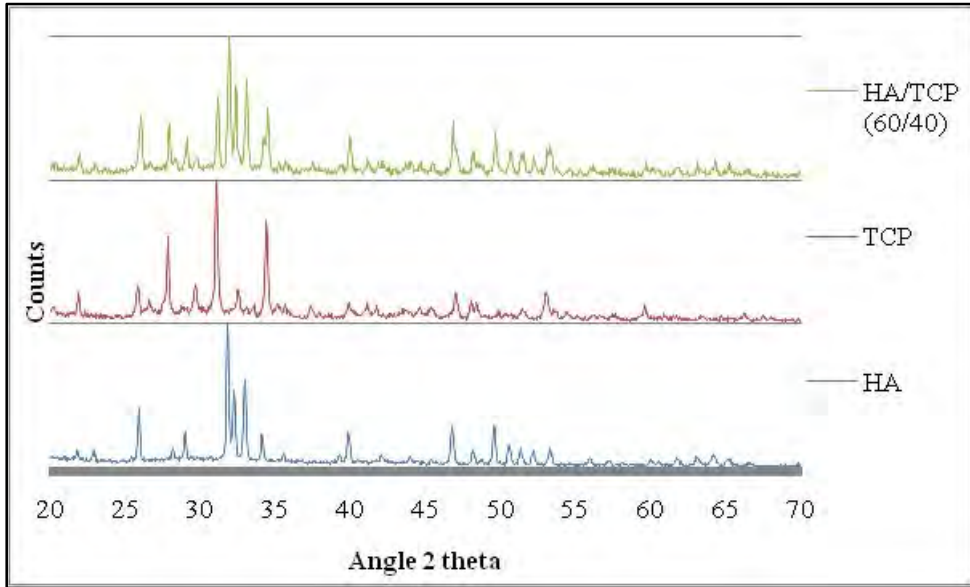


Fig. 6.1. Análisis por medio de difracción de rayos X del hidroxiapatito (HA), en azul; beta fosfato tricálcico (β -TCP), en rojo; y la mezclas de ambos compuestos en una proporción 60% HA y 40% TCP en volumen, en verde.

También se estudia por medio de la difracción de Rayos X la mezcla de HA/ β -TCP después de ser tratada a diferentes temperaturas, tal y como muestra la figura 6.2.

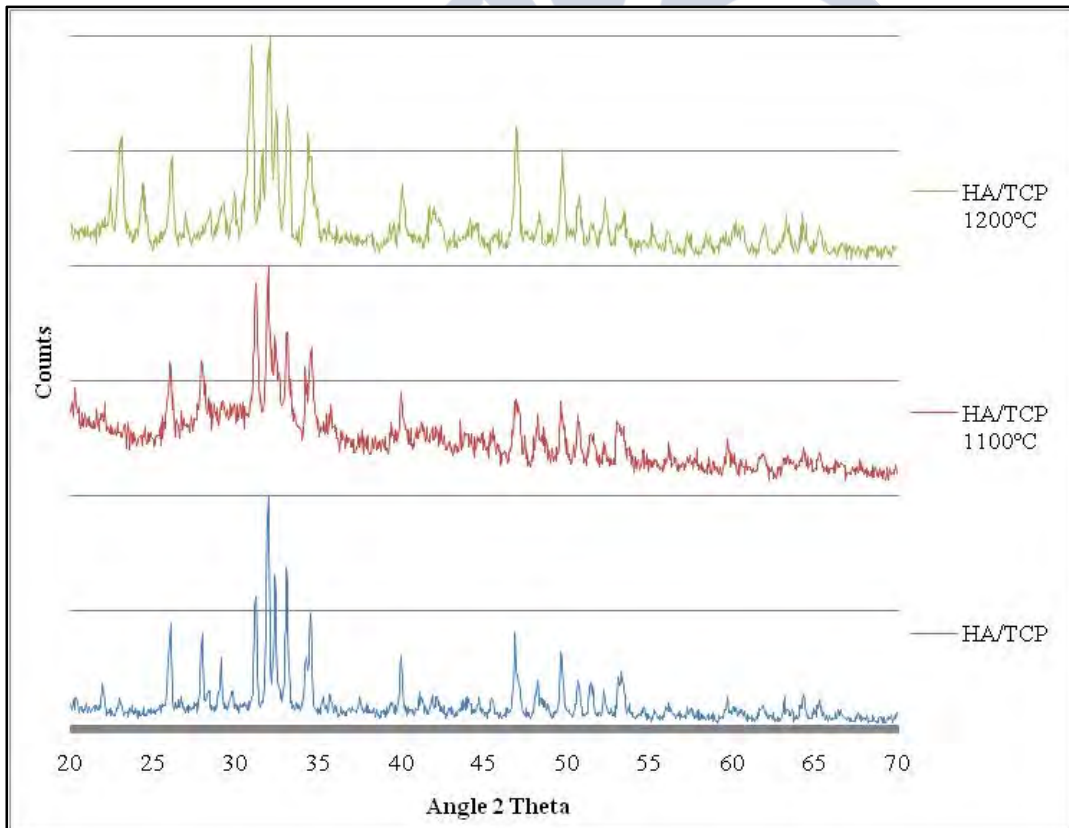


Fig. 6.2. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50% en volumen de BG 45S5 y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

Tabla 6.3. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	HA/ β -TCP	β -TCP	α -TCP
HA/ β -TCP 1200 °C	++	-	++
HA/ β -TCP 1100 °C	++	++	-
HA/ β -TCP	++	++	-

Legenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

El análisis por difracción de rayos X muestra en la tabla 6.3 que la mezcla HA/ β -TCP tiene estabilidad térmica hasta, por lo menos, los 1100 °C. El estudio también indica que el β -TCP pasa a ser α -TCP cuando es tratado a 1200 °C.

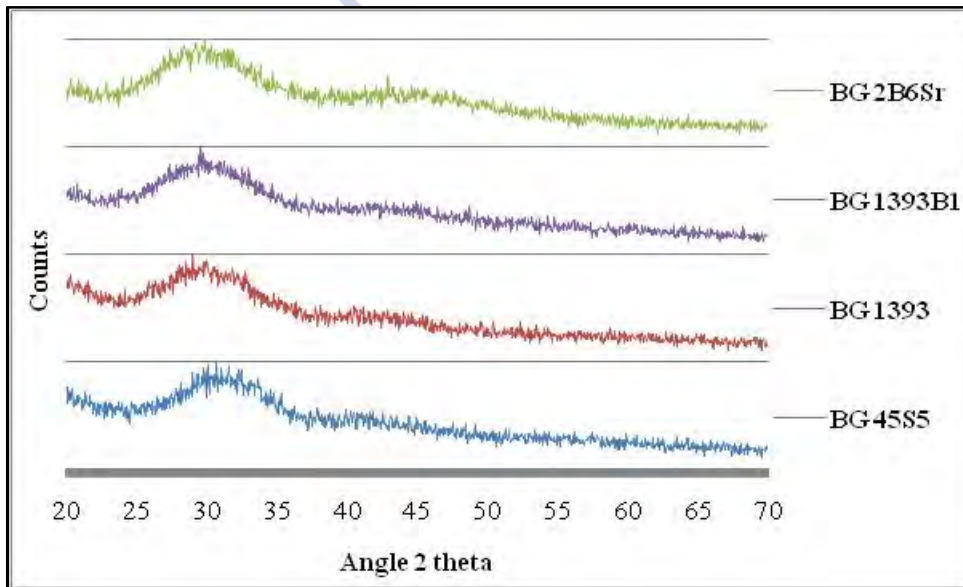


Fig. 6.3. Análisis por medio de difracción de rayos X de los diferentes vidrios bioactivos utilizados durante la presente investigación. De arriba a abajo: vidrio bioactivo 2B6Sr, en verde; vidrio bioactivo 1393B1, en violeta; vidrio bioactivo 1393, en rojo; y vidrio bioactivo 45S5 (también conocido como BioGlass), en azul.

El análisis de fase realizado a los vidrios bioactivos, representado en la figura 6.3 muestra que estos compuestos no presentan una estructura cristalina con parámetros definidos sino que tienen una estructura amorfa, típica de los vidrios.

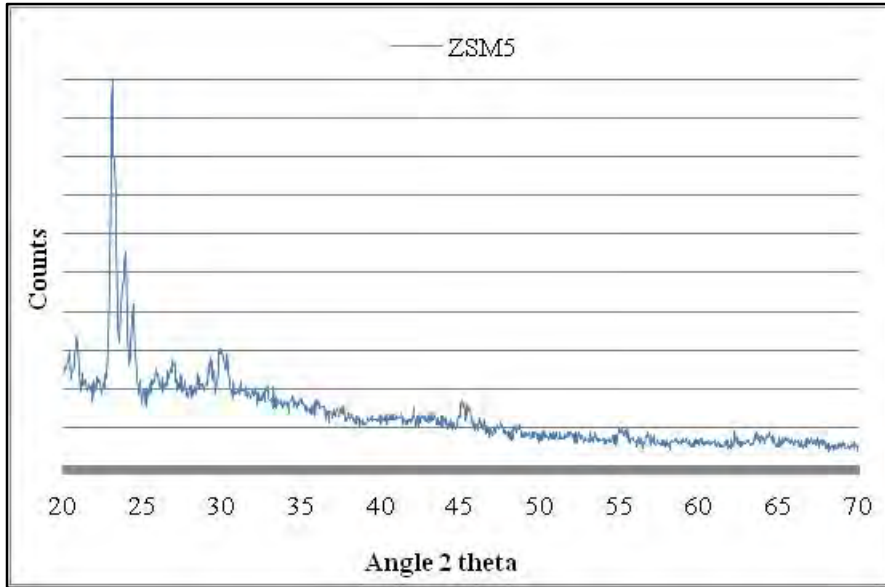


Fig. 6.4. Análisis por medio de difracción de rayos X de las zeolitas tipo ZSM-5.

El análisis de fase de las zeolitas muestra que sí que tienen estructura cristalina definida, tal y como se observa en el análisis de difracción de rayos X obtenido, con la presencia de varios picos muy marcados en la gráfica.

6.3. Estudio de dilatometría.

Se realizó un estudio de dilatometría para la mezcla de hidroxiapatito con β -fosfato tricálcico por un lado, y de las zeolitas tipo ZSM-5 por el otro.

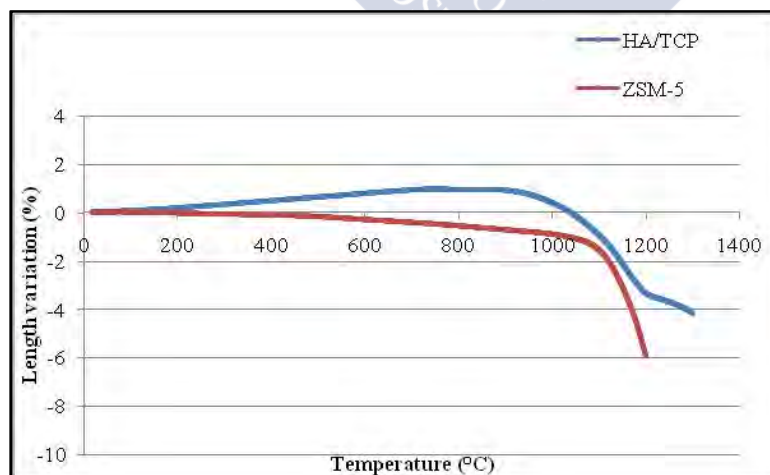


Fig. 6.5. Estudio de dilatometría de la mezcla HA/ β -TCP (60/40% vol), en azul; y de las zeolitas tipo ZSM-5, en rojo.

La figura 6.5 muestra que la mezcla HA/ β -TCP (60/40) presenta una pequeña dilatación (~1%) entre 200 y 950°C, aproximadamente, y que, a partir de estos 950°C el material experimenta una contracción que llega al 4% a los 1300°C.

Por otro lado, también en la figura 6.5 se puede apreciar que las zeolitas ZSM-5 experimentan una pequeña contracción desde los 200 hasta los 1100°C, en donde empiezan a experimentar una contracción mucho mayor entre los 1100 °C y los 1200 °C.

6.4. Medición de la superficie específica.

Las zeolitas ZSM-5 poseen una superficie específica muy grande y se procede a analizar la superficie específica de dicho compuesto después de someterlo a diferentes tratamientos térmicos.

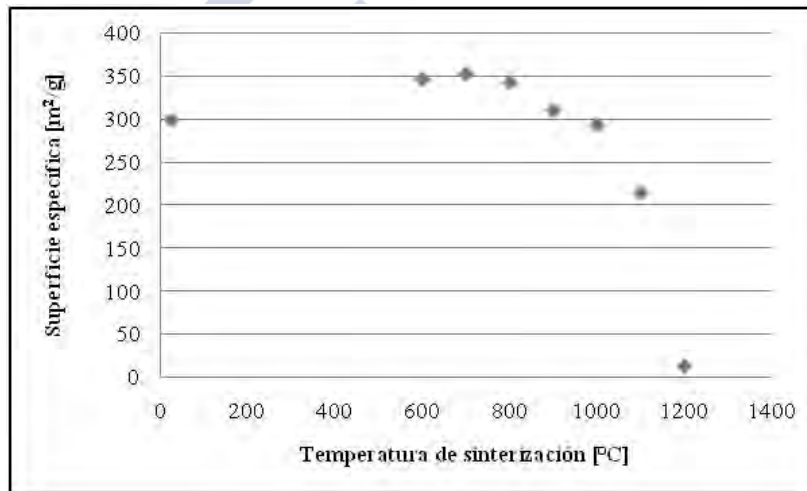


Fig. 6.6. Variación de la superficie específica de las zeolitas ZSM-5 en función de la temperatura de sinterización. El primer punto corresponde con el material sin ser tratado térmicamente.

Como se puede observar en la figura 6.6 la superficie específica de las zeolitas se mantiene en unos valores muy altos (> 300 m²/g) hasta los 1000 °C, en donde empieza a decrecer drásticamente.

6.5. Medición de tamaño de partícula.

Se realiza un estudio de medición de partículas del compuesto BG 45S5.

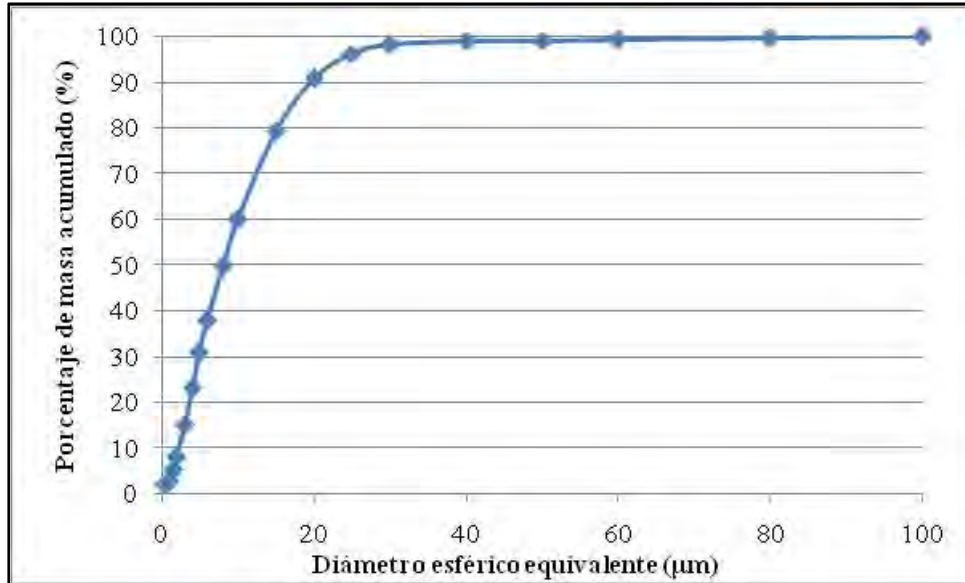


Fig. 6.7. Análisis del tamaño de partícula del vidrio bioactivo 45S5 utilizado en la investigación.

Además de la distribución de los diferentes tamaños de partículas, el estudio realizado también nos indica el diámetro de partícula equivalente medio, en este caso con un valor de 8,05 µm; y el valor del diámetro modal, que se corresponde con 12,18 µm.

6.6. Resumen y discusión del capítulo.

6.6.1. Densidad real.

Los valores obtenidos a través de la medición de la densidad real serán utilizados más adelante para establecer las cantidades de compuestos necesarias para crear piezas con una determinada concentración cerámica.

En el caso de la seda, se tomará como valor de densidad real para la preparación de disoluciones el valor que se ha obtenido de la fibroína de seda, ya que será con este compuesto (con la sericina extraída de la seda inicial) con el que se realizarán piezas para la regeneración de tejido óseo.

6.6.2. Difracción de rayos X.

Las gráficas obtenidas en este estudio de las materias primas servirán para comparar con las gráficas que se obtendrán de los materiales después de ser sometidos a tratamientos

térmicos. La comparación de los diferentes diagramas de difracción de rayos X nos dará información sobre posibles reacciones químicas o cambios de fase que se puedan producir en los compuestos debido a los correspondientes tratamientos térmicos a los que serán sometidos.

Como se puede observar en la figura 6.1, tanto el hidroxiapatito como el fosfato tricálcico muestran una estructura marcadamente cristalina, con picos bien definidos y relativamente fáciles de identificar. La mezcla de ambos compuestos, con una proporción 60/40 (HA/ β -TCP) manifiesta un difractograma que es el producto de la suma de ambos compuestos, con una mayor representación del hidroxiapatito, ya que se encuentra presente en una mayor proporción en comparación con el fosfato tricálcico.

El tratamiento térmico que lleva el β -TCP hasta 1200 °C transforma este compuesto a α -TCP. A pesar de que algunos autores apuntan a que el α -TCP también es biocompatible y muy válido para la regeneración ósea [153, 154], no existen demasiados resultados sobre este hecho. Sin embargo, el β -TCP sí que ha sido utilizado en multitud de estudios de regeneración ósea, incluyendo *in vitro* y *in vivo* [32, 158, 220]. También es un hecho remarcable que una gran mayoría de productos en el mercado mundial están formados, principalmente, por β -TCP, como se ha visto en el apartado 3.5. Marcas comerciales en la actualidad. Por ello, el tratamiento térmico de las piezas conformadas con β -TCP de este presente estudio nunca alcanzará los 1200 °C. Tal y como indica la bibliografía, el β -TCP se transforma en α -TCP a los 1180 °C y en α' -TCP en torno a los 1480 °C [151].

El análisis de los vidrios bioactivos muestra en la figura 6.3 que todos ellos presentan una estructura no cristalina, si no vítrea, tal y como sus nombres indican.

El estudio de las zeolitas ha dado como resultado la identificación de las ZSM-5 con óxido alúminosilicato, con número de referencia 42-0305.

6.6.3. Dilatometría.

Las gráficas obtenidas a partir del estudio de dilatometría nos indican que la contracción del HA/ β -TCP (60/40) se empieza a producir a partir de los 1000 °C, con lo que se puede interpretar que es a partir de esta temperatura donde se empieza a producir el proceso de sinterización. Por otro lado, las zeolitas ZSM-5 experimentan el mismo fenómeno a una temperatura más elevada, en torno a los 1100 °C, en donde empieza la contracción del material, por lo que establecemos que es a partir de esta temperatura cuando se comienza a producir la sinterización de las zeolitas ZSM-5.

6.6.4. Superficie específica.

Los datos sobre la superficie específica de las zeolitas se corresponden con los datos que hemos obtenido del estudio de dilatometría del mismo compuesto. En torno a los 1000-1100 °C es cuando la superficie específica de las zeolitas empieza a descender drásticamente, fenómeno relacionado con el proceso de sinterización del propio material.

Estos datos nos indican que el posible uso de las zeolitas como portadores de ciertos tipos de moléculas puede ser bastante complicado, ya que al intentar sinterizar este compuesto para dotarlo de unas propiedades mecánicas mínimas, éste perderá la cualidad de su gran superficie específica, estrechamente ligada al hecho de que estos compuestos puedan ser utilizados como portadores moleculares en el interior de las piezas para regeneración de tejido óseo.

6.6.5. Tamaño de partículas.

El tamaño de partículas del BG 45S5 será de utilidad posteriormente ya que el BG 45S5 será utilizado sin ser sometido a un proceso de sinterización, con lo que conservará su tamaño de partícula original.



7. Estudio de la conformación de piezas de HA/ β -TCP + BG 45S5.

A continuación se desarrolla el estudio de la mezcla de los fosfatos cálcicos hidroxiapatito y beta fosfato tricálcico (HA/ β -TCP) en una proporción 60/40% junto con el vidrio bioactivo 45S5 (BG 45S5), con diferentes proporciones de cada uno de estos dos compuestos.

Para desarrollar piezas porosas por medio de *freeze casting* de la mezcla de estos compuestos, se comenzará por el análisis del proceso térmico que se aplicará a las piezas una vez estén conformadas, para así dotarlas de propiedades mecánicas.

7.1. Estudio del proceso térmico.

Para llevar a cabo el estudio del proceso térmico al que serán sometidos las piezas de HA/ β -TCP con BG 45S5 se lleva a cabo un estudio de dilatometría. En dicho estudio se han analizado tres composiciones diferentes de la mezcla de ambos compuestos. Las tres composiciones elegidas para el estudio son del 10, 30 y 50% volumen de BG 45S5, y el resto del porcentaje corresponde a HA/ β -TCP. Por la bibliografía y los estudios de dilatometría realizados en el apartado anterior, se da por hecho que el HA/ β -TCP sinteriza a una temperatura entre 1100 y 1200 °C, aunque el vidrio posee una temperatura de fusión cercana a los 900 °C [66, 122, 156, 157].

En la figura 7.1. se puede apreciar que la temperatura en la que se empieza a producir la contracción del material (que, a su vez, se corresponde con el proceso de sinterización) es menor cuanto mayor contenido de vidrio bioactivo hay en la muestra.

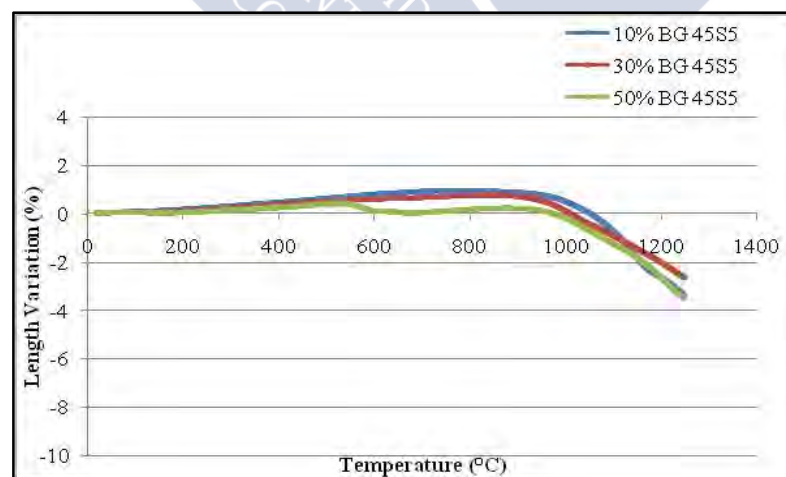


Fig. 7.1. Estudio de dilatometría para tres composiciones diferentes de la mezcla HA/ β -TCP con BG 45S5. 10% BG 45S5 en azul; 30% BG 45S5 en rojo; 50% BG 45S5 en verde. El porcentaje de BG 45S5 es en volumen y el resto se corresponde con HA/ β -TCP.

También se realiza un estudio de dilatometría para el BG 45S5, aunque hasta una temperatura más baja que la utilizada en otros estudios de dilatometría, tal y como se aprecia en la figura 7.2.

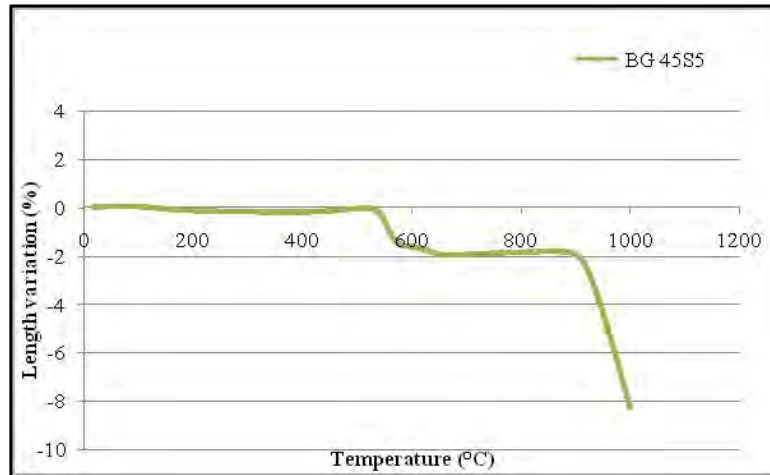


Fig. 7.2. Estudio de dilatometría del vidrio bioactivo 45S5 puro.

De esta manera, se puede apreciar en la figura 7.2 que el vidrio 45S5 presenta una contracción del 2% alrededor de 580 °C.

También se lleva a cabo el análisis de las fases presentes en la mezcla al 50% de volumen de BG 45S5 y 50% de HA/ β -TCP (60/40) después de ser sometidos a diferentes tratamientos térmicos, como muestra la figura 7.3. Los difractogramas obtenidos después de llevar la mezcla a 1200 °C y 1100 °C son comparados con la propia mezcla y los compuestos por separado sin aplicar ningún tipo de tratamiento térmico.

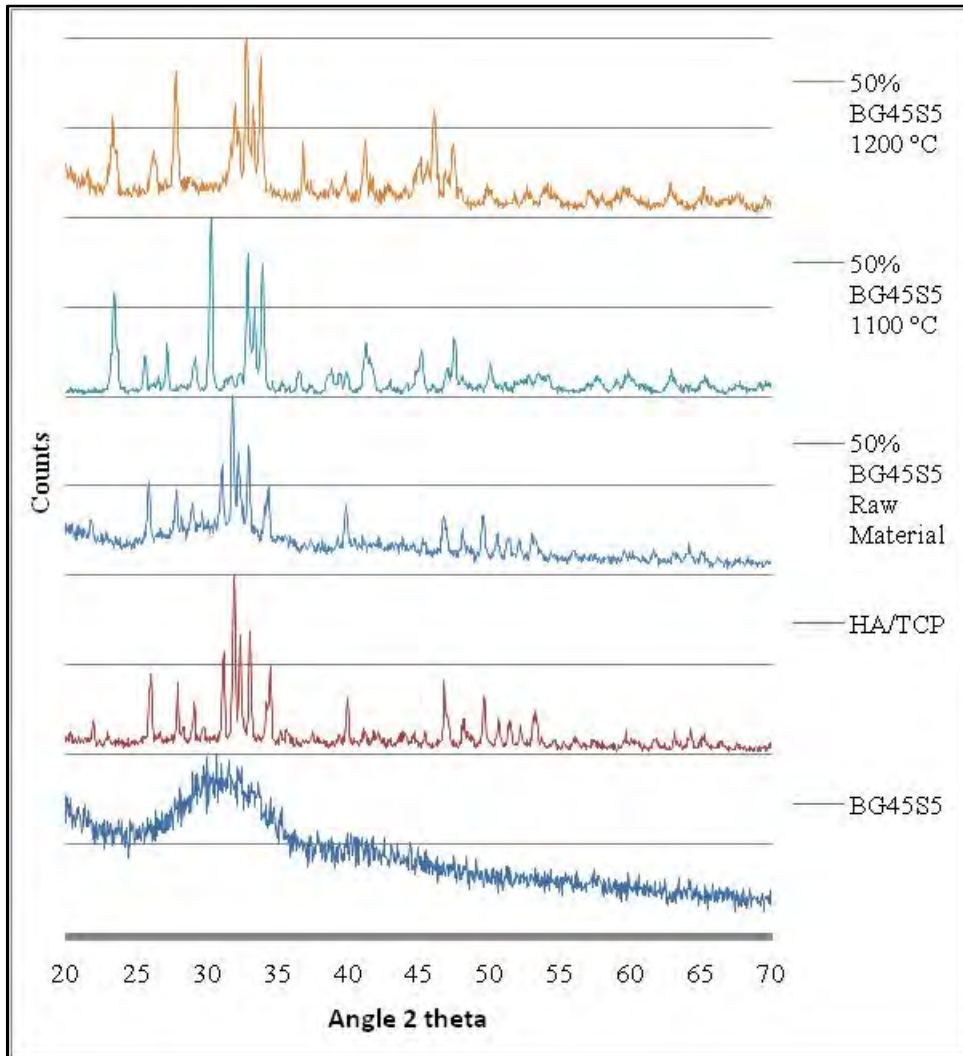


Fig. 7.3. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50% en volumen de BG 45S5 y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

Tabla 7.1. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	HA/ β -TCP	Fosfato Cálculo Sódico	Wollastonita	Pseudo Wollastonita
50% BG 45S5 1200 °C	-	++	-	++
50% BG 45S5 1100 °C	-	++	++	-
50% BG 45S5	++	-	-	-
HA/β-TCP	+++	-	-	-
BG 45S5	-	-	-	-

Leyenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

Por otro lado, también se hace un análisis de fases de BG 45S5, comparando el material sin ser sometido a ningún tipo de tratamiento térmico y después de llevarlo hasta los 800 °C, tal y como se aprecia en la figura 7.4.

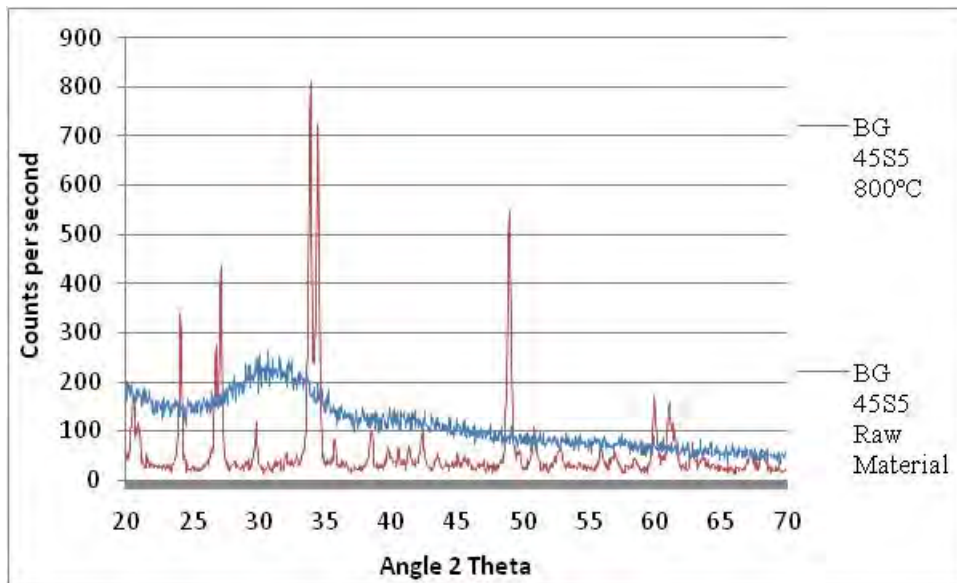


Fig. 7.4. Análisis por medio de difracción de rayos X del vidrio bioactivo 45S5 antes (en azul) y después (en rojo) de ser sometido a un proceso térmico de 800°C.

El análisis del difractograma ha identificado el compuesto que se obtiene después de alcanzar una temperatura de 800 °C con un silicato cálcico-sódico de manera muy mayoritaria.

7.2. Resumen y discusión del capítulo.

Estos compuestos se habían elegido para intentar desarrollar muestras porosas con una degradabilidad controlada. Esto, a priori, podría ser conseguido fácilmente ya que ambos compuestos presentan una degradabilidad muy diferente por separado. Mientras que el HA/ β -TCP presenta una degradabilidad prácticamente nula [44, 63], el vidrio bioactivo tiene unos valores muy altos de degradación, incluso demasiado altos en comparación con la velocidad de regeneración natural del tejido óseo humano [221]. Mezclando ambos compuestos podrían obtenerse velocidades adecuadas de disolución, en el que un producto se disolvería más rápidamente (en este caso el vidrio bioactivo) y a la vez, dejando una estructura primaria de HA/ β -TCP que se disolvería mucho más lentamente. Por otro lado, de entre todos los vidrios bioactivos, el 45S5, también conocido como BioGlass, es el que mejores propiedades biológicas presenta, con lo que las buenas propiedades que fomentarían el crecimiento celular provocadas por el BioGlass se verían reforzadas por la estabilidad química del HA/ β -TCP.

Desarrollando diferentes concentraciones de los compuestos se podría hacer un estudio completo de la degradabilidad de un composite conformado por ambos, para poder escoger una concentración determinada en función de la degradabilidad que se quisiera obtener para las piezas para regeneración de tejido óseo.

Los resultados obtenidos del estudio de dilatometría a diferentes concentraciones de BG 45S5 muestra que cuanto mayor sea la concentración del vidrio bioactivo, a menor

temperatura se empieza a contraer la muestra. Estos resultados tienen bastante coherencia, ya que el BG 45S5 tiene una temperatura de fusión bastante menor que la mezcla HA/ β -TCP. Sin embargo, es bastante llamativo que en el compuesto con un 50% de BG 45S5 existe una contracción bastante marcada alrededor de los 580-600 °C.

Parece que esta contracción está provocada por el vidrio bioactivo, ya que a menores concentraciones del BG 45S5 no se detecta, así como tampoco se aprecia nada parecido en la figura 6.5 en el apartado anterior, en la que se estudiaba a través de dilatometría el comportamiento de la mezcla HA/ β -TCP al aumentar la temperatura.

Por otro lado, la figura 7.3 muestra el estudio de fases llevado a cabo a través del estudio de la difracción de rayos X de la mezcla al 50% de HA/ β -TCP y BG 45S5. A medida que se aumenta la temperatura, aparecen nuevas fases en el sistema, en concreto fosfatos cálcicos sódicos por un lado y wollastonita y pseudo-wollastonita por otro. Estos últimos compuestos están formados por silicio, que necesariamente tiene que provenir del vidrio bioactivo. Esto indica que parte del vidrio bioactivo se ha cristalizado y transformado en la propia wollastonita

Efectivamente, el estudio de difracción de la figura 7.4 muestra que el BG 45S4 es un vidrio antes de ser tratado térmicamente pero cristaliza después de ser llevado hasta 800 °C. Al consultar la bibliografía se puede encontrar que el BioGlass cristaliza a una temperatura alrededor de 600 °C [66, 122]. El compuesto se identifica con un silicato cálcico sódico.

Esto provoca que toda la estructura cristalina del compuesto cambie, lo que, a su vez, hará que su comportamiento como biomaterial también sea completamente diferente. Tal y como se describía en el apartado de Materias Primas, el vidrio 45S5 pierde una gran cantidad de propiedades como biomaterial al dejar de ser un vidrio y transformarse en un compuesto vitrocerámico, perdiendo gran parte de sus propiedades bioactivas y la alta velocidad de disolución con la que se disolvía en suero fisiológico [78, 104, 122, 160, 161]. Debido al hecho de que pierde gran parte de las propiedades bioactivas originales, el estudio de la conformación de piezas compuestas por HA/ β -TCP y BG 45S5 se detiene en este punto y se opta por seguir con otros materiales.

De esta manera, se puede afirmar que la contracción que mostraba el estudio de dilatometría del vidrio bioactivo 45S5 puro a una temperatura cercana a los 580 °C (Fig. 7.2), se corresponde a la temperatura de cambio de fase del material. De tener estructura vítrea, pasa a tener estructura cristalina antes de que llegue a la temperatura de sinterización, en torno a los 900 °C, que se corresponde con los datos encontrados en la bibliografía [78, 160, 161].

Por otro lado, es un detalle bastante obvio que una vez que el vidrio bioactivo cristaliza ya no es vidrio, puesto que deja de tener estructura amorfa. A pesar de ello, muchos autores siguen utilizando este compuesto y llamándolo vidrio bioactivo 45S5 [89, 104, 108, 122], de manera errónea.

A pesar de que inicialmente sí que se trata de un compuesto con estructura vítrea, una vez que es sometido a tratamientos térmicos por encima de 580 °C este compuesto se desvitrifica, por lo que debería de ser llamado "vidrio desvitrificado" o "vitrocerámica bioactiva".

En otro capítulo más adelante, en el apartado 10 de esta tesis, se volverá a retomar la investigación con el vidrio bioactivo 45S5, pero sin someterlo a un tratamiento térmico. Se intentarán buscar otro tipo de alternativas para conformarlo como material sólido, con lo que esperamos siga conservando las propiedades bioactivas originales del vidrio.



8. Estudio de la conformación de piezas de HA/ β -TCP + BG 1393.

En el presente apartado se estudian las piezas para la regeneración de tejido óseo que contienen diferentes concentraciones de HA/ β -TCP y vidrio bioactivo BG 1393 conformadas por medio del proceso de *freeze casting*.

8.1. Análisis del proceso térmico.

El primer estudio del comportamiento de la mezcla de BG 1393 con HA/ β -TCP al ser sometidos a tratamientos térmicos es el análisis por medio de dilatometría. Se preparan tres concentraciones diferentes de BG 1393 y HA/ β -TCP (10, 30 y 50% de BG 1393 en volumen) y se observa como dilatan y contraen con el aumento de la temperatura, tal y como muestra la figura 8.1. Puesto que según la bibliografía, el BG 1393 tiene una temperatura de fusión bastante más baja que la mezcla de HA/ β -TCP, las concentraciones mayores de BG 1393, se llevan hasta temperaturas más bajas.

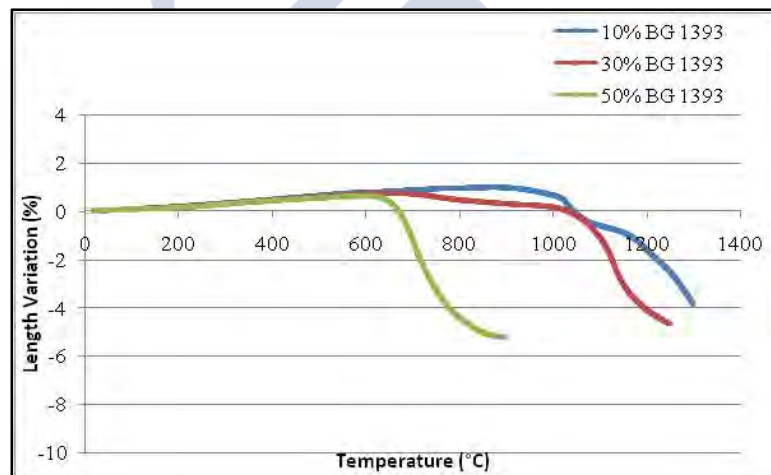


Fig. 8.1. Estudio de dilatometría para tres composiciones diferentes de la mezcla HA/ β -TCP con BG 1393. 10% BG 1393 en azul; 30% BG 1393 en rojo; 50% BG 1393 en verde.

El porcentaje de BG 1393 es en volumen y el resto se corresponde con HA/ β -TCP.

Como se puede observar en la figura 8.1, cuanto mayor es el contenido de BG 1393 en la mezcla, menor es la temperatura a la que el material se empieza a contraer.

El estudio de difracción de rayos X se lleva a cabo y se obtienen los resultados que muestra la figura 8.2. Corresponden a una mezcla 50% volumen de HA/ β -TCP y BG 1393 que es llevada hasta diferentes temperaturas y comparada con ambos compuestos iniciales sin ser sometidos a ningún tipo de tratamiento térmico.

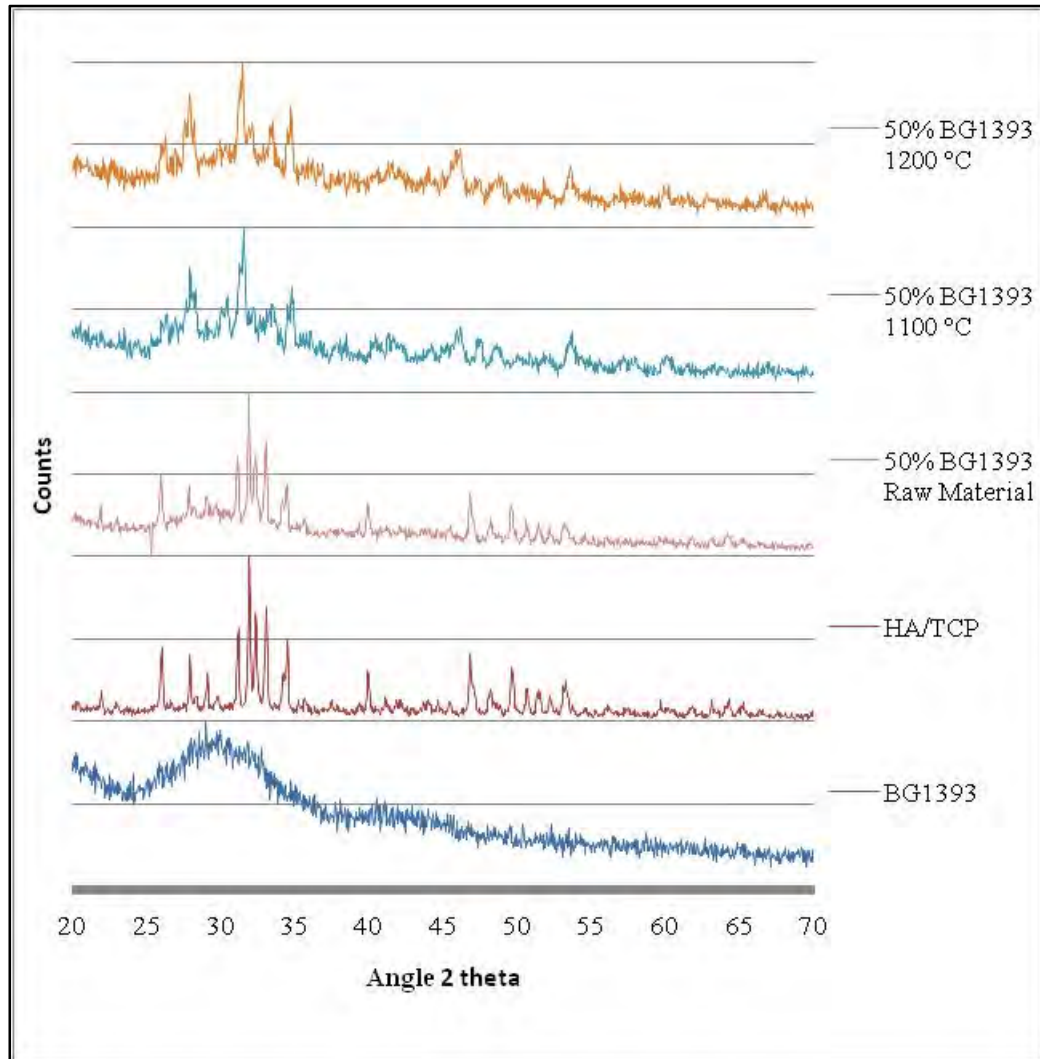


Fig. 8.2. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50% en volumen de BG 1393 y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

El análisis de la difracción de rayos X muestra en la tabla 8.1 los compuestos en cada una de las diferentes temperaturas.

Tabla 8.1. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	HA	β -TCP	Otros fosfatos cálcicos
50% BG 1393 1200 °C	++	-	++
50% BG 1393 1100 °C	++	+	+
50% BG 1393	++	++	-
HA/β-TCP	++	++	-
BG 1393	-	-	-

Leyenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

La tabla 8.1 muestra la evolución de los diferentes compuestos cristalinos al aumentar la temperatura. Mientras que se aprecia la presencia de HA durante todo el proceso, se observa que el β -TCP se va descomponiendo en otros fosfatos cálcicos. No se aprecia la aparición de ningún compuesto con presencia de silicio que pueda proceder del vidrio bioactivo.

8.2. Conformado.

Una vez terminado el estudio del proceso térmico al que se someten los compuestos que serán utilizados durante este trabajo, se inicia el estudio del conformado de dichos materiales, para transformar las materias primas en polvo en piezas sólidas con estructura interna que puedan ser aptas para ser utilizadas como injertos en los que puedan crecer tejido óseo.

8.2.1. *Freeze casting.*

El primer paso para llevar a cabo el proceso de *freeze casting* es la preparación de la suspensión inicial. Tal y como se indicaba en el apartado de Métodos experimentales, uno de los parámetros más importantes es el contenido sólido de la disolución y que se estableció en un valor del 20% en volumen de contenido sólido para las piezas de este estudio, y el restante 80% es agua.

Este 20% en volumen de contenido sólido es la suma de los volúmenes del HA/ β -TCP y del BG 1393. Para realizar un estudio completo que abarque desde piezas de HA/ β -TCP puras a BG 1393 puro, se preparan 7 concentraciones de BG 1393, siendo el resto del porcentaje correspondiente a HA/ β -TCP:

0% (HA/ β -TCP Puro)-10%-30%-50%-70%-90%-100% (BG 1393 Puro)

Se toman las densidades reales de los dos compuestos, que fueron obtenidas previamente a través de picnometría, y se aplican las fórmulas para obtener las cantidades necesarias de cada compuesto para preparar 100 ml de suspensión:

$$m_{BG1393} = \%_{cc} \cdot \rho_{BG1393} \cdot \%_{BG1393} \quad (\text{Ecuación 8.1})$$

$$m_{HA/\beta-TCP} = \%_{cc} \cdot \rho_{HA/\beta-TCP} \cdot (1 - \%_{BG1393}) \quad (\text{Ecuación 8.2})$$

En dónde:

m_x : masa a añadir del compuesto x.
 $\%_{cc}$: porcentaje en volumen de contenido cerámico en la suspensión.
 ρ_x : densidad del compuesto x.

%BG1393: porcentaje de BG 1393 en la suspensión a obtener.

Así, con las ecuaciones anteriores, se obtienen 20 ml de volumen de compuestos cerámicos sólidos, que es lo mismo que decir que el 20% de los 100 ml de volumen de la suspensión inicial estarán formados por compuestos sólidos.

Tabla 8.1. Masa de cada compuesto necesaria para preparar 100 ml de suspensión con un 20% de volumen de contenido cerámico

	Contenido de BG 1393 (vol %) en la suspensión						
	0%	10%	30%	50%	70%	90%	100%
HA/β-TCP (g)	61,20	55,13	42,88	30,63	18,38	6,13	
BG 1393 (g)		5,35	16,04	26,73	37,42	48,11	53,46

Estas masas de compuestos sólidos obtenidos en la tabla 8.1, se añaden a 80 ml de agua (se toma, por aproximación y comodidad, que la densidad del agua es 1 g/ml) a la que, previamente se le han añadido tres diferentes aditivos orgánicos para dotar a las suspensiones de las propiedades reológicas apropiadas para poder llevar a cabo el proceso de *freeze casting*, tal y como se ha explicado en el apartado de Métodos experimentales, utilizando PEG-300 (lubricante), Darvan CN (dispersante) y Aquazol 50 (aglutinante).

Durante el proceso experimental, el orden de mezcla de los compuestos para producir las suspensiones cerámicas siempre ha sido el mismo, tomando primero el peso correspondiente de agua y añadiendo el lubricante, el dispersante, el aglutinante. Después se completaba con la adición de HA/ β -TCP y finalmente el BG 1393.

Una vez que todos los compuestos han sido puesto en el interior de un bote plástico, se la añadían tres pequeños cilindros de zircona y el bote era colocado en un dispositivo rotatorio que hace que el bote plástico, junto con los cilindros de zircona, actúen como un molino de bolas. Este proceso se lleva a cabo durante 24 horas.

Un día después, la mezcla es retirada del dispositivo rotatorio y se elimina el aire que la suspensión pueda contener (para evitar la aparición de burbujas que podrían distorsionar la estructura lamelar que se quiere obtener en la futura pieza) por medio del vertido de la suspensión en un vaso de precipitados sobre hielo (para ir aproximando la temperatura de la suspensión a los 3 °C de inicio del proceso de *freeze casting*) y al vacío durante 3 minutos.

Transcurrido este tiempo, la suspensión está lista para ser sometida al proceso de Freeze Casting. Como se apuntó en el apartado de Métodos Experimentales, otro parámetro muy importante para las propiedades que presentarán las futuras piezas es la velocidad de enfriamiento durante el proceso de *freeze casting*. En este estudio se ha tomado una velocidad de enfriamiento de 5 °C/min.

Con el programa de enfriamiento ya seleccionado, el proceso de *freeze casting* en sí da comienzo. Una vez que la suspensión se ha congelado por completo, las piezas se retiran de

los moldes y se introducen en un liofilizador a bajas presiones y bajas temperaturas durante 72 horas, tal y como se detallaba en el apartado de Métodos experimentales.

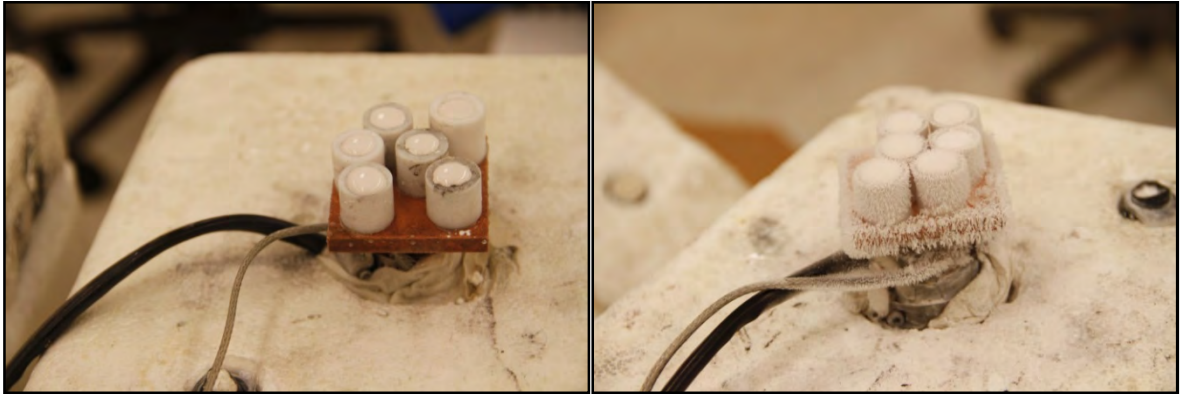


Fig. 8.3. Imágenes de la suspensión cerámica colocada en los moldes de teflón sobre el controlador de temperatura del proceso de *freeze casting* al inicio (izquierda) y al final (derecha) del propio proceso.

8.2.2. Sinterización.

Una vez que se ha sublimado todo el hielo de las piezas después del proceso de *freeze casting*, las piezas conformadas por HA/ β -TCP y BG 1393 tienen que ser sometidas a un proceso térmico de sinterización para adquirir consistencia estructural, ya que, de lo contrario, únicamente son polvo compactado y que se deshace con la más mínima manipulación.

Con mucho cuidado, todas las piezas son extraídas del liofilizador e insertadas en el horno donde recibirán el tratamiento térmico. A priori no se conoce la temperatura adecuada de sinterización para cada una de las composiciones que se están estudiando, a excepción de las piezas de HA/ β -TCP, cuya temperatura de sinterización se fija en 1150 °C, dato que se obtiene de la bibliografía [146, 158] y a través de los cambios de fase que se producen en el β -TCP antes de los 1200 °C y que se quieren evitar. Para hacer una estimación de las temperaturas de sinterización del resto de piezas con diferentes concentraciones de BG 1393, se toman como referencia los datos obtenidos a partir de los estudios de dilatometría llevados a cabo previamente.

De esta manera se establecen los intervalos que se van a estudiar:

Tabla 8.2. Intervalo de temperaturas en el que se encuentra la temperatura óptima de sinterización para cada concentración de BG 1393.

Composición	10% BG 1393	30% BG 1393	50% BG 1393	70% BG 1393	90% BG 1393	100% BG 1393
Rango de temperaturas	950- 1200 °C	850- 1150 °C	750- 1050 °C	650- 950 °C	550- 750 °C	550- 700 °C

Estos intervalos son divididos en subintervalos de 50°C entre cada punto. En el caso de 100% BG 1393 se utilizan intervalos de 25 °C para obtener una optimización de la temperatura más precisa.

Para este apartado de optimización de la temperatura de sinterización se han utilizado durante el proceso de *freeze casting* moldes de teflón de 1 cm de diámetro interno y una altura de 1,5 cm. Se procesan cuatro cilindros de cada composición para cada temperatura para poder realizar el estudio de las propiedades mecánicas y el análisis de la estructura interna por medio de microscopía electrónica. En las figuras 8.4-8.9 se presentan las piezas para cada composición a las temperaturas en las que se ha llevado a cabo el estudio.

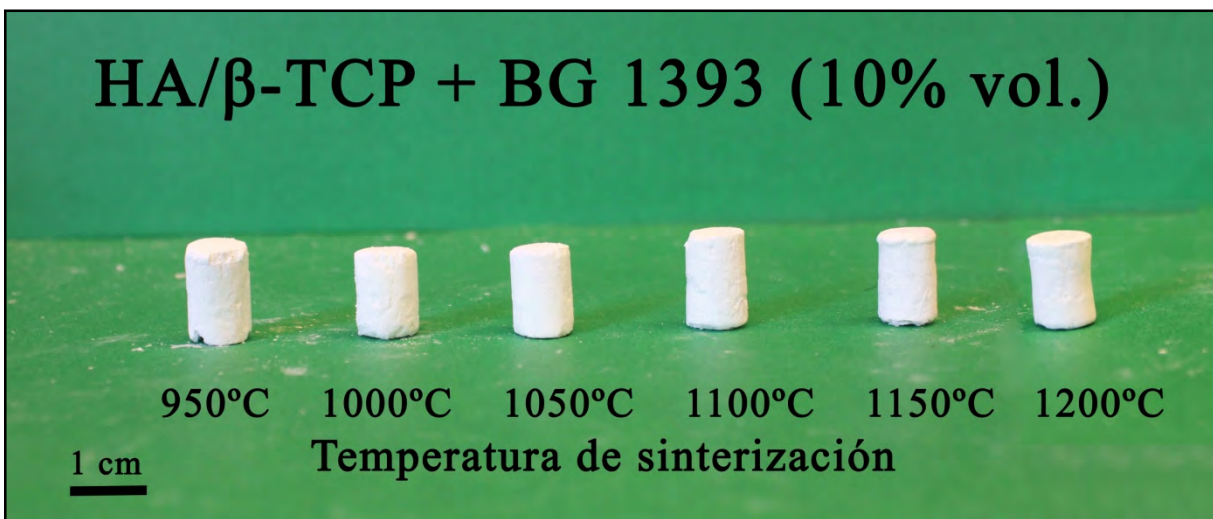


Fig. 8.4. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 10% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.



Fig. 8.5. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 30% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

En las figuras 8.4 y 8.5, que son las correspondientes a una menor concentración de BG 1393, se puede observar que todas las piezas tienen, prácticamente, la misma apariencia externa, independientemente de la temperatura de sinterización a la que fueron sometidas previamente.

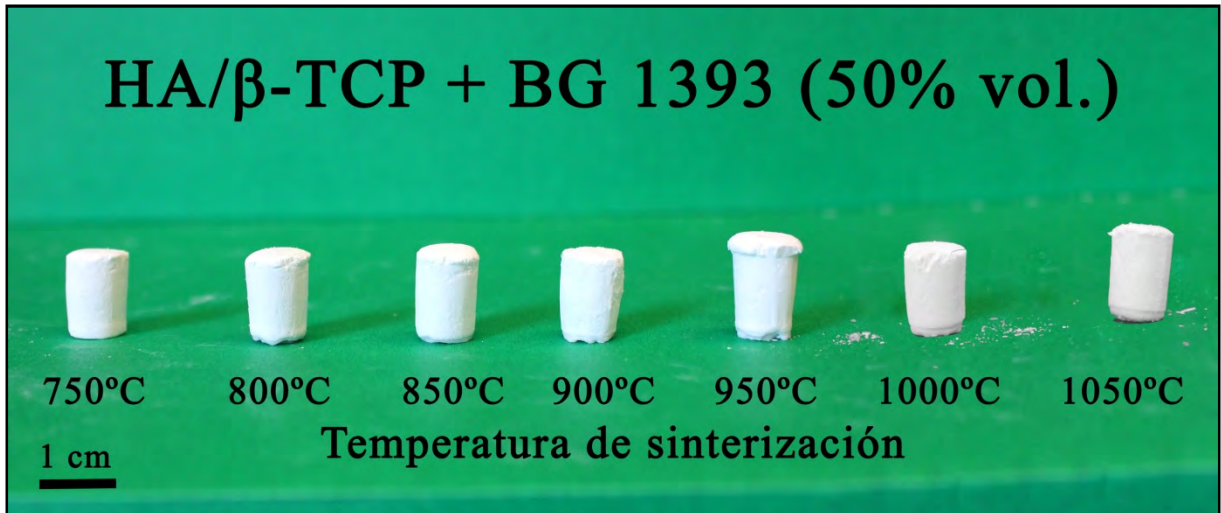


Fig. 8.6. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 50% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.



Fig. 8.7. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 70% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

Por otro lado, las figuras 8.6 y 8.7 muestran piezas con mayores concentraciones de BG 1393 que las figuras previas y se pueden observar pequeñas diferencias en el aspecto externo de las piezas. En las muestras de la figura 8.6, con un contenido del 50% de BG 1393, las piezas correspondientes a las temperaturas de 1000 y 1050 °C presentan una alteración de la estructura en la parte inferior de la pieza. La figura 8.7 muestra también este fenómeno para todas las piezas.



Fig. 8.8. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 90% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.



Fig. 8.9. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 100% de volumen de BG 1393 a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

En las figuras 8.8 y 8.9, que son las piezas con mayores contenidos de BG 1393 se observa un fenómeno parecido, especialmente para las piezas que han sido sometidas a mayores temperaturas de sinterización.

La figura 8.9 muestra las piezas conformadas únicamente con BG 1393. Son muy llamativas las piezas sinterizadas a 675 °C y 700 °C, que presentan un color negro muy diferente del color blanco que presentan todas las demás piezas conformadas con HA/ β -TCP y BG 1393.

De todas las piezas obtenidas a través del proceso de Freeze Casting y con el posterior proceso térmico se seleccionarán las que se consideren válidas para ser utilizadas como piezas para la regeneración de tejido óseo, como se discutirá más adelante en el apartado 8.5 de Discusiones.

8.3. Caracterización fisicoquímica.

Una vez que las piezas han sido conformadas, se procede a la caracterización fisicoquímica de éstas, donde también se estudia la temperatura óptima de sinterización y se establecen los principales parámetros físicos y químicos de cada una de las piezas obtenidas y, posteriormente, sinterizadas.

8.3.1. Propiedades mecánicas a compresión.

El proceso de medición de las propiedades mecánicas se realiza como se describe en el apartado de Métodos experimentales, utilizando los discos obtenidos a partir del proceso de cortado de los cilindros obtenidos directamente del proceso de *freeze casting*.

En la figura 8.10 se puede apreciar las curvas de compresión/deformación tipo que resultan del estudio mecánico de estas piezas. Aunque se obtienen diferentes parámetros, como compresión máxima o una pendiente (correspondiente con el módulo de Young de la pieza), todas ellas presentan un comportamiento similar, con un máximo de resistencia a la compresión a partir del cual la pieza no aguanta la presión ejercida y colapsa.

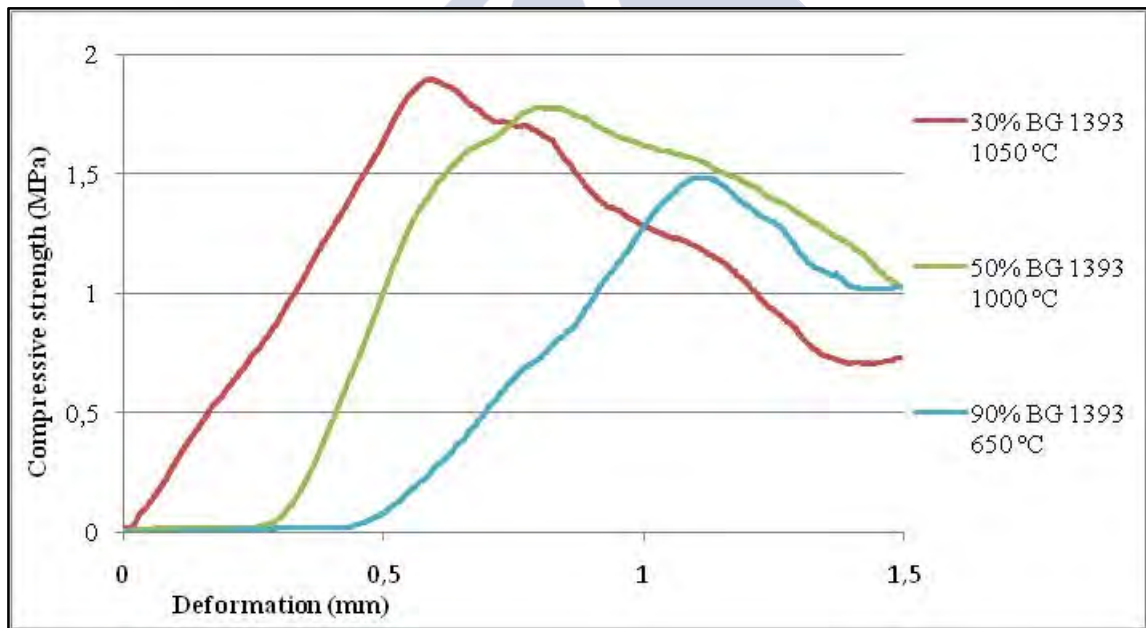


Fig. 8.10. Análisis de las propiedades mecánicas a compresión en función de la deformación para piezas con diferentes concentraciones de BG 1393 en volumen: 30% (rojo), 50% (verde) y 90% (azul).

El estudio de las propiedades mecánicas se lleva a cabo para todos los cilindros con diferentes concentraciones de BG 1393 y diferentes temperatura de sinterización, obteniéndose los resultados que muestra la figura 8.11.

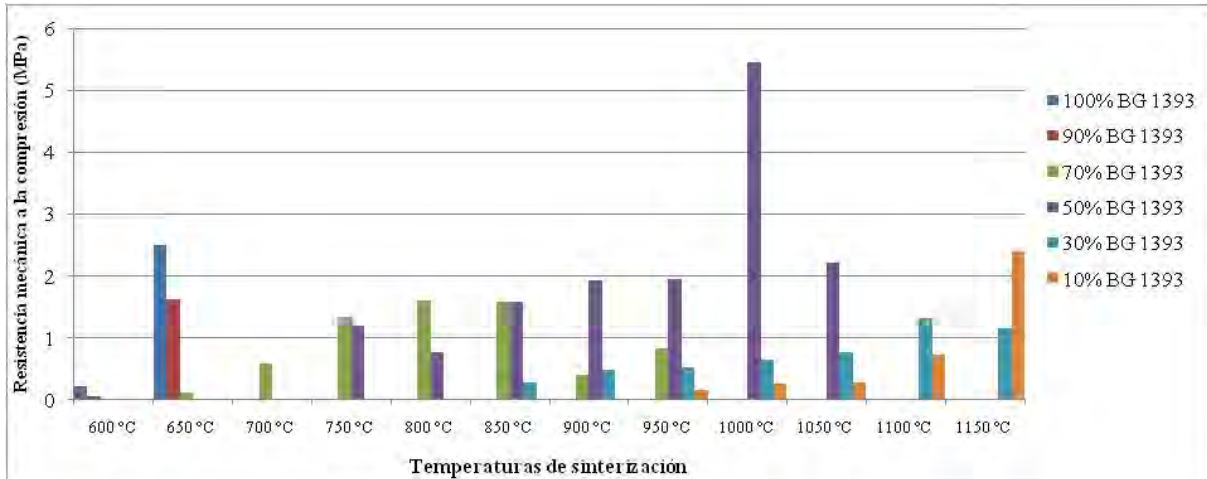


Fig. 8.11. Análisis de la resistencia mecánica máxima a compresión de piezas con diferentes concentraciones de BG 1393 sinterizadas a diferentes temperaturas.

La mayoría de concentraciones ofrece un máximo de resistencia a la compresión diferenciado a una temperatura concreta (como en los casos de concentración de BG 1393 de 100%, 90%, 50% y 10%), aunque en otros casos existen valores muy similares de máximos de resistencia a la compresión (BG 1393 70%, 30%).

8.3.2. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.

Las obtención de imágenes a través del microscopio de barrido electrónico permite analizar con un gran detalle la estructura que se ha creado gracias al proceso de conformación de las piezas del *freeze casting*.

La primera imagen de piezas analizadas son las correspondientes a HA/ β -TCP puro (0% BG 1393) en la figura 8.12, que tienen una temperatura de sinterización de 1150 °C.

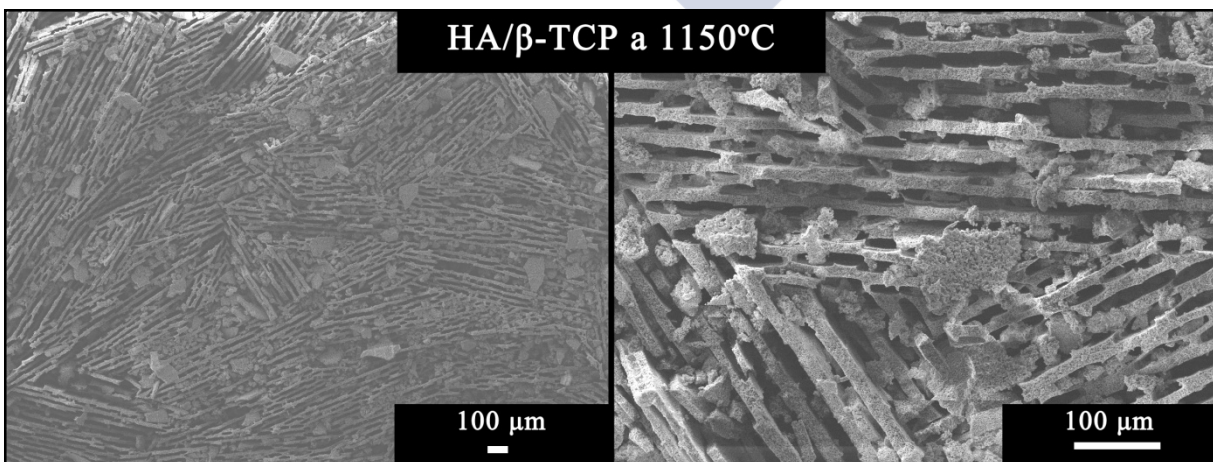


Fig. 8.12. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 100% HA/ β -TCP y sinterizadas a una temperatura de 1150 °C.

La característica estructura lamelar del proceso de *freeze casting* se puede observar en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de estas piezas. Esta estructura crea canales huecos a lo largo de la estructura, delimitados por paredes del material sólido que se encontraba en la suspensión inicial.

El proceso de análisis de la microestructura lamelar también se lleva a cabo para el resto de concentraciones de la mezcla de BG 1393 y HA/ β -TCP. La figura 8.12 corresponde con un 10% de BG1393, que posee un máximo de resistencia a la compresión a 1150 °C.

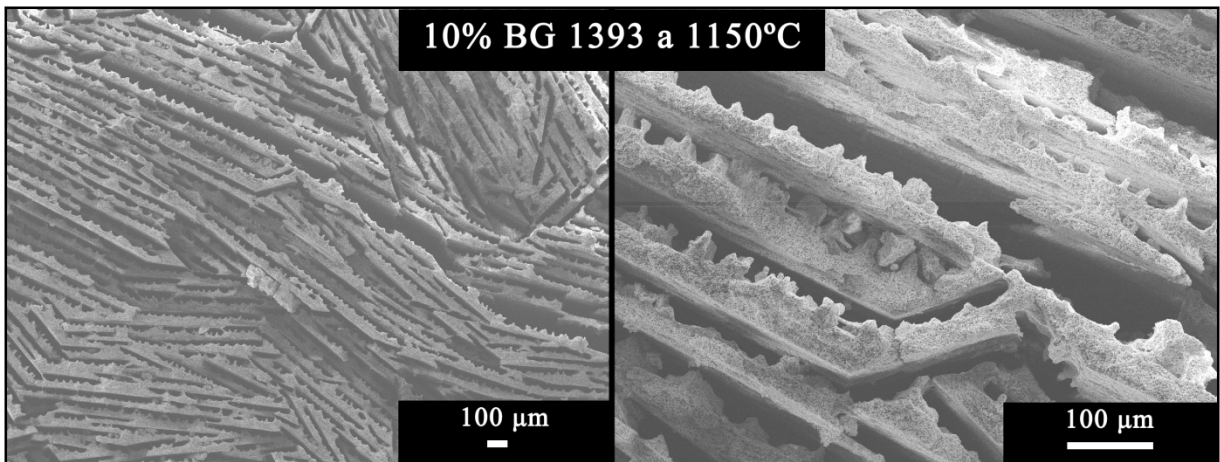


Fig. 8.12. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 10% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 1150 °C.

Como se puede apreciar en la figura 8.12, el proceso de sinterización a una temperatura de 1150 °C para una concentración de BG 1393 del 10% conserva los canales que han resultado del proceso de conformado del *freeze casting* y no han sido destruidos por el tratamiento térmico.

A continuación se muestra la microestructura de las piezas con un 30% de BG 1393, que cuentan con valores de resistencia mecánica a la compresión máximos muy similares para 1150, 1100 y 1050 °C, por lo que se analizan a través del SEM después de sinterizar las piezas a cada una de estas temperaturas.

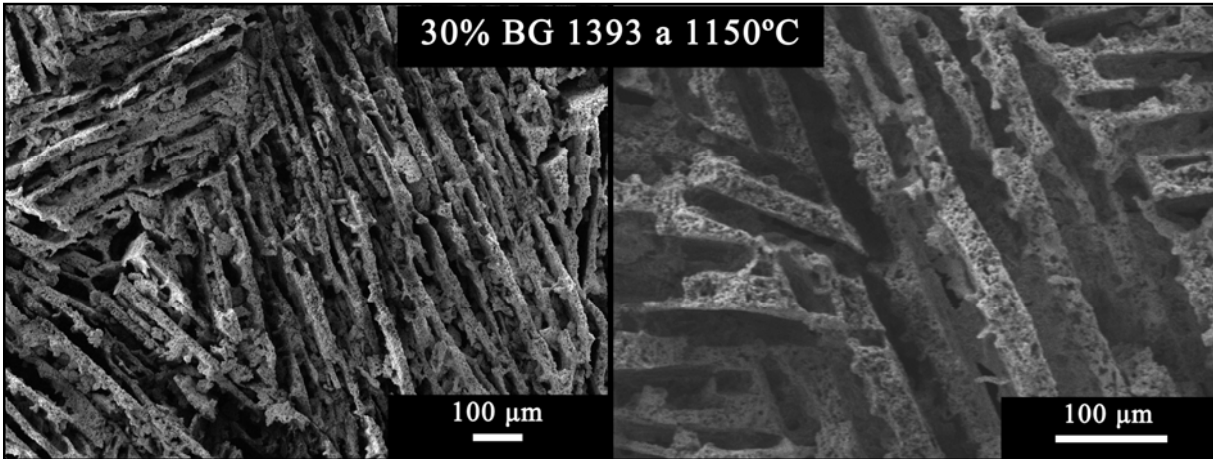


Fig. 8.13. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 30% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 1150 °C.

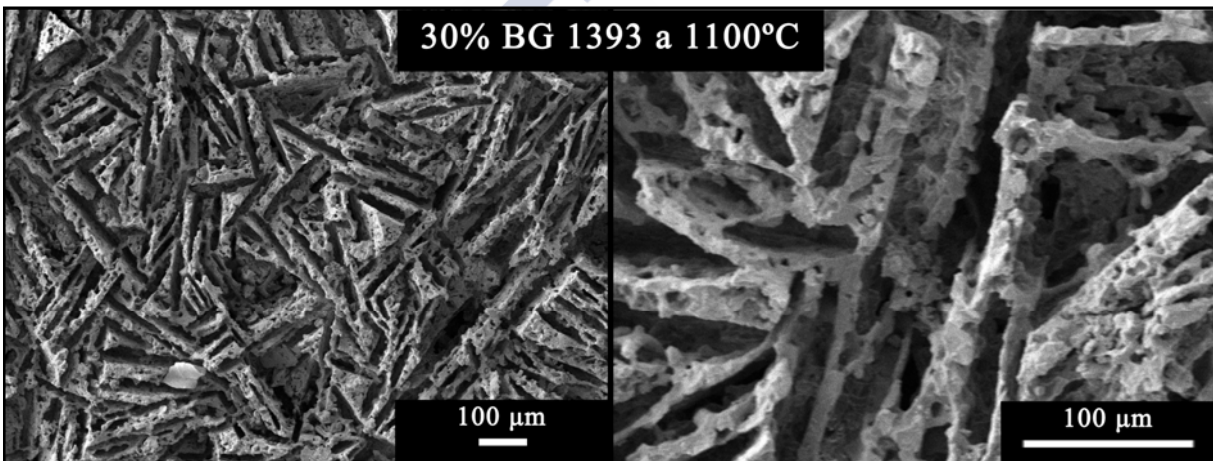


Fig. 8.14. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 30% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 1100 °C.

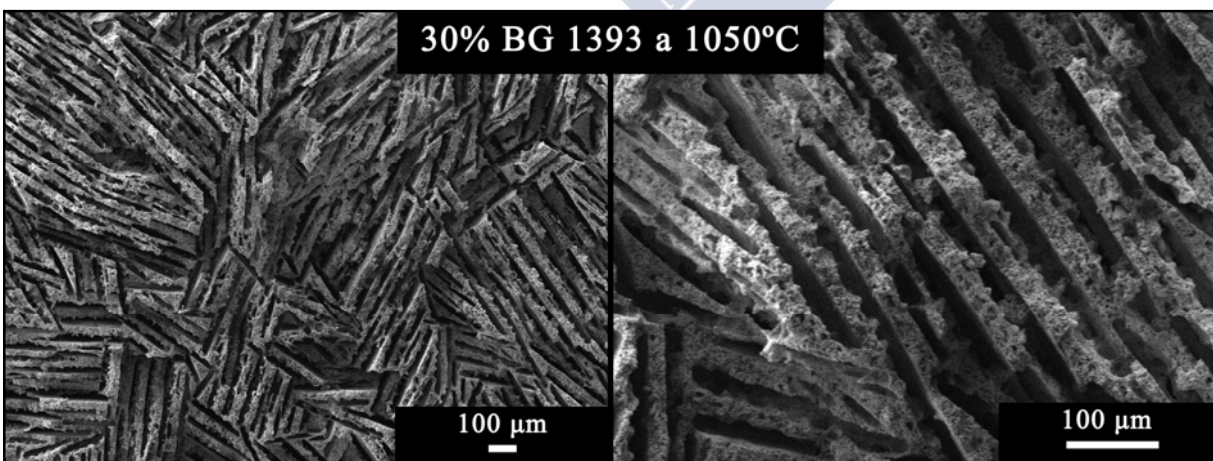


Fig. 8.15. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 30% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 1050°C.

En las figuras 8.13, 8.14 y 8.15 se puede observar como la estructura lamelar interna de las piezas que tienen la misma composición se ve afectada por la temperatura que se alcanza durante el tratamiento térmico de sinterización.

En las figuras 8.13 y 8.14 las piezas son llevadas hasta 1150 °C y 1100 °C, respectivamente. La figura 8.13 muestra canales que se encuentran bloqueados, con la presencia de material sólido en su interior. Un efecto muy parecido se aprecia en la figura 8.14, en donde no están completamente huecos. Sin embargo, la figura 8.15 sí que muestra unos canales sin presencia de ningún tipo de elemento sólido bloqueando los huecos creados durante el proceso de conformación.

La siguiente pieza tienen una concentración del 50% de BG 1393, que presenta un máximo de resistencia mecánica a la compresión muy diferenciado a una temperatura de sinterización de 1000 °C.

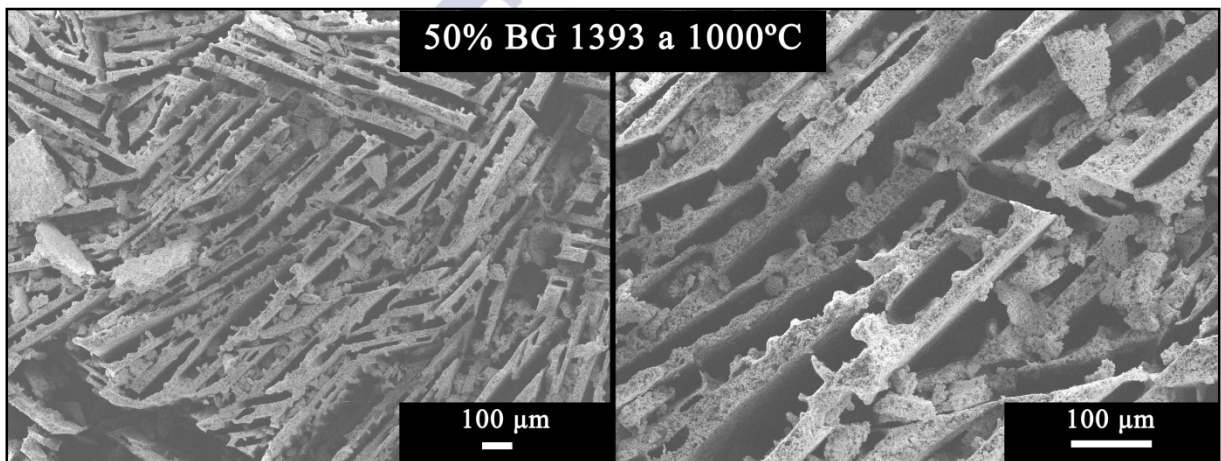


Fig. 8.16. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 1000 °C.

La figura 8.16 muestra que las piezas de 50% BG 1393 sinterizadas a 1000°C sí mantienen la microestructura lamelar interna que se quiere preservar en las piezas después del proceso térmico al que se someten.

Seguidamente se muestra el análisis de microestructura de las piezas que poseen un 70% en volumen de BG 1393, comenzando por las piezas que fueron sinterizadas a 850 °C, que muestran una mayor resistencia mecánica a la compresión, aunque con valores poco mayores a los de las piezas con tratamiento térmico a una temperatura de 800 °C.

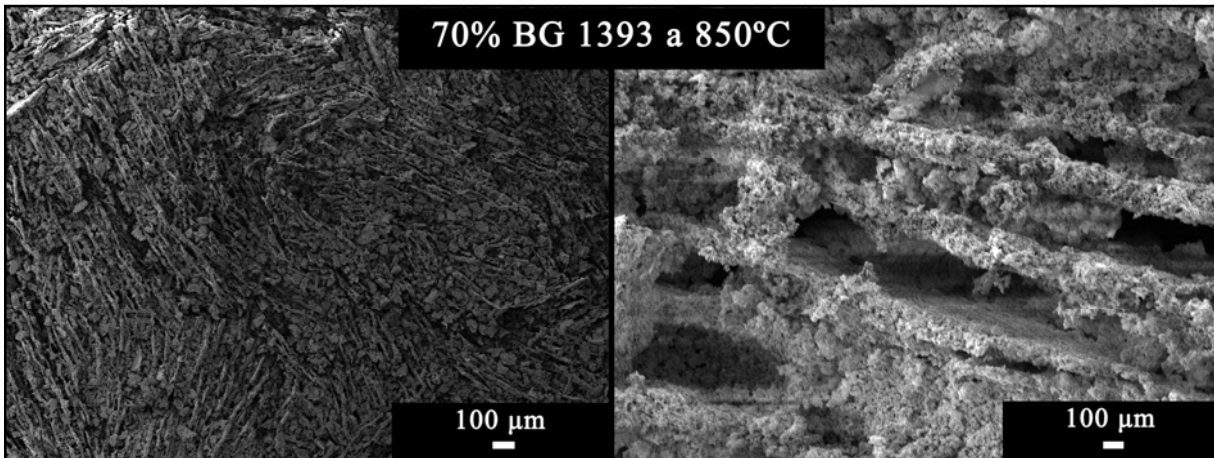


Fig. 8.17. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 10% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 850 °C.

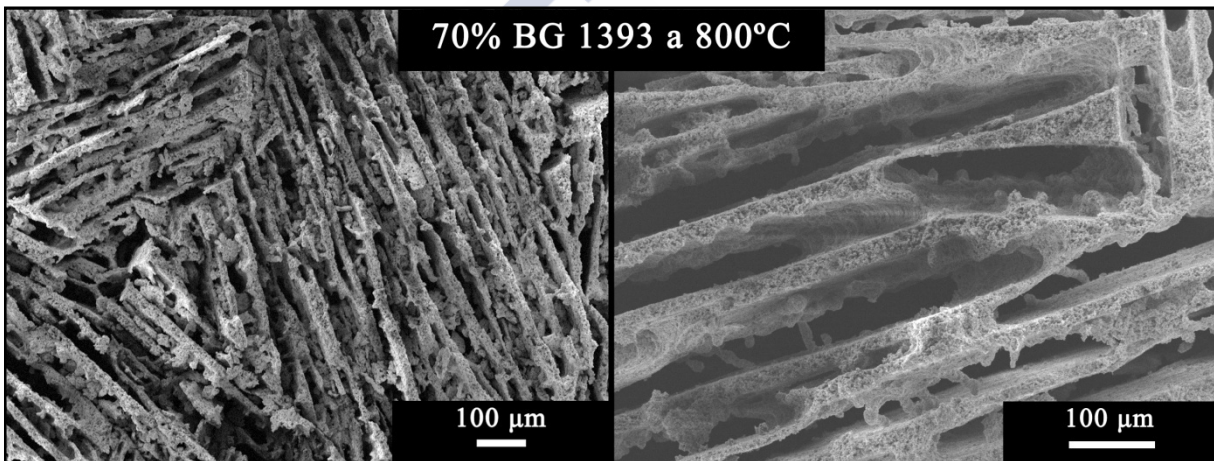


Fig. 8.18. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 70% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 800 °C.

Como se puede observar en las figuras 8.17 y 8.18, la sinterización a una temperatura de 850 °C ha bloqueado casi por completo los canales que otorgaban una gran porosidad interna a la pieza compuesta de un 70% de BG 1393. Por otro lado, en la figura 8.17 se observa que la temperatura de 800 °C sí que conserva dicha microestructura.

La concentración de BG 1393 correspondiente al 90% en volumen posee un máximo de resistencia mecánica con un proceso de sinterización a una temperatura de 650 °C.

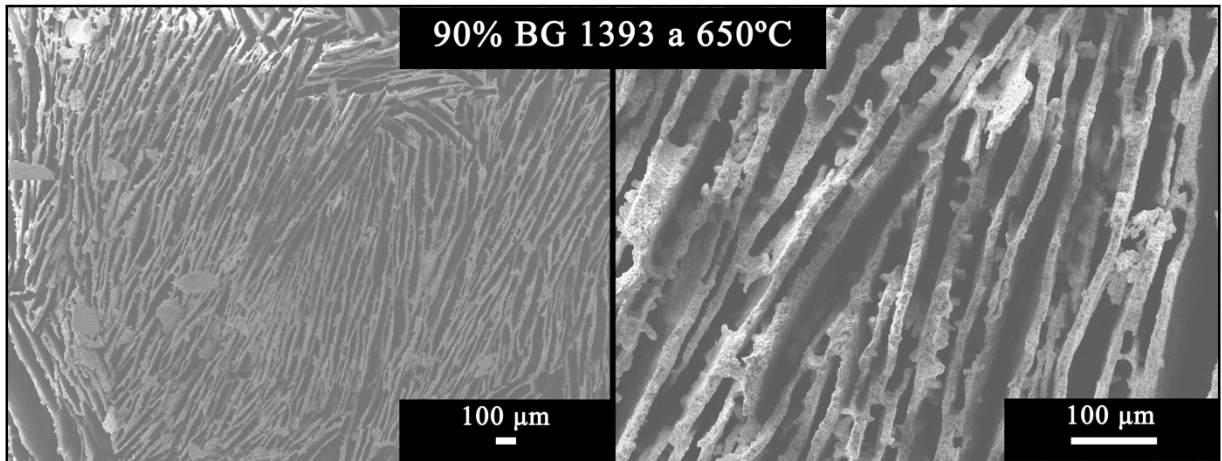


Fig. 8.19. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 90% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 650 °C.

La figura 8.19 muestra que la temperatura de 650 °C para una concentración del 90% de BG 1393 permite conservar la estructura lamelar.

Las siguientes imágenes de la microestructura lamelar interna se corresponde con las piezas conformadas de un 100% de BG 1393, para las cuales se han obtenido máximos de propiedades mecánicas en la temperatura de sinterización de 650 °C, aunque también se analizan las piezas sinterizadas a 625 °C y 600 °C.

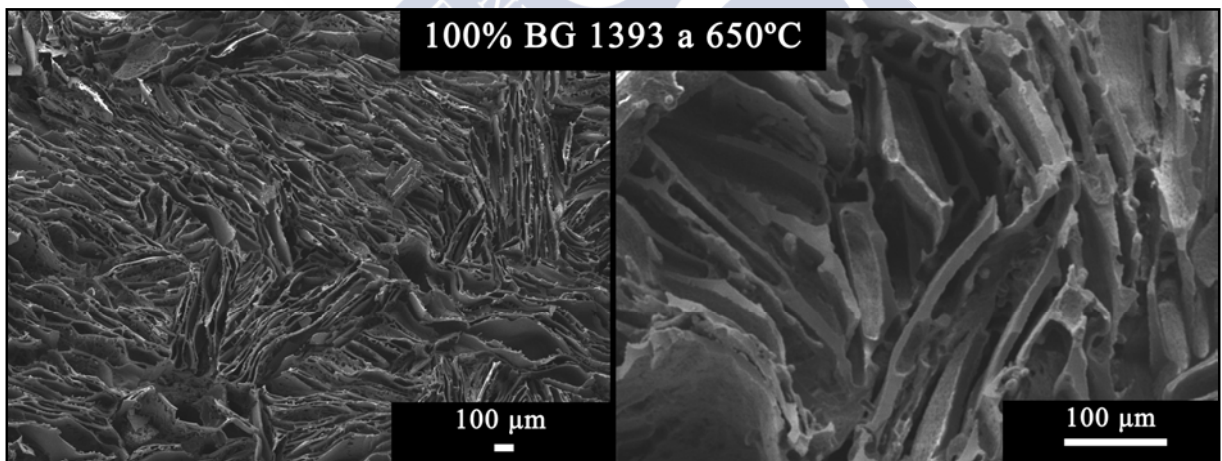


Fig. 8.20. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 100% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 650 °C.

En la figura 8.20 se aprecia que, a pesar de que la estructura lamelar sigue presente y existen espacios entre las paredes, estos huecos se encuentran taponados.

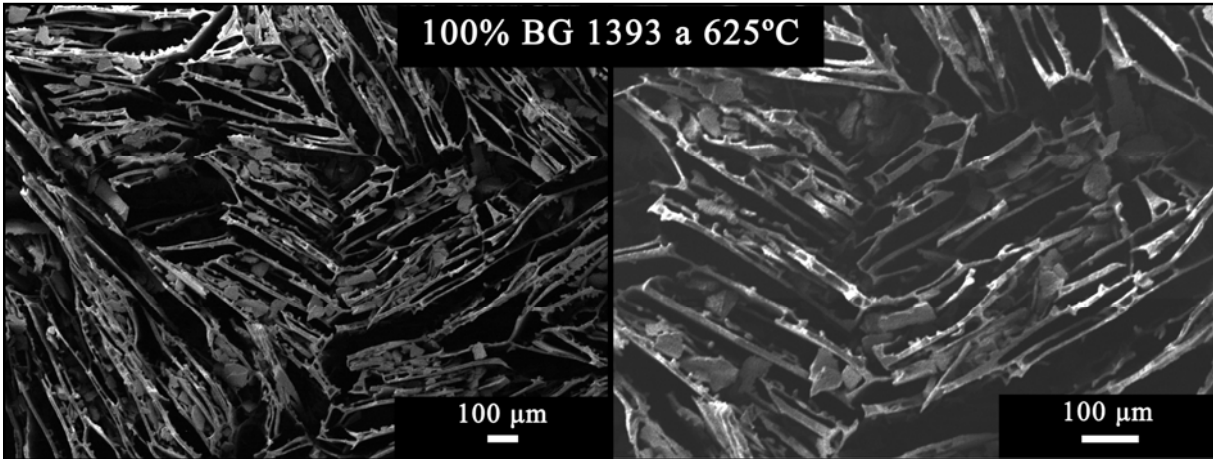


Fig. 8.21. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 100% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 625 °C.

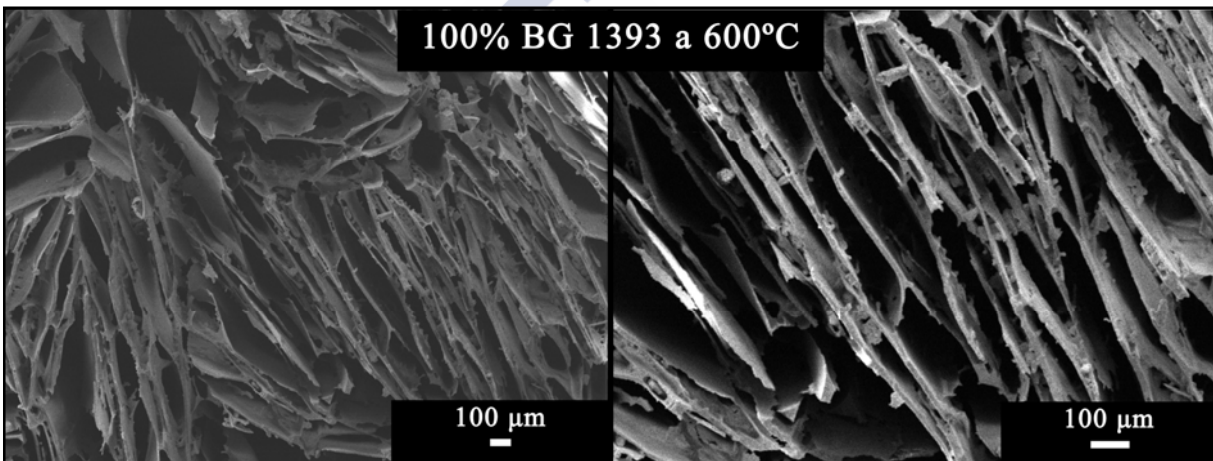


Fig. 8.22. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 100% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 600 °C.

Las figuras 8.21 y 8.22 muestran que en las temperaturas de 625 y 600 °C se mantienen las microestructuras lamelares, aunque *a priori* parece que en las piezas sinterizadas a 600 °C tienen un mayor tamaño de canales internos.

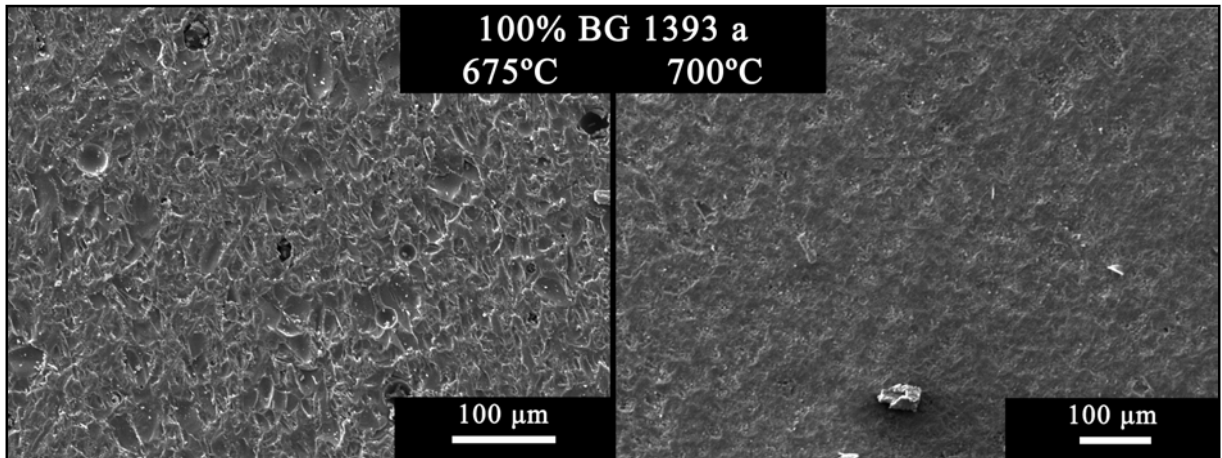


Fig. 8.23. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 100% BG 1393 y sinterizadas a una temperatura de 675 °C (izquierda) y 700 °C (derecha).

Las últimas imágenes SEM mostradas en la figura 8.23 muestran lo que les ocurre a las piezas a nivel de la microestructura al ser tratadas a temperaturas demasiado altas. La estructura lamelar que se había conformado por medio del proceso de *freeze casting* ha desaparecido por completo.

En función de los resultados obtenidos por medio de la medición de las propiedades mecánicas y las imágenes obtenidas de la microestructura interna de las piezas, en el apartado de Discusión se seleccionarán las que se crean más apropiadas para ser utilizadas como piezas para la regeneración de tejido óseo.

8.3.3. Tamaño de poro y estructura lamelar.

Con las imágenes obtenidas a través del SEM para cada una de las diferentes concentraciones de BG 1393 y utilizando el software Image-J se han medido los parámetros característicos de la microestructura lamelar interna de cada una de las piezas seleccionadas. Se ha hecho un estudio de cuatro imágenes diferentes, analizando en cada una 10 poros y 10 paredes de cada una de las concentraciones estudiadas, 40 mediciones en total para cada una. Los valores obtenidos de la media y los errores asociados se recogen en la tabla 8.3.

Tabla. 8.3. Valores de tamaño de poro y de la estructura lamelar obtenidos a través de las imágenes SEM y del software Image-J para cada concentración de BG 1393.

	BG 1393 vol. Concentración						
	0% (HA/ β -TCP puro)	10%	30%	50%	70%	90%	100% (BG 1393 puro)
Eje mayor de los canales (μm)	318.3 \pm 115.2	423.6 \pm 114.9	375.2 \pm 97.7	358.2 \pm 102.0	437.5 \pm 109.0	445.8 \pm 70.8	319.0 \pm 44.5
Eje menor de los canales (μm)	25.8 \pm 7.7	37.7 \pm 11.6	27.5 \pm 4.7	40.9 \pm 7.2	45.8 \pm 12.7	30.5 \pm 4.7	41.0 \pm 21.4
Cociente del aspecto de los canales	13.9 \pm 7.8	12.2 \pm 5.0	15.3 \pm 5.1	9.3 \pm 4.2	10.9 \pm 5.4	21.2 \pm 9.5	10.3 \pm 5.7
Ancho de las paredes (μm)	16.5 \pm 2.8	38.7 \pm 6.2	23.9 \pm 7.5	30.0 \pm 8.5	32.8 \pm 10.2	19.2 \pm 10.2	18.6 \pm 6.1

Los valores obtenidos de la medición de los parámetros de la microestructura lamelar de las piezas de BG 1393 son bastante similares para las diferentes concentraciones de BG 1393.

8.3.4. Porosidad.

Tal y como se ha descrito en el apartado de Métodos experimentales, la porosidad de la pieza es hallada por medio del método de Arquímedes, el cual, por medio de las medidas conocidas de la pieza y la densidad y el porcentaje de cada uno de los materiales que conforman dicha pieza, se obtiene la relación entre volumen, peso y densidad, y que a su vez están relacionadas con la porosidad de cada una de las piezas.

Los datos de medidas y pesos de cada pieza fueron obtenidos a partir de los discos que fueron cortados para su posterior análisis de solubilidad. De entre todas las temperaturas de sinterización que se han estudiado, se seleccionaron las que se consideraron óptimas en el apartado de Discusiones que se encuentra al final de este capítulo. También hay que destacar que se desecha la parte inferior de los cilindros obtenidos a partir del *freeze casting*, ya que no presenta la estructura lamelar que se quiere estudiar y no darían resultados de porosidad relevantes.

De esta manera, utilizando el diámetro y la altura se halla el volumen de cada disco, y por medio de su peso, las densidades del BG 1393 y del HA/ β -TCP (valores estudiados en la Caracterización de las materias primas, en el apartado 6.1) y la concentración de cada compuesto se llega a la porosidad que presenta cada disco.

Se han medido nueve discos de cada concentración y los valores finales son mostrados en la tabla 8.4.

Tabla. 8.4. Valores de porosidad para las piezas correspondientes a cada concentración de BG 1393.

Concentración BG 1393 (% Vol)	0% (HA/ β - TCP puro)	10%	30%	50%	70%	90%	100% (BG 1393 puro)
Porosidad (%)	72,63 $\pm 0,24$	74,73 $\pm 0,57$	78,74 $\pm 0,44$	79,88 $\pm 1,00$	80,85 $\pm 0,73$	72,58 $\pm 1,32$	72,63 $\pm 0,24$

8.3.5. Solubilidad en suero fisiológico simulado estático.

El proceso de análisis de la solubilidad de las piezas se realiza por medio de la inmersión de éstas en pequeños recipientes con suero fisiológico simulado, tal y como se ha descrito en el capítulo de Métodos experimentales.

Cada uno de los cilindros originales obtenidos a través del proceso de *freeze casting* son cortados en discos, que tiene un diámetro de 20 mm y una altura de 3 mm. Aplicando la ecuación 5.10 resulta en una S_a (superficie aparente) de 503 mm². A través de la relación expuesta en Métodos experimentales, a dichos discos les corresponde un volumen de 50 ml de suero fisiológico simulado.

Para poder analizar la evolución de este proceso se han obtenido los datos de la diferencia de peso que dichas piezas han experimentado a una, dos, cuatro y seis semanas y estas diferencias han sido representadas en función del porcentaje de pérdida de peso que experimentan. El valor negativo de pérdida de peso se corresponde con ganancia de peso durante el proceso de disolución (el fluido corporal simulado está casi saturado y puede precipitar y hacer ganar peso a las piezas).

Los resultados obtenidos tienen una tendencia bastante marcada en la que a mayor concentración de BG 1393, mayor degradación se produce. Con el paso del tiempo esta degradación aumenta, aunque la mayor degradación se produce en la primera semana del experimento, estancándose en las siguientes y siendo la pérdida de peso mucho menor en comparación. También cabe destacar que las piezas de HA/ β -TCP ganan peso, más cuanto más pasa el tiempo. En las piezas con sólo un 10% de BG 1393 la variación del peso es prácticamente nula.

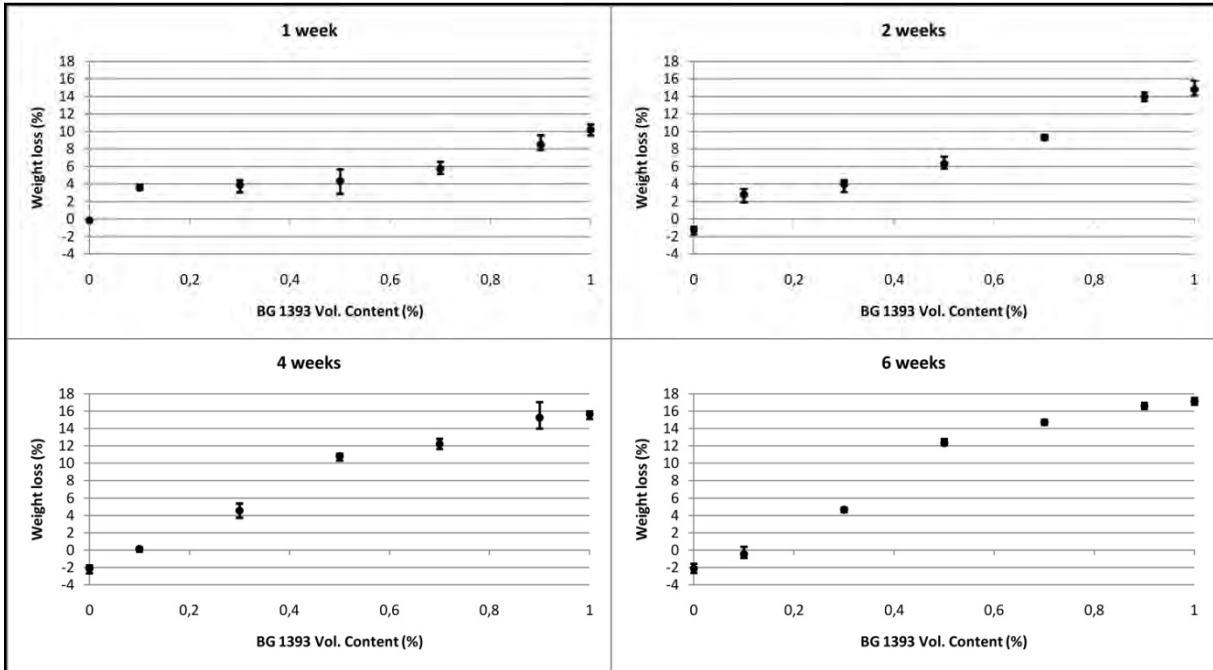


Fig. 8.24. Variación del peso de las piezas con diferentes concentraciones de BG 1393 en suero fisiológico simulado estático a una semana (arriba izquierda), dos semanas (arriba derecha), cuatro semanas (abajo izquierda) y seis semanas (abajo derecha).

Para poder apreciar de una manera más visual los datos obtenidos en la figura 8.24, éstos también se han dispuesto en una gráfica de barras, la figura 8.25.

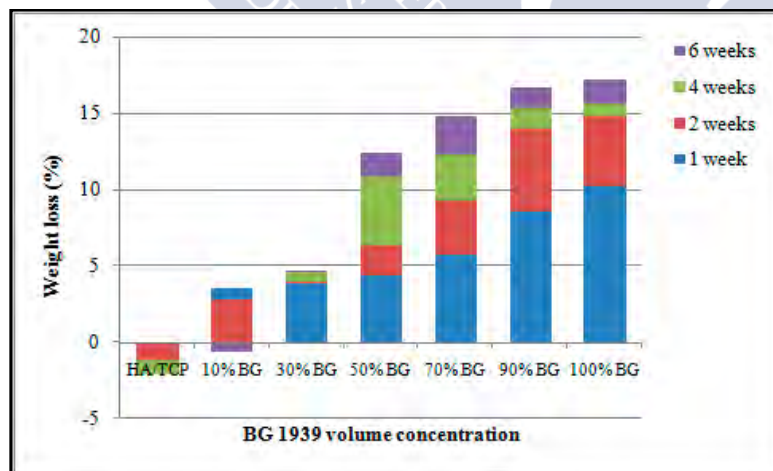


Fig. 8.25. Pérdida de peso por la disolución de diferentes concentraciones de BG 1393 a 1, 2, 4 y 6 semanas en suero fisiológico simulado estático.

Como ya se había podido observar en la gráfica anterior, los resultados obtenidos muestran una mayor solubilidad cuanto mayor sea el porcentaje de BG 1393 utilizado para la conformación de las piezas. De hecho, las muestras de puro HA/ β -TCP presentan una ganancia de peso que se hace mayor con el paso del tiempo. Este efecto también está presente en las piezas de 10% de BG 1393 que, aunque en las primeras semanas pierden peso, con el

paso del tiempo vuelven a recuperar peso y llegar hasta una ganancia de peso al final de las 6 semanas de duración del experimento.

8.3.6. Solubilidad en suero fisiológico simulado dinámico.

El mismo tipo de experimento que se realizó en el apartado anterior ahora se va a llevar a cabo con el suero fisiológico en constante movimiento y renovación diaria. A través del montaje diseñado, cada una de las muestras a analizar se encuentra confinada en un compartimento de una caja plástica por la que circula el suero fisiológico, que se encuentra en constante agitación. También entra suero fisiológico fresco todos los días en el sistema y se expulsa la misma cantidad de suero fisiológico, haciendo que este estudio de solubilidad sea llamado dinámico en comparación con el anterior, que era estático.

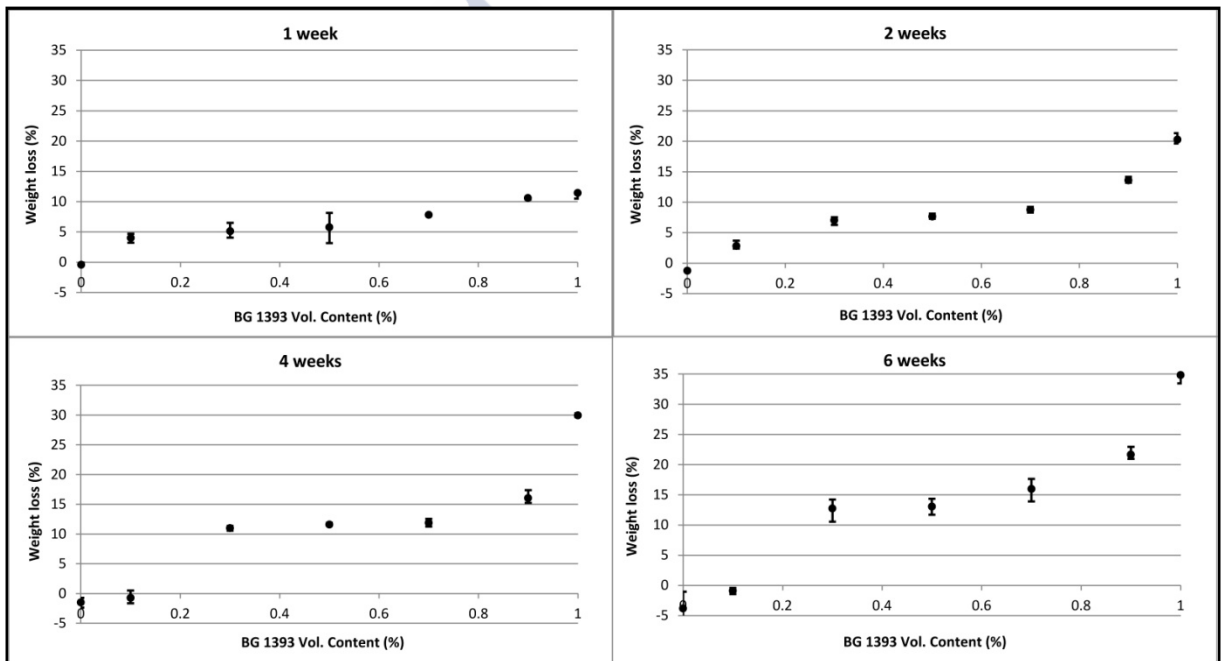


Fig. 8.26. Variación del peso de las piezas con diferentes concentraciones de BG 1393 en suero fisiológico simulado dinámico a una semana (arriba izquierda), dos semanas (arriba derecha), cuatro semanas (abajo izquierda) y seis semanas (abajo derecha).

De la misma manera que se ha hecho con los resultados obtenidos para el experimento con suero fisiológico estático, los datos obtenidos a partir del modelo dinámico son representados en una gráfica de barras para apreciar mejor los resultados del experimento.

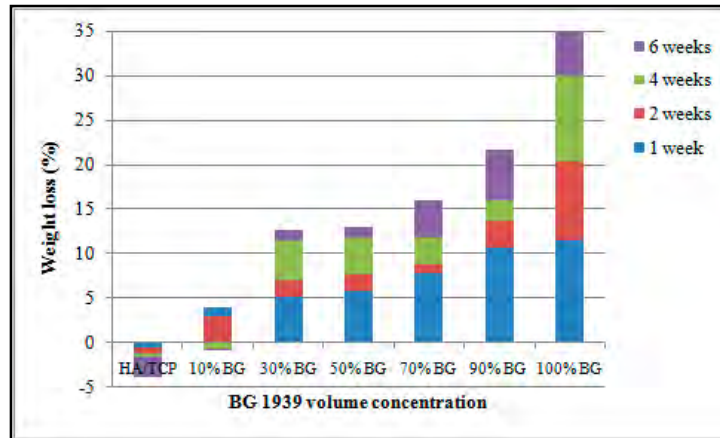


Fig. 8.27. Pérdida de peso por la degradabilidad de diferentes concentraciones de BG 1393 a 1, 2, 4 y 6 semanas en suero fisiológico simulado dinámico.

Al igual que ocurriría con el experimento en modo estático, cuanto mayor es el contenido de vidrio bioactivo en las muestras, mayor solubilidad presenta con el paso del tiempo sólo que, en este caso, dichas pérdidas de peso son mucho mayores. Para poder visualizarlo de una mejor manera, las gráficas obtenidas para los dos métodos (tanto estático como dinámico) son representadas en la misma escala y una al lado de la otra.

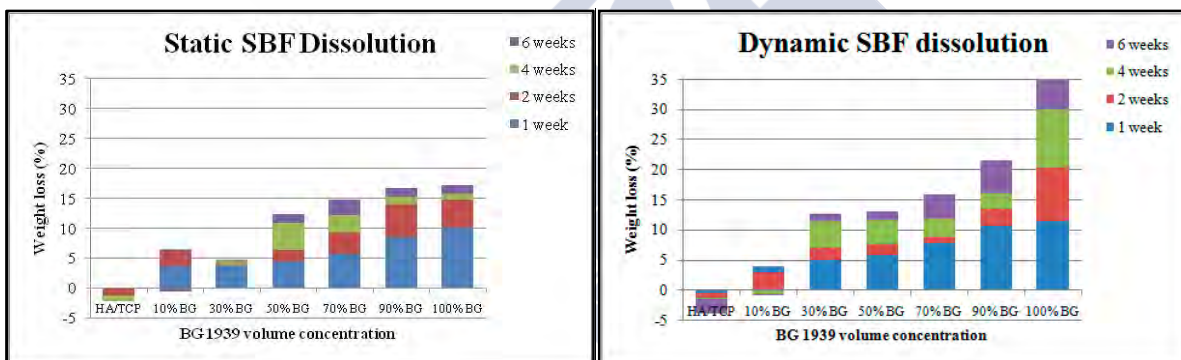


Fig. 8.28. Comparación de la pérdida de peso por la degradabilidad de diferentes concentraciones de BG 1393 a 1, 2, 4 y 6 semanas en suero fisiológico simulado estático (izquierda) y dinámico (derecha).

La figura 8.28 muestra la diferencia de resultados obtenidos dependiendo de si el estudio se lleva a cabo en suero fisiológico simulado en estado estático o en estado dinámico. En los dos casos, cuanto mayor es el contenido de BG 1393 mayor es la pérdida de peso que, además, aumenta con el caso del tiempo (con la excepción de puro HA/ β -TCP y 10% BG 1393, que también contiene una gran mayoría de HA/ β -TCP). Sin embargo, el experimento realizado suero fisiológico simulado en estado dinámico arroja unos valores mucho mayores que el estático.

8.4. Caracterización biológica.

Para terminar con la caracterización de las muestras obtenidas, se procede a un estudio del comportamiento que las piezas tienen en cultivos celulares en condiciones controladas en el laboratorio.

8.4.1. Pruebas *in vitro*

Las pruebas *in vitro* han sido realizadas con la colaboración del Doctor R. Couceiro en el Hospital Clínico del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los estudios realizados con cultivos celulares para la determinación de la biocompatibilidad de muestras de HA/ β -TCP y mezcla al 50% de este compuesto y BG 1393 obtenidas a través del proceso de *freeze casting*.

8.4.1.1. Interleukina-6.

Los estudios de IL-6 dan una idea de la inflamación que sufrirá el tejido huésped al entrar en contacto con las piezas de regeneración ósea que se están investigando.

Para ello, se han tomado piezas fabricadas a través del método de *freeze casting*, por un lado piezas de HA/ β -TCP puro y por otro lado piezas con el 50% de volumen de BG 1393. Esto se hace para comparar el efecto de ambos compuestos que han sido utilizados como principales materiales para la conformación de las piezas.

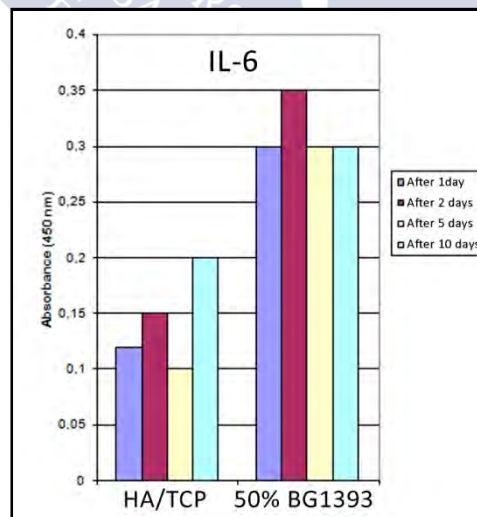


Fig. 8.29. Comparación de los valores de IL-6 para piezas de HA/ β -TCP puros (izquierda) y 50% vol. BG 1393 (derecha).

La figura 8.29 muestra que las piezas fabricadas solo con HA/ β -TCP presentan una presencia menor de IL-6. Esto es que provocarán una inflamación menor en el tejido que lo que va a hacer el BG 1393. Los valores obtenidos de IL-6 para las piezas de HA/ β -TCP son,

aproximadamente, la mitad que los valores obtenidos para las piezas con un 50% de contenido de BG 1393.

8.4.1.2. MTT

Los ensayos con células mesenquimales humanas para la proliferación celular por medio de métodos colorimétricos, también conocidos como MTT, son muy comunes en las investigaciones de biomateriales y sirven para medir la afinidad que las células de los diferentes tejidos tienen por dichos biomateriales.

Al igual que se ha hecho con los estudios *in vitro*, en este apartado se van a comparar los resultados que se obtienen para piezas obtenidas a través del proceso de *freeze casting* compuestas sólo de HA/ β -TCP en comparación con piezas conformadas con el 50% en volumen de vidrio bioactivo 1393. Los resultados obtenidos después de 1, 2, 5 y 10 días se representan en la figura 8.30.

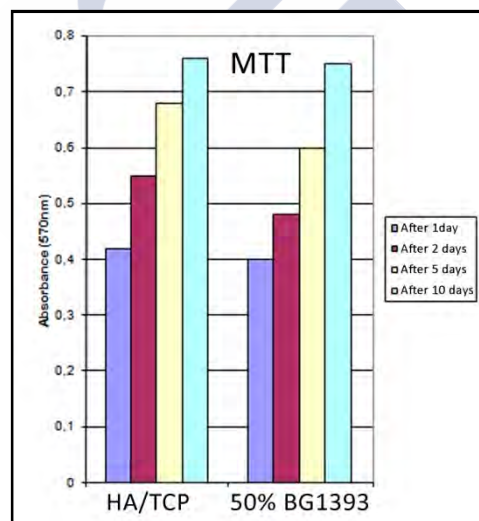


Fig. 8.30. Comparación de los valores de IL-6 para piezas de HA/ β -TCP puros (izquierda) y 50% vol. BG 1393 (derecha).

Los resultados obtenidos muestran prácticamente la misma afinidad celular para ambos compuestos.

8.4.1.3. Microscopia de fluorescencia.

El último estudio que se realiza sobre las piezas producidas por medio del proceso de *freeze casting* con BG 1393 y HA/ β -TCP es la microscopia confocal de fluorescencia de las células que, previamente, han sido depositadas sobre discos de las piezas.

En la figura 8.31 se puede observar las imágenes obtenidas del estudio de las piezas compuestas únicamente de HA/ β -TCP con las células vivas sobre su superficie en verde y las muertas en rojo. No se aprecia ningún punto rojo, sino que todo está coloreado de verde, lo que quiere decir que este material no ha matado a ninguna célula y que es altamente biocompatible. Cabe destacar que también se puede observar la estructura lamelar típica del proceso de *freeze casting*, sobre cual las propias células están proliferando.

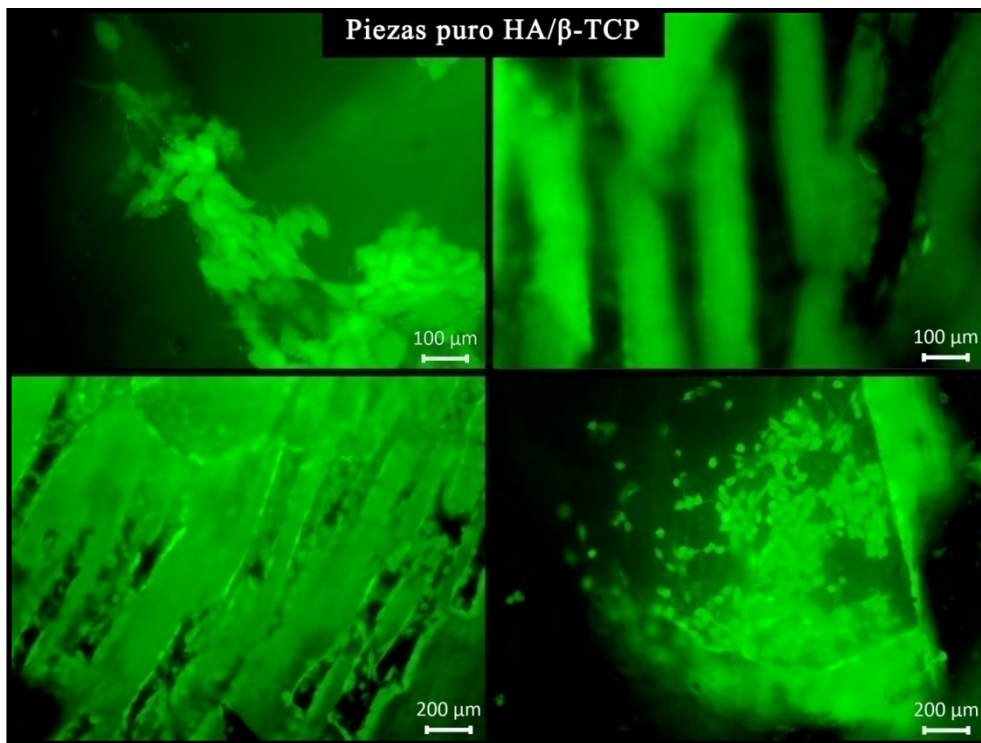


Fig. 8.31. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia en piezas obtenidas a través de *freeze casting* compuestas de HA/ β -TCP.

Por otro lado, la figura 8.32 es el mismo estudio que el de la figura anterior, pero sobre discos conformados por HA/ β -TCP y BG 1393, al 50% de volumen de cada compuesto. En esta imagen se puede observar también una gran proliferación de células vivas y ningún punto rojo, que se correspondería con las células que hayan muerto. En esta imagen de fluorescencia también se aprecia muy bien la microestructura lamelar que el proceso de *freeze casting* ha conferido a las piezas.

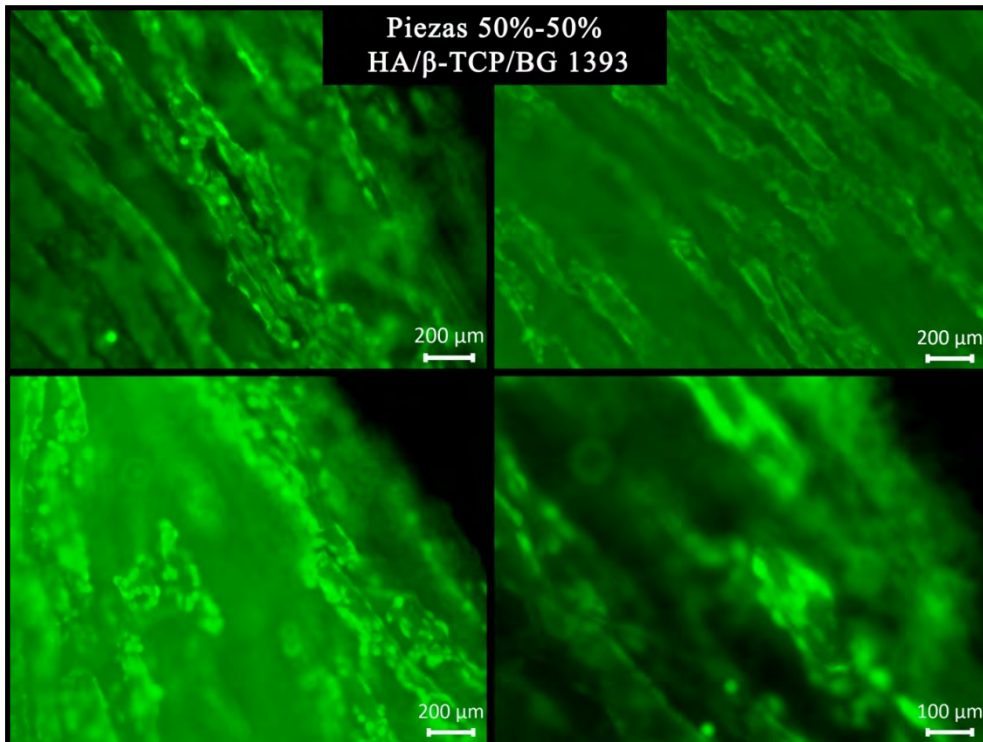


Fig. 8.32. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia en piezas obtenidas a través de Freeze Casting compuestas de 50% HA/ β -TCP y 50% BG 1393.

8.5. Resumen y discusión del capítulo.

En el presente apartado se analizarán en profundidad los resultados obtenidos y se discutirán el significado que éstos pueden tener.

8.5.1. Proceso térmico.

Puesto que el vidrio bioactivo 45S5 presenta el problema de que cristaliza a una temperatura menor que su temperatura de sinterización, se opta por otro compuesto. En este caso se ha escogido el vidrio bioactivo 1393 ya que también presenta una biocompatibilidad con el crecimiento de células óseas muy buenos y unos valores de degradabilidad similares al BG 45S5. Los niveles de biocompatibilidad no son tan altos como presenta el 45S5 pero el BG 1393 no cristaliza a una temperatura menor que su temperatura de sinterización, según la bibliografía [67, 161].

Al realizar los análisis de dilatometría se obtienen resultados similares a los obtenidos en el estudio realizado para la mezcla HA/ β -TCP y BG 45S5. A mayor concentración de vidrio bioactivo en las muestras, menor es la temperatura a la que empieza a producirse el fenómeno de sinterización. Estos resultados son bastante coherentes teniendo en cuenta las temperaturas de fusión del BG 1393 (alrededor de los 750 °C) y del compuesto HA/ β -TCP (alrededor de los 1400 °C).

Sin embargo, en estos estudios de dilatometría no se aprecia la contracción provocada por la cristalización que ocurriría con el BG 45S5 alrededor de los 550-600 °C que se podía observar en las figuras 7.1. y 7.2. Los datos obtenidos en estos estudios de dilatometría servirán para determinar un rango de temperaturas para la optimización de la temperatura de sinterización para diferentes concentraciones de ambos compuestos.

El estudio de cambios de fase llevado a cabo a través de la difracción de los rayos X muestra que no se produce ningún compuesto con estructura cristalina y que tenga presencia de silicio, el elemento más abundante en el BG 1393. Esto indica que, muy probablemente, el BG 1393 siga manteniendo una estructura vítrea o, por lo menos, la mayor parte de este compuesto. Esto concuerda con la bibliografía respecto a que el BG 1393 tiene una temperatura de cristalización más alta que su temperatura de sinterización.

8.5.2. Conformado.

En el momento de llevar a cabo el proceso de *freeze casting* es importante determinar los parámetros que definirán el proceso. El primer parámetro a tener en cuenta es el contenido sólido de la suspensión que será congelada por el *freeze casting*. Tomando como referencia valores obtenidos de la bibliografía [100, 182] y para intentar conseguir un equilibrio entre porosidad y propiedades mecánicas (cuanta mayor porosidad tengan las piezas, más pobres serán sus propiedades mecánicas) se decidió construir todas las piezas con un contenido sólido inicial del 20% en volumen. Esto quiere decir que el restante 80% del volumen de la suspensión se corresponde con agua.

Otro parámetro del proceso de *freeze casting* que condicionará la estructura lamelar interna de las piezas es la velocidad de enfriamiento del propio proceso. Tomando como referencia la bibliografía consultada [100, 182], se ha decidido programar un enfriamiento de 5 °C/min, que, a priori, debería permitir obtener una estructura lamelar adecuada para la proliferación celular que se quiere conseguir para las futuras piezas.

Una vez que se ha llevado a cabo el proceso de *freeze casting* sobre las suspensiones, éstas son sometidas a bajas temperaturas y bajas presiones para sublimar el hielo creado. Después tienen que ser sinterizadas.

Partiendo de los resultados obtenidos a través del estudio de dilatometría se establece el rango de temperaturas en que cada una de las concentraciones de BG 1393 será estudiado para poder optimizar su temperatura de sinterización. Estos rangos de temperaturas fueron mostrados en la tabla 8.2.

En las figuras 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8 y 8.9 se pueden apreciar las diferentes temperaturas de sinterización a las que fueron sometidas cada una de las concentraciones de BG 1393. En dichas imágenes se puede observar que a menor concentración de BG 1393, mayor tiene que ser la temperatura de sinterización. A pesar de que el aspecto externo de las piezas con bajo contenido de BG 1393 (10% y 30%) es muy similar entre todas ellas, las propiedades mecánicas difieren mucho.

En las imágenes de las piezas con mayor contenido de BG 1393 (50%, 70% y, especialmente 90% y 100%) se puede observar que en la parte inferior de las piezas aparece una alteración que se hace más grande a medida que aumenta la temperatura de sinterización. Se ha identificado esa alteración con parte del BG 1393 que se ha fundido y ha ido a parar a la parte inferior de la pieza debido a los canales presentes en el interior de la pieza. Esto se corresponde con el propio BG 1393 que, a estas altas temperaturas, experimenta una ligera fundición de su estado sólido inicial, haciendo que parte de dicho BG 1393 fundido se desplace hasta la base de la pieza debido a la porosidad de dichas muestras.

La temperatura de sinterización es demasiado alta y esto es muy evidente en algunas piezas del 90% (a las temperaturas de 700 °C y 750 °C) y del 100% del BG 1393 (a las temperaturas de 675 °C y 700 °C). Dichas piezas fueron descartadas del proceso de optimización de la temperatura de sinterización por haber colapsado toda la pieza y no poseer la estructura lamelar interna que se está intentando obtener para facilitar la proliferación celular que pueda permitir el proceso de regeneración de tejido óseo.

8.5.3. Propiedades fisicoquímicas.

El primer parámetro fisicoquímico que se estudia de las piezas obtenidas son las propiedades mecánicas a compresión. A través de la medición de las propiedades mecánicas de todas las piezas obtenidas para cada temperatura y para cada composición se puede obtener la que sería la temperatura óptima de sinterización. La temperatura óptima de sinterización será, *a priori*, aquella a la que las piezas consigan la máxima resistencia a la compresión. Sin embargo, es importante destacar que, además de presentar buenas propiedades mecánicas, es indispensable que las piezas conserven la microestructura lamelar interna característica del proceso de *freeze casting*. No son válidas piezas macizas en las que la estructura haya sido colapsada ya que, el objetivo principal de estas piezas es la colonización celular en el interior de éstas, por lo que piezas con una gran resistencia mecánica pero sin porosidad son absolutamente inútiles para el cometido que se está intentando obtener. Por ello, además de poseer una buena resistencia mecánica, la temperatura óptima de sinterización de las piezas vendrá también determinada por el hecho de que se conserve la microestructura interna lamelar.

Como se ha apuntado previamente, algunas temperaturas de sinterización ya han sido descartadas para ciertas concentraciones antes de llevar a cabo el estudio de propiedades mecánicas por la evidentemente apreciación visual del colapso de las piezas.

Al partir del estudio de las propiedades mecánicas tomamos los máximos de resistencia para cada una de las concentraciones de BG 1393 para analizar la estructura interna a través del SEM y determinar si se tratan de piezas con los canales y la porosidad necesarios para ser utilizados como piezas para la regeneración de tejido óseo. En los casos en que existen varias temperaturas de sinterización con valores máximos de resistencia a la compresión muy similares, se toman todas estas piezas para ser analizadas, como ocurre para las piezas con un 30% de BG 1393 a las temperaturas de 1150 °C, 1100 °C y 1050 °C o en las piezas con un 70% a 800 °C y 850 °C.

Con la información obtenida a través de las imágenes de microscopía electrónica se determinan las temperaturas óptimas de sinterización. La temperatura de las piezas de 0% de BG 1393 (HA/ β -TCP puro) ya venía determinada por la bibliografía [146, 158] y se comprueba en la figura 8.12 que la temperatura de 1150 °C mantiene la estructura interna del proceso de *freeze casting*.

Esta misma temperatura también se elige para las piezas con un 10% de BG 1393 pero es una temperatura demasiado elevada para las piezas de un 30% de BG 1393. En estas piezas la estructura lamelar interna está parcialmente bloqueada ya que, a dicha temperatura parte del BG se funde y empieza a descender en estado líquido a través de la estructura porosa de las piezas. Sin embargo, dichas muestras con un 30% de BG 1393 sí que presentan una estructura interna adecuada a la temperatura de sinterización de 1050 °C, como muestra la figura 8.15.

De la misma manera que para las piezas anteriores, por medio de la comprobación de la presencia de esta estructura interna, se determinan las temperaturas óptimas de sinterización para un 50%, 70% y 90% de contenido de BG 1393. Dichas temperaturas son de 1000 °C, 800 °C y 650 °C, respectivamente.

A pesar de que en la bibliografía diversos autores afirman que la temperatura óptima de sinterización del vidrio bioactivo 1393 puro es de 700 °C [67, 189], se puede observar que para la conformación lamelar obtenida a través de la técnica del *freeze casting*, esta temperatura es, definitivamente, demasiado alta. La figura 8.23 muestra que, mientras que a 675 °C quedan muy pocos poros y de tamaño demasiado pequeño, a 700 °C toda la estructura ha colapsado y no queda ningún rastro de la gran porosidad característica del proceso de conformación que se ha aplicado a las piezas. Según los resultados que se han obtenido en el presente estudio, la temperatura óptima de sinterización de piezas de BG 1393 puro es de 625 °C. A pesar de que la temperatura de sinterización de 600 °C conserva canales con tamaños mayores, las propiedades mecánicas aumentan considerablemente a 625 °C.

Una vez que la temperatura óptima de sinterización para cada una de las concentraciones de BG 1393 ha sido determinada, el estudio de las propiedades fisicoquímicas continúa con la medición de las medidas de las estructuras internas de las piezas que se han obtenido después del proceso de *freeze casting* y de la sinterización de las piezas.

A pesar de que las piezas tienen diferentes contenidos de BG 1393 y diferentes temperaturas de sinterización, todas ellas presentan valores muy similares. El eje mayor de los canales tiene unos valores entre 318 y 445 μm y el eje menor entre 25 y 46 μm .

La bibliografía consultada no se pone de acuerdo en cuáles deben ser los tamaños de poros para una propia colonización celular en el interior de este tipo de piezas para la regeneración de tejido óseo. Si bien el tamaño de los poros que las piezas obtenidas se encuentra en el límite de tamaño entre 400 y 350 μm que algunos autores creen necesarios [38, 55, 106], están muy por encima de los 150, 100 ó 50 μm que otros autores apuntan [99, 108, 109].

La medida de porosidad de las piezas también muestra valores muy similares para todas ellas. Teniendo en cuenta que todas las suspensiones creadas para el proceso de *freeze*

casting tenían un contenido sólido del 20%, tiene mucho sentido que las piezas finales tengan también valores similares de porosidad, que se encuentran entre el 72% y el 80%. Muchos autores afirman que este es un valor muy importante para la colonización celular de la pieza y que tiene que ser superior al 50% [78, 92, 100, 101], por lo que las piezas que se están estudiando cumplen perfectamente con estos requisitos.

Una vez que se han estudiado las propiedades físicas de las piezas con diferentes contenidos de BG 1393 en ellas, se procede a elaborar la tabla 8.5 en la que se recogen los datos obtenidos a partir de este estudio.

Tabla. 8.5. Resumen de las propiedades físicas estudiadas para cada una de las concentraciones de BG 1393 con sus respectivas temperaturas óptimas de sinterización previamente halladas.

	BG 1393 vol. Concentración						
	0% (HA/ β -TCP puro)	10%	30%	50%	70%	90%	100% (BG 1393 puro)
Temperatura de sinterización (°C)	1150	1150	1050	1000	800	650	625
Porosidad (%)	71.9 \pm 1.9	74.7 \pm 3.1	78.0 \pm 2.1	77.4 \pm 7.1	78.1 \pm 5.9	72.0 \pm 8.4	78.3 \pm 7.1
Eje mayor de los canales (μm)	318.3 \pm 115.2	423.6 \pm 114.9	375.2 \pm 97.7	358.2 \pm 102.0	437.5 \pm 109.0	445.8 \pm 70.8	319.0 \pm 44.5
Eje menor de los canales (μm)	25.8 \pm 7.7	37.7 \pm 11.6	27.5 \pm 4.7	40.9 \pm 7.2	45.8 \pm 12.7	30.5 \pm 4.7	41.0 \pm 21.4
Cociente del aspecto de los canales	13.9 \pm 7.8	12.2 \pm 5.0	15.3 \pm 5.1	9.3 \pm 4.2	10.9 \pm 5.4	21.2 \pm 9.5	10.3 \pm 5.7
Ancho de las paredes (μm)	16.5 \pm 2.8	38.7 \pm 6.2	23.9 \pm 7.5	30.0 \pm 8.5	32.8 \pm 10.2	19.2 \pm 10.2	18.6 \pm 6.1
Resistencia a la compresión máxima (MPa)	10.04 \pm 0.56	2.41 \pm 0.57	0.77 \pm 0.25	2.22 \pm 0.17	1.60 \pm 0.17	1.62 \pm 0.14	2.51 \pm 0.29
Módulo de Young, E (GPa)	3.99 \pm 0.88	5.58 \pm 1.37	0.46 \pm 0.16	1.57 \pm 0.61	2.20 \pm 0.97	1.52 \pm 0.12	1.95 \pm 0.63

Una vez terminada la caracterización física, se procedió al análisis de la velocidad de disolución de las piezas en suero fisiológico simulado.

La mayoría de la bibliografía utiliza el método de disolución en suero fisiológico simulado para el análisis de la biocompatibilidad de muchos materiales utilizados para la ingeniería de tejidos óseos [20, 88, 152, 153] por medio de la precipitación o no de hidroxiapatito sobre las piezas. Además de algunas críticas que recibe este proceso porque el propio fluido no se aproxima todo lo que debiera a la composición del plasma humano [200, 203] y en ocasiones se obtienen resultados que no corresponden con la biocompatibilidad probada de un material concreto [78, 202], también existe el hecho de que los propios experimentos se reproducen de una manera estática en la que el fluido se satura y no llega a reproducir la verdadera degradabilidad de los compuestos a estudiar. En toda la bibliografía consultada hemos encontrado muy pocos ejemplos en los que se intentara evitar este problema [210].

Para intentar reproducir estos experimentos de una manera similar al proceso que ocurre en el interior del cuerpo humano se estableció un sistema dinámico en el que todos los días entra fluido fresco en el sistema y se retirara parte del que ya se encontraba y que, según creemos, se encontraría saturado por el proceso de disolución de las piezas que se estaban analizando.

Así, en la figura 8.28 se pueden comparar los resultados obtenidos del sistema estático y del sistema dinámico. En ambos experimentos las piezas con una mayor concentración de BG 1393 se disuelven más rápido. De hecho, las piezas de HA/ β -TCP ganan peso, un hecho provocado por la precipitación de hidroxiapatito procedente de la disolución que está saturada. Pero lo más llamativo es que, a pesar de que la tendencia en ambos casos es similar, el experimento dinámico muestra unos valores que, a medida que avanzan las semanas, se hace más diferente. De esta manera, para la primera semana de experimento, ambos métodos muestran unos resultados similares. Sin embargo, a la sexta semana del experimento, los resultados de disolución de las piezas del sistema dinámico son el doble que los resultados del experimento estático.

Tal y como cabría esperar, esto puede ser fácilmente explicado por la saturación que experimenta el suero fisiológico simulado. El agua es capaz de disolver hasta cierta cantidad de soluto, concretamente hasta alcanzar el punto de equilibrio. Una vez alcanzada esta cantidad de soluto, el material se sigue disolviendo, sólo que a la misma velocidad que este mismo material precipita. El hecho de que el BG 1393 además precipita como capas de HA provoca que se pueda seguir disolviendo más cantidad de vidrio bioactivo, aunque a velocidades muy bajas.

Sin embargo, si se retira suero fisiológico simulado que ya está saturado y se sustituye por fluido nuevo, éste podrá disolver más cantidad de sólido, con lo que los valores de pérdida de peso son mucho mayores.

Este proceso de manera dinámica parece simular de una manera mucho más fidedigna el proceso de disolución que se produce en el interior del cuerpo humano ya que los fluidos corporales se encuentran en continuo movimiento y depuración a través de su flujo en los riñones e hígado. Por ello, creemos que este proceso es mucho más correcto y aproximado para hacer la estimación de cuál será la verdadera velocidad de disolución de las muestras previamente diseñadas.

El protocolo que está descrito para la realización de experimentos por el suero fisiológico simulado propuesto por Kokubo *et al.* [200] debería ser mejorado. Tanto, por la composición del propio fluido, tal y como destacan muchos autores y que han propuesto otros fluidos similares como posibles candidatos [203], como por la forma de llevar a cabo el experimento. Aquí se ha demostrado que el comportamiento dinámico actúa mucho más que el estático, tanto en el precipitado de hidroxiapatito, tal y como señalan las piezas con un alto contenido de fosfato cálcico bifásico (en este caso una mezcla 60/40% en volumen de HA/ β -TCP), tanto como en el proceso de disolución del BG 1393. Definitivamente, habría que estandarizar el modelo de estudio con suero fisiológico simulado: flujo entrante, tiempos, medidas de muestras, etc.

También sería muy interesante comparar estos estudios de disolución de las piezas en suero fisiológico simulado con resultados *in vivo* e intentar establecer si realmente existe una relación entre estos dos estudios para poder considerar estas pruebas *in vitro* como un indicador fidedigno del comportamiento que piezas para la regeneración ósea tendrán *in vivo*. Hasta el momento, se han podido encontrar muy pocos estudios que hagan un análisis de la disolución o de la degradabilidad de piezas que servirán para regeneración de tejidos óseos como el que hemos llevado a cabo aquí [75, 163] y ninguno en el que se compare esta disolución hallada a través de cualquier manera con la disolución que presentan cuando son implantados en un ser vivo a través de experimentación *in vivo*, lo cual daría una idea mucho más veraz y precisa de la correlación que tienen estos diferentes estudios.

8.5.4. Propiedades biológicas.

En cuanto a los estudios de las propiedades biológicas, se ha decidido llevar a cabo un estudio comparativo entre piezas conformadas solamente por HA/ β -TCP y por la mezcla de éste con BG 1393, para poder evaluar el impacto biológico de este vidrio bioactivo.

Los resultados obtenidos a través de la medición de la interleucina no concuerdan mucho con el concepto previo que se creía de una mayor biocompatibilidad para el BG 1393 que para el HA/ β -TCP. Los resultados de los estudios de IL-6 muestran valores de inflamación en el tejido nativo que son el doble para la mezcla de BG 1393 y HA/ β -TCP que en las piezas conformadas únicamente por HA/ β -TCP. Esto significa que las piezas de HA/ β -TCP provocan una inflamación mucho menor.

Por otro lado los valores de proliferación de células mesenquimales humanas, estudio también conocido como MTT, son prácticamente los mismos para las piezas formadas únicamente por HA/ β -TCP que por las conformadas en un 50% por BG 1393. Estos valores también son ligeramente sorprendentes ya que no muestran esa gran biocompatibilidad que se suponía del vidrio bioactivo en comparación con el hidroxiapatito y el fosfato tricálcico. Esa teórica mayor biocompatibilidad y bioactividad no se ven reflejados en ninguno de los estudios *in vitro* que se han llevado a cabo.

Sin embargo, como se ha podido apreciar en los estudios de disolución, estos valores sí que eran mucho mayores para el vidrio bioactivo que para la mezcla de HA/ β -TCP, que

incluso ganaban peso al ser inmersos en suero fisiológico simulado. Si bien, la velocidad de disolución no es un indicativo directo del nivel de biocompatibilidad de un material.

Además, cabe destacar, que no se ha utilizado para estos experimentos el vidrio bioactivo original, el 45S5, que es el considerado como el más bioactivo de todos los compuestos cerámicos utilizados como biomateriales para la regeneración de tejido óseo [66, 89, 159], el vidrio bioactivo 1393 también debería presentar una propiedades biocompatibles superiores a la mezcla HA/ β -TCP.

En cuanto a las imágenes de fluorescencia confocal, es difícil cuantificar en cual de las dos muestras (la conformada solo por HA/ β -TCP o la que contiene un 50% de BG 1393) existe una mayor proliferación, pareciendo que en ambas existe la misma proliferación celular.

Lo que es innegable a la vista de las figuras 8.31 y 8.32 es la presencia de multitud de células vivas (en verde) en comparación con la ausencia de células muertas (en rojo) para ambas piezas, demostrando la gran biocompatibilidad que poseen los materiales utilizados y lo adecuado que es el método del *freeze casting* para conformar piezas que sean utilizadas para la regeneración del tejido óseo.





9. Estudio de la conformación de piezas de otros sistemas compuestos cerámicos.

Además de las piezas conformadas con vidrio bioactivo 1393 y la mezcla HA/ β -TCP, también se han hecho experimentos para comprobar el funcionamiento del proceso de *freeze casting* con otros compuestos cerámicos bioactivos.

9.1. HA/ β -TCP + Zeolitas ZSM-5.

Las zeolitas ZSM-5 son conocidas desde hace mucho tiempo por tener una gran superficie específica. Además, también han sido utilizadas como portadores moleculares y su biocompatibilidad ya ha sido estudiada, como se ha revisado en el apartado de las Materias primas.

En las siguientes páginas, se lleva a cabo un estudio de la posible utilización de este material como portador de moléculas así como su posible conformación por medio del proceso de *freeze casting*.

9.1.1. Estudio del proceso térmico.

De la misma manera que se ha procedido con anterioridad, se procede a evaluar la viabilidad del proceso térmico. Con los datos que se han obtenido en el apartado de Caracterización previa de las materias primas se puede afirmar que la temperatura de sinterización del compuesto puro de zeolitas está alrededor de 1100°C. Sin embargo, el estudio de superficie específica realizado en ese mismo apartado también indica una drástica disminución de la superficie específica, lo que conlleva una gran pérdida de la propiedad de transportador molecular.

A pesar de estas dificultades iniciales, se van a intentar hacer aproximaciones a la conformación de las piezas, incluyendo el proceso térmico de sinterización.

La primera aproximación es el estudio de la dilatación de la mezcla de las zeolitas con HA/ β -TCP, tal y como muestra la figura 9.1. Estos estudios de dilatometría muestran que cuanto mayor sea la concentración de zeolitas en las piezas, la temperatura a la que se empieza a experimentar la contracción del material es menor, tal y como ocurría con el vidrio bioactivo. Sin embargo, en este caso, el efecto que las zeolita causan no es tan marcado como el producido por los vidrios.

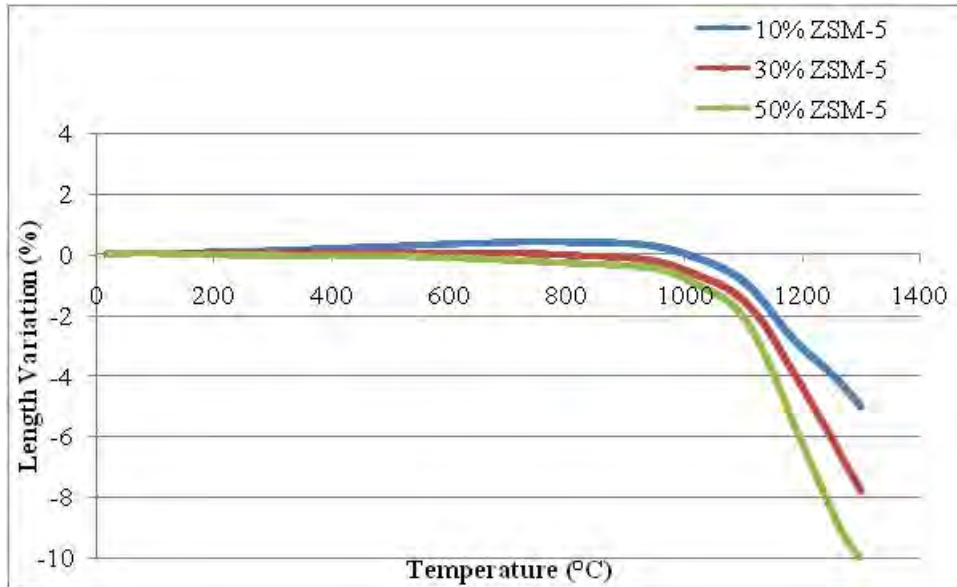


Fig. 9.1. Estudio de dilatación térmica para tres composiciones diferentes de la mezcla HA/ β -TCP con ZSM-5. 10% ZSM-5 en azul; ZSM-5 en rojo; 50% BG 1393 en verde.

El porcentaje de ZSM-5 es en volumen y el resto se corresponde con HA/ β -TCP.

El paso siguiente a continuación del estudio dilatométrico es el estudio de posibles cambios de fase que puedan ocurrir en el material por medio de la difracción por rayos X de diferentes composiciones de mezclas de zeolitas y fosfatos cálcicos bifásicos.



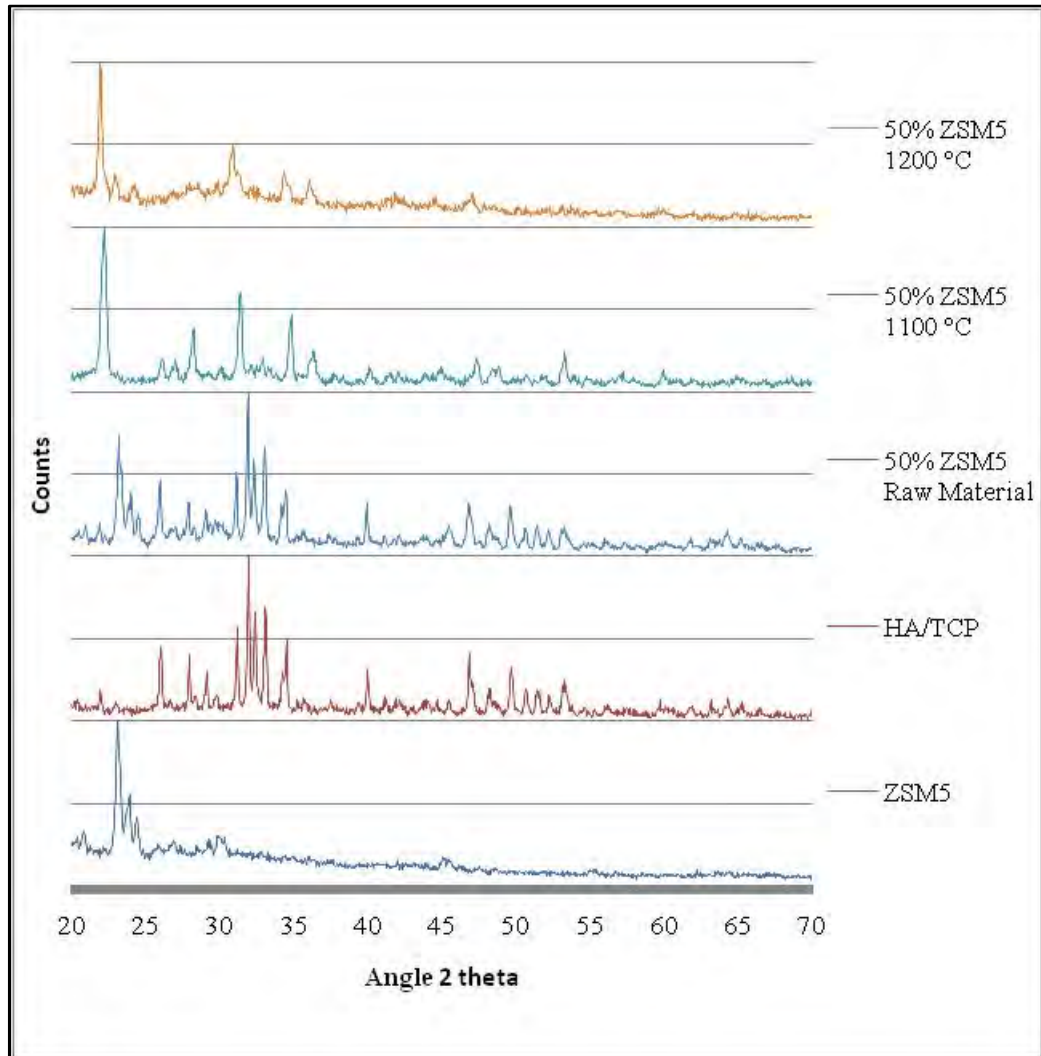


Fig. 9.2. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50 en volumen de ZSM-5 y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

El análisis de difracción de rayos X realizado sobre piezas con 50% de zeolitas muestra que a partir de 1100 °C se produce un cambio cristalográfico, con un pico predominante en un ángulo cercano a 23° (remarcado en rojo en la propia figura), como se puede observar en las figura 9.2. El análisis de los picos obtenidos a diferentes temperaturas muestra la evolución del sistema compuesto al aumentar la temperatura.

Tabla 9.1. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	ZSM-5	HA	β -TCP	Cristobalita	α -TCP	Estilbíta-Ca
50% ZSM-5 1200 °C	-	-	-	-	++	++
50% ZSM-5 1100 °C	-	-	++	++	-	-
50% ZSM-5	++	++	++	-	-	-
HA/ β -TCP	-	++	++	-	-	-
ZSM-5	+++	-	-	-	-	-

Legenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

El estudio a través de difracción de rayos X muestra que las zeolitas reaccionan con el HA, formando nuevos compuestos, cristobalita a los 1100 °C y estibilita-Ca a partir de los 1200 °C. El β -TCP sin embargo, se mantiene hasta los 1100 °C y se transforma en α -TCP a los 1200 °C, tal y como ocurría en los otros casos del β -TCP estudiados anteriormente.

9.1.2. Conformado.

Con la limitación térmica de sinterizar las zeolitas a una temperatura máxima de 1000 °C, se comienza con el proceso de conformado de dichas piezas con zeolitas ZSM-5.

9.1.2.1. *Freeze casting*.

La primera aproximación para la conformación de piezas compuestas de zeolitas y HA/ β -TCP consistió en una mezcla al 50% de volumen de cada uno de los compuestos, para lo que, teniendo en cuenta la densidad de ambos se realizó la consiguiente suspensión, de la misma manera que se había preparado para la mezcla de BG 1393 y HA/ β -TCP en el apartado 8.

Para la suspensión se añadieron 30,62 g de HA/ β -TCP y 23,45 g de ZSM-5, con los correspondientes aditivos poliméricos y las cantidades establecidas en el apartado de Métodos experimentales para el proceso de *freeze casting*. El orden de adición al agua fue la de añadir primero los aditivos poliméricos, lubricante, dispersante y aglutinante, en este orden. Después se agregaron el HA/ β -TCP y el ZSM-5.

Al igual que se he hecho con las suspensiones anteriores, antes de comenzar el proceso de *freeze casting*, la suspensión, que se encuentra en el interior de un bote plástico con la presencia de bolas de zircona, es sometida a un proceso de mezclado por medio de rotación de dichos botes. Justo antes del comenzar el proceso de *freeze casting* en sí, la suspensión es colocada en un baño con hielo, para bajar su temperatura y, al mismo tiempo, sometida a vacío para eliminar todas las posibles burbujas de aire que pueda haber en su seno.

Seguidamente se inició el proceso de *freeze casting* de la misma manera que se ha realizado previamente, con la posterior sublimación del hielo formado.

9.1.2.2. Sinterización.

Una vez todo el hielo de las piezas ha sido sublimado se procede al sinterizado de las piezas. Este es un punto importante, puesto que temperaturas mayores de 1000 °C reducirán por completo la superficie específica de las zeolitas, que es la propiedad en concreto que se quiere explotar de ellas. Sin embargo, temperaturas por debajo de 1000 °C probablemente no sean suficientes para conseguir piezas sólidas. A pesar de ello, se intentan sinterizarlas a 900, 950 y 1000 °C.



Fig. 9.3. Imágenes de las piezas de 50% vol. ZSM-5 sinterizadas a 900 °C (izquierda), 950 °C (centro) y 1000 °C (derecha).

La figura 9.3 muestra que el resultado del proceso térmico no es el deseado y, efectivamente, las piezas no han sido sinterizadas correctamente. Esto provoca que la más mínima manipulación de éstas conlleve el colapso de la pieza. Por la manera en que las piezas han colapsado, se puede afirmar que sí tienen una configuración interna lamelar, obtenida gracias al proceso previo de *freeze casting*.

9.1.2.3. Reformulación de la composición de los composites cerámicos, *freeze casting* y posterior sinterizado.

A continuación se explora un método alternativo para poder conformar las piezas de zeolitas y que puedan ser sinterizadas sin tener que llevar las piezas por encima de la temperatura de 1000 °C.

Consultando en la bibliografía se observa que Ojuva *et al.* [166] han conseguido realizar el proceso de *freeze casting* en zeolitas de otro tipo, las denominadas 13X, por medio de otro tipo de aglomerante, la bentonita. Este compuesto no es orgánico, como ocurría con el Aquazol, sino que este es un tipo de arcilla muy fina del tipo montmorillonita [22]. Este estudio utilizaba cantidades entre el 9 y el 16% del peso total de zeolitas como cantidad de bentonita.

De esta manera se procede a realizar el *freeze casting* del 50% de las zeolitas ZSM-5 con HA/ β TCP utilizando un 15 y un 20% del peso total con bentonita y, de nuevo, se procede a la sinterización de las piezas resultantes a 1000 °C. Sin embargo, las muestras obtenidas siguen siendo piezas que no se pueden manejar y que al más mínimo contacto colapsan.

Por otro lado, se lleva a cabo el proceso de conformación por *freeze casting* con la inclusión del vidrio bioactivo 1393. El hecho de que este compuesto se empieza a fundir a temperaturas en torno los 675-700 °C puede provocar que actúe como una especie de cemento

entre todas las partículas, tanto las zeolitas como el HA/ β -TCP, una vez que se vuelve a la temperatura ambiente.

De esta manera, se formulan seis diferentes disoluciones iniciales en las que habrá distintas concentraciones de cada uno de los tres compuestos sólidos, como se recoge en la tabla 9.2. Todas estas suspensiones tienen un 20% de contenido sólido inicial y las masas que se presentan en la siguiente tabla 9.2 están referidas para la preparación de 10 ml de suspensión.

Tabla. 9.2. Composición y masa de cada uno de las nuevas suspensiones propuestas compuestas de ZSM-5, BG 1393 y HA/ β -TCP.

	ZSM-5		BG 1393		HA/ β -TCP	
	%	Masa (g)	%	Masa (g)	%	Masa (g)
Nº 1	20%	1,256	20%	1,256	60%	3,768
Nº 2	15%	0,942	25%	1,570	60%	3,768
Nº 3	25%	1,570	25%	1,570	50%	3,140
Nº 4	20%	1,256	30%	1,884	50%	3,140
Nº 5	30%	1,884	30%	1,884	40%	2,512
Nº 6	15%	0,942	15%	0,942	70%	4,396

Además de estos compuestos, también se añaden las cantidades de aditivos poliméricos que se han descrito en el apartado de Métodos experimentales. El orden de adición al agua es lubricante, dispersante y aglutinante. Finalmente se añaden las cantidades correspondientes de zeolitas ZSM-5, vidrio bioactivo 1393 y la mezcla HA/ β -TCP, en este orden.

A la suspensión, que se encuentra confinada dentro de un bote de plástico, se le añaden bolas de zircona y se procede a su rotación para completar la homogeneización de la mezcla durante un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, la suspensión es tratada en un baño de hielo y al vacío, para bajar la temperatura de ésta y eliminar los restos de aire que pueda contener, respectivamente, tal y como se ha hecho con anterioridad con otros compuestos.

Una vez llevado a cabo todo el proceso de conformación del *freeze casting* y el correspondiente posterior sublimado del hielo de las muestras, éstas fueron sometidas al proceso térmico de sinterización. Para este proceso se han elegido temperaturas de 825, 875 y 925 °C.

Después de llevar a cabo el proceso de sinterización de las diferentes piezas obtenidas a dichas temperaturas y una vez que han sido retiradas del horno, las piezas tienen consistencia, a diferencia de las primeras, ya que pueden ser manejadas sin que colapsen por completo. En el siguiente apartado se lleva a cabo el estudio de la microestructura interna necesaria para que sean piezas válidas para la colonización celular y, así, poder ser utilizadas como piezas para la regeneración del tejido óseo.

9.1.3. Caracterización física.

Una vez que las piezas compuestas de zeolitas, BG 1393 y HA/ β -TCP han sido conformadas, se procede a la caracterización física de dichas piezas.

9.1.3.1. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.

Las piezas cilíndricas originales obtenidas del proceso del *freeze casting* son cortadas en discos y dichos discos son analizados por medio del SEM. Como se ha apuntado previamente, las seis mezclas de los compuestos cerámicos han sido sometidas a tres diferentes procesos térmicos de sinterización, con distintas temperaturas máximas alcanzadas. Las imágenes de la microestructura interna de las piezas son mostradas a continuación.

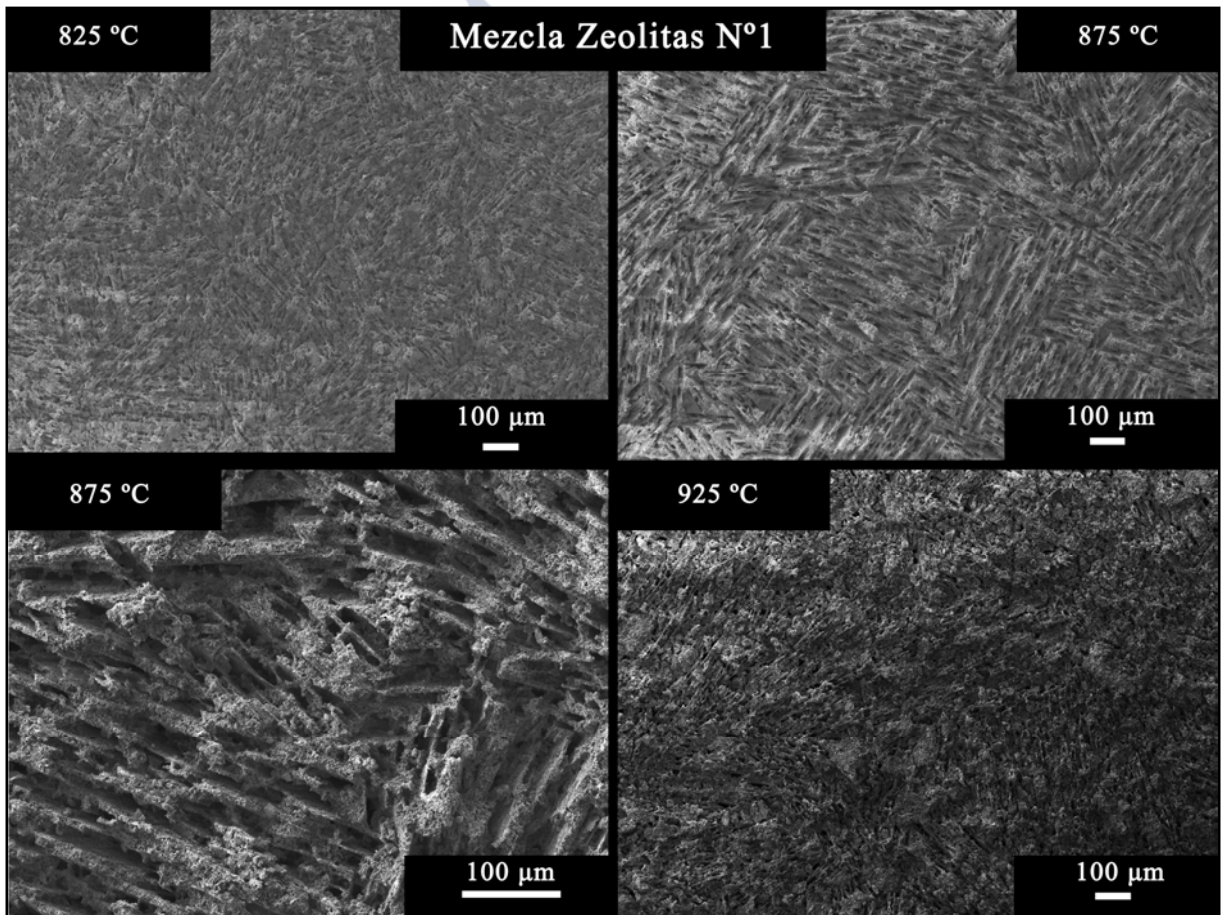


Fig. 9.4. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 1 (60% HA/ β -TCP, 20% BG 1393 y 20% ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

La imagen 9.4 muestra las estructuras de la primera de las mezclas de zeolitas sinterizada. A pesar de que a las temperaturas de 825 y 875 °C aún sigue siendo distinguible la estructura lamelar, ésta ha sido parcialmente obstruida. A la temperatura de 925 °C la estructura está completamente bloqueada.

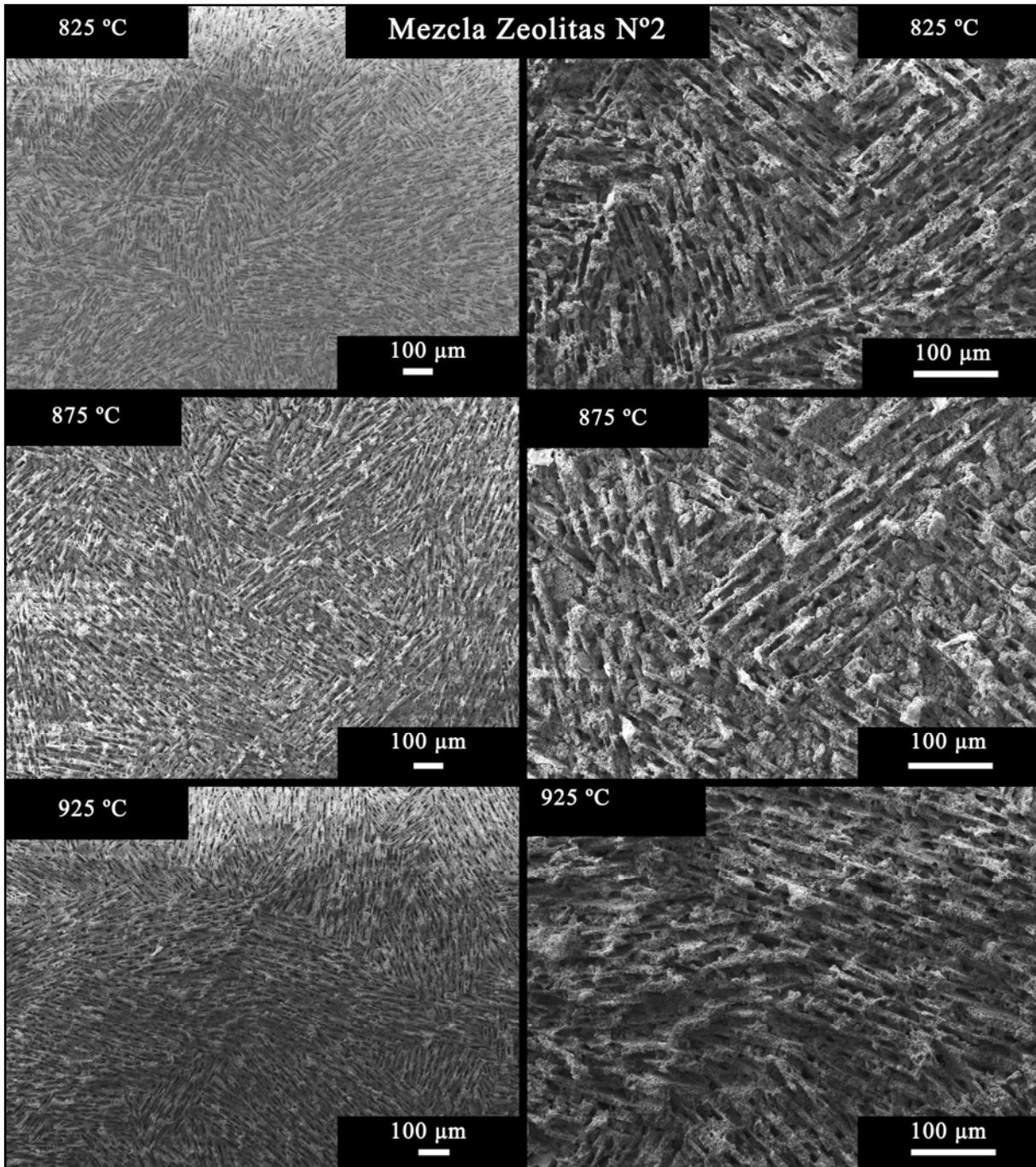


Fig. 9.5. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 2 (60% HA/ β -TCP, 25% BG 1393 y 15% en peso ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

La figura 9.5 se corresponde con la mezcla número 2, en la que se ha aumentado la concentración del BG 1393 un 5% en detrimento de la concentración de zeolitas. En dicha figura se puede apreciar que se ha mejorado la conservación de la estructura lamelar, que aparece mucho más marcada.

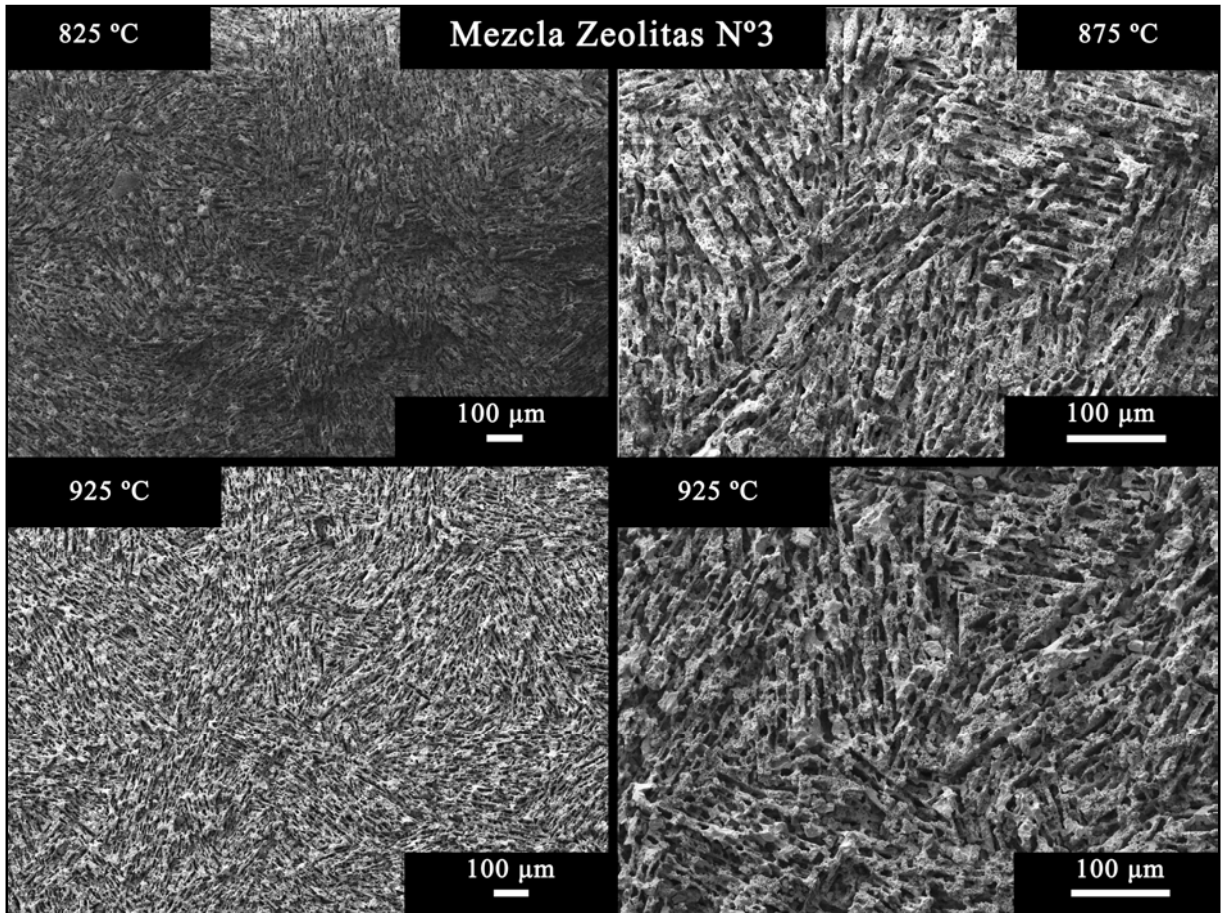


Fig. 9.6. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 3 (50% HA/ β -TCP, 25% BG 1393 y 25% en peso ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

La mezcla de zeolitas número 3 ha sido analizada en la figura 9.6, en la que se reduce el contenido de HA/ β -TCP en comparación con las dos primeras mezclas. En las imágenes de la microestructura de esta mezcla sigue estando presente la microestructura lamelar, aunque tampoco se aprecian tamaños de poros demasiado grandes, lo que podría comprometer la futura proliferación celular en su interior. Se puede apreciar que las tres diferentes temperaturas de sinterización afectan bastante poco a la conformación de la microestructura.

En la figura 9.7 se recogen las imágenes de la mezcla número 4, en la que sí que se aprecia una buena constitución de canales y estructura lamelar a lo largo de toda la pieza para las tres temperaturas de sinterización que se han estudiado.

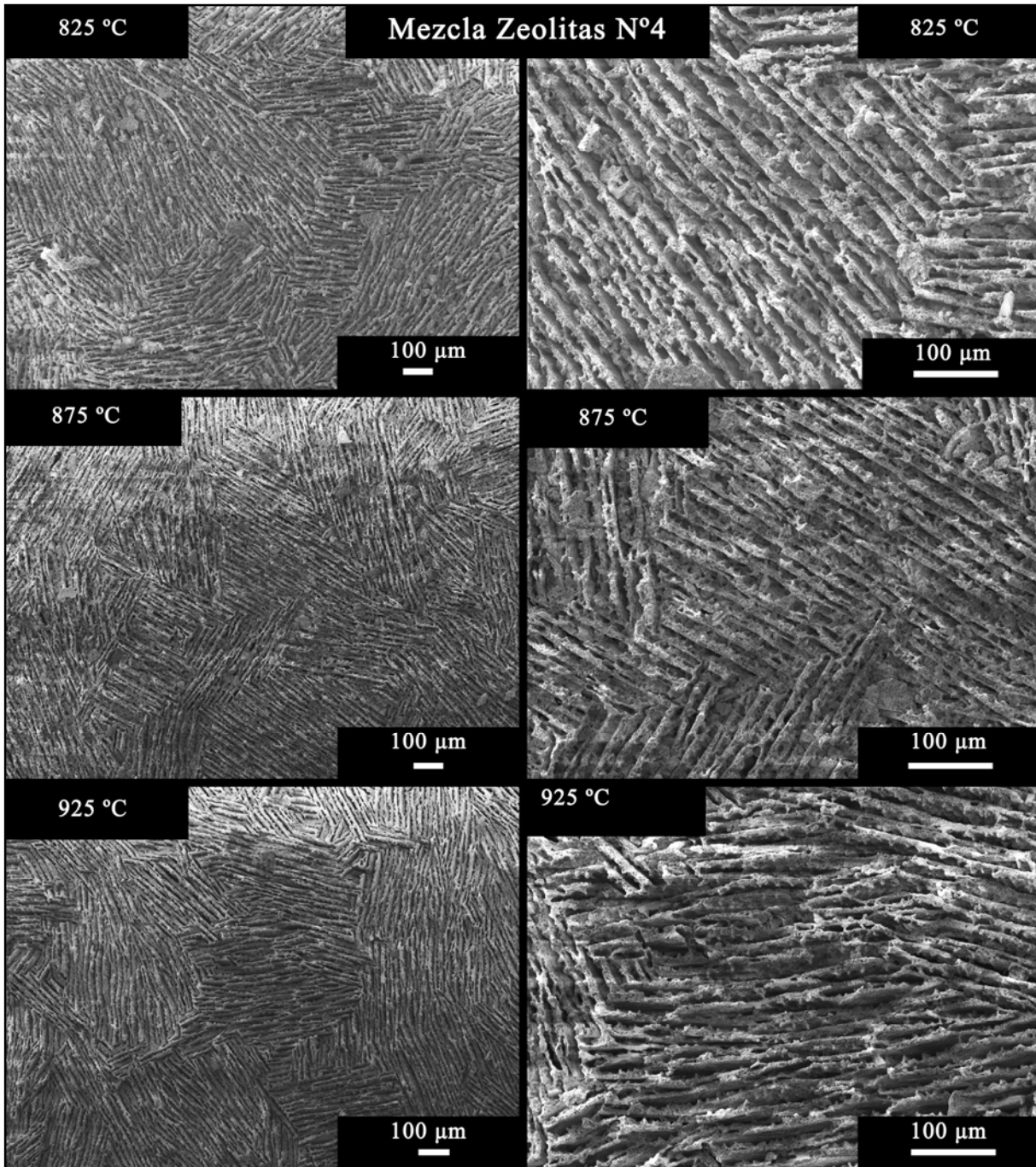


Fig. 9.7. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 4 (50% HA/ β -TCP, 30% BG 1393 y 20% en peso ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

La mezcla número 5, también con un 30% de contenido de BG 1393, aunque con mayor presencia de zeolitas que la mezcla número 4 y con una reducción de la cantidad de HA/ β -TCP muestra poros que, *a priori*, tienen un mayor tamaño que las anteriores mezclas, si bien es difícil de cuantificar solamente por medio de las imágenes SEM.

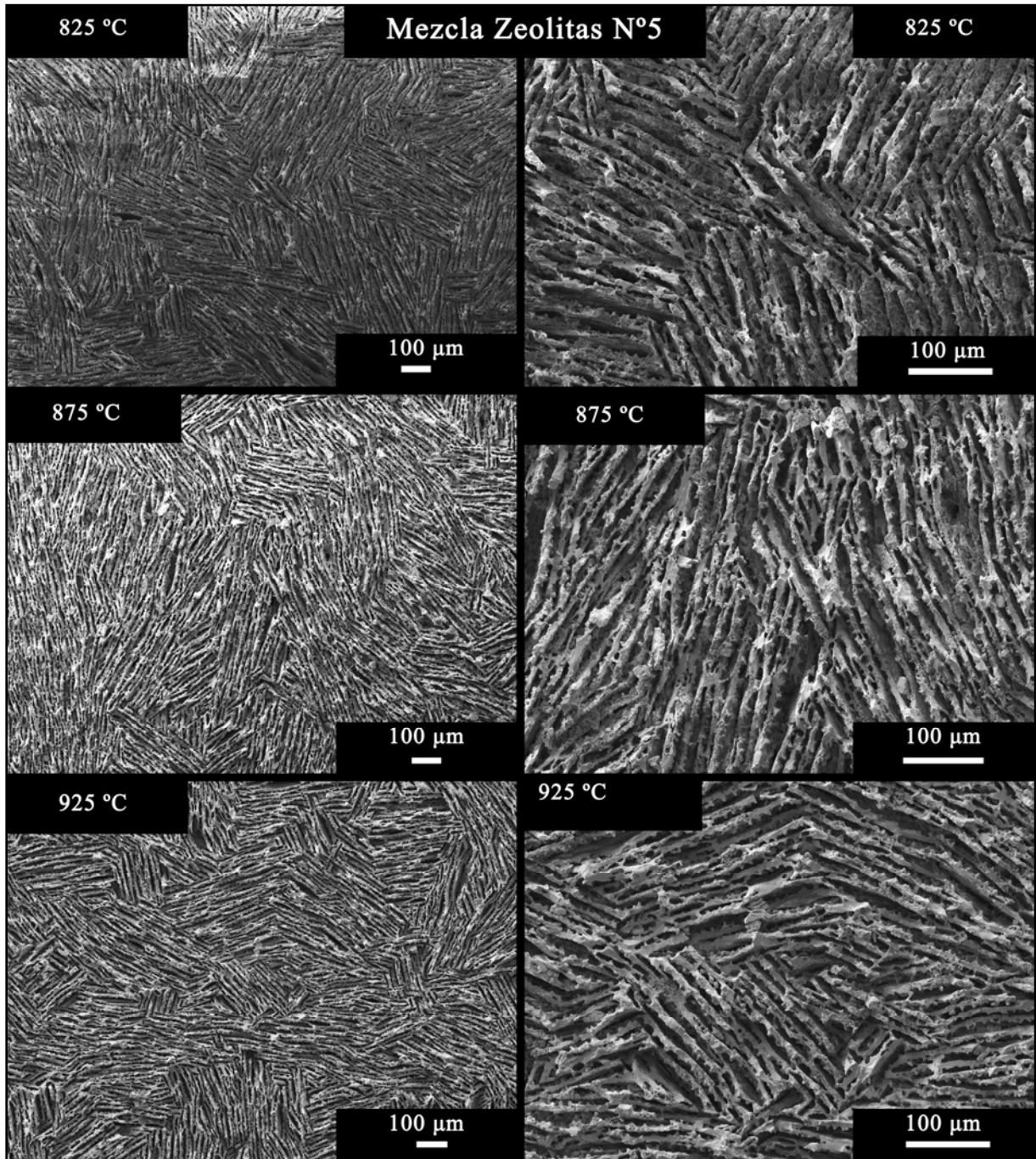


Fig. 9.8. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 5 (40% HA/ β -TCP, 30% BG 1393 y 30% en peso ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

Por último, la mezcla de zeolitas número 6 tiene un alto contenido de HA/ β -TCP y bajos contenidos de ZSM-5 y BG 1393 y tampoco muestra una buena conformación de la estructura interna a través de las imágenes que hemos obtenido por SEM. Los poros aparecen bastante bloqueados.

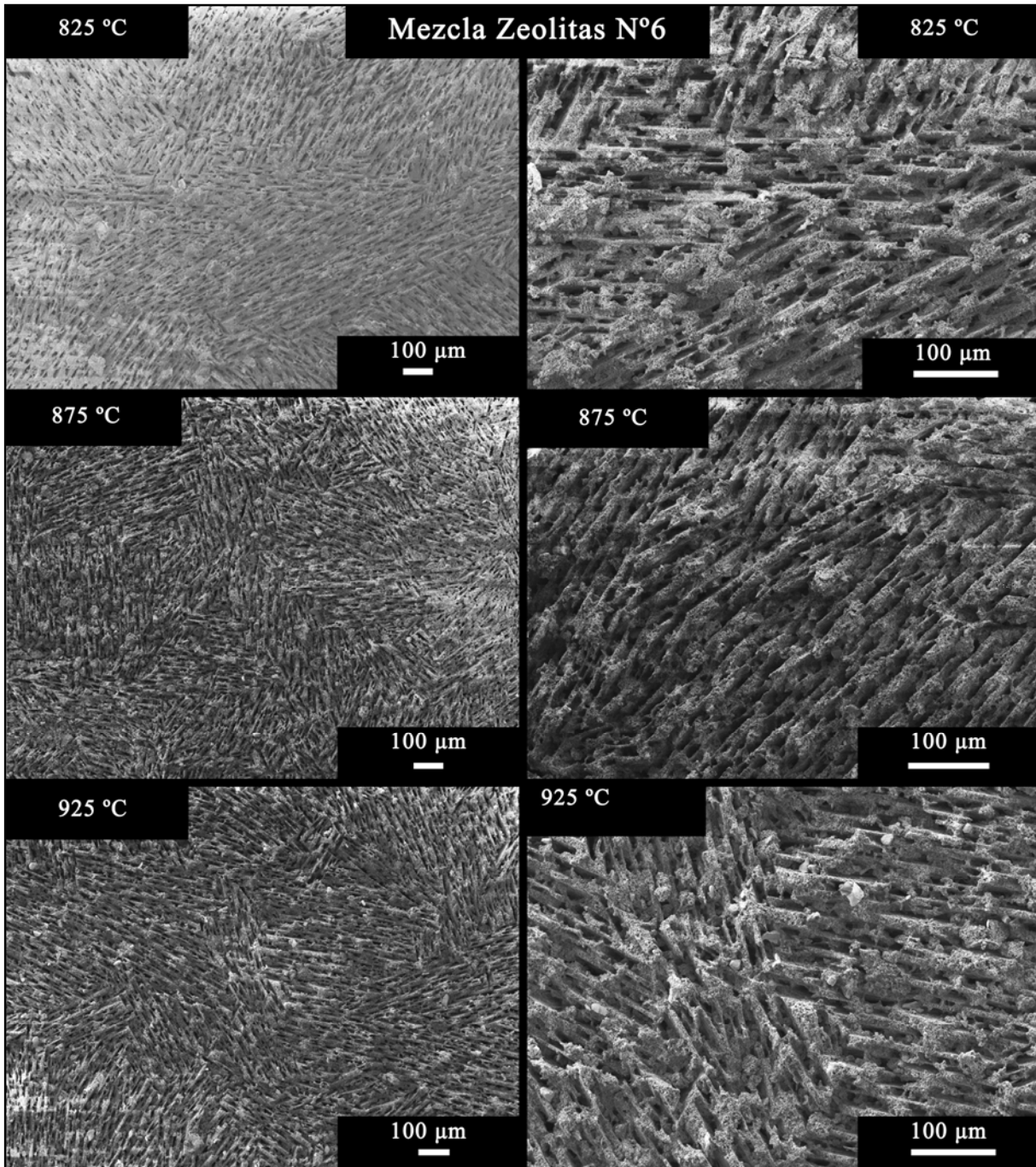


Fig. 9.9. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas de mezcla de zeolitas número 6 (70% HA/ β -TCP, 15% BG 1393 y 15% en peso ZSM-5) sinterizadas a diferentes temperaturas.

9.2. HA/TCP + Vidrio Bioactivo BG1393B1.

En el presente apartado se lleva a cabo el estudio de esta nueva mezcla de compuestos analizando el proceso térmico que será necesario llevar a cabo para la conformación de las piezas.

9.2.1. Estudio del proceso térmico.

El primer estudio ha sido al análisis dilatométrico de diferentes mezclas de HA/ β -TCP con BG 1393B1 para poder aproximar las que serán las temperaturas de sinterización de cada una de las mezclas a estudiar.

Como se puede apreciar en la figura 9.10, al igual que ocurría con mezclas previas de otros vidrios bioactivos con HA/ β -TCP, a mayor cantidad de vidrio, menor será la temperatura de sinterización óptima, debido al menor punto de fusión que presentan los vidrios bioactivos en comparación con la mezcla de fosfatos cálcicos.

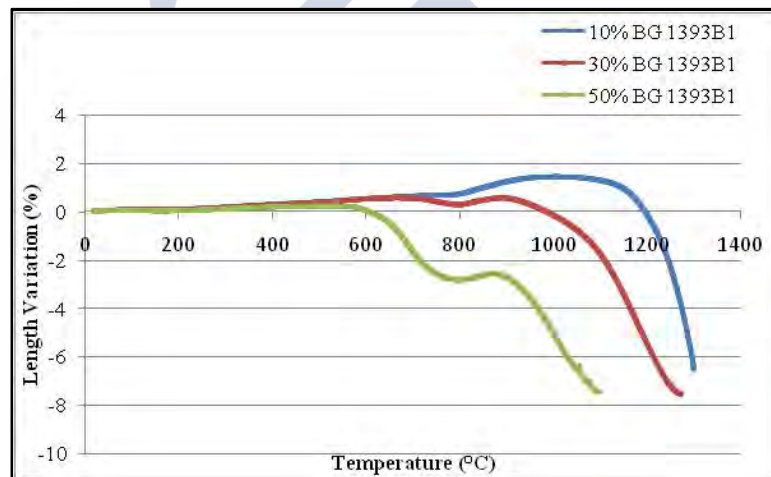


Fig. 9.10. Estudio de dilatación térmica para tres composiciones diferentes de la mezcla HA/ β -TCP con BG 1393B1. 10% BG 1393B1 en azul; 30% BG 1393B1 en rojo; 50% BG 1393B1 en verde. El porcentaje de BG 1393B1 es en volumen y el resto se corresponde con HA/ β -TCP.

Es necesario remarcar que en la figura 9.10 la mezcla al 50% de BG 1393B1 experimenta una gran contracción del material alrededor de 650 °C, similar a la que le ocurría al BG 45S5 cuando cristalizaba. En la bibliografía consultada, no se ha podido encontrar ningún indicio de que el BG 1393B1 cristalice al ser sometido a algún proceso térmico de consolidación, pero es necesario realizar más estudios para corroborar si realmente ocurre un proceso de cristalización o no.

De esta manera, el siguiente paso es hacer un estudio de los posibles cambios de fase que puedan ocurrir en los compuestos debido al proceso térmico al que son sometidas las piezas. Para poder tener una visión de todos los compuestos, se ha tomado la mezcla al 50% de BG 1393B1 y 50% de HA/ β -TCP y ésta ha sido analizada a través de difracción de rayos X

después de procesos térmicos a diferentes temperaturas, tal y como se puede apreciar en la figura 9.11.

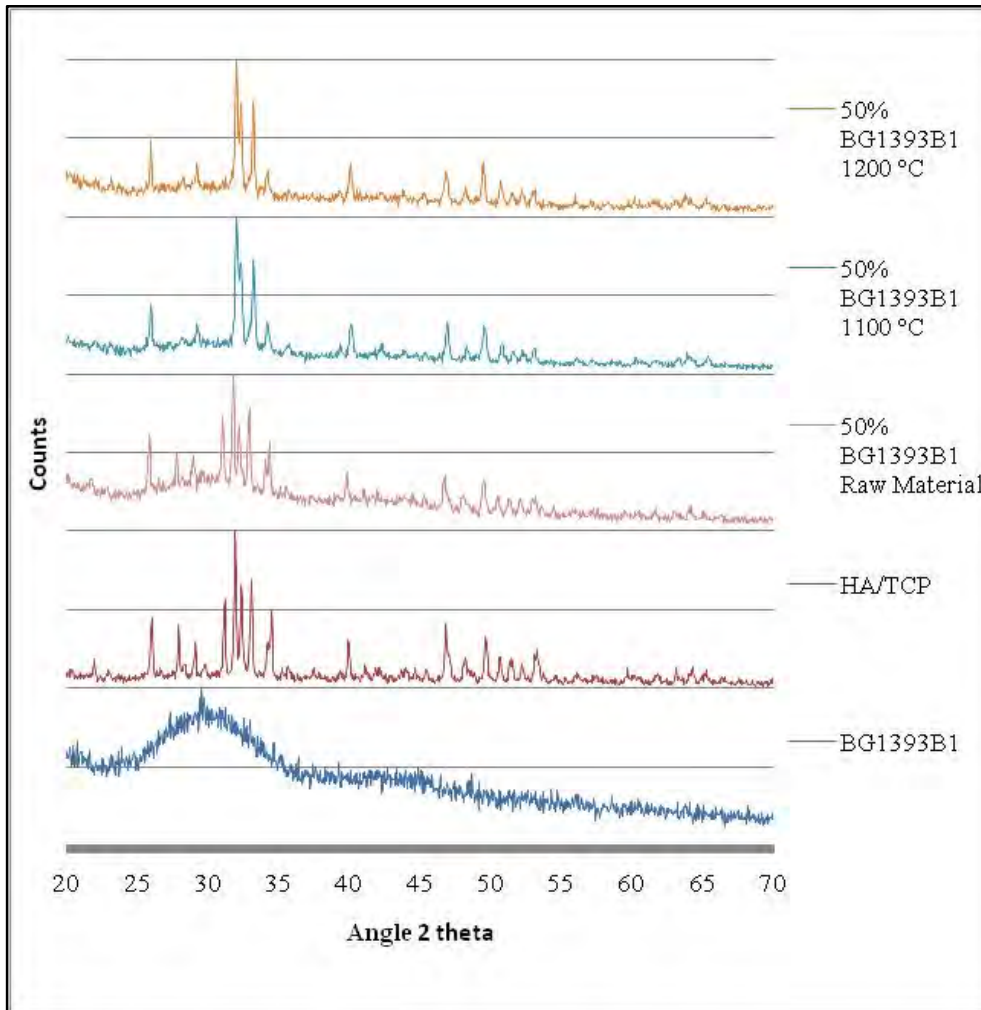


Fig. 9.11. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50% en volumen de BG 1393B1 y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

Los picos obtenidos a través del estudio de difracción de rayos X son identificados con los compuestos correspondientes en la tabla 9.3.

Tabla 9.3. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	HA	β -TCP	Otros fosfatos cálcicos
50% BG 1393B1 1200 °C	++	-	++
50% BG 1393B1 1100 °C	++	-	++
50% BG 1393B1	++	++	-
HA/ β -TCP	++	++	-
BG 1393B1	-	-	-

Leyenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

9.2.2. Conformado.

Una vez que se ha comprobado la viabilidad del proceso de sinterización que se llevará a cabo después del *freeze casting*, el estudio continúa con el propio proceso de conformación de las piezas.

9.2.2.1. Freeze casting.

Al igual que se ha procedido con los otros compuestos con los que se han realizado piezas previamente, el primer paso del proceso de *freeze casting* es la preparación de las suspensiones iniciales.

Tomando los valores de densidad real que se han obtenido del BG 1393B1 y del HA/ β -TCP en el apartado de Caracterización previa de las materias primas, se calcula la cantidad necesaria de cada compuesto para poder crear piezas con un 20% de contenido cerámico y con una concentración del 50% en volumen, tanto para el BG 1393B1 como para el HA/ β -TCP.

Después de hacer los cálculos pertinentes, se obtiene que son necesarios 30,63 g de HA/ β -TCP y 26,73 g de BG 1393B1, además de las cantidades establecidas de los diferentes aditivos poliméricos que se han utilizado a lo largo de este estudio con los otros compuestos, para poder llevar a cabo el proceso de *freeze casting* con éxito.

En el proceso para preparar la suspensión, el orden de mezcla de los compuestos siempre ha sido igual, comenzando primero con el peso correspondiente del agua y añadiendo en este orden las cantidades correspondientes de lubricante, el dispersante, el aglutinante, tal y como se ha establecido previamente en el apartado de Métodos experimentales. Después se completaba con la adición del BG 1393B1 y finalmente del HA/ β -TCP.

Una vez preparada la suspensión y después del correspondiente mezclado con cilindros de zircona en el interior de los botes plásticos que están en continua rotación durante 24 horas, se lleva a cabo un baño en hielo y al vacío, al igual que se ha hecho con otras suspensiones en apartados previos. Este proceso permite bajar la temperatura de la suspensión a valores cercanos a los 0 °C del inicio del proceso de *freeze casting* y eliminar restos de aire en su interior.

Se lleva a cabo el proceso de *freeze casting* en la suspensión y las piezas resultantes son sometidas a un proceso de sublimación para eliminar el hielo de éstas para que queden únicamente las paredes lamelares de los compuestos sólidos de la suspensión inicial.

9.2.2.2. Sinterización.

Una vez que las piezas son retiradas del liofilizador en el que se ha producido la sublimación del hielo, dichas piezas son introducidas en el horno para llevar a cabo el proceso térmico de sinterizado.

Tomando como ejemplo las piezas producidas con el vidrio bioactivo 1393 con una mezcla al 50% de HA/ β -TCP, similar a la que se está estudiando en este punto, se eligen temperaturas cercanas a los 1000 °C. De esta manera, se lleva a cabo el proceso de sinterizado a las temperaturas de 950, 1000 y 1050 °C de la manera establecida previamente en el apartado de Métodos experimentales.

9.3.2. Caracterización física.

Una vez finalizado el proceso térmico al que son sometidas las piezas, éstas se encuentran completamente conformadas y se lleva a cabo una breve caracterización física de las piezas.

9.3.2.1. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.

Las piezas cilíndricas originales obtenidas a través del proceso de *freeze casting* son cortadas transversalmente en discos que son analizados a través de microscopía electrónica, que indicará cómo está conformada la estructura interna de dichas piezas que han sido sometidas a diferentes temperaturas de sinterización.

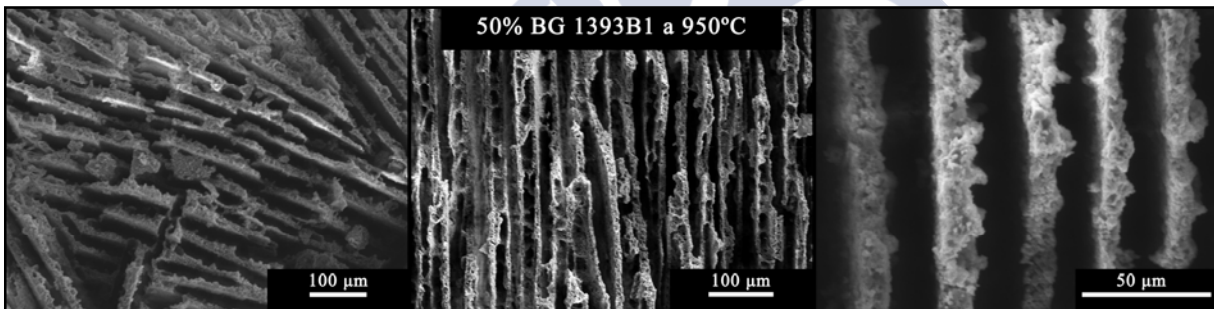


Fig. 9.12. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 1393B1 y sinterizadas a una temperatura de 950°C.

En la figura 9.12 se puede observar que, efectivamente, el proceso de *freeze casting* ha dado lugar a una microestructura interna lamelar y que el posterior proceso térmico ha permitido consolidarla sin dañarla.

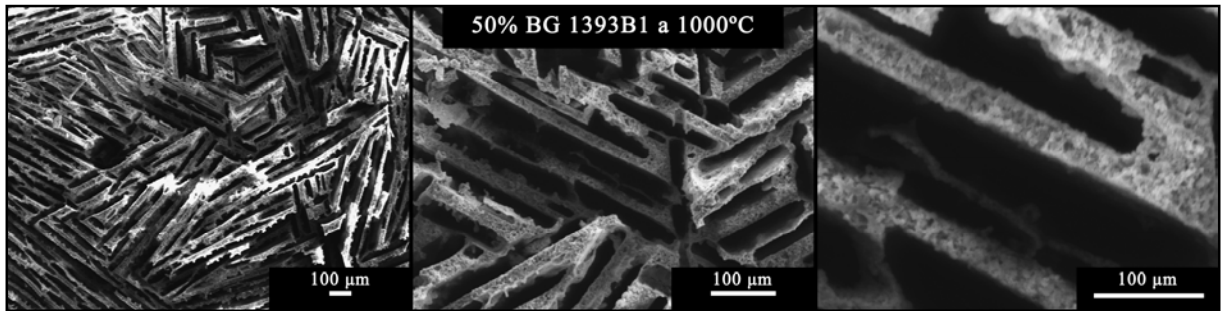


Fig. 9.13. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 1393B1 y sinterizadas a una temperatura de 1000°C.

La figura 9.13 muestra también una microestructura lamelar interna. Se demuestra que la estructura lamelar obtenida se corresponde con las propiedades características que otorga el proceso de *freeze casting*.

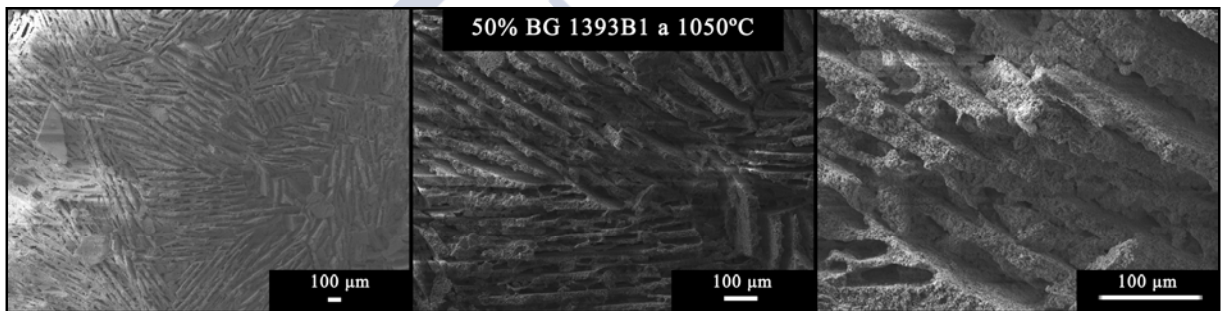


Fig. 9.14. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 1393B1 y sinterizadas a una temperatura de 1050°C.

Por último, la figura 9.14 muestra las mismas piezas a la mayor temperatura de sinterización utilizada, correspondiente a 1050 °C. En este caso, a pesar de que también se puede identificar una microestructura lamelar, los canales que deberían aparecer entre las paredes se encuentran bloqueados.

9.3. HA/ β -TCP + Vidrio Bioactivo BG2B6Sr.

A continuación se muestra el estudio llevado a cabo para la conformación de piezas por medio del *freeze casting* con diferentes compuestos cerámicos. En este aparatado se llevará a cabo la conformación de piezas con HA/ β -TCP y el vidrio bioactivo 2B6Sr.

9.3.1. Estudio del proceso térmico.

De nuevo se inicia el estudio de esta mezcla de compuestos con la viabilidad del proceso térmico que será necesario para la conformación sólida de las piezas creadas por medio del *freeze casting*. El primer paso es un estudio por medio de dilatometría de diferentes mezclas de BG 2B6Sr con HA/ β -TCP para aproximar la que será la temperatura de sinterización.

La figura 9.15 muestra que, al igual que ocurría con otros vidrios bioactivos estudiados anteriormente, a mayor contenido de vidrio bioactivo, el inicio del proceso de sinterización del compuesto, al igual que el comienzo de de contracción de la pieza, ocurren a temperaturas más bajas.

También es destacable el hecho de que en la mezcla al 50% de BG 2B6Sr se produce una contracción muy marcada a una temperatura cercana a los 650 °C, similar a la que ocurría en el BG 45S5 cuando desvitrificaba. Para comprobar si también se produce un proceso de cristalización similar en el BG 2B6Sr es necesario realizar un análisis de cambios de fase por medio de difracción de rayos X.

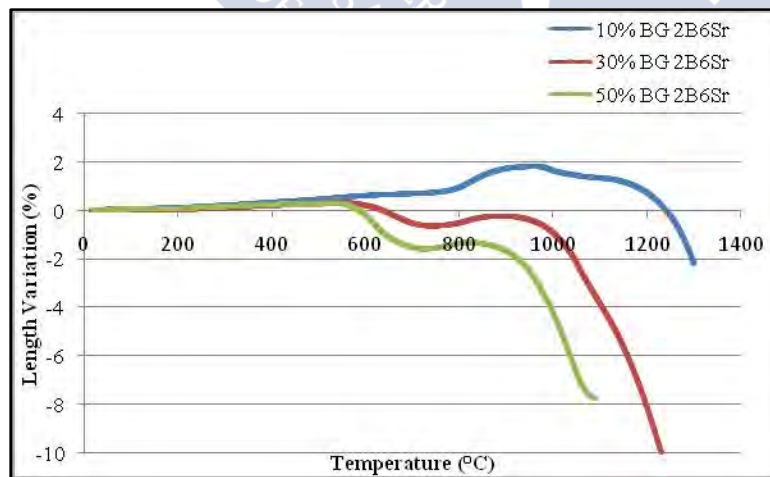


Fig. 9.15. Estudio de dilatometría para tres composiciones diferentes de la mezcla HA/ β -TCP con BG 2B6Sr. 10% BG 2B6Sr en azul; 30% BG 2B6Sr en rojo; 50% BG 2B6Sr en verde. El porcentaje de BG 2B6Sr es en volumen y el resto se corresponde con HA/ β -TCP.

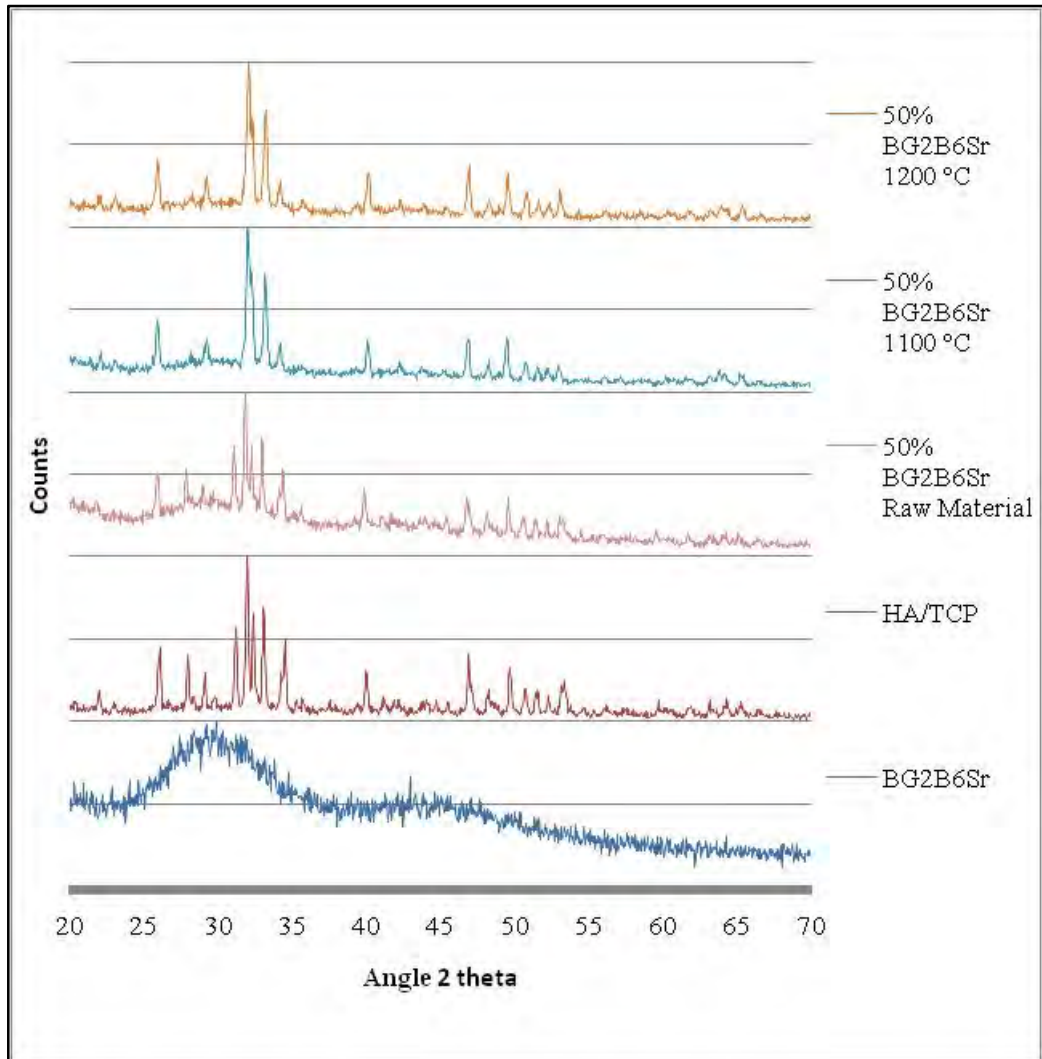


Fig. 9.16. Análisis por medio de difracción de rayos X de la mezcla 50-50% en volumen de BG 2B6Sr y HA/ β -TCP a diferentes temperaturas y comprado con ambos compuestos sin tratamiento térmico.

Los picos obtenidos a través del estudio de difracción de rayos X son identificados con los compuestos correspondientes en la tabla 9.4.

Tabla 9.4. Análisis semicuantitativo de los elementos detectados a través de difracción de rayos X en cada muestra después del correspondiente tratamiento térmico.

Compuestos	HA	β -TCP	Otros fosfatos cálcicos
50% BG 2B6Sr 1200 °C	++	-	++
50% BG 2B6Sr 1100 °C	++	-	++
50% BG 2B6Sr	++	++	-
HA/β-TCP	++	++	-
BG 2B6Sr	-	-	-

Legenda: +++: muy abundante; ++: abundante; +: presente; -: ausente.

9.3.2. Conformado.

Una vez realizado el estudio previo del proceso térmico de sinterización que será necesario aplicar a las piezas, se lleva a cabo el propio proceso de conformado.

9.3.2.1. Freeze casting.

A partir de los datos de densidades reales obtenidos en el apartado de Caracterización de materias primas se obtiene el valor de la densidad del vidrio bioactivo 2B6Sr. Para elaborar las suspensiones de 100 ml, que posteriormente serán conformadas a través del proceso de *freeze casting*, con un contenido sólido del 20% en volumen es necesario añadir las siguientes cantidades de BG 2B6Sr y HA/ β -TCP más 80 ml de agua.

Tabla 9.5. Masa de cada compuesto necesaria para preparar 100 ml de suspensión con un 20% de volumen de contenido cerámico

	Contenido de BG 2B6Sr (vol %) en la suspensión						
	0%	10%	30%	50%	70%	90%	100%
HA/ β -TCP (g)	61,20	55,13	42,88	30,63	18,38	6,13	
BG 2B6Sr (g)		5,46	16,37	27,28	38,19	49,10	54,56

Además, también es necesario añadir los aditivos poliméricos, tal y como se ha descrito en el apartado de Métodos experimentales. El orden de preparación de dichas suspensiones siempre ha sido la misma, añadiendo primero el lubricante, dispersante y aglutinante, en este orden. Después se añadió el HA/ β -TCP y, por último, el BG 2B6Sr.

Después del proceso de *freeze casting* en sí, el hielo de las piezas fue sublimado durante 72 horas y, en ese momento, las piezas se encontraban listas para ser sometidas al proceso térmico de sinterización.

9.3.2.2. Sinterización.

A partir de los datos obtenidos del estudio dilatométrico de la mezcla de los compuestos HA/ β -TCP y BG 2B6Sr se procede a elaborar una tabla con los intervalos de temperaturas que serán estudiados para cada una de las concentraciones de 2B6Sr.

Tabla 9.6. Intervalo de temperaturas en el que se encuentra la temperatura óptima de sinterización para cada concentración de BG 2B6Sr.

Composición	10% BG 2B6Sr	30% BG 2B6Sr	50% BG 2B6Sr	70% BG 2B6Sr	90% BG 2B6Sr	100% BG 2B6Sr
Rango de temperaturas	850- 1200 °C	800- 1150 °C	750- 1050 °C	700- 900 °C	600- 850 °C	550- 750 °C

Los intervalos de temperaturas obtenidos de la tabla 9.6. son divididos en subintervalos de 50 °C, en los cuales se estudiará el resultado de aplicar dicho proceso térmico de sinterización a los diferentes cilindros obtenidos a través del proceso de conformación del *freeze casting*.



Fig. 9.17. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 10% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.



Fig. 9.18. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 30% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.



Fig. 9.19. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 50% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

En las figuras 8.17, 8.18 y 8.19 se puede observar que la apariencia externa de los cilindros sinterizados a diferentes temperaturas para las concentraciones de 10%, 30% y 50%, respectivamente, son prácticamente iguales en todos los casos.

Sin embargo, en la figura 9.20 se observa que la temperatura de 900 °C es demasiado alta, haciendo que el cilindro colapse. El cilindro sinterizado a 800 °C también muestra una extraña apariencia con un ligero tono grisáceo que contrasta con el color blanco de los demás cilindros.



Fig. 9.20. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 70% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

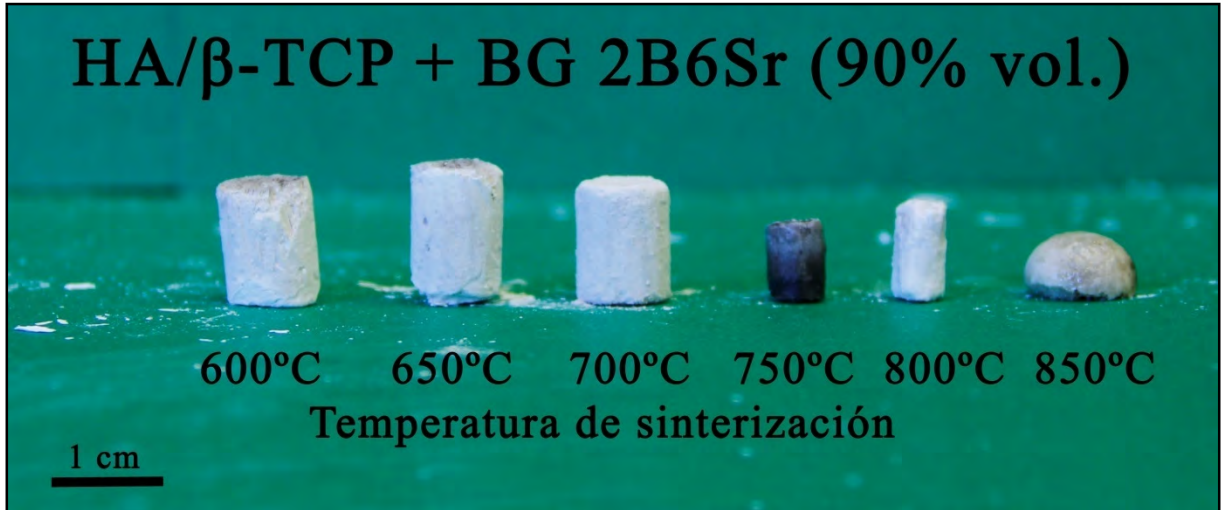


Fig. 9.21. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 90% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

La figura 9.21 muestra que 750 °C ya es una temperatura demasiado elevada para esta composición. Tanto en esta temperatura como en 800 °C y 850 °C los cilindros han colapsado por completo.



Fig. 9.22. Imágenes de las piezas obtenidas con concentración 100% de volumen de BG 2B6Sr a las diferentes temperaturas de sinterización del intervalo seleccionado.

Por último, la figura 9.22 muestra las piezas conformadas únicamente con BG 2B6Sr. En este caso, también es muy visual el resultado de las piezas que han sido sometidas a tratamientos térmicos por encima de 650 °C. Tanto la pieza de 700 °C como la de 750 °C muestran color negro oscuro además de un tamaño de pieza mucho menor que los otros cilindros sometidos a temperaturas de sinterización más bajas.

9.3.3. Caracterización física.

Una vez conformadas todas las piezas para cada una de las composiciones estudiadas, se procede al análisis de la microestructura interna a través del microscopio electrónico de barrido.

9.3.3.1. . Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.

El análisis a través del microscopio electrónico de la estructura interna de las piezas obtenidas sólo se ha realizado para tres temperaturas diferentes para la concentración de un 50% de BG 2B6Sr.

En dicho estudio de la microestructura, se han analizado las temperaturas de sinterización de 950 °C, 1000 °C y 1050 °C, cuyas imágenes se muestran a continuación.

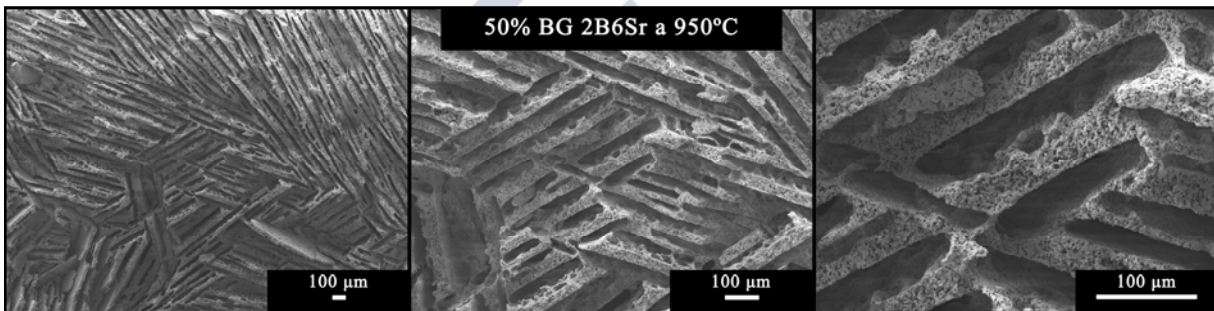


Fig. 9.23. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 2B6Sr y sinterizadas a una temperatura de 950°C.

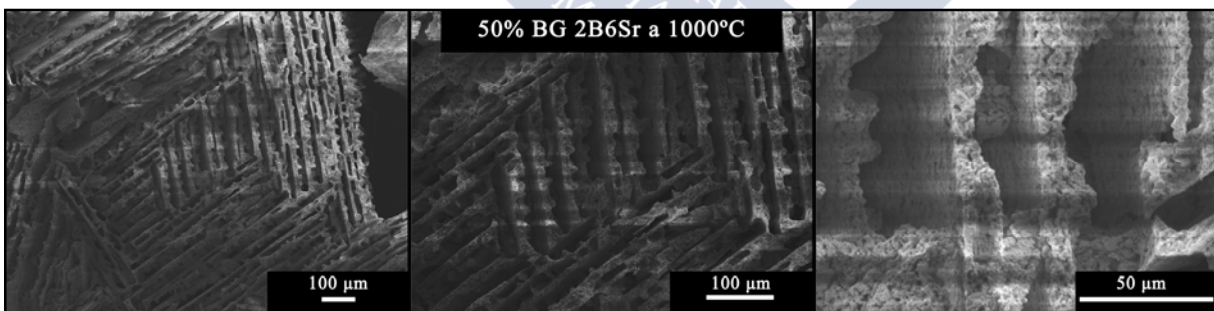


Fig. 9.24. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 2B6Sr y sinterizadas a una temperatura de 1000°C.

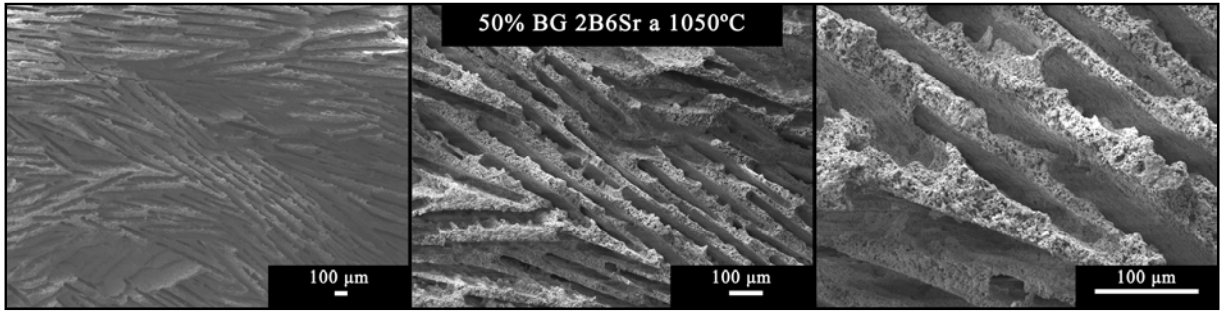


Fig. 9.25. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas con composición 50% BG 2B6Sr y sinterizadas a una temperatura de 1050°C.

En las imágenes que se observan en las figuras 8.23, 8.24 y 8.25 se puede identificar la estructura lamelar interna característica del proceso de conformación del *freeze casting*. En todos los casos se pueden observar canales bien formados y que no se encuentran bloqueados.

9.4. Resumen y discusión del capítulo.

A priori, la intención de este apartado era llevar a cabo un estudio exhaustivo de todos los materiales utilizados (Zeolitas ZSM-5, BG 1393B1, BG 2B6Sr) a diferentes composiciones con HA/ β -TCP, tal y como se había hecho previamente en el capítulo del vidrio bioactivo 1393. Sin embargo, estos experimentos se habrían dilatado demasiado en el tiempo, por lo que se decidió realizar, únicamente, el conformado de las piezas y pocas pruebas de caracterización física, las necesarias para determinar la viabilidad de la aplicación del proceso de *freeze casting* sobre otros diferentes materiales.

9.4.1. Piezas de HA/ β -TCP + ZSM-5.

Uno de los primeros objetivos que se marcaron en esta investigación era incorporar las zeolitas tipo ZSM-5 en las piezas destinadas a regeneración del tejido óseo. El gran área específica que presentan, junto con su habilidad como transportador molecular podría permitir utilizarlas como liberador sostenido de varios elementos, como podrían ser factores de crecimiento o moléculas de oxígeno que ayudarían a la supervivencia inicial de las células óseas que se establecieran en el tejido. El hecho de que las células no tengan alimento suficiente al inicio de la colonización celular es identificado por muchos autores como uno de los principales problemas para la regeneración del tejido [51, 93].

Con este objetivo, los primeros intentos se centraron en infiltrarlas en el medio de la estructura primaria de HA/ β -TCP, tal y como se llevó a cabo previamente con el BG 1393. Sería necesario estudiar las velocidades de disolución de las zeolitas, ya que tanto el HA como el β -TCP presentan velocidades muy bajas.

Para ello se llevo a cabo el análisis de dilatometría de la mezcla, que junto con los resultados obtenidos en Caracterización previa de las materias primas, muestra que las zeolitas pierden su característica superficie específica a partir de los 1000 °C. Para ello es necesario no alcanzar esta temperatura durante el tratamiento térmico, ya que ello conllevaría la capacidad de transportador molecular de las propias zeolitas. También el estudio de cambios de fase llevado a cabo a través de la difracción de rayos X demuestra que las zeolitas reaccionan con el HA, transformándose en otros compuestos diferentes, mientras que el β -TCP parece no reaccionar, más allá de su cambio en α -TCP a una temperatura próxima a 1180 °C, como se ha visto en los estudios anteriores.

El proceso de sinterización presentó múltiples contratiempos. La temperatura de 1000 °C no es suficiente para un proceso de sinterización de la mezcla ZSM-5 y HA/ β -TCP, tal y como se mostraba en la figura 9.3.

La siguiente aproximación al problema se centró en la adición de bentonita como aglutinante en la suspensión inicial de un proceso de *freeze casting*, tal y como se lleva a cabo en la bibliografía con un tipo diferente de zeolitas, las X13 [166]. Sin embargo, las piezas formadas por ZSM-5 y HA/ β -TCP con tratamientos térmicos a temperaturas menores de 1000 °C continuaban sin haber sido correctamente sinterizadas.

A continuación, se vuelve a la receta de aditivos poliméricos original y se decide añadir BG 1393 como tercer compuesto sólido de la suspensión que será conformada por medio de *freeze casting*. A través del proceso térmico, es muy probable que parte del BG 1393 se funda y que se solidifique con el enfriamiento de la pieza, de manera similar a un cemento entre las demás partículas cerámicas.

Las propiedades bioactivas de ambos compuestos no se perderían y a medida que el BG 1393 se fuera disolviendo más rápidamente que el HA/ β -TCP (tal y como han demostrado los resultados de la solubilidad en fluido corporal simulado obtenidos en los apartados anteriores), también se irían liberando las partículas de zeolitas que han quedado atrapadas con el fundición de parte del vidrio bioactivo. Tampoco se ha estudiado si el BG 1393 afectaría a la superficie específica de las zeolitas en el momento en el que se funde.

Para ello se formulan las 6 nuevas composiciones que se han estudiado y que muestran resultados diferentes.

Las imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica muestran que todas las diferentes mezclas presentan estructura lamelar interna formada a través del proceso de *freeze casting*. *A priori*, las mezclas 1, 2 y 6 no muestran un gran tamaño de poro y con posibles restos de BG 1393 fundido por las paredes internas. Por otro lado, las mezclas 3, 4 y 5 sí que podrían ser candidatas a ser utilizadas como piezas para la regeneración ósea. Sin embargo, para llevar a cabo las afirmación serían necesarios muchos otros estudios, como una caracterización del tamaño de estructuras más detallados, propiedades mecánicas o velocidades de disolución de las zeolitas y de los compuestos que llevaran en su interior.

Sin embargo, estos estudios se dilatarían mucho en el tiempo, por lo que esta parte de la investigación fue detenida en detrimento de otras líneas de investigación.

9.4.2. Piezas de HA/ β -TCP + BG 1393B1.

El vidrio bioactivo BG 1393B1 presenta unas características muy similares al BG 1393, con el que ya se han conformado piezas por *freeze casting* y caracterizado de diversas maneras previamente.

La diferencia es que el BG 1393B1 sustituye una tercera parte del contenido de SiO₂ del BG 1393 por B₂O₃ lo que, según diversos autores, favorece la formación del sistema vasculatorio en el interior de las piezas, uno de los mayores problemas que presentan diversas piezas diseñadas como sustitutos de tejido óseo [72, 162].

A pesar de que se produce una contracción del material BG 1393B1, el análisis de difracción de rayos X demuestra la estabilidad térmica de todos los materiales, mostrando únicamente resultados muy parecidos a los que hemos obtenido con el propio BG 1393. La aparición de nuevos picos está relacionada con pequeñas transformaciones que se producen en el β -TCP y que dan lugar a diferentes fosfatos cálcicos.

A raíz de las imágenes de la microestructura que se han obtenido se puede considerar que el proceso de *freeze casting* es válido para obtener piezas con una microestructura lamelar interna conformadas con BG 1393B1 y HA/ β -TCP. Estructura que, muy probablemente, sea apta para ser utilizada para la conformación de piezas destinadas a la regeneración del tejido óseo.

Sin embargo, al igual que ocurrió con la investigación de las zeolitas ZSM-5, se decidió invertir más tiempo en otras líneas de investigación. En este caso, también serían necesarios muchos más estudios para determinar la idoneidad de este tipo de piezas para ser utilizadas para regeneración de tejido óseo.

9.4.3. Piezas de HA/ β -TCP + BG 2B6Sr.

También se llevó a cabo un estudio sobre la posibilidad de realizar el proceso de Freeze Casting con este tipo de vidrio bioactivo. Este es un compuesto bastante reciente y puede presentar propiedades interesantes debido a la combinación de su actividad como vidrio bioactivo junto con la liberación de iones de estroncio y boro, que provocan un mayor desarrollo del sistema vascular a la vez que estimulan la diferenciación de los osteoblastos, respectivamente [30, 77, 79].

En los primeros análisis, realizados sobre el comportamiento de este material al ser tratado térmicamente, se puede comprobar que presenta un comportamiento similar a los vidrios bioactivos 1393 y 1393B1. Todos estos compuestos presentan una temperatura de fusión más baja que el HA/ β -TCP, con lo que su temperatura de sinterización será más baja.

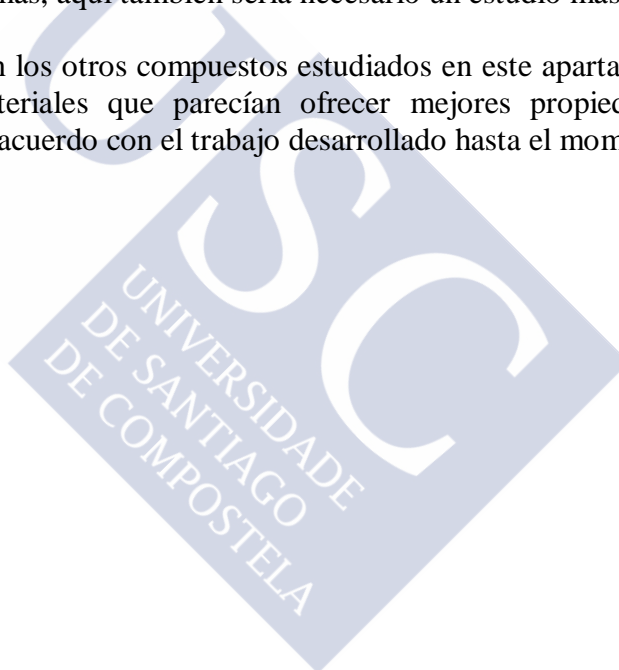
Por otro lado, el análisis de cambios de fase con la temperatura llevado a cabo a través de la difracción de rayos X muestra que este compuesto tiene suficiente estabilidad térmica y no cristaliza hasta, por lo menos, los 1200 °C, temperatura por encima de los procesos

térmicos llevados a cabo durante la presente investigación. El β -TCP presente se descompone en otros fosfatos cálcicos mientras que el HA presenta una mayor estabilidad térmica.

El proceso de *freeze casting* resultó exitoso para todas las diferentes concentraciones de BG 2B6Sr analizadas y el proceso térmico de sinterización aplicado a las piezas demostró una tendencia similar a los experimentos llevados a cabo con los vidrios bioactivos 1393 y 1393B1. A mayor concentración del vidrio bioactivo, más baja debe ser la temperatura de sinterización ya que, de lo contrario, toda la estructura obtenida a través del proceso de *freeze casting* puede colapsar y hacer que las piezas no sean útiles para la regeneración de tejidos óseos. Para poder determinar con precisión las temperaturas de sinterización de cada una de las diferentes composiciones de BG 2B6Sr sería necesario un estudio mucho más exhaustivo, que debería ser completado con datos de propiedades mecánicas y del tamaño de los canales obtenidos.

Por otro lado, las imágenes de la microestructura interna obtenidas a través de SEM muestran que todas las piezas analizadas muestran, a priori, una buena estructura lamelar para regenerar tejido óseo. Una vez más, aquí también sería necesario un estudio más detallado.

Al igual que ocurrió con los otros compuestos estudiados en este apartado, se decidió centrar el estudio en los materiales que parecían ofrecer mejores propiedades para la regeneración de tejido óseo, de acuerdo con el trabajo desarrollado hasta el momento.



10. Estudio de la conformación de piezas de composite BG 45S5 y seda.

En el presente apartado se realizarán piezas para la regeneración ósea conformados de el vidrio bioactivo BG 45S5 y de fibroína de seda disuelta en la suspensión inicial del proceso de *freeze casting*. Las piezas serán posteriormente caracterizadas física, química y biológicamente.

10.1. Conformado.

A diferencia de los apartados anteriores, las piezas que se conformarán por medio de BG 45S5 y seda no necesitan un tratamiento térmico después de la conformación. Por ello, no es necesario estudiar dicho proceso térmico y se inicia directamente el apartado del conformado de las piezas.

10.1.1. Preparación de las disoluciones.

El proceso de disolución de la seda se encuentra descrito de una manera más detallada en el apartado de Métodos experimentales.

Para obtener la disolución de seda se cortaron en pequeños trozos varios capullos de seda que, en total suman una masa de 10 gramos. Dichos capullos son tratados con una disolución Na_2CO_3 de concentración 0,02M, que elimina la sericina de la seda y mantiene únicamente la fibroína. Después de secarse se obtiene un total de una masa de 6,62 gramos. Tal y como se ha descrito en el apartado de Métodos experimentales, sobre esta cantidad de seda se vierten 66,20 ml de disolución 9,3M de LiBr y comienza el proceso de disolución de la seda. Se continua con el proceso de ósmosis y finalmente se obtiene la primera disolución acuosa de seda.

Se separan 42 g de esta disolución inicial que, más adelante, serán mezclados con el vidrio bioactivo 45S5. También se toman tres pequeñas alícuotas de esta primera disolución para determinar la concentración de seda y la cantidad restante se concentra por medio de diálisis en PEG 10.000.

Una vez realizada esta primera concentración de la seda, de la disolución obtenida, se retiran nuevamente 42 g y otras tres pequeñas alícuotas para determinar la concentración de la seda en esta segunda disolución y se procede de nuevo a concentrar la cantidad restante.

Finalizado el segundo proceso de concentración de la seda, se toman de nuevo tres muestras para determinar la cantidad de seda presente y 42 g para mezclar con BG 45S5. De esta manera hemos obtenido tres disoluciones de 42 g cada una con concentraciones diferentes de seda, cuyas concentraciones han sido determinadas:

Tabla 10.1. Pesos y concentraciones obtenidos para la Disolución de Seda n° 1.

Peso Alícuota (g)	Peso después de evaporar el agua (g)	Concentración de la seda en la disolución (peso)
0,9795	0,0385	3,83%
0,8377	0,0331	3,95%
0,8761	0,0344	3,93%
Media Dis. 1		3,90%

Tabla 10.2. Pesos y concentraciones obtenidos para la Disolución de Seda n° 2.

Peso Alícuota (g)	Peso después de evaporar el agua (g)	Concentración de la seda en la disolución (peso)
0,4587	0,0207	4,51%
0,9468	0,0404	4,27%
0,6286	0,0259	4,12%
Media Dis. 2		4,30%

Tabla 10.3. Pesos y concentraciones obtenidos para la Disolución de Seda n° 3.

Peso Alícuota (g)	Peso después de evaporar el agua (g)	Concentración de la seda en la disolución (peso)
0,6773	0,0391	5,77%
0,6708	0,0376	5,61%
0,7957	0,0447	5,62%
Media Dis. 3		5,67%

De esta manera se han producido tres disoluciones diferentes con una concentración de seda en cada una de ellas de 3,90%, 4,30% y 5,67% en peso, las cuales se mezclan con las correspondientes cantidades de vidrio bioactivo 45S5. Cada una de estas disoluciones es nombrada como Disolución 1 (Dis. 1), Disolución 2 (Dis. 2) y Disolución 3 (Dis. 3), respectivamente.

Para poder estudiar el efecto que produce la cantidad de BG 45S5 en las piezas, a cada una de las tres disoluciones de seda se les añade tres diferentes cantidades de vidrio bioactivo para así obtener tres contenidos sólidos en tres diferentes disoluciones: del 15%, 20% y 25% de contenido sólido. Esto da un total de nueve disoluciones diferentes, que se denominan en función de la concentración de seda en la disolución inicial y por el contenido sólido inicial de cada una.

Partiendo de los 42 g de cada una de las disoluciones de seda, este volumen se divide en tres partes iguales de 14 g, que serán la base de cada disolución para realizar el *freeze casting*. A estas disoluciones también se les añaden las mismas cantidades de lubricante (1% del peso cerámico total, utilizando PEG 300), dispersante (1% del contenido cerámico total, usando Darvan CN) y aglutinante (5% del peso cerámico total, Aquazol 50 al 40% en peso). Las cantidades de BG 45S5 y de los diferentes

aditivos poliméricos añadidos para crear cada una de las nueve diferentes suspensiones creadas vienen recogidas en las tablas 10.4, 10.5 y 10.6.

Tabla 10.4. Pesos de cada uno de los compuestos utilizados para realizar el Freeze Casting con la disolución de seda nº 1 (3,90%) y diferentes concentraciones de sólido.

Contenido Sólido	Disolución de seda (g)	Lubricante (g)	Dipersante (g)	Aglutinante (g)	BG 45S5(g)	Denotación
15%	14	0,07	0,07	0,35	6,90	Dis. 1 15%
20%	14	0,10	0,10	0,50	9,92	Dis. 1 20%
25%	14	0,13	0,13	0,67	13,45	Dis. 1 25%

Tabla 10.5. Pesos de cada uno de los compuestos utilizados para realizar el Freeze Casting con la disolución de seda nº 2 (4,60%) y diferentes concentraciones de sólido.

Contenido Sólido	Disolución de seda (g)	Lubricante (g)	Dipersante (g)	Aglutinante (g)	BG 45S5(g)	Denotación
15%	14	0,07	0,07	0,35	6,90	Dis. 2 15%
20%	14	0,10	0,10	0,50	9,92	Dis. 2 20%
25%	14	0,13	0,13	0,67	13,45	Dis. 2 25%

Tabla 10.6. Pesos de cada uno de los compuestos utilizados para realizar el Freeze Casting con la disolución de seda nº 3 (5,67%) y diferentes concentraciones de sólido.

Contenido Sólido	Disolución de seda (g)	Lubricante (g)	Dipersante (g)	Aglutinante (g)	BG 45S5(g)	Denotación
15%	14	0,07	0,07	0,35	6,90	Dis. 3 15%
20%	14	0,10	0,10	0,50	9,92	Dis. 3 20%
25%	14	0,13	0,13	0,67	13,45	Dis. 3 25%

Una vez determinadas las cantidades de cada uno de los compuestos de la suspensión, éstos se añadieron de uno en uno en un contenedor plástico en donde ya se encontraba la disolución de seda. El orden de adición de los compuestos siempre fue lubricante, dispersante, aglutinante y, finalmente, la cantidad determinada de BG 45S5. También se añadieron tres cilindros de zircona en el interior del bote plástico para actuar como mezcladores.

Los recipientes plásticos fueron colocados en continua rotación durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo, las disoluciones estaban listas para ser procesadas a través del *freeze casting*.

10.1.2. Freeze casting.

Antes de comenzar el proceso de *freeze casting* en sí, las suspensiones son puestas en un baño de hielo a enfriar. A pesar de que las suspensiones anteriores eran sometidas al vacío para eliminar posibles burbujas del seno de la suspensión, en la suspensión con seda ocurría un fenómeno diferente. La suspensión comenzaba a formar

demasiadas burbujas en el momento en el que el vacío era aplicado y no servía para eliminar restos de aire.

Una vez enfriada la suspensión, se inició el proceso de *freeze casting* normalmente. Una vez terminado el proceso, las piezas eran colocadas en muy bajas temperaturas y presiones durante 72 horas para sublimar el hielo formado.

El siguiente paso es el reticulado de la seda que se encuentra en el interior de las piezas.

10.1.3. Reticulación de la seda.

La disolución que produce la reacción de la polimerización de la fibroína de la seda fue preparada tal y como se describe en Metodos experimentales.

Se prepara suficiente cantidad de disolución para llevar a cabo la reticulación como para sumergir por completo las piezas de vidrio bioactivo 45S5 y seda que se han obtenido después del proceso de *freeze casting*.

Las piezas se sumergen en la disolución durante 15 minutos. Durante este tiempo, se aplica un ligero vacío para intentar eliminar las burbujas de aire del interior de la estructura interna de las piezas y permitir así que la disolución reticuladora entre en todos los poros de los cilindros.

Una vez que ha transcurrido el tiempo de la reacción, las piezas son retiradas de la disolución reticuladora y son lavadas con etanol, primero, y con agua ultrapura posteriormente. Seguidamente las piezas son secadas en una estufa a 60 °C durante 24 horas.

La imagen externa de todas las piezas obtenidas es bastante similar, tal y como se muestra en la figura 10.1.



Fig. 10.1. Piezas cilíndricas obtenidas después de los procesos de Freeze Casting y reticulación de la seda. Debajo de cada pieza aparece su denominación, porcentaje de BG 45S5, porcentaje de seda y porosidad de la pieza.

10.2. Caracterización fisicoquímica.

Después de llevar a cabo la conformación de los materiales por medio de los procesos de *freeze casting* y de reticulación de la seda los en el interior de las piezas, éstas se encuentran listas para ser investigadas y caracterizadas en detalle. Los primeros estudios que se realizan sobre dichas piezas son las propiedades físicas y químicas que presentan.

10.2.1. Propiedades mecánicas.

Los cilindros que se obtuvieron del proceso de *freeze casting* y que fueron reticulados posteriormente, fueron cortados en discos para analizar sus propiedades mecánicas a la compresión, de la manera en que se describió en el apartado de Métodos experimentales.

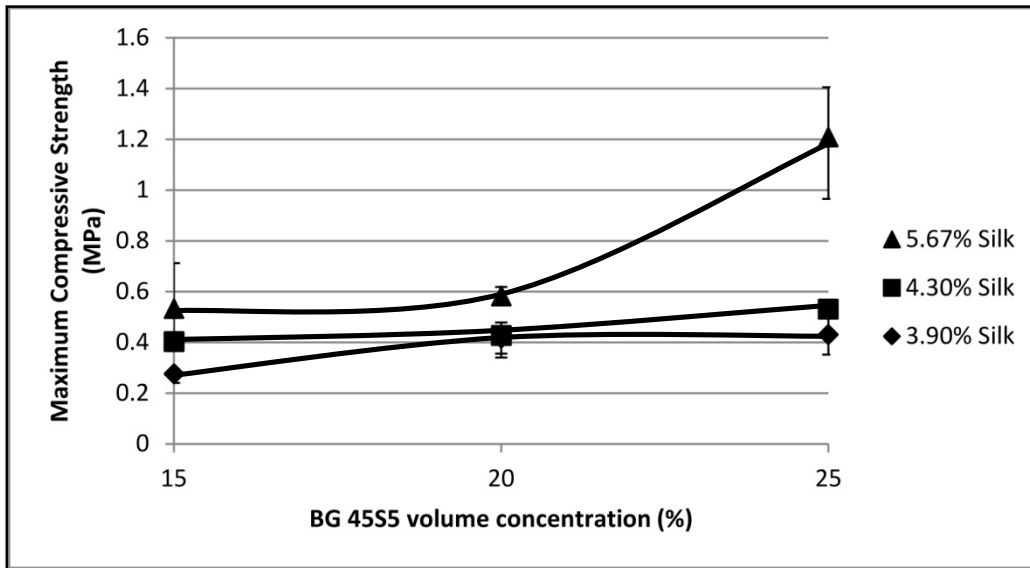


Fig. 10.2. Propiedades mecánicas obtenidas para cada uno de las 9 diferentes piezas creadas, con diferentes concentraciones de BG 45S5 y seda.

La figura 10.2 muestra que, en las piezas analizadas, cuanto mayor es el contenido de BG 45S5, también la resistencia mecánica a la compresión es ligeramente mayor. También cuanto más alto es el contenido de seda en las piezas, éstas también poseen una mayor resistencia mecánica a la compresión, en este caso con un efecto mayor que el aumento del contenido de BG 45S5.

10.2.2. Imágenes SEM: Determinación de la microestructura.

Se procede al estudio de la microestructura interna de todas las piezas obtenidas a través de microscopía electrónica. De la misma manera que se llevó a cabo previamente con otras piezas obtenidas a través del proceso de Freeze Casting, los cilindros obtenidos fueron cortados en discos, pulidos y recubiertos de una fina capa de oro para ser analizados a través de un microscopio electrónico de barrido. Las imágenes obtenidas de este estudio se muestran en las siguientes figuras.

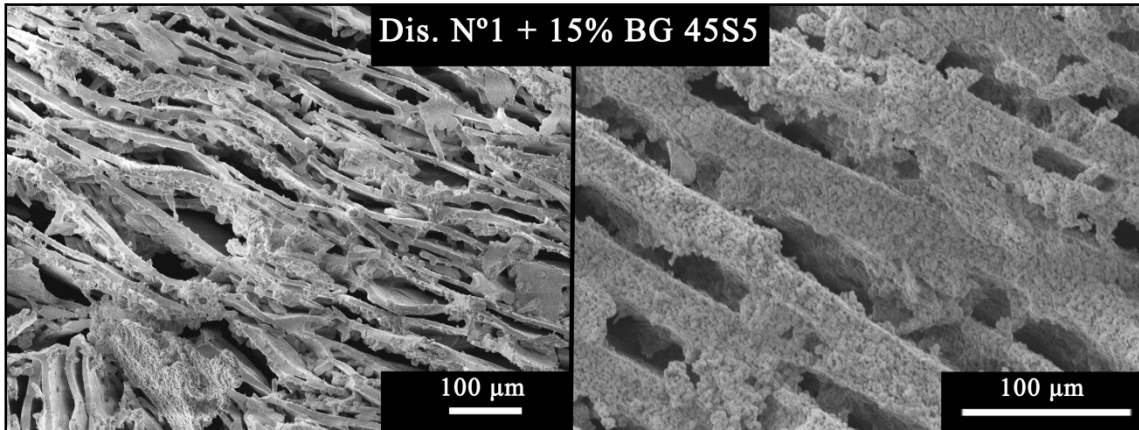


Fig. 10.3. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 1 (3,90%) y un 15% de BG 45S5.

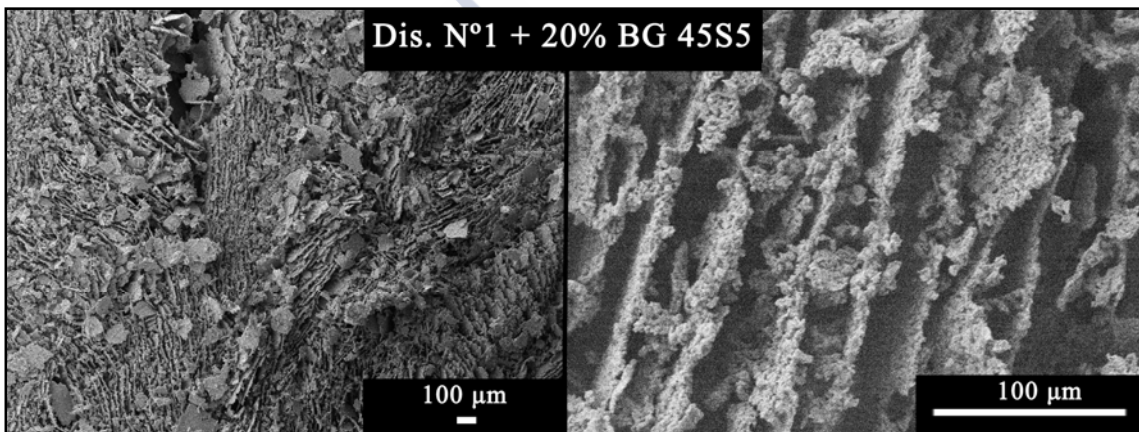


Fig. 10.4. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 1 (3,90%) y un 20% de BG 45S5.

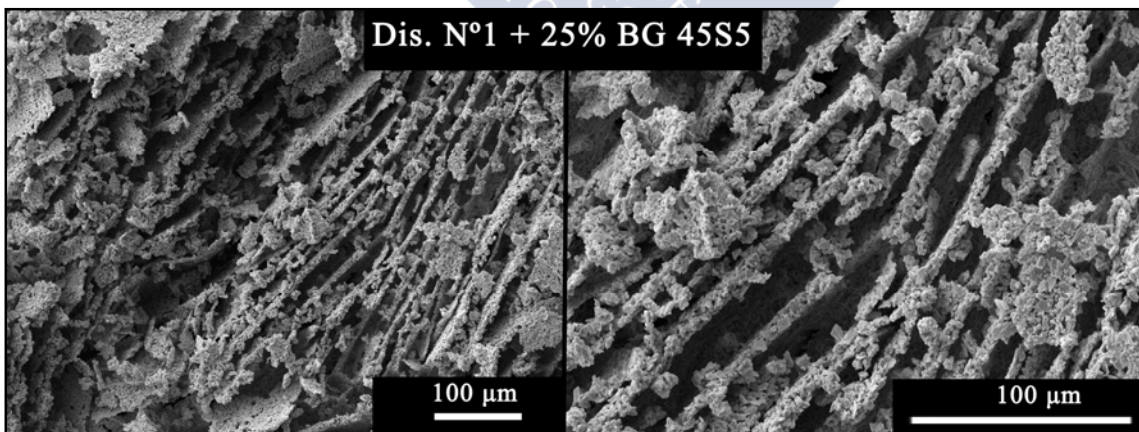


Fig. 10.5. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 1 (3,90%) y un 25% de BG 45S5.

Las figuras 10.3, 10.4 y 10.5 muestran la microestructura interna de las piezas conformadas a partir de la Disolución número 1 con un contenido de 15%, 20% y 25% de BG 45S5, respectivamente. Todas las piezas obtenidas muestran la estructura interna lamelar característica del proceso de *freeze casting*.

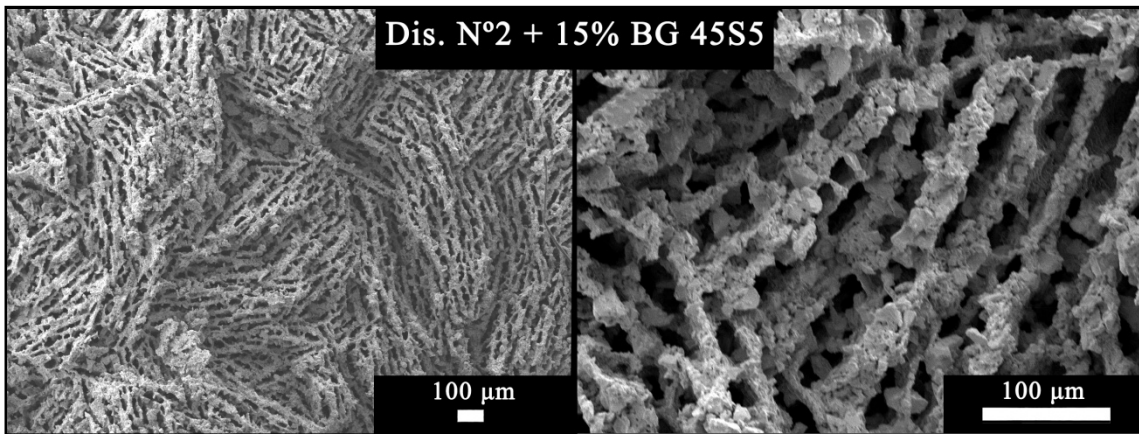


Fig. 10.6. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 2 (4,30%) y un 15% de BG 45S5.

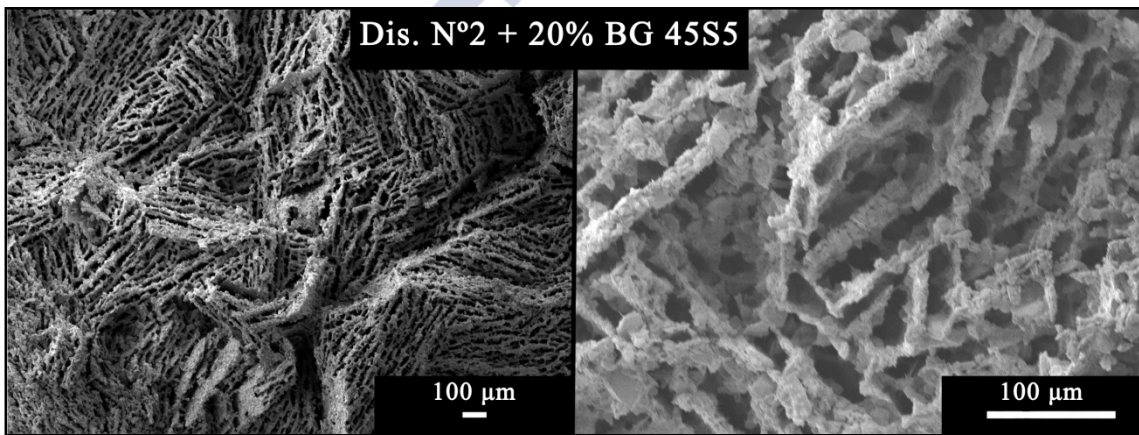


Fig. 10.7. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 2 (4,30%) y un 20% de BG 45S5.

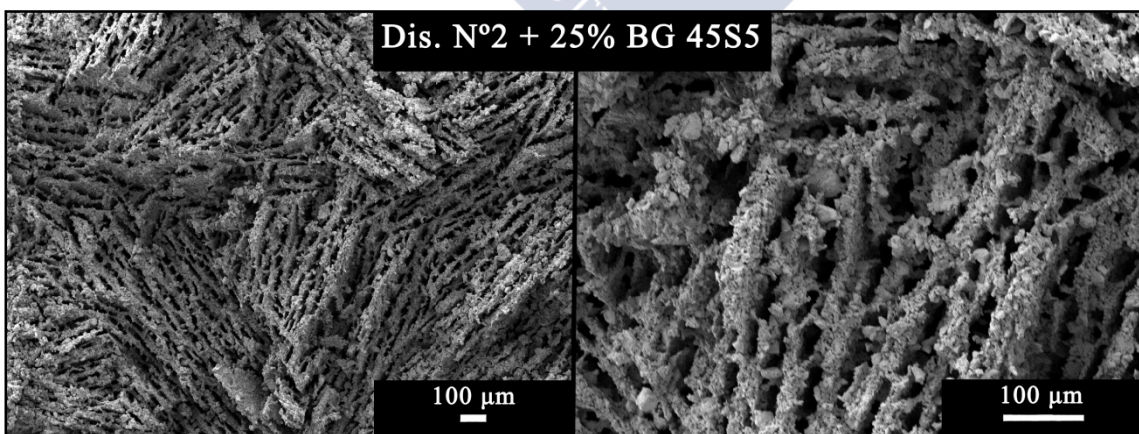


Fig. 10.8. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 2 (4,30%) y un 25% de BG 45S5.

En las imágenes previas se mostraban las figuras 10.6, 10.7 y 10.8 en las que se puede apreciar la microestructura que resulta de la Disolución número 2 al ser mezclada

con un 15%, 20% y 25% de BG 45S5, respectivamente. Todas estas piezas también poseen la típica microestructura que se obtiene a través del proceso de *freeze casting*.

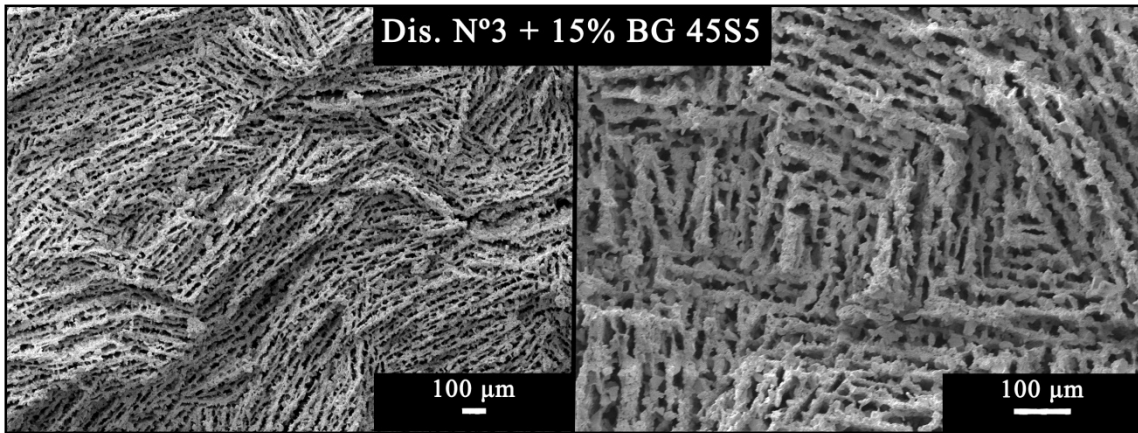


Fig. 10.9. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 3 (5,67%) y un 15% de BG 45S5.

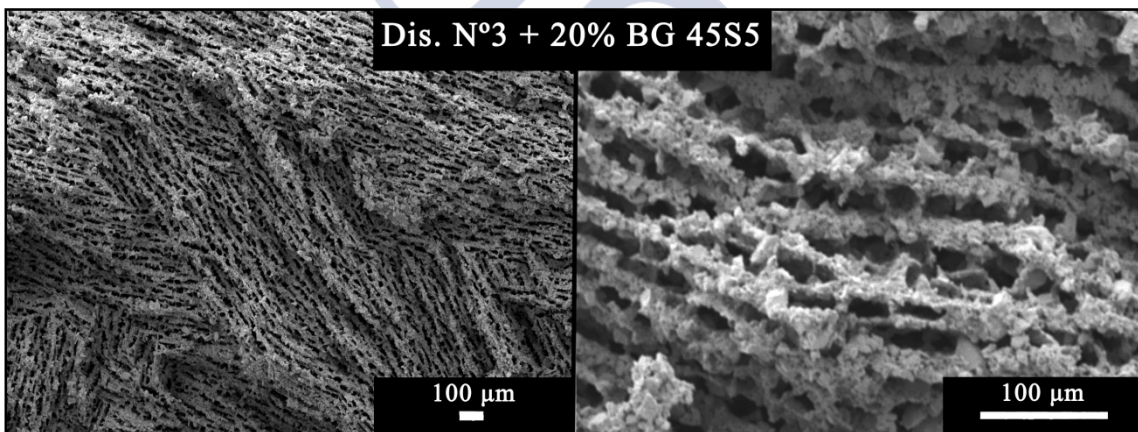


Fig. 10.10. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 3 (5,67%) y un 20% de BG 45S5.

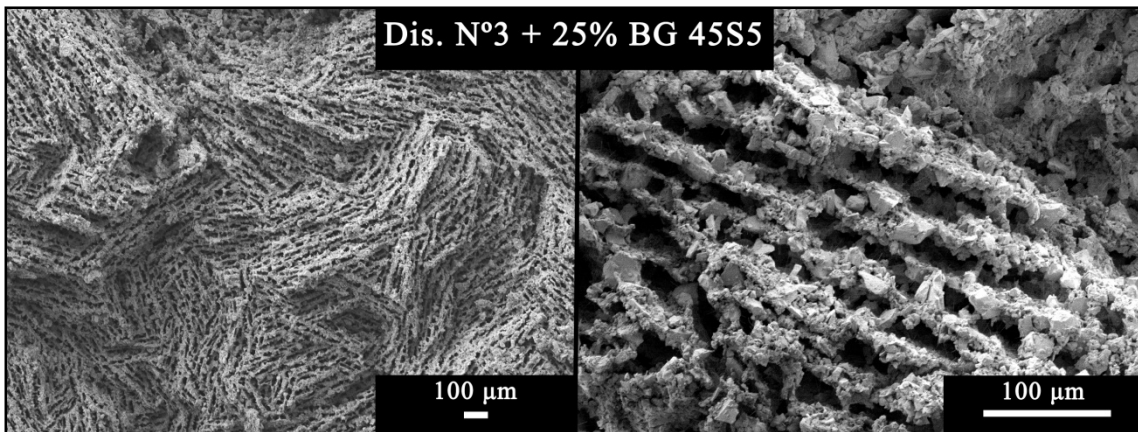


Fig. 10.11. Imágenes SEM de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 3 (5,67%) y un 25% de BG 45S5.

Por último, en las figuras 10.9, 10.10 y 10.11 se muestran las piezas conformadas a partir de la Disolución número 3, la de mayor contenido en seda de todas las estudiadas en este estudio, mezclada con un 15%, 20% y 25% de BG 45S5. Al igual que ocurrió con las anteriores piezas de BG 45S5 y seda estudiadas a través del microscopio electrónico, todas estas figuras muestran una marcada estructura interna de tipo lamelar, que podría ser utilizada para la regeneración de tejido óseo.

Además, en la imagen de la derecha de la figura 10.11 se pueden apreciar pequeñas fibras o hilos que sobresalen de la estructura sólida primaria. Dicha imagen es ampliada en la figura 10.12 para poder apreciar con más detalle estas pequeñas fibras que son identificadas con la seda que había sido disuelta en la suspensión inicial y que, posteriormente, fue reticulada.

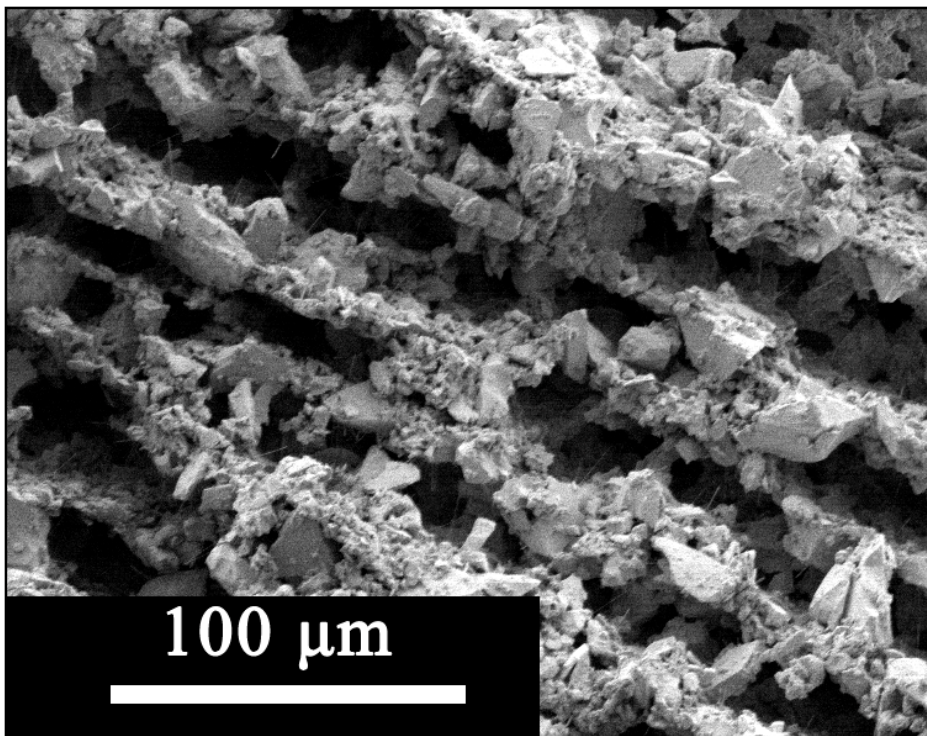


Fig. 10.12. Imágenes SEM en detalle de la microestructura interna de las piezas realizadas con la disolución de seda número 3 (5,67%) y un 25% de BG 45S5.

10.2.3. Determinación del contenido de seda y BG 45S5.

A partir de los datos de concentración de seda en la disolución inicial, así como la cantidad de BG 45S5 que se añadió a cada una de ellas, se puede obtener el porcentaje de cada pieza que corresponde con seda y el porcentaje que corresponde con BG 45S5 en peso. La tabla 10.7 que se muestra a continuación muestra el porcentaje en volumen que corresponde con el vidrio bioactivo 45S5.

Tabla 10.7. Porcentaje de volumen de vidrio bioactivo en cada una de las piezas creadas.
El resto del porcentaje hasta el 100% corresponde con contenido de seda.

		Contenido sólido inicial (BG 45S5)		
		15%	20%	25%
Concentración de seda en la disolución inicial	3.90%	84.94%	89.02%	91.66%
	4.30%	83.65%	88.03%	90.89%
	5.67%	79.51%	84.80%	88.32%

10.2.4. Porosidad.

Partiendo de los datos de las medidas de las piezas obtenidas, su peso y el porcentaje de cada una de ellas que corresponde a la seda y al BG 45S5 se puede obtener la porosidad de las piezas por medio del método de Arquímedes.

Las mediciones de la porosidad de todas las piezas obtenidas a través de mezclar la disolución de seda con el BG 45S5 ha dado como resultado los valores que se muestran en la tabla 10.8:

Tabla 10.8. Valores de porosidad obtenidos para cada una de las piezas creadas con diferentes contenidos de seda y de BG 45S5.

		Contenido sólido inicial (BG 45S5)		
		15%	20%	25%
Concentración de seda en la disolución inicial	3.90%	$72.79 \pm 0.45\%$	$70.86 \pm 0.19\%$	$69.16 \pm 0.30\%$
	4.30%	$73.22 \pm 0.22\%$	$71.24 \pm 0.67\%$	$69.42 \pm 0.12\%$
	5.67%	$73.38 \pm 0.14\%$	$71.42 \pm 0.23\%$	$69.58 \pm 0.96\%$

Los resultados obtenidos del análisis de porosidad muestra que a mayor contenido sólido inicial, menor es el valor de la porosidad. Por otro lado, un mayor valor de la concentración de seda en la disolución inicial otorga una mayor porosidad a las piezas, aunque aumenta en valores muy pequeños.

Con estos resultados se puede construir la siguiente tabla 10.9 en la que se resumen las propiedades físicas estudiadas de cada uno de las piezas obtenidas a través de todo el proceso de conformación.

Tabla 10.9. Valores de propiedades físicas obtenidos para cada una de las piezas creadas con diferentes contenidos de seda y de BG 45S5.

Disolución de seda	Disolución 1			Disolución 2			Disolución 3		
	15%	20%	25%	15%	20%	25%	15%	20%	25%
Contenido sólido inicial									
Máxima resistencia a compresión (MPa)	0,28 ± 0,04	0,42 ± 0,08	0,43 ± 0,10	0,40 ± 0,04	0,43 ± 0,07	0,53 ± 0,11	0,53 ± 0,18	0,58 ± 0,04	1,21 ± 0,20
Porosidad	72,79 ± 0,45%	70,86 ± 0,19%	69,16 ± 0,30%	73,22 ± 0,22%	71,24 ± 0,67%	69,42 ± 0,12%	73,38 ± 0,14%	71,42 ± 0,23%	69,58 ± 0,96%
Porcentaje de BG 45S5	84,94 %	89,02 %	91,66 %	83,65 %	88,03 %	90,89 %	79,51 %	84,80 %	88,32 %

10.2.5. Solubilidad en suero fisiológico simulado estático.

Al igual que se ha hecho anteriormente, se evalúa la solubilidad de las piezas obtenidas por medio de su inmersión en suero fisiológico simulado a temperatura corporal por diferentes periodos de tiempo de una manera estática (el suero no se encuentra en movimiento ni es renovado durante dicho periodo de tiempo).

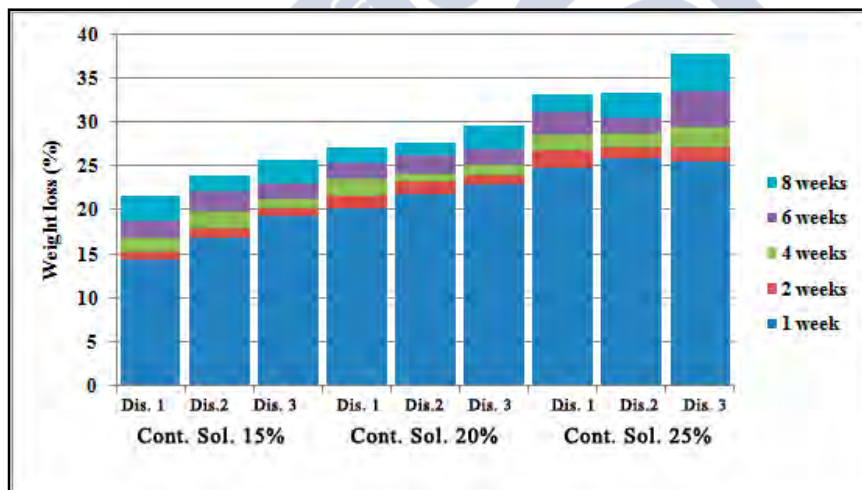


Fig. 10.13. Evolución de la pérdida de peso de las diferentes piezas creadas a partir de seda y BG 45S5 a 1, 2, 4, 6 y 8 semanas.

Los resultados obtenidos muestran que, por un lado, a mayores valores de contenido sólido en las disoluciones iniciales, mayor es el porcentaje de material disuelto en el suero fisiológico simulado. Y por otro lado, que a mayores valores de concentración de seda, también se produce un mayor porcentaje de disolución del material.

10.3. Caracterización biológica.

Una vez que las piezas han sido caracterizadas física y químicamente, las mismas piezas van a ser caracterizadas desde un punto de vista biológico. Primero se realizarán pruebas *in vitro* y posteriormente se llevará a cabo un estudio *in vivo* de una de estas piezas.

10.3.1. Pruebas *in vitro*.

Las pruebas *in vitro* llevadas a cabo analizan el comportamiento de las células en un medio de cultivo en el laboratorio.

10.3.1.1. Interleucina-6.

La Interleucina-6 sirve para medir la inflamación que el tejido experimenta por efecto del material que es implantado. Las pruebas de Interleucina-6 han sido llevadas a cabo a 1, 2, 5 y 10 días para cuatro tipos diferentes de piezas obtenidas con seda y BG 45S5 en comparación con las piezas de HA/ β -TCP que fueron creadas en apartados anteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.14.

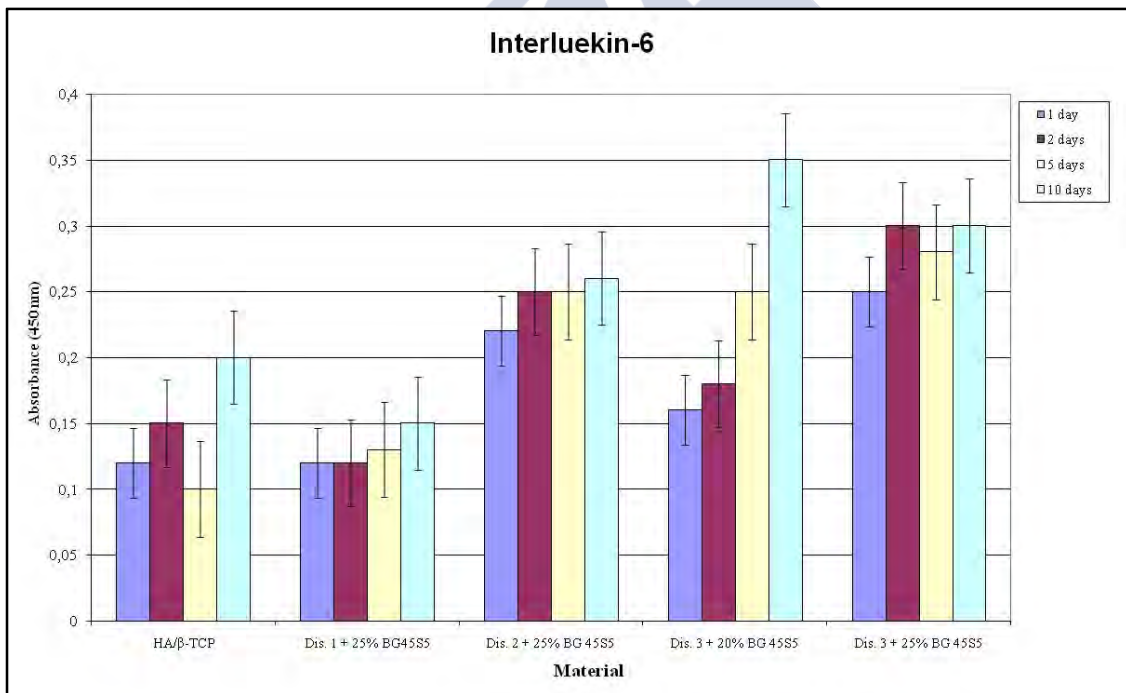


Fig. 10.14. Valores de IL-6 para piezas de HA/ β -TCP (izquierda) y para diferentes piezas de BG 45S5 y seda: (de izquierda a derecha) Disolución 1 con un 25% de contenido sólido inicial; Disolución 2 con un 25% de contenido sólido inicial; Disolución 3 con un 20% de contenido sólido inicial; Disolución 3 con un 25% de contenido sólido inicial.

Los resultados obtenidos para las piezas creadas a partir de seda y BG 45S5 muestran valores que aumentan al aumentar la concentración de seda en las piezas y al aumentar el contenido de BG 45S5.

10.3.1.2. MTT.

Los estudios MTT miden la proliferación de células mesenquimales humanas en el material a estudiar. Para tener un material de referencia, también en este estudio se han tomado las piezas conformadas con HA/ β -TCP. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 10.15.

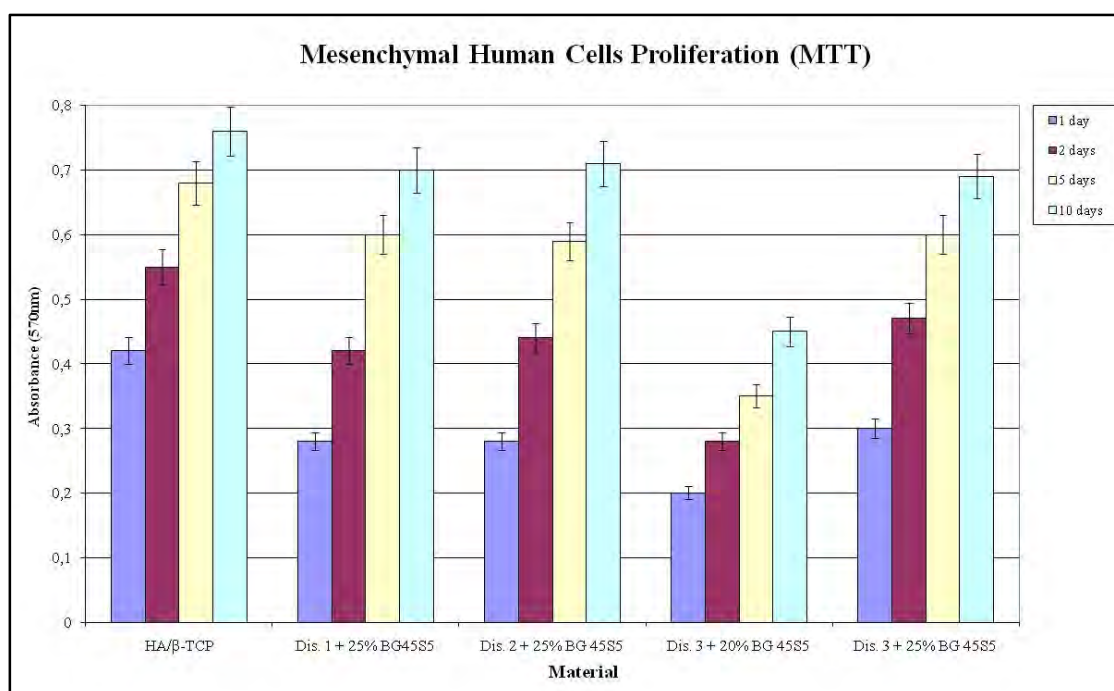


Fig. 10.15. Valores de MTT para piezas de HA/ β -TCP (izquierda) y para diferentes piezas de BG 45S5 y seda: (de izquierda a derecha) Disolución 1 con un 25% de contenido sólido inicial; Disolución 2 con un 25% de contenido sólido inicial; Disolución 3 con un 20% de contenido sólido inicial; Disolución 3 con un 25% de contenido sólido inicial.

Los resultados obtenidos del estudio de la proliferación de células en las diferentes piezas conformadas por seda y BG 45S5 muestran resultados bastante parecidos para todas ellas, aunque los resultados son ligeramente mayores para las piezas de HA/ β -TCP que para las piezas estudiadas en este apartado.

10.3.2. Pruebas *in vivo*.

Las piezas obtenidas a través del *freeze casting* son estudiadas por medio de la experimentación *in vivo* en un conejo. En los siguientes apartados se describe los resultados obtenidos.

10.3.2.1. Operación a conejo.

La operación al conejo se realizó tal y como se establece en el apartado de Métodos experimentales.

Se procede a la implantación de dos piezas en forma de disco, de 6,3 mm de diámetro y 4 mm de alto. Dichos discos han sido obtenidos a partir del cilindro creado con la disolución número 3 con un 25% de contenido sólido inicial. El peso del animal en ese momento era de 2 kg.

La intervención se desarrolló sin mayores complicaciones aunque cabe destacar que en el momento de la implantación de las piezas en los huecos que previamente se habían practicado en el cráneo del animal, éstas, al instante de ser colocadas, absorbieron una gran cantidad de sangre, tiñéndose completamente de rojo.



Fig. 10.16. Fotografía de la inyección bajo la dermis del animal de epinefrina, que actúa como anestésico local.

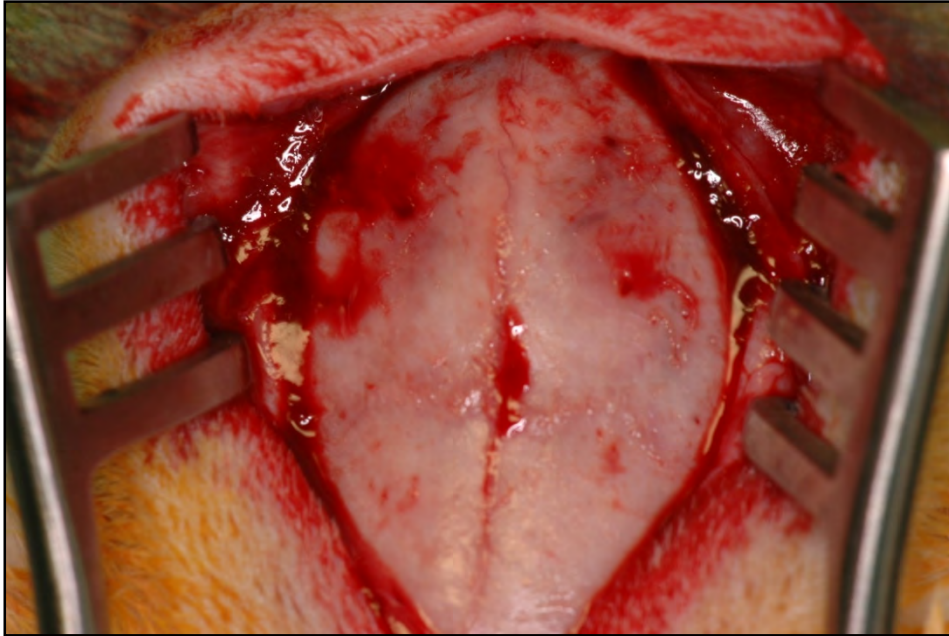


Fig. 10.17. Fotografía de la disección de la piel y el periostio en la cabeza del conejo y que deja el cráneo a la vista.



Fig. 10.18. Fotografía del proceso de trepanación del cráneo del animal. Los agujeros que se realizan serán rellenados con los discos de las piezas.

El animal se recobró satisfactoriamente de la operación y a los pocos días ya se encontraba completamente recuperado. Durante 10 semanas el animal fue alimentado y cuidado sin mayores incidencias. Cabe destacar que, en comparación con otros animales en los que se experimentaron otros materiales, el conejo del presente estudio mostró una cicatrización y un crecimiento de vello en el lugar en donde se produjo la intervención visiblemente superior a los animales de los otros estudios.

10.3.2.2. Radiografía de rayos X.

Una vez que el animal ha sido sacrificado se le extrae el cráneo y se sumerge en formol para su conservación. Dicho cráneo ha de ser cortado para estudiar el lugar en el que se colocaron las piezas y el tejido que se encuentra a su alrededor. Para ello, se obtiene una imagen de rayos X del cráneo en el que se han insertado dos agujas metálicas como localizadoras del lugar por el que se deben realizar los cortes.

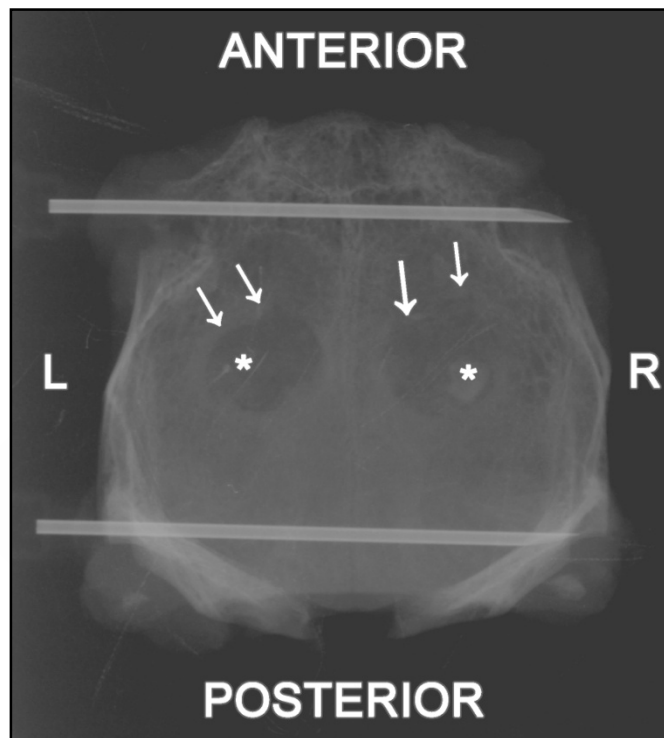


Fig. 10.19. Radiografía de los implantes en el cráneo de conejo con dos agujas como marcadores de posición.

La imagen de rayos X muestra la corona-basal de la bóveda craneal del animal en el que se han realizado dos trepanaciones completas de diámetro subcrítico en ambos parietales. Se puede observar el límite borroso e irregular de las cavidades, que parece mejor delimitado en el defecto izquierdo. En ambos se observa la aparición de nuevo tejido óseo (flechas), además de fragmentos radiodensos residuales de las piezas de BG 45S5 y seda implantadas previamente.

Teniendo esta imagen en cuenta se procede al corte de la pieza para la infiltración de alcohol primero (desplazando al agua contenida en el interior de las células) y la posterior infiltración de la resina, que en el siguiente paso será polimerizada, cortada, pulida y teñida tal y como se describe en el apartado de Métodos experimentales.

10.3.2.3. Análisis histológico.

Finalmente, se procede al análisis histológico de las láminas obtenidas por medio de microscopía óptica. La figura 10.20 realizada a bajo aumento, muestra un corte longitudinal por su diámetro de uno de las trepanaciones que se hicieron al animal. En la parte superior de la imagen se puede observar el periostio superficial (marcado en la imagen como P) de la tabla externa (TE) que presenta algunas soluciones de continuidad (flechas) debido a su formación incompleta, al igual que tampoco hay una restitución completa de la tabla interna (TI). Adherido a la tabla interna se aprecian los restos de las muestras implantadas, inmersos en una matriz de hueso plexiforme de forma y bordes irregulares que se adentra en el interior de la cavidad craneal (M). Esta formación ósea presenta espacios medulares (BM). La formación ósea relacionada con la presencia del material es tan relevante que incluso se aprecian islas óseas ya formadas en relación con material aislado (IO).

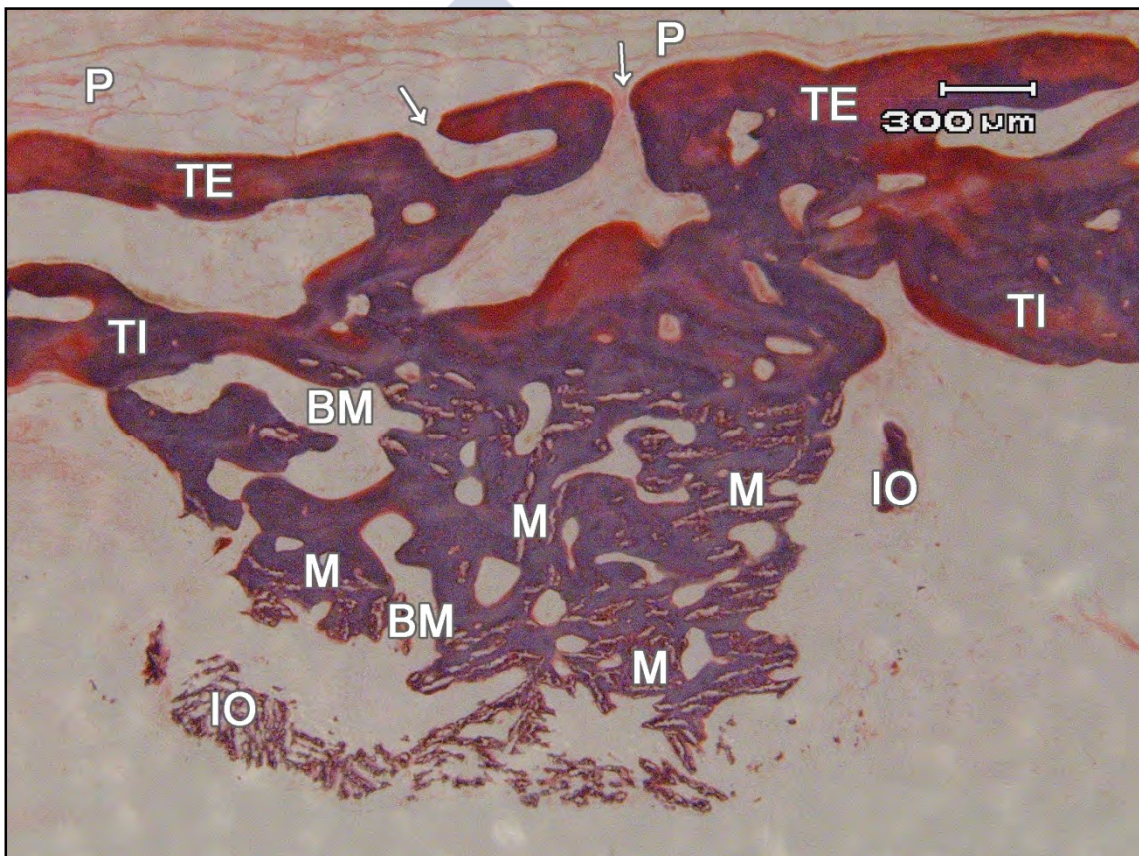


Fig. 10.20. Imagen con detalle aumentado del análisis histológico de los implantes colocados al animal durante un periodo de 10 semanas. La barra superior se corresponde con una longitud de 300 μm . P: Periostio. TE: Tabla externa. TI: Tabla interna. M: Cavidad craneal. BM: Espacios medulares. IO: Islas óseas. Flechas: Soluciones de continuidad.

La figura 10.21 muestra en detalle el hueso neoforado en relación con los implantes. En la parte inferior de la imagen se puede observar una mayor cantidad de las estructuras lamelares del material implantado que permanecieron en las trepanaciones realizadas al animal. Estos restos del material se encuentran casi completamente

reabsorbido (MT) y totalmente rodeados por trabéculas de matriz de hueso neoformado (NB). En la parte superior de la figura la cantidad de hueso neoformado es mayor y menor la cantidad de estructuras residuales de las piezas implantados (MT). También se puede observar que el hueso neoformado es plexiforme y con abundantes espacios vasculares (VS) en los que se aprecia la presencia de concreciones de mineral proveniente del material implantado (flechas). No se observan signos de inflamación ni de secuestro en el entorno del material. La matriz óseo neoformada presenta lagunas osteocitarias en disposición aleatoria.

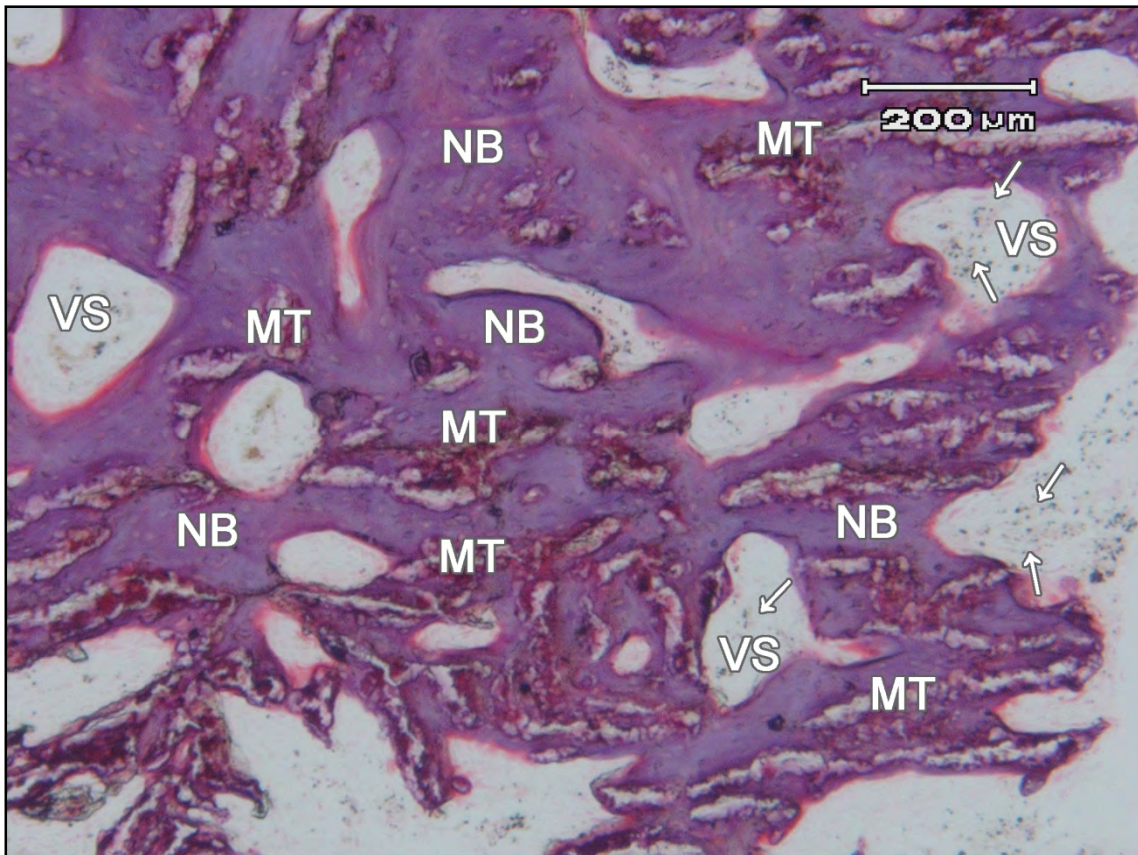


Fig. 10.21. Imagen con detalle aumentado del análisis histológico de los implantes colocados al animal durante un periodo de 10 semanas. La barra superior se corresponde con una longitud de 200 μm .

MT: Restos del material. NB: Hueso neoformado. VS: Espacios vasculares.

Flechas: Concreciones de mineral proveniente del material implantado.

Por último, la figura 10.22 es un detalle aumentado de la interfase entre los restos del material (F) y el hueso neoformado (NB). La matriz de hueso parece comenzar a desarrollarse en el contacto estrecho con el material, formando esa interfase dentada (IF) a partir de osteocitos que se ven rodeados por matriz ósea (flecha). En los espacios vasculares de la medula inmadura (VS) se observan acumulaciones granulares del material implantado en el interior de las células del sistema retículo endotelial (GM).

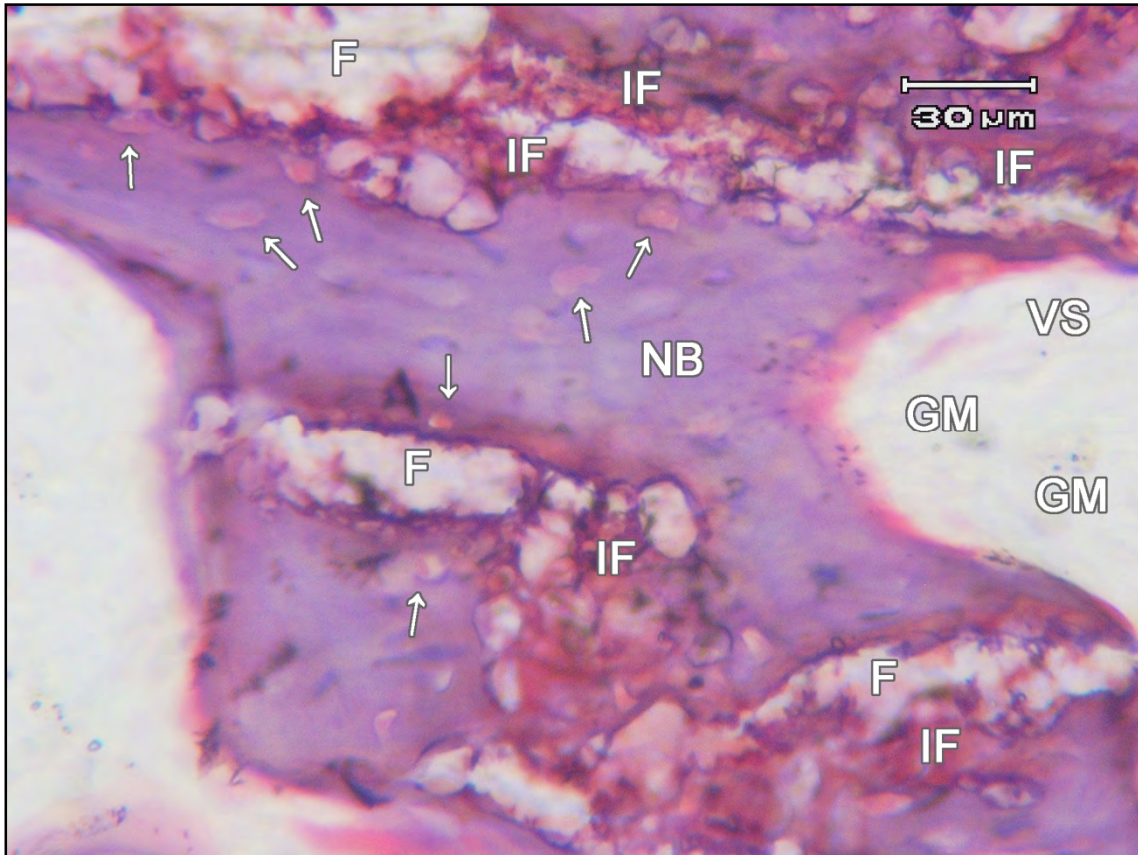


Fig. 10.19. Imagen con detalle aumentado del análisis histológico de los implantes colocados al animal durante un periodo de 10 semanas. La barra superior se corresponde con una longitud de 30 μm .

F: Restos del material. NB: Hueso neoformado. IF: Interfase.

VS: Espacios vasculares de la médula inmadura. GM: Acumulaciones granulares del material implantado.

Flechas: Osteocitos rodeados por matriz ósea.

10.4. Resumen y discusión del capítulo.

En las siguientes líneas se discuten los resultados obtenidos durante el desarrollo y caracterización de las piezas destinadas de regeneración de tejido óseo conformadas por seda y vidrio bioactivo 45S5.

10.4.1. Conformado.

En el apartado de conformado de la suspensión inicial se llevó a cabo el proceso de *freeze casting* de dicha suspensión, el posterior sublimado del hielo formado durante dicha operación y el posterior reticulado de la seda que se encontraba en el interior de dichas piezas.

Esta parte experimental está basada en el hecho de que, a través de la reticulación de la seda, este compuesto polimérico podría actuar como una red que sujete las partículas del vidrio bioactivo 45S5. Con este planteamiento se evita el tratamiento térmico necesario para consolidar las piezas, ya que la red de seda actúa con ese cometido. Al evitar el tratamiento térmico, también se evita el desvitrificado del BG

45S5 y que provoca que el compuesto pierda muchas de sus propiedades bioactivas originales.

10.4.2. Propiedades fisicoquímicas.

La investigación de las propiedades físicas y químicas de las piezas conformadas con seda y vidrio bioactivo ha permitido conocer muchas de sus características.

El estudio de las propiedades mecánicas de dichas piezas ha demostrado que distan mucho de las que presenta el hueso natural. Sin embargo, sí que se podrían utilizar como piezas que no soportaran carga mecánica. Los resultados de la mayoría de las piezas se encuentran entre 0,3 y 0,6 MPa de máxima resistencia a la compresión. La pieza conformada con la disolución de seda número 3 y con un 25% de contenido sólido inicial muestra el valor más alto, con 1,2 MPa.

En este punto es importante destacar que dichas piezas no han sido sometidas a ningún tipo de tratamiento térmico de sinterización, por lo que no dejan de ser partículas empacadas por medio de la reticulación de la seda, por lo que es bastante entendible que muestren propiedades mecánicas tan bajas en comparación con otras piezas que se han conformado en apartados previos.

Por otro lado, el estudio de la microestructura interna de las piezas muestra que todas ellas mantienen la estructura lamelar que el proceso de *freeze casting* confiere a las suspensiones. Esto, por un lado, demuestra la viabilidad de este proceso para ser utilizado en mezclas de disoluciones poliméricas (como es el caso de la disolución de seda que se ha utilizado) con materiales sólidos en suspensión (el propio BG 45S5). Y por otro lado, también demuestra que el proceso de reticulación de la seda ha sido exitoso y ha conseguido empacar las partículas sólidas sin modificar la estructura inicial del *freeze casting*.

Los resultados de porcentaje de seda en las piezas finales muestran que, a pesar de utilizar bajas concentraciones de seda en las disoluciones iniciales, el porcentaje en peso del polímero en dichas piezas finales se encuentra entre el 8% y el 20%, con lo que no son valores de concentración tan bajos como se cabría esperar, lo que conlleva que, muy probablemente, la seda también tenga un impacto en el comportamiento de estas piezas.

Las estructuras obtenidas muestran una gran porosidad, con valores en todas las piezas muy similares, entre el 69% y el 73%. El hecho de que tengan valores tan grandes de porosidad, también afecta a las pobres propiedades mecánicas que presentan estas piezas. El mismo material, cuanto más poroso sea, peores propiedades mecánicas presenta.

En cuanto a la solubilidad que las piezas muestran en suero fisiológico simulado estático hay que destacar varios aspectos que se pueden interpretar de los datos obtenidos. En primer lugar, la disolución de las piezas es mayor cuanto mayor es la concentración de sólido en la suspensión inicial y cuanto mayor es la concentración de seda en la disolución inicial.

Por otro lado, también es interesante destacar que este experimento sobre las solubilidad de las piezas fue llevado a cabo en suero fisiológico simulado de manera estática, sin que existiera ningún tipo de renovación del suero ni ningún tipo de movimiento del fluido. Como se ha mostrado en previos apartados, el hecho de que este tipo de experimentos se hagan de manera dinámica o estática influye enormemente en la cantidad de material que se disuelve, por lo que sería predecible una mayor cantidad de disolución de los compuestos formados por seda y BG 45S5 si dicho estudio fuera llevado a cabo de manera dinámica.

A pesar de todo, las pérdidas de peso de las piezas a las 8 semanas es de entre un 20% y un 38%, lo que son unos valores bastante elevados.

10.4.3. Propiedades biológicas.

Debido a lo innovador que resultaban las piezas conformadas por BG 45S5 y la seda, se decidió llevar a cabo experimentos *in vitro* con las piezas que presentaban mejores propiedades mecánicas, ya que la estructura lamelar estaba presente en todas ellas y mostraban apariencias muy similares en este aspecto.

El estudio de las propiedades biológicas de las piezas llevado a cabo *in vitro* muestra que estas piezas provocan una inflamación en el tejido mayor que las piezas formadas por HA/ β -TCP. También, estos mismo estudios muestran que se da una mayor proliferación de células mesenquimales en las piezas de HA/ β -TCP que en las conformadas con seda y BG 45S5.

Estos resultados no concuerdan con las magníficas propiedades biocompatibles del BG 45S5 que se han encontrado en la bibliografía, unidas a las que la propia seda aporta, también considerado un material muy biocompatible. Sin embargo, sí que sirven para constatar que, a priori, ninguno de los materiales ni los reactivos que se han utilizado a lo largo de esta investigación son tóxicos ni producen ningún problema para el crecimiento celular en las piezas.

El último estudio que se ha hecho ha sido la de implantar las piezas obtenidas en el cráneo de un conejo. Este tipo de investigación *in vivo* es el método más fidedigno y que realmente refleja la biocompatibilidad y bioactividad de un material.

Para este fin, se ha elegido la pieza obtenida a partir de la disolución de seda número 3 con un contenido sólido inicial del 25%. Dado que la estructura lamelar que se observó en el interior de todas las piezas era muy similar y la pieza seleccionada mostraba muchos mejores valores de propiedades mecánicas.

En el análisis histológico se puede observar un gran crecimiento del tejido óseo en el interior de las piezas insertadas en el cráneo del animal después de 10 semanas. A pesar de que aún se pueden observar restos del propio material en dichos análisis, prácticamente la totalidad de la pieza se ha reabsorbido, dando paso a hueso neoformado. En la parte superior de la pieza, que era donde se encontraba en contacto con los bordes del propio hueso nativo, se observa un mucho mayor crecimiento del tejido óseo en lugar de mostrar tantos restos del material original.

En la imagen con un mayor aumento (figura 10.21) se puede apreciar que la matriz del hueso empieza a desarrollarse en contacto estrecho con el material, a pesar de que también se pueden apreciar algunas acumulaciones granulares del material en los espacios vasculares de la médula inmadura.







V. Conclusiones.



11. Resumen y conclusiones.

A partir de todos los experimentos y estudios realizados durante el presente trabajo se han obtenido las siguientes conclusiones:

1.-El *freeze casting* es un método de procesamiento que puede ser aplicado a diferentes compuestos cerámicos, minerales y poliméricos. Todos los intentos que se han llevado a cabo durante este estudio han resultado exitosos, creando la estructura lamelar interna esperada. Aunque las propiedades mecánicas obtenidas están muy por debajo de las del hueso natural, cabe destacar que esto se debe a los altos valores de porosidad que las piezas presentan, valores que oscilan entre el 69% y 80% en las piezas estudiadas y al tamaño que presentan los macroporos en el interior de las piezas.

2.-El vidrio bioactivo 45S5 presenta una clara desvitrificación a una temperatura menor que su temperatura de sinterización. Esto provoca que las piezas de BG 45S5 conformadas no presenten estructura vítrea y sus propiedades sean diferentes a las del vidrio original, incluyendo sus propiedades biológicas. A pesar de este proceso de desvitrificación, una gran multitud de estudios siguen sinterizando el BG 45S5, con su consecuente proceso de desvitrificación, y se le sigue llamando erróneamente vidrio bioactivo a pesar de que ya no se trata de un vidrio.

3.-Se ha demostrado la viabilidad de producir piezas en tres dimensiones compuestas por mezclas variables de fosfatos cálcicos bifásicos (HA/ β -TCP) con BG 1393. Después de la conformación de los materiales por medio del *freeze casting*, las piezas resultantes fueron sometidas a un proceso térmico de sinterización. Dicho proceso tuvo que ser optimizado dependiendo del porcentaje de cada uno de los componentes en función de dos variables: las propiedades mecánicas a la compresión y la conservación después del proceso de sinterización de la estructura lamelar interna obtenida a través del *freeze casting*. Los resultados obtenidos muestran una relación directa entre la concentración de HA/ β -TCP y el aumento de la temperatura necesaria para sinterizar las piezas.

4.-A pesar de que el BG 45S5 no muestra estabilidad térmica, los otros vidrios estudiados sí que lo hacen: BG 1393, BG 1393B1, BG 2B6Sr. Esto indica que todos estos vidrios pueden ser sometidos a un proceso de sinterización sin que cristalicen, por lo menos hasta una temperatura de 1200 °C. Al mezclar cualquiera de estos vidrios con HA/ β -TCP ha sido necesario realizar un estudio del proceso térmico de sinterización en el cual se demuestra que a mayor concentración de vidrio bioactivo, menor tiene que ser la temperatura de sinterización para conservar la microestructura lamelar interna obtenida a través del proceso de conformación de *freeze casting*.

5.-Las zeolitas ZSM-5 son compuestos que presentan una enorme superficie específica a temperatura ambiente y que pueden ser utilizadas como transportadores moleculares. Sin embargo, durante el proceso térmico de sinterización pierden estos grandes valores de

superficie específica. Este compuesto presenta valores de 300 m²/g a temperatura ambiente, que aumenta hasta los 350 m²/g a alrededor de 800 °C y que se reduce a 220 m²/g a los 1100 °C y cae drásticamente hasta los 30 m²/g a los 1200 °C. Este descenso se ve corroborado por el estudio de difracción de rayos X en el que se comprueba que las zeolitas se transforman en estilbita-Ca a dicha temperatura. Esto hace que sea necesario sinterizar este compuesto a temperaturas menores de 1200 °C para que conserve valores de superficie específica en torno a los 200-300 m²/g.

Para resolver este problema se ha llevado a cabo la mezcla de las zeolitas con HA/ β -TCP y con BG 1393, éste último con una temperatura de sinterización mucho menor y que, al fundirse ligeramente, actúa como una especie de cemento que mantiene las demás partículas unidas en la estructura. A las temperaturas de sinterización estudiadas se observa que se conserva la microestructura lamelar interna al mismo tiempo que las piezas poseen una propiedades mecánicas mínimas que permiten manejarlas y que mantiene, en parte, los valores de superficie específica originales.

6.-La inclusión de fibroína disuelta en el proceso de conformado de *freeze casting* permite obtener piezas de BG 45S5 que no necesitan un proceso térmico de consolidación. Al reticular la fibroína de la seda después de conformar las piezas, ésta actúa como una red que sujeta toda la estructura del BG 45S5 sin que éste se desvitrifique y, de esta manera, conserve sus propiedades originales junto con las propiedades de la fibroína de la seda.

7.-Las piezas obtenidas con diferentes porcentajes de HA/ β -TCP y BG 1393 fueron sometidas a un estudio de solubilidad en suero fisiológico simulado en dos maneras diferentes: en líquido estático, como la mayoría de estudios realizados, y con el líquido en constante movimiento y renovación. En ambos estudios se puede comprobar la mayor solubilidad del BG 1393 en comparación con el HA/ β -TCP. A mayores concentraciones de BG 1393 mayor es la pérdida de peso a lo largo del tiempo. Las piezas de HA/ β -TCP puro incluso ganan peso debido a la precipitación de HA en el seno del suero fisiológico simulado, que se encuentra saturado.

Sin embargo, a pesar de que en ambos estudios se muestra una relación directa entre el porcentaje de BG 1393 y la pérdida de peso de las piezas, en el experimento dinámico los valores de pérdida de peso son mucho mayores. Las piezas que mayor disolución presentaron en ambos casos fueron las compuestas únicamente de BG 1393 y, mientras que en el modelo estático perdía un 16% de peso a las 6 semanas, en el modelo dinámico de suero fisiológico simulado la pérdida de peso en el mismo periodo de tiempo asciende a un 35%. Esto demuestra que la experimentación del suero fisiológico simulado presenta más problemas e imprecisiones de las que se creían inicialmente.

8.-Las pruebas de caracterización biológica llevadas a cabo en las piezas de HA/ β -TCP puro y del 50% de HA/ β -TCP y BG 1393 muestran que ambas piezas estudiadas muestran una gran proliferación celular a través de los estudios de MTT. Por otro lado, la microscopía confocal de fluorescencia también demuestra que no provocan la muerte significativa de células. Sin embargo, los niveles de IL-6 obtenidos son mucho mayores para

las piezas con presencia de BG 1393. Esto indica que el tejido huésped presentará una inflamación mucho mayor en las piezas con BG 1393. Estos datos no concuerdan con las propiedades biocompatibles que se esperaban del vidrio bioactivo *a priori*, y demuestran que el BG 1393 provoca una respuesta inmunológica mucho mayor que el HA/ β -TCP.

10.-Todas las piezas conformadas a través de *freeze casting* muestran valores de porosidad en torno al 70%. Además, las piezas conformadas por HA/ β -TCP y BG 1393 y las compuestas de fibroína de seda y BG 45S5 han mostrado una buena proliferación celular en los estudios *in vitro*.

11.-Las piezas formadas por BG 45S5 y fibroína de seda fueron estudiadas *in vivo* por medio de la implantación en trepanaciones en la calota de un conejo de raza New Zealand. Después de diez semanas, las piezas se degradaron por completo, dejando pequeños residuos en el medio de una gran matriz de hueso neo formado en el que se puede apreciar una gran vascularización del tejido.







VI. Fuentes consultadas.



12. Bibliografía y referencias.

1. <http://keramat.es/>
2. http://politica.elpais.com/politica/2015/02/26/actualidad/1424969363_446948.html
3. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biomaterials-393.html>
4. <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/global-biomaterials.asp>
5. W.F. Smith. Pub. by J. Hashemi. *Fundamentos de la ciencia e ingeniería de materiales*. McGraw-Hill Interamericana, México D.F., México. 2006.
6. W.D. Callister Jr. *Materials Science and Engineering. An introduction*. Pub. by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 2003.
7. D.R. Askeland. *The Science and Engineering of materials*. Pub. by Chapman and Hall. London, UK. 1990.
8. J.F. Shackelford. *Introducción a la Ciencia de Materiales para Ingenieros*. Pearson Alhambra. London (UK), 2005
9. C. Mijangos, J.S. Moya. *Nuevos materiales en la sociedad del siglo XXI*. CSIC. 978-84-00-08453-0 (2005)
10. https://es.wikipedia.org/wiki/Ciencia_de_materiales
11. https://es.wikipedia.org/wiki/Ingenier%C3%ADa_de_materiales
12. <http://www.csic.es/ciencia-y-tecnologia-de-materiales>
13. <https://www.nsf.gov/nsf/nsfpubs/nsf9491/nsf9491b.htm>
14. J.I. Gersten, F.W. Smith. *The physics and chemistry of materials*. Pub. by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 2001.
15. <http://divulgatia.blogspot.com.es/2014/12/la-cristalografia-y-el-chocolate.html>
16. <http://www.google.com/patents/US8545786>
17. E. García-Tuñón Blanca. *Obtención y caracterización de fases de refuerzo monocristalinas y biocompatibles para su aplicación en biocomposites para regeneración ósea*. Tesis doctoral. 2010.

18. Y. Zhang, N. Cheng, R. Miron, B. Shi, X. Cheng. *Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglasssilk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects*. Biomaterials 33 (2012) 6698-6708.
19. Arcos, M. Vallet-Regí. *Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration*. Actabiomaterialia 6 (2010) 2874-2888.
20. L. Esteban-Tejeda, K. Zheng, C. Prado, B. Cabal, R. Torrecillas, A.R. Boccaccini, J.S. Moya. *Bone tissue scaffold based on antimicrobial SiO₂-Na₂O-Al₂O₃-CaO-B₂O₃ glass*. J of non-crystalline solids (2015)
21. K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios. *An introduction to tissue-biomaterial interactions*. Pub. by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 2002.
22. H. Keller, U. Erb. *Dictionary of Engineering Materials*. Pub. by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA. 2004.
23. J. Franco Vázquez. *Síntesis y procesamiento de β -TCP para la fabricación de implantes*. Tesis doctoral. 2004.
24. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. *Biomaterials Science. An introduction to materials in medicine*. 2nd Edition, Pub. by Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA. 2004.
25. M. Vert, Y. Doi, K.H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué. *Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)*. Pure Appl. Chem., Vol. 84, No. 2, pp. 377-410. 2012
26. M. Vallet-Regí. *Progress in Bioceramics*. Pub. by Trans Tech Publications Ltd, Zurich, Switzerland. 2008.
27. L.L. Hench. *The story of Bioglass*. J Mater Sci: Mater Med (2006) 17;967-978.
28. L.L. Hench, J.M. Polak. *Third-Generation Biomedical Materials*. Science 295, 1014 (2002)
29. G. Melinte, L. Baia, V. Simon, S. Simon. *Hydrogen peroxide versus water synthesis of bioglass-nanocrystalline hydroxyapatite composites*. Journal of Material Science (2011) 46:7393-7400.
30. E. Gentleman, Y.C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M.D. O'Donnell, R.G. Hill, M.M. Stevens. *The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro*. Biomaterials 31 (2010) 3949-3956.

31. N. Cheng, Y. Wang, Y. Zhang, B. Shi. *The Osteogenic Potential of Mesoporous Bioglasses Silk and Non-Mesoporous BioglassesSilk Scaffolds in Ovariectomized Rats In vitro and In vivo Evaluation*. PLoS ONE 8(11): e81014.
32. A. CuneytTas, F. Korkusuz, M. Timucin, N. Akkas. *An investigation of the chemical synthesis and high temperature sinteringbehaviour of calcium hydroxyapatite (HA) and tricalciumphosphate (TCP) ceramics*.Journal of material science; Materials in medicine 8 (1997) 91-96.
33. M. Vandrovcova, L. Bacakova. *Adhesion, Growth and differentiation of osteoblasts on surface modified materials developed for bone implants*. Physiol. Res. 60: 403-417, 2011.
34. H. Mostaghaci, E. Armanios, Y.W. Mai, G.M. Newaz, F.H. Wöhlbier. *Advanced ceramic materials*. Pub. by Trans Tech Publications Ltd, Zurich, Switzerland. 1996.
35. N. Lyczko, A. Nzihou, P. Sharrok. *Calcium phosphate sorbent for environmental application*. Procedia Engineering 83 (2014) 423-431.
36. <http://current-odontology.blogspot.com.es/2015/09/historia-de-la-odontologia.html>
37. R. Langer, J.P. Vacanti. *Tissue engineering*. Science, Vol. 260 (1993) 920-926.
38. L.L. Hench. . *Bioactive Ceramics*. NY Acad. Science, 1988; 523: 54-71.
39. W. Suchanek, M. Yoshimura. *Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants*. Journal of materials research, Vol. 13, No. 1. 94-11
40. L.L. Hench. *Biomaterials: a forecast for the future*. Biomaterials 19 (1998) 1419-1423.
41. A.C. Guyton. *Medical physiology, Chap. 79, Bones Methabolism*, 759-773. 9th Ed. Guanabara Koogan.
42. <https://es.wikipedia.org/wiki/Hueso>
43. F. Mottaghitalab, H. Hosseinkhani, M.A. Shokrgozar, C. Mao, M. Yang, M. Farokhi. *Silk as a potential candidate for bone tissue engineering*. J of Controlled Release 215 (2015) 112-128.
44. C. Szpalski, M. Wetterau, J. Barr, S.M. Warren. *Bone tissue engineering: Current strategies and techniques, Part I: Scaffolds. Tissue Engineering, Part B*. Vol. 18, number 4, 2012.

45. A.M. Ferreira, P. Gentile, V. Chiono, G. Ciardelli. *Collagen for bone tissue regeneration*. *Actabiomaterialia* 8 (2012) 3191-3200.
46. Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomisa. *Toward strong and tough glass and ceramic scaffolds for bone repair*. *Adv. Funct. Mater.* 2013. DOI: 10.1002/adfm.201301121.
47. S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay. *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. *Trends in biotechnology*, Oct. 2012, Vol. 30, No 10, 546-554.
48. F. Bronner, M.C. Farach-Carson, H.I. Roach. *Bone and development*. Pub. by Springer-Verlag, London, UK. 2010.
49. J. Cejka, H. van Bekkum, A. Corma, F. Schuth. *Introduction to zeolite science and practice*. *Studies in surface science and catalysis* 168, 2007.
50. Y.H. An, R.A. Draughn. *Mechanical testing of bone and the bone-implant interface*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, USA.
51. J.M. Kanczler, R.O.C. Oreffo. *Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone*. *European Cells and Materials* Vol. 15 (pp 100-114) 2008.
52. A.J. Mieszawska, J. Gallego Llamas, C.A. Vaiana, M.P. Kadakia, R.R. Naik, D.L. Kaplan. *Clay enriched silk biomaterials for bone formation*. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3036-3041.
53. A.J. Freemont. *The tissue we deal with (I) Bone*. *Current Orthopaedics* (1998) 12, 181-192.
54. N.A. Sims, T.J. Martin. *Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit*. *BoneKEY Reports* 3, Art. Number 481 (2014).
55. L. Sun, S. T. Parker, D. Syoji, X. Wang, J.A. Lewis, D.L. Kaplan. *Direct-Write Assembly of 3D SilkHydroxyapatite Scaffolds for bone co-cultures*. *Adv. Healthcare Mater.* 2012, 1, 729-735.
56. J.D. Adachi, S. Adami, S. Gehlbach, F.A. Anderson Jr, S. Boonen, R.D. Chapurlat, J.E. Compston, C. Cooper, P. Delmas, A. Díez-Pérez, S.L. Greenspan, F.H. Hooven, A.Z. LaCroix, R. Lindsay, J.C. Netelenbos, O. Wu, J. Pfeilschifter, C. Roux, K.G. Saag, P.N. Sambrook, S. Silverman, E.S. Siris, G. Nika, N.B. Watts. *Impact of prevalent fractures on quality of life: Baseline results from the global longitudinal study of osteoporosis in women*. *Mayo Clinic Proc.* 2010; 85 (9): 806-813
57. R. Burge, B. Dawson-Hughes, D.H. Solomon, J.B. Wong, A. King, A. Tosteson. *Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in*

- the United States 200-2025*. J. of Bone and Mineral Research. Vol. 22, N. 3, 2007.
58. Szpalski, J. Barr, M. Wetterau, P.B. Saadeh, S.M. Warren. *Cranial bone defects: current and future strategies*. Neurosurg Focus 29 (6):E8, 2010.
59. Y. Jin, B. Kundu, Y. Cai, S.C. Kundu, J. Yao. *Bio-inspired mineralization of hydroxyapatite in 3D silk fibroin hydrogel for bone tissue engineering*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 134 (2015) 339-345.
60. E. Zeimaran, S. Pourshahrestani, i. Djordjevic, B. Pinguan-Murphy, N.A. Kadri, M.R. Towler. *Bioactive glass reinforced elastomer composites for skeletal regeneration: A review*. Materials Science and Engineering C 53 (2015) 175-188.
61. M.S. Scholz, J.P. Blanchfield, L.D. Bloom, B.H. Coburn, M. Elkington, J.D. Fuller, M.E. Gilbert, S.A. Muflahi, M.F. Pernice, S.I. Rae, J.A. Trevarthen, S.C. White, P.M. Weaver, I.P. Bond. *The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review*. Composites science and technology 71 (2011) 1791-1803.
62. S. Pattnaik, S. Nethala, A. Tripathi, S. Saravanan *Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering.*, A. Moorthi, N. Selvamurugan. Int. Journal of biological macromolecules 49 (2011) 1167-1172.
63. J. Franco, P. Hunger, M.E. Launey, A.P. Tomsia, E. Saiz. *Direct write assembly of calcium phosphate scaffolds using a water-based hydrogel*. Acta Biomaterialia 6 (2010) 218-228.
64. F.H. Fred. *Studies in bone growth. Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis*. Ann Surg 71, 32, 1920.
65. L.L. Hench, J. Wilson. *An introduction to Bioceramics*. Pub. by World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapur. 1998.
66. J. R. Jones. *Review of bioactive glass: from Hench to hybrids*. Acta Biomaterialis 9 (2013) 4457-4486.
67. M. Velez, S. Jung, K.C.R. Kolan, M.C. Leu, D.E. Day, T-M.G. Chu. *In vivo evaluation of 1393 bioactive glass scaffolds made by selective laser sintering (SLS)*. Biomaterials science: Processing, properties and applications II. Ed. By R. Narayan, S. Bose, A. Bandyopadhyay. The American ceramic society.
68. M. Regina, T. Filgueiras, G. LaTorre, L. Hench. *Solution effects on the surface reactions of three bioactive glass compositions*. Journal of biomedical Mat. Research, Vol. 27, 1485-1493 (1993)

69. M. M. Echezarreta-Lopez, M. Landin. *Using machine learning for improving knowledge on antibacterial effect of bioactive glass*. Int. Journ. Of Pharmaceutics 453 (2013) 641-647.
70. Q. Fu, E. Saiz, A. P. Tomsia. *Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration*. ActaBiomaterialia 7 (2011) 3547-3554.
71. A. Polini, H. Bai, A.P. Tomsia. *Dental applications of nanostructured bioactive glass and its composites*. WIREs NanomedNanobiotechnol2013. doi: 10.1002/wnan.1224.
72. L. Bi, M. N. Rahaman, D. E. Day, Z. Brown , C. Samujh, X. Liu, A. Mohammadkhah, V. Dusevich, J. D. Eick, L. F. Bonewald. *Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model*. ActaBiomaterialia 9 (2013) 8015–8026.
73. H. Oonishi, S. Kushitani, E. Yasukawa, H. Iwaki, L. L. Hench, J. Wilson, E. Tsuji, T. Sugihara. *Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute*. Clinical Orthopaedics and related research, N. 334, pp 316-325.
74. M.N. Rahaman, X. Liu, B.S. Bal, D.E. Day, L. Bi, L.F. Bonewald. *Bioactive glass in bone tissue engineering. Biomaterials science: Processing, properties and applications II*. Ed. By R. Narayan, S. Bose, A, Bandyopadhyay. The American ceramic society.
75. Q. Fu, M. N. Rahaman, H. Fu, X. Liu. *Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications I.Preparation and in vitro degradation*. Journal of biomedical materials research A. Oct 2010, Vol 95A, issue 1.
76. C. Stähli, M. James-Bhasin, A. Hoppe, A. R. Boccaccini, S.N. Nazhat. *Effect of ion release from Cu-doped 45S5 BioGlass on 3D endothelial cell morphogenesis*. Acta Biomaterialia 19 (2015) 15-22.
77. E. Saiz, E.A. Zimmermann, J.S. Lee, U.G.K. Wegst, A.P. Tomsia. *Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering*. Dent Mater. 2013 Jan;29(1):103-15.
78. M.N. Rahaman, D.E. Day, B.S. Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P.Tomsia. *Bioactive glass in tissue engineering*. ActaBiomaterialia 7 (2011) 2355-2373.
79. X. Wei, T. Xi, Y. Zheng, C. Zhang, W. Huang. *In Vitro comparative effect of three novel borate bioglasses on the behaviors of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. J. Mater. Sci. Technol., 2014, 30 (10), 979-983.

80. L. Bi, S. Jung, D. Day, K. Neidig, V. Dusevich, D. Eick, L. Bonewald. *Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds*. J. of biomedical materials research A, Dec. 2012 Vol. 100A, issue 12.
81. C. Wu and J. Chang. *Mesoporous bioactive glasses. structure characteristics, drug growth factor delivery and bone regeneration application*. Interface Focus 2012 2, 292-306.
82. L.L. Hench, J. Wilson. *An introduction to bioceramics*. Advanced series in ceramics, Vol. 1. World Scientific Publishing, 1993.
83. D. Nadeem, M. Kiamehr, X. Yang, B. Su. *Fabrication and in vitro evaluation of a sponge-like bioactive-glass/gelatin compositescaffold for bone tissue engineering*. Materials Science and Engineering C 33 (2013) 2669–2678.
84. W. Jie, L. Yubao. *Tissue engineering scaffold material of nano-apatite crystals and polyamide composite*. European polymer journal 40 (2004) 509-515.
85. Z. Dong, Y. Li, Q. Zou. *Degradation and biocompatibility of porous nano-hydroxyapatite/polyurethane composite scaffold for bone tissue engineering*. Applied surface science 255 (2009) 6087-6091.
86. Tripathi, S. Saravanan, S. Pattnaik, A. Moorthi, N.C. Partridge, N. Selvamurugan. *Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering*. Int. Journal of biological macromolecules 50 (2012) 294-299.
87. W. Lu, K. Ji, J. Kirkham, Y. Yan, A.R. Boccaccini, M. Kellet, Y. Jin, X.B. Yang. *Bone tissue engineering by using a combination of polymerBioglass composites with human adipose-derived stem cells*. Cell tissue Res (2014) 356:97-107
88. P. Fabbri, L. Valentini, J. Hum, R. Detsch, A.R. Boccaccini. *45S5 Bioglass-derived scaffolds coated with organic–inorganic hybrids containing graphene*. Materials Science and Engineering C 33 (2013) 3592–3600.
89. H. Porwal, S. Grasso, L. Cordero-Arias, C. Li, A.R. Boccaccini, M.J. Rece. *Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass(®)-graphene nanoplatelets composites*. J Mater Sci: Mater Med.
90. J. A. Killion, S. Kehoe, L. M. Geever, D. M. Devine, E. Sheehan, D. Boyd, C. L. Higginbotham. *Hydrogel/bioactive glass composites for bone regeneration applications: Synthesis and characterization*. Material Science and Engineering C 33 (2013) 4203-4212.
91. S. Teixeira, M.A. Rodriguez, P. Pena, A.H. De Aza, S. De Aza, M.P. Ferraz, F.J. Monteiro. *Physical characterization of hydroxyapatite porous*

- scaffolds for tissue engineering*. Material science and engineering C 29 (2009) 1510-1514.
92. M. Schumacher, U. Deisinger, R. Detsch. *Indirect rapid prototyping of biphasic calcium phosphate scaffolds as bone substitutes: influence of phase, macroporosity and pore geometry on mechanical properties*. J Mater Sci: Mater Med (2010) 21:3119-3127.
 93. G.F. Muschler, C. Nakamoto, L. G. Griffith. *Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering*. The Journal of bone and joint surgery, Vol. 86-A, N. 7, 2004, 1541-1558.
 94. R. Dimitrou, E. Jones, D. McGonagle, P.V. Giannoudis. *Bone regeneration: current concepts and future directions*. BMC Medicine 2011, 9:66.
 95. Y. Liu, J. Lim, S. Teoh. *Review. Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone*. Biotechnology Advances 31 (2013) 688–705.
 96. B. Glover. *George Washington, a dental victim*. Riversdale Historical Society, University of Maryland, College Park, USA.
 97. M. I. Santos, R. L. Reis. *Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges*. Macromol. Biosci. 2010, 10, 12–27.
 98. G. Camci-Unal, N. Alemdar, N. Annabi, A. Khademhosseini. *Oxygen-releasing biomaterials for tissue engineering*. Polym. Int. 2013; 62: 843-848.
 99. C. Vitale-Brovarone, F. Baino, E. Verne. *High strength bioactive glass-ceramic scaffold for bone regeneration*. J Mater Sci: Mater Med (2009) 20:643–653.
 100. S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia. *Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering*. Biomaterials 27 (2006) 5480-5489.
 101. M. Zhu, K. Wang, J. Mei, C. Li, J. Zhang, W. Zheng, D. An, N. Xiao, Q. Zhao, D. Kong, L. Wang. *Fabrication of highly interconnected porous silk fibroin scaffolds for potential use as vascular grafts*. Acta Biomaterialia 10 (2014) 2014-2023.
 102. C. Wu, Y. Zhang, Y. Zhu, T. Friis, Y. Xiao. *Structure–property relationships of silk-modified mesoporous bioglass scaffolds*. Biomaterials 31 (2010) 3429-3438.
 103. D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan. *Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin*. Nature Protocols. Vol. 6, No. 10, 2011.

104. Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini. *45S5 Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. *Biomaterials* 27 (2006) 2414-2425.
105. M.R. Dias, P.R. Fernandes, J.M. Guedes, S.J. Hollister. *Permeability analysis of scaffolds for bone tissue engineering*. *Journal of biomechanics* 45 (2012), 938-944.
106. V. Karageorgiou, D. Kaplan. *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials* 26 (2005) 5474-5491.
107. U.J. Kim, J. Park, H.J. Kim, M. Wada, D.L. Kaplan. *Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin*. *Biomaterials* 26 (2005) 2775-2785.
108. E.A. Aguilar-Reyes, C.A. Leon-Patino, B.Jacinto-Diaz, L.P. Lefebvre. *Mechanical and microstructural characterization of 45S5 bioglass scaffolds for tissue engineering*. *Biomaterials science: Processing, properties and applications II*. Ed. By R. Narayan, S. Bose, A. Bandyopadhyay. The American ceramic society.
109. A.I. Itala, H.O. Ylanen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, H.T. Aro. *Pore diameter of more than 100 microm is not required for bone ingrowth in rabbits*. *Journal of Biomedical Materials Research* Volume 58, Issue 6.
110. B. D. Boyan, C.H. Lohmann, D.D. Dean, V.L. Sylvia, D.L. Cochran, Z. Schwartz. *Mechanism involved in osteoblast response to implant surface morphology*. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2001. 31:357-71.
111. J. Lovmand, J. Justesen, M. Foss, R.H. Lauridsen, M. Lovmand, C. Modin, F. Besenbacher, F.S. Pedersen, M. Duch. *The use of combinatorial topographical libraries for the screening of enhanced osteogenic expression and mineralization*. *Biomaterials* 30 (2009) 2015-2022.
112. W. Singhatanadgit. *Biological Responses to Advanced Surface Modifications-of-Endosseous medical implants*. *Bone and tissue regeneration insights* 2009:2.
113. M. Thery. *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*. *J. of cell science* 123 (24) 4201-4213.
114. H.V. Unadkat, M. Hulsman, K. Cornelissen, B.J. Papenburg, R.K. Truckenmuller, G.F. Post, M. Uetz, M.J.T. Reinders, D. Stamatialis, C.A. van Blitterswijk, J. de Boer. *An algorithm based topographical biomaterials library to instruct cell fate*. *PNAS*, Oct. 4, 2011, vol. 108, no. 40, 16565-16570.

115. L.Treccani, T.Y. Klein, F. Meder, K. Pardun, K.Rezwan. *Functionalized ceramics for biomedical, biotechnological and environmental applications*. ActaBiomaterialia (2013).
116. A. Diaz, T. Lopez, J. Manjarrez, E. Basaldella, J.M. Martinez-Blanes, J.A. Odriozola. *Growth of hydroxyapatite in a biocompatible mesoporous ordered silica*. ActaBiomaterialia 2 (2006) 173-179
117. R.O. Ritchie, A.P. Tomsia, *Mechanical properties of materials: nature-inspired ultralight toughness, lightweight structural materials*.
118. E. Munch, M.E. Launey, D.H. Alsem, E. Saiz, A.P. Tomsia, R.O. Ritchie. *Tough bio-inspired hybrid materials*. Science 2008; 322: 1516.
119. U.G.Wegst, H. Bai, E. Saiz, A.P. Tomsia, R.O. Ritchie. *Bioinspired structural materials*. Nature Materials.
120. A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu. *Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges*. Crit. Rev. Biomed Eng. 2012; 40 (5): 363-408.
121. S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia. *Ice-templated porous alumina structures*. Acta Materialia 55 (2007) 1965-1974.
122. S. Eqtesadi, A. Motellah, P. Miranda, A. Pajares, A. Lemos, J.M.F. Ferreira. *Robocasting of 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering*. Jour. Of the European Ceramic Society 34 (2014) 107-118.
123. M. H. Mankani, S. Afghani, J. Franco, M. Launey, S. Marshall, G. W. Marshall, R. Nissenon, J. Lee, A. P. Tomsia, and E. Saiz. *Lamellar spacing in cuboid hydroxyapatite scaffolds regulates bone formation by human bone marrow stromal cells*. Tissue Engineering: Part A, Volume 17, Numbers 11 and 12, 2011.
124. K.C.R. Kolan, M.C. Leu, G.E. Hilmas, T. Comte. *Effect of architecture and porosity on mechanical properties of borate glass scaffolds made by selective laser sintering*. Proceedings of the 8th annual ISC graduate research symposium. ISC-GRS 2014, Rolla, Missouri.
125. T. Albrektsson, C. Johansson. *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. Eur Spine J (2001) 10:S96-S101.
126. U. Kneser, D.J. Schaefer, E. Polykandriotis, R.E. Horch. *Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view*. J. Cell. Mol. Med. Vol 10, No 1, 2006, 7-19.
127. K.J.L. Burg, S. Porter. J.F. Kellam. *Biomaterial developments for bone tissue engineering*. Biomaterials 21 (2000) 2347-2359.

128. *The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field*. The National Science Foundation, 4201 Wilson Boulevard, Arlington, Virginia, USA. 2013.
129. D.G. Seifu, T.T. Isimjan, K. Mequanint. *Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors*. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3670-3678.
130. S. Sanchez-Salcedo, A. Nieto, M. Vallet-Regi. *Hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/agarose macroporous scaffolds for bone tissue engineering*. *Chemical engineering journal* 137 (2008) 62-71.
131. B.H. Yoon, W.Y. Choi, H.E. Kim, J.H. Kim, Y.H. Koh. *Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering*. *Scripta Materialia* 58 (2008) 537-540.
132. X. Wang, J.M. Ruan, Q.Y. Chen. *Effects of surfactants on the microstructure of porous ceramic scaffolds fabricated by foaming for bone tissue engineering*. *Material research bulletin* 44 (2009) 1275-1279.
133. B. Hüsing, B. Bühlren, S. Gaisser. *Human Tissue Engineered Products- Today's markets and future prospects*. Fraunhofer Institute for Systems and Innovation research. Karlsruhe, Germany, 2003.
134. <http://www.bloomberg.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapid=6515373>
135. <http://www.codon.de/>
136. <http://www.integralife.com/>
137. https://en.wikipedia.org/wiki/Osiris_Therapeutics
138. <http://www.osiris.com/>
139. <http://www.biomet.co.uk/home-uk>
140. https://en.wikipedia.org/wiki/Zimmer_Biomet
141. <http://www.zimmerbiomet.com.es/>
142. <http://shop.geistlich-na.com/>
143. S. Bailliez, A. Nzihou, E. Bèche, G. Flamant. *Removal of lead (Pb) by hydroxyapatite sorbent*. *Tran IChemE, Part B, Process Safety and Environmental Protection*, 2004, 82 (B2): 175-180.
144. http://portalteses.icict.fiocruz.br/transf.php?id=00006603&lng=pt&nrm=iso&script=thes_chap

145. R.S. Bedi, G. Chow, J. Wang, L. Zanello, Y.S. Yan. *Bioactive materials for regenerative medicine: zeolite-hydroxyapatite bone mimetic coatings*. *Advanced engineering materials* 2012, 14, No. 3, 200-206.
146. F. Guitian Rivera, R. Conde-Pumpido, C. Santos Exposito, A. Pazo Vazquez, J. Couceiro Follente. *Biomateriales ceramicos: Sintesis y propiedades de hidroxiapatito y β -fosfato cálcico*. *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.* 29 (1990) 4, 253-257.
147. F. Mottaghtalab, H. Hosseinkhani, M.A. Shokrgozar, C. Mao, M. Yang, M. Farokhi. *Silk as a potential candidate for bone tissue engineering*. *J of Controlled Release* 215 (2015) 112-128.
148. S. Kapoor, U. Batre. *Preparation and bioactivity evaluation of bone like hidroxiapatite-bioglass composite*. *Int. Journal of chemical and biological engineering* 3:1 2010, 24-28.
149. <http://www.aditivosalimentarios.com/index.php/codigo/341iii/fofosfatotricAlcico>
150. https://es.wikipedia.org/wiki/Fosfato_tric%C3%A1lcico
151. J. Vivanco, A. Araneda, H.L. Ploeg. *Effect of sintering temperature on microstructural properties of bioceramic bone scaffolds*. *Biomaterials science: Processing, properties and applications II*. Ed. By R. Narayan, S. Bose, A. Bandyopadhyay. The American ceramic society.
152. G. Fielding, J. Feuerstein, A. Bandyopadhyay, S. Bose. *SiO₂ and SrO doped b-TCP, influence of dopants on mechanical and biological properties*. *Biomaterials science: Processing, properties and applications II*. Ed. By R. Narayan, S. Bose, A. Bandyopadhyay. The American ceramic society.
153. A. Priya, S. Nath, K. Biswas, B. Basu. *In vitro dissolution of calcium phosphate-mullite composite*. *J Mater Sci: Mater Med* (2010) 21:1817–1828.
154. R.G. Carrodeguas, S. De Aza. *α -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications*. *ActaBiomaterialia* 7 (2011) 3536-3546.
155. B. J. Dick De, G. Klaas De, H. Yuan. *Method of improving the osteoinductivity of calcium phosphate*. Patent number WO2006115398A1.
156. C. Gao, B. Yang, H. Hu, J. Liu, C. Shuai, S. Peng. *Enhanced sintering ability of biphasic calcium phosphate by polymers used for bone*. *Materials Science and Engineering C* 33 (2013) 3802–3810.
157. R.Z. Legeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, J.P. Legeros. *Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications*. *Journal of Mat. Science: Mat. In Medicine* 14 (2003) 201-209.

158. N. Kivrak, A. CuneytTaş. *Synthesis of calcium hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior*. J. Am. Ceram. Soc., 81 (9) 2245-52 (1998)
159. L. Lefebvre, J. Chevalier, L. Gremillard, R. Zenati, G. Thollet, D. Bernache-Assolant, A. Govin. *Structural transformations of bioactive glass 45S5 with thermal treatments*. Acta Materialia 55 (2007) 3305-3313.
160. O.P. Filho, G.P. LaTorre, L.L. Hench. *Effect of crystallization on apatite-layer formation of bioactive glass 45S5*. J Biomedical Mat Research, Vol. 30, 509-514 (1996).
161. X. Liu, N. Rahaman, Q. Fu. *Oriented bioactive glass (1393) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response*. ActaBiomaterialia 7 (2011), 406-416.
162. W. Huang, D. E. Day, K. Kittiratanapiboon, M. N. Rahaman. *Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions*. J Mater Sci: Mater Med (2006) 17:583-596.
163. Q. Fu, M.N. Rahaman, B.S. Bal, L.F. Bonewald, K. Kuroki, R.F. Brown. *Silicate, borosilicate, and borate bioactive glasses scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. II. In vitro and in vivo biological evaluation*. J. Biomed. Mater. Research Part A: 95A: 172-179, 2010.
164. <http://www.iza-structure.org/databases/>
165. <http://webmineral.com/danaclass.shtml#77.1>
166. A. Ojuva, F. Akhtar, A.P.Tomsia, L. Bergstrom. *Laminated adsorbents with very rapid CO₂ uptake by freeze-casting of zeolites*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, 5 (7), pp 2669-2676.
167. R. Bastiani, Y.L. Lam, C. A. Henriques, V. Teixeira. *Application of ferrierite zeolite in high-olefin catalytic cracking*. Fuel 107 (2013) 680-687.
168. S. K. Saxena, N. Viswanadham, M.O. Garg. *Cracking and isomerization functionalities of bi-metallic zeolites for naphtha value upgradation*. Fuel 107 (2013) 432-438.
169. Yamane, T. Nakazawa. *Development of zeolite for non-phosphated detergents in Japan*. Pure & Appl. Chem. Vol. 58, No 10, 1397-1404, 1986.
170. Dyer, S. Morgan, P. Wells, C. Williams. *The use of zeolites as slow release anthelmintic carriers*. J. Helminthology (2000) 74, 137-141.

171. M.J. Sanchez, P. Gamero, D. Cortes. *Bioactivity assessment of ZSM-5 type zeolite functionalized with silver or zinc*. Materials Letters (2012) 250-253.
172. Eslava, C. Hartmann, E. Saiz. *Zeolite monoliths with controlled internal porous structure prepared by freeze casting*.
173. R.S. Bedi, L.P. Zanello, Y. Yan. *Osteoconductive and osteoinductive properties of zeolite MFI coatings on titanium alloys*. Advanced functional materials, 2009, 19, 3856-3861.
174. P.O. Vasiliev, A. Ojuva, J. Grins, L. Bergstrom. *The effect of temperature on the pulsed current processing behavior and structural characteristics of porous ZSM-5 and zeolite Y monoliths*. J. of the European Ceramic Soc. 30 (14): 2977-2983 (2010)
175. R.S. Bedi, D.E. Beving, L.P.Zanello, Y. Yan. *Biocompatibility of corrosion-resistant zeolite coatings for titanium alloy biomedical implants*. ActaBiomaterialia 5 (2009) 3265-3271
176. http://www.espaciodepurativo.com.ar/depuracion_corporal/zeolita.php
177. A.E. Thurber, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan. *In Vivo bioresponses to silk proteins*. Biomaterials 71 (2015) 145-157.
178. S. Sofia, M.B. McCarthy, G. Gronowicz, D.L. Kaplan. *Functionalized silk-based biomaterials for bone formation*. Journal of Biomed. Mat. Research, Vol. 54, 139-148 (2001).
179. <http://www.suekayton.com/Silkworms/lifecycle.htm>
180. http://www.crisaguil.com/Talleres/Talle%20de%20seda/tipos%20de%20seda/Seda_tipos.htm
181. <http://www.fibre2fashion.com/industry-article/16/1510/a-value-added-finish-from-silk-degumming-waste-liquor1.asp>
182. S. Deville, E. Saiz, R.K. Nalla, A.P. Tomsia. *Freezing as a path to build complex composites*. Science 311, 515 (2006).
183. E. Munch, J. Franco, S. Deville, P. Hunger, E. Saiz, A.P. Tomsia. *Porous ceramic scaffolds with complex architectures*. Biological material science, June 2008, 54-58.
184. Q. Fu, M.N. Rahaman, F. Dogan, B.S. Bal. *Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. I. Processing and general microstructure*. Journal of Biomedical Materials Research 2008; 86B:514-22.

185. B. Delattre, H. Bai, R.O. Ritchie, J. De Coninck, A.P. Tomsia. . *Unidirectional freezing of ceramic suspensions: In situ X-ray investigation of the effects of the aditives*. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014, 6, 159-166.
186. <http://www.tecnologia-informatica.es/tecnologia/diagrama-de-fase.php>
187. Q. Fu, M.N. Rahaman, F. Dogan, B.S. Bal. *Freeze casting of porous hydroxyapatite scaffolds. II. Sintering, microstructure, and mechanical behavior*. Journal of Biomedical Materials Research 2008; 86B:125-35.
188. P.M. Hunger, A.E. Donius, U.G.K. Wegst. *Structure-property-processing correlations in freeze-cast composite scaffolds*. Actabiomaterialia 9 (2013) 6338-6348.
189. Lasalle, C. Guizard, E. Maire, J. Adrien, S. Deville. *Particle redistribution and structural defect development during ice templating*. ActaMaterialia 60 (2012) 4594-4603.
190. Y.M. Soon, K.H. Shin, Y.H. Koh, W.Y. Choi, H.E. Kim. *Assembling unidirectionally frozen alumina/camphene bodies for aligned porous alumina ceramics with larger dimensions*. Journal of the European Ceramic Society 31 (2011) 415-419.
191. C.T. Buckley, K.U. O'Kelly. *Fabrication and characterization of a porous multidomain hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering investigations*. J Biomed Mater Res B ApplBiomater. 2010 May;93(2):459-67.
192. E. D'Elia, S. Barg, N. Ni, V.G. Rocha, E. Saiz. *Self-healing graphene-based composites with sensing capabilities*. Adv. Materials. 2015, 27, 4788-4794.
193. M. Jafarkhani, A. Fazlali, F. Moztafzadeh, Z. Moztafzadeh, M. Mozafari. *Fabrication and characterization of PLLA/Chitosan/Nano calcium phophate scaffolds by freeze casting technique*. Industrial and engineering chemistry research 51, 2012, 9241-9249.
194. R.W. Cahn, P. Haasen, E.J. Krame. *Materials Science and Technology. A Comprehensive treatment. Characterization of Materials*. Pub. by Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (Alemania). 2005.
195. R.M. German. *Sintering theory and practice*. Pub. by John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New York, USA. 1996.
196. C. Wu, Y. Xiao. . *Mesopore Bioglass Silk Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Biomaterials science and engineering, Ed. Prof. R. Pignatello, ISBN: 978-953-307-609-6. 2011, InTech.
197. X. Ding, M. Zhu, B. Xu, J. Zhang, Y. Zhao, S. Ji, L. Wang, X. Li, D. Kong, X. Ma, Q. Yang. *Integrated trilayered silk fibroin scaffold for*

- osteochondral differentiation of adipose-derived stem cells*. ACS Appl. Mater. Interfaces. 2014 Oct 8; 6 (19).
198. L. Meinel, V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, B. Snyder, C. Li, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan. *Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds*. J. Biomed. Mater. Research 71A: 25-34, 2004.
199. <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>
200. T. Kokubo, H. Takadama. *How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?* Biomaterials 27 (2006) 2907-2915.
201. M. Plewinski, K. Schickle, M. Lindner, A. Kirsten, M. Weber, H. Fischer. *The effect of crystallization of bioactive bioglass 45S5 on apatite formation and degradation*. Dental Materials 29 (2013) 1256-1264.
202. M. Bohner, J. Lemaitre. *Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?* Biomaterials 30 (2009) 2175-2179.
203. T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro. *Solutions able to reproduce in vivo surface-structures changes in bioactive glass-ceramic A-W*. Journal of biomedical Mat. Research, Vol. 24, 721-734 (1990)
204. *AccuPyc 1330 pycnometer Operator's Manual*. Micromeritics.
205. https://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Stokes
206. <http://www.micromeritics.com/Product-Showcase/SediGraph-III-Plus/SediGraph-Method-Overview.aspx>
207. B.D. Cullity. *Elements of X-Ray diffraction*. Pub. by Addison-Wesley Publishing Company Inc., Boston, Massachusetts, Estados Unidos, 1978.
208. https://es.wikipedia.org/wiki/Ley_de_Bragg
209. <https://metodosexperimentales.wordpress.com/microscopia-electronica-de-barrido-sem/>
210. A. L. Oliveira, S. A. Costa, R. A. Sousa, R. L. Reis. *Nucleation and growth of biomimetic apatite layers on 3D plotted biodegradable polymeric scaffolds. effect of static and dynamic coating conditions*. ActaBiomaterialia 5 (2009) 1626-1638
211. Y. Stevens, A. Yang, B. Mohandas, S. Stucker, K.T. Nguyen. *A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues*. J Biomed Mater Res B ApplBiomater. 2008 May; 85(2):573-82.

212. <http://www.ebioscience.com/application/elisa.htm>
213. C. Yeo, N. Saunders, D. Locca, A. Flett, M. Preston, P. Brookman, B. Davy, A. Mathur, S. Agrawal. *Ficoll-Paque versus Lymphoprep: A comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations*. Regen. Med. 4, 689–696 (2009).
214. A. E. Loisel, L. Wei, M. Faryad, E.M. Paul, G. S. Lewis, J. Gao, A. Lakhtakia, H. J. Donahue,. *Specific biomimetic hydroxyapatite nanotopographies enhance osteoblastic differentiation and bone graft osteointegration*. Tissue engineering: Part A, Volume 19, Numbers 15 and 16, 2013.
215. L.L. Hench. *Bioceramics*. J. Am. Ceram. Soc. 81 (7) 1705-28 (1998).
216. Y.F. Feng, L. Wang, X. Li, Z.S. Ma, Y. Zhang, Z.Y. Zhang, W. Lei. *Influence of architecture of β -tricalcium phosphate scaffolds on biological performance in repairing segmental bone defects*. Plos One, Nov. 2012, Vol 7, issue 11, e49955.
217. A. A. Appel, M. A. Anastasio, J. C. Larson, Eric M. Brey. *Imaging challenges in biomaterials and tissue engineering*. Biomaterials 34 (2013) 6615-6630.
218. http://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Soluci%C3%B3n-de-Papanicolaou-1a-soluci%C3%B3n-de-hematoxilina-seg%C3%BAAn-Harris,MDA_CHEM-109253#anchor_PI
219. <http://www.newcomersupply.com/sds.php>
220. Q. Liu, L. Cen, S. Yin, L. Chen, G. Liu, J. Chang. *A comparative study of proliferation and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cell on akemanite and beta-TCP ceramics*. Biomaterials 29, 4792, 2008.
221. J. A. Killion, S. Kehoe, L. M. Geever, D. M. Devine, E. Sheehan, D. Boyd, C. L. Higginbotham. *Hydrogel/bioactive glass composites for bone regeneration applications: Synthesis and characterization*. Materials Science and Engineering C 33 (2013) 4203–4212.
222. <https://es.wikipedia.org/wiki/Bentonita>





VII. Anexos.



Congresos asistidos como oyente:

- 2014 Materials Research Society Spring Meeting & Exhibit en San Francisco. 21-25/4/2014.
- 2013 Materials Research Society Spring Meeting & Exhibit en San Francisco. 1-5/4/2013.
- American Ceramic Society Winter School en Orlando. 22-25/1/2016.
- Ceramic Material in building heritage: Conservation Problems and intervention en Madrid. 29-30/6/2016.

Comunicaciones orales:

**Biomateriales
cerámicos
ultraporosos para
ingeniería de
tejidos óseos**

BERKELEY LAB
Lawrence Berkeley National Laboratory

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ICG INSTITUTO DE
CERÁMICA
DE GALICIA

David Don López


Prof. **Antoni P. Tomsia**
Prof. **Francisco
Guitián**

Fundación
Pedro Barrié de la Maza

III Encontro Mocidade Investigadora 26/3/2015

Presentación realizada durante el III Encontro da Mocidade Investigadora, en Santiago de Compostela (España), organizado por la Universidade de Santiago de Compostela, el día 26 de marzo de 2015.

3D high porous BioGlass 45S5 non crystallized bone tissue scaffolds assembled with natural silk



BERKELEY LAB
Lawrence Berkeley National Laboratory

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA


ICG INSTITUTO DE CERÁMICA DE GALICIA

David Don López

14th INTERNATIONAL CONFERENCE
European Ceramic Society
Toledo, 23/6/2015

Presentación realizada durante el 14º International Conference, en Toledo (España), organizado por la European Ceramic Society, el día de 23 de junio de 2015.

3D high porous BioGlass 45S5 non crystallized bone tissue scaffolds assembled with natural silk



BERKELEY LAB
Lawrence Berkeley National Laboratory

David Don López

Prof. Antoni P. Tomsia
Prof. Francisco Guitián

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ICG INSTITUTO DE CERÁMICA DE GALICIA

Santiago de Compostela, 15/10/2015

Presentación realizada durante el Biobone Symposium, en Santiago de Compostela (España), organizado por Biobone (Bioceramics for Bone repair), el día 15 de octubre de 2015.

**Composites para
regeneración de
tejidos óseo:
biovidrio con
seda**



BERKELEY LAB
Lawrence Berkeley National Laboratory

David Don López
Prof. Antoni P. Tomsia
Prof. Francisco Guifián



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



ICG INSTITUTO DE
CERÁMICA
DE GALICIA

Santiago de Compostela, 10/6/2016

Presentación realizada durante el IV Encontro da Mocidade Investigadora, en Santiago de Compostela (España), organizado por la Universidade de Santiago de Compostela, el día 10 de junio de 2016.

David Don López,^{a,b} Francisco Guitián,^a Jaime Franco,^a Ramiro Couceiro,^a Antoni P. Tomsia,^b

^a: Instituto de Cerámica de Galicia, Universidade de Santiago de Compostela, Spain.

^b: Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, California, USA.

Introduction

A new composite material made by the two most widely used bone graft substitutes components, bioactive glass (BG) and biphasic calcium phosphate (BCP): hydroxyapatite (HA) with beta tricalcium phosphate (β -TCP), has been used to create 3D high-porous composite scaffolds for bone tissue regeneration. The technique used to create the new bio ceramic scaffolds was the freeze casting, based in the controllable freezing process of a water based ceramic suspension that creates a lamellar structure with a high connected porosity. This new kind of composite scaffolds is expected to create a dual modal scaffold with controlled degradation. Meanwhile the BG dissolves much faster with a later precipitation as HA, the HA/ β -TCP will remain as a stable base for cell colonization meanwhile the BG stimulates the growing and spreading of the cell bones. A study of this new composite has been done at different BCP:BG 1393 ratios. Thermal consolidation was optimized for different compositions and all the resulting scaffolds were thoroughly characterized and tested mechanically. The obtained samples were In Vitro tested by immersing them in simulated body fluid (SBF) into a static system at body temperature.

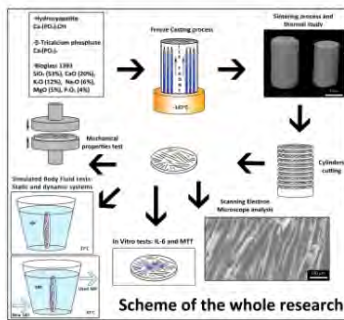
Materials and methods

1. Materials.

The scaffolds were prepared with three ceramic components:

- Bioactive glass 1393 (SiO₂ [53%], CaO [20%], K₂O [12%], Na₂O [6%], MgO [5%], P₂O₅ [4%])
- Hydroxyapatite (Ca₅(PO₄)₃OH)
- Beta tricalcium phosphate (Ca₃(PO₄)₂).

There were obtained different BG 1393 concentrations in the HA/TCP mixture: 0% (pure HA/TCP), 10%, 30%, 50%, 70%, 90% and 100% (pure BG 1393).



2. Freeze Casting.

Appropriate amounts of BG 1393, HA and TCP were mixed with binder, dispersant and lubricant, obtaining an aqul solution with 20% of ceramic content. This ceramic solution was homogenized and poured into teflon molds. At the bottom of the mold there was a cold copper finger with controlled temperature that takes the solution from room temperature to -147°C at a cooling rate of 5°C/min. When the water is freezing it expels the ceramic particles creating a lamellar structure. When the ice is sublimated the ceramic structure is left with high porosity and good mechanical properties.

3. Sintering process and thermal study.

Meanwhile the BG 1393 melts at 700°C, the mixture HA/TCP (60/40) needs temperatures above 1100°C to get sinterized. This made complicated to find the proper sintering temperature for each BG concentration. All the materials were characterized in a X-RAY diffractometer in order to discard any chemical or structure transformation due to the thermal process. It was needed mechanical and SEM tests to find each optimized temperature.

4. Mechanical properties tests.

The cylindrical scaffolds were cut into 4 mm height discs and tested in a single column tabletop system, compressing them until fatal break.

5. Scanning Electron Microscope Analysis.

The same discs were analyzed through an SEM in order to measure the channels of the lamellar structure.

6. Simulated Body Fluid Dynamic and Static test.

In order to study the dissolution process of the scaffolds, they were soaked into SBF in two different ways. The static one, used for many other authors consist in submerge the samples into a closed flask full of SBF at body temperature and wait a determined time. The second way, the dynamic method, introduces 1 liter of fresh SBF into the system per week, at the same rate than the used SBF is removed from the system.

7. In Vitro tests.

Two different In Vitro tests were carried out to find out the biocompatibility of the samples. 50% BG 1393 concentration and pure HA/TCP were used, taking into account that the last one has already been tried many times before. In one hand the Interleukin 6 (IL-6) test measures the inflammation of the tissue. IL-6 is secreted by T cells and macrophages to stimulate immune response in a tissue damage leading to inflammation. In addition, osteoblasts secrete IL-6 to stimulate osteoclast formation.

Results and discussion

After creating the scaffolds through the freeze-casting method the samples were sinterized in the oven. In order to obtain the optimized sintering temperature for each BG 1393 concentration, all the scaffolds were studied at different temperatures after a dilatometer test. Then a mechanical and SEM study were carried out to obtain the best mechanical properties and good lamellar structure inside of the scaffold.

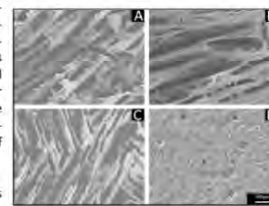


Fig. 1 shows three good lamellar structures and a blocked one because of too high sintering temperature.

Fig. 1: SEM scaffolds images for: A) 50% BG 1393 at 1000°C; B) 70% BG 1393 at 850°C; C) 90% BG 1393 at 650°C; D) pure BG 1393 at 700°C. The scale bar is 100 µm for all the images.

Reference	BG 1393 wt. Concentration						
	0% BG 1393	10%	30%	50%	70%	90%	100% BG 1393
Porosity (%)	12.07	12.01	12.05	12.05	12.07	12.07	12.07
Thermal Exp.	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Channel size	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Work Load	15.1	15.0	15.1	15.1	15.1	15.1	15.1
Thermal shock	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Water Load	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Channel width	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Water Load	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Thermal Exp.	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Water Load	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Thermal Exp.	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Water Load	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Thermal Exp.	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0
Water Load	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0	10.111.0

Fig. 2: Physical properties obtained for each BG1393 concentration in the scaffolds.

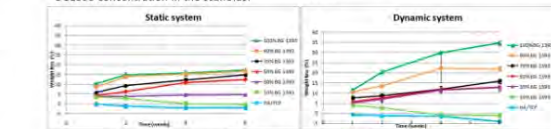


Fig. 3: Scaffolds weight percentage loss for different BG 1393 concentrations in the scaffolds at different times

Finally the IL-6 and MTT studies showed the biocompatibility of the material (Fig. 4).

Conclusions

After creating composite scaffolds of HA/TCP + BG 1393 through the freeze casting technique and characterize the obtained samples we can conclude:

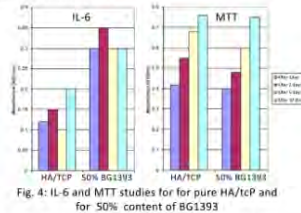


Fig. 4: IL-6 and MTT studies for pure HA/Tcp and for 50% content of BG1393


-It is possible to create a composite of both materials with different sintering temperatures. The obtained scaffolds have good physical properties (porosity, mechanical strength, lamellar structure, thermal stability), biocompatibility and fast dissolution rate. This dissolution rate increase as the BG 1393 content does.

-There is a difference using a static and a dynamic system in order to evaluate the dissolution rate in SBF.

References

1. S. Deville, E. Saiz, A.P. Tomsia. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27 (2006) 5480-5489.
2. S. Kapoor, U. Batre. Preparation and bioactivity evaluation of bone like hidroxiapatite-bioglass composite. *Int. J. Chem. and Bio. Eng.* 3:1 2010, 24-28.



- 
- **Aplicaciones dentales de vidrio bioactivo nanoestructurado**
 - **Percepción social sobre nanotecnología en Cuba**
 - **Nanomateriales magnéticos para la remoción de arsénico del agua para consumo humano**
 - **Nanotecnologías, tierras raras y ética: la defensa por un giro ético**



**Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria
en Nanociencias y Nanotecnología**

DIRECTORIO

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. José Narro Robles

Rector

Dr. Eduardo Bárzana García

Secretario General

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Coordinador de la Investigación Científica

Dr. Estela Morales Campos

Coordinadora de Humanidades

Mtro. Juan Manuel Romero Ortega

Coordinador de Innovación y Desarrollo

Dra. Norma Blazquez Graf

Directora del CEIICH

Dr. Sergio Fuentes Moyado

Director CNYN

Dr. José Saniger Blesa

Director CCADET

Mundo Nano

Editores

Dr. Gian Carlo Delgado Ramos • giandelgado@unam.mx

Dr. Noboru Takeuchi Tan • takeuchi@cnyun.unam.mx

Editor Asociado

M. en C. Rogelio López Torres • mrlt@unam.mx

Comité Editorial

Física (teoría)

Dr. Sergio Ulloa • ulloa@ohio.edu

(Departamento de Física y Astronomía,
Universidad de Ohio. Estados Unidos)

Dr. Luis Mochán Backal • mochan@em.fis.unam.mx

(Instituto de Ciencias Físicas, UNAM. México)

Física (experimental)

Dr. Isaac Hernández Calderón •

Isaac.Hernandez@fis.cinvestav.mx

(Departamento de Física, Cinvestav. México)

Ingeniería

Dr. Sergio Alcocer Martínez de Castro

• SALcocerM@ingen.unam.mx

(Instituto de Ingeniería, UNAM. México)

Microscopía

Dr. Miguel José Yacamán • miguel.yacamán@utsa.edu

(Departamento de Ingeniería Química,
Universidad de Texas en Austin, Estados Unidos)

Catálisis

Dra. Gabriela Díaz Guerrero • diaz@fisica.unam.mx

(Instituto de Física, UNAM. México)

Materiales

Dr. Roberto Escudero Derat • escu@servidor.unam.mx

(Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM. México)

Dr. José Saniger Blesa • jose.saniger@ccadet.unam.mx

(Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM.

México)

Dr. Pedro Serena Domingo, Instituto de Ciencia de Materiales

de Madrid-CSIC (España)

Ciencia, tecnología y sociedad

Dr. Louis Lemkow • Louis.Lemkow@uab.es

(Instituto de Ciencia y Tecnología Ambiental,

Universidad Autónoma de Barcelona. España)

Dra. Sofía Liberman Shkolnikoff (Psicología-UNAM, México)

Ciencia, tecnología y género

Dra. Norma Blazquez Graf • blazquez@servidor.unam.mx

(Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y
Humanidades, UNAM. México)

Filosofía de la ciencia

Dr. León Olivé Morett • olive@servidor.unam.mx

(Instituto de Investigaciones Filosóficas, UNAM. México)

Complejidad de las ciencias

Dr. José Antonio Amozurrutia • amoz@labcomplex.net

(Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y
Humanidades, UNAM. México)

Dr. Ricardo Mansilla Corona • mansy@servidor.unam.mx

(Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y
Humanidades, UNAM. México)

Medio ambiente, ciencia y tecnología

Dra. Elena Álvarez-Buyllá • eabaylla@gmail.com

(Instituto de Ecología, UNAM. México)

Aspectos éticos, sociales y ambientales

de la nanociencia y la nanotecnología

Dra. Fern Wickson (Genøk Center for Biosafety

Tromsø, Noruega)

Dr. Roger Strand • roger.strand@svt.uib.no

(Centro para el Estudio de las Ciencias y la Humanidades,

Universidad de Bergen. Noruega)

Dr. Paulo Martins • marpaulo@ipt.br

(Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de

São Paulo, Brasil)

Mtra. Kamilla Kjolberg • kamilla.kjolberg@svt.uib.no

(Centro para el Estudio de las Ciencias y la Humanidades,

Universidad de Bergen. Noruega)

Divulgación

Dra. Julia Tagueña Parga, CIE-UNAM (México)

Dr. Aquiles Negrete Yankelevich, CEIICH-UNAM (México)

Dr. Joaquín Tutor Sánchez, ETSI-ICAI, Universidad Pontificia

Comillas (España)

Cuidado de la edición: Concepción Alida Casale Núñez

Número financiado parcialmente por el proyecto PAPIME de la DGAPA-UNAM No. PE100313 y por el proyecto No. 190607 del CONACyT
www.mundonano.unam.mx



Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología, Vol. 6, No. 11, julio-diciembre 2013, es una publicación semestral editada por la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México, 04510, D. F., a través del Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, el Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades y el Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Ciudad Universitaria, Torre II de Humanidades, 4º piso, Circuito Interior, Delegación Coyoacán, México, 04510, D. F., correo-e: mundonanounam@gmail.com, editores responsables: Gian Carlo Delgado Ramos

y Noboru Takeuchi Tan. Certificado de Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2009-010713303600-102, ISSN 2007-5979, Certificado de Licitud de Título y Contenido: No. 15689, otorgado por la Comisión Calificadora de Publicaciones y Revistas Ilustradas de la Secretaría de Gobernación. Impresa por Solar, Servicios Editoriales, S. A. de C. V., Calle 2 No. 21, Col. San Pedro de los Pinos, México, 03800, D. F. Este número se terminó de imprimir en offset en diciembre de 2013 con un tiraje de 500 ejemplares en papel couché de 90 g. para los interiores y de 300 g. para los forros.

Prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin la previa autorización de los editores.

CONTENIDO

4 EDITORIAL

5 NOTICIAS

- 5 Computadoras con nanotubos de carbono
- 6 'Colesterol bueno artificial'. Podrían tratar enfermedades cardiovasculares
- 7 Computación con ADN
- 8 Transporte eléctrico en campos eléctricos y temperaturas altas en grafeno suspendido
- 8 Contacto eléctrico unidimensional en un material bidimensional
- 9 Nueva arma contra las superbacterias
- 9 Vidrio de grosor atómico
- 10 Descubren nueva nanopartícula con forma de pelota puntiaguda
- 11 Extrayendo energía de la luz
- 11 Nanotecnología y la ciudad de conocimiento Yachay (Ecuador)
- 12 Base de datos sobre nanotoxicología de la Unión Europea

13 ARTÍCULOS

- 13 Nuevas aplicaciones dentales de vidrio bioactivo nanoestructurado y sus composites
David Don López, Alessandro Polini, Hao Bai, Antoni P. Tomsia
- 29 Observación de capas de grafeno mediante contraste óptico y dispersión Raman
Claudia Bautista Flores, Roberto Ysacc Sato Berrú, Doroteo Mendoza López
- 40 Influencia de las nanopartículas de sílice en polímeros termoplásticos
Dr. José Vega Baudrit, Dr. José Miguel Martín Martínez, Quim. Melissa Camacho Elizondo

- 52 Percepción social sobre nanotecnologías en Cuba: Realidades y desafíos
Ariannis Tomasa Alcazar Quiñones
- 76 Uso de nanomateriales magnéticos para la remoción de arsénico del agua para consumo humano
Barrientos J.E., Matutes A. J.
- 85 Nanotecnologías, tierras raras y ética: la defensa por un giro ético
Fanny Verrax

96 LIBROS E INFORMES

- 96 *Ja nanociencia jits ja nanotecnología, Ja timy mutskpikta'akyjenyimatya'aky.* Takeuchi, Noboru; Gallardo Vázquez, Julio César y Díaz Robles, Tonantzin Indira. Ciencia Pumita. UNAM. México. 2013
- 97 *Nanotechnology: The Whole Story.* Rogers, Ben; Adams, Jess y Pennathur, Sumita. CRC Press. EUA. 2013
- 98 *Nanotechnology Safety.* Asmatulu, Ramazan. Elsevier. EUA. 2013
- 99 *Nanotechnology in the Agri-Food Sector.* Frewer, Lynn; Norde, Willem; Fischer, Arnout y Kampers, Frans. (eds.). Wiley. 2011
- 100 *Nanotechnology Risk Encyclopedia: Medical, Environmental, Ethical, Legal and Societal Implications of Nanomaterials.* Report of the National Nanotechnology Initiative Workshop. EPA/NIH/FDA. 2013

102 INSTRUCTIVO PARA AUTORES

103 EVENTOS

Correspondencia:

Mundo Nano. Centro de Investigaciones Interdisciplinarias en Ciencias y Humanidades, Torre II de Humanidades, 4° piso, Ciudad Universitaria, México, 04510, D. F., México.
Correo-e: mundonanonam@gmail.com

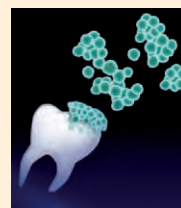


Ilustración de Angeles Alegre Schettino.

Nuevas aplicaciones dentales de vidrio bioactivo nanoestructurado y sus composites*

DAVID DON LÓPEZ,** ALESSANDRO POLINI,**
HAO BAI,** ANTONI P. TOMSIA**

RESUMEN: Para la mejora de los tratamientos de traumas dentales u óseos y diferentes enfermedades, como pueden ser la osteoporosis, el cáncer o distintas infecciones, los científicos se esfuerzan en colaborar conjuntamente con médicos para poder diseñar y probar nuevos biomateriales para la regeneración del tejido perdido o dañado. Desarrollado hace más de 50 años, el vidrio bioactivo (BG, por sus siglas en inglés) empieza a ser recientemente uno de los biomateriales más prometedores del panorama científico, como consecuencia del descubrimiento de inusuales propiedades que provocan respuestas biológicas específicas en el cuerpo. Entre estas importantes propiedades está la capacidad del BG de formar fuertes interacciones, tanto con tejidos blandos como con los duros, así como el proceso de liberación de iones en la disolución. Desarrollos recientes en nanotecnología han introducido nuevas oportunidades para la ciencia de materiales, aplicados a terapias dentales y óseas de diferentes tipos. Por ejemplo, las aplicaciones para el BG se expanden a medida que es posible controlar con mayor precisión las estructuras producidas con él y las propiedades fisicoquímicas del propio material a nivel molecular. En la presente publicación se hace un estudio de cómo las propiedades de estos materiales han sido mejoradas con la llegada de la nanotecnología, y cómo estos avances están produciendo resultados realmente prometedores en la regeneración de tejido duro y el desarrollo del innovador sistema de liberación de medicamentos basado en el BG.

PALABAS CLAVE: vidrio bioactivo, biomateriales, regeneración de tejido duro.

ABSTRACT: In order to achieve the improvement of dental and bone treatments for different kind of trauma or diseases, e.g., osteoporosis, cancer or infections, material scientists are joining their efforts and working together with clinicians towards the development of new biomaterials. Developed more than 50 years ago, bioactive glass (BG) has recently gained attention and is considered promising biomaterial in the scientific scene, thanks to the discovery of its unusual properties that promote biological responses inside of the human body. Among their important properties, the BG is able to form strong interactions with both soft and hard tissue, also due to the release of ions upon dissolution. In material science, the last developments in nanotechnology have showed new opportunities and directions in several application fields, including for dental and bone therapies. For example, new applications for BG are available as more control on the structures and physicochemical properties of materials at the molecular level is possible. Here, we summarize how these material properties have been improved by the use of nanotechnology, and how these developments are leading to really promising results in the field of hard-tissue regeneration and in the progress of innovative drug delivery systems based on BG.

KEY WORDS: bioactive glass, biomaterials, hard-tissue regeneration.

* Este trabajo ha sido financiado por los National Institutes for Health and Dental and Craniofacial Research (NIH/NIDCR), con la beca número 1R01DE015633.

** Materials Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720.
Correo-e de Alessandro Polini: (apolini@lbl.gov).

INTRODUCCIÓN

En los tratamientos de traumas o de enfermedades dentales u óseas, como puede ser la osteoporosis, el cáncer o diferentes tipos de infecciones, los materiales sintéticos biocompatibles son habitualmente utilizados para remplazar los tejidos dañados. Sin embargo, este tipo de materiales no suelen tener propiedades químicas, biológicas o físicas lo suficientemente similares al tejido original, provocando problemas y, en ocasiones, la necesidad de retratamiento para poder arreglar la situación. Para llegar al objetivo de la completa recuperación del paciente es esencial desarrollar nuevos materiales activos que sean capaces de interactuar con los tejidos circundantes, mejorando y dirigiendo la completa recuperación del tejido.

Para conseguir este objetivo, diferentes grupos científicos de investigación en el área de la ciencia de materiales están focalizando sus esfuerzos en el vidrio bioactivo (BG, por sus siglas en inglés) y otro tipo de composites con BG. Los BGs son materiales con capacidad de inducir respuestas biológicas específicas después de su implantación [1]. Concretamente, esta bioactividad es conseguida gracias a la formación en su superficie de capas de hidroxiapatita (HA), capaz de establecer fuertes enlaces tanto con el tejido blando como con el duro, y libera iones después de disolverse [2]. Además, los avances técnicos en el procesamiento del BG han desembocado en el desarrollo de vidrios bioactivos mesoporosos (MBG), materiales que extienden el potencial del BG hacia el diseño de sistemas innovadores para la liberación de medicamentos [3].

Estudios recientes han demostrado también que las herramientas de la nanotecnología pueden ser utilizadas para mejorar el funcionamiento de los materiales actualmente utilizados para tratar problemas con el crecimiento óseo o para solucionar diferentes problemas dentales [4-6]. Estas nuevas técnicas, las cuales tienen en cuenta la compleja y jerárquica estructura de los dientes y los huesos, pueden imitar la nanoestructura original de los tejidos humanos y así desarrollar nuevos implantes que podrían ser cuidadosamente diseñados a diferentes escalas [7]. Mientras tanto, la aplicación de la nanotecnología para tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de los sistemas biológicos (recientemente nombrada como “nanomedicina” por el Instituto Nacional de Salud estadounidense, el NIH) ofrece una oportunidad única para un verdadero diseño racional y una liberación de medicamentos focalizada, minimizando los efectos adversos para los tejidos adyacentes [8].

Aquí se muestra cómo la nanotecnología puede ser aplicada para modificar y mejorar los materiales de BG. Después de un pequeño resumen de las principales propiedades del BG y de un estudio de la relación entre la composición y la bioactividad, se describirán los últimos avances y estudios en el uso de materiales nanoestructurados con presencia de BG para la regeneración de tejido duro y el desarrollo de sistemas con liberación de medicamentos.

VIDRIO BIOACTIVO

El BG puede ser formado usando dos métodos diferentes. Por un lado, el tradicional fundido–enfriado, utilizado para aplicaciones comerciales del BG, en donde se emplean temperaturas superiores a 1,300 °C para fundir todos los óxidos en un crisol de platino, mientras que barras o monolitos de grafito o agua son utilizados para el en-

friamiento. Por otro lado, el método más moderno desarrollado se basa en el sol-gel, una síntesis química en la que se emplean precursores de sílice para formar y aglomerar nanopartículas (NPs) dentro de un gel a temperatura ambiente [9]. El vidrio es formado después de secar y calentar este gel, que es una red húmeda y orgánica de enlaces covalentes de sílice. Una diferencia notable entre los vidrios obtenidos a partir de estos métodos es la presencia de nanoporosidad empleando la técnica sol-gel, lo cual conlleva a un aumento de la superficie específica y mejora la respuesta celular al material [10]. Las composiciones obtenidas a través del método sol-gel muestran menos componentes porque algunos óxidos, como el Na_2O , muy comúnmente utilizado en el proceso de fundido-enfriado para mejorar el proceso disminuyendo la temperatura del punto de fusión de la mezcla, no son necesarios para este método. Más detalles pueden ser encontrados en los últimos estudios [2,11,12].

Los MBGs altamente ordenados son comúnmente sintetizados a través del método sol-gel por medio de bloques de polímeros no iónicos, que son utilizados para dirigir la formación de la estructura durante el proceso de auto ensamblaje que se produce al inducir la evaporación del agua del gel [3]. A pesar de que los BGs convencionales muestran una estructura mesoporosa debido a la distribución aleatoria de CaO dentro de la red de SiO_2 , el auto ensamblaje de los surfactantes en el MBGs conlleva la uniformización de los mesoporos, con tamaños entre 2 y 50 nm así como estructuras ordenadas. Además del control sobre la composición del MBG, este proceso de auto ensamblaje ofrece la oportunidad de establecer el tamaño de poro y la estructura final [3]. Cuando es comparado con la arquitectura del BG no mesoporoso, el incremento de la superficie específica en la estructura del MBG otorga mejores cualidades, tanto *in vivo* como *in vitro*, como la bioactividad, la degradación y las propiedades de liberación de fármacos [13,14].

ESTRUCTURA ATÓMICA DEL BG

La bioactividad de los materiales basados en el BG, que se mineralizan y forman capas de hidroxicarbonato de apatito (HCA), depende del control preciso de la composición y de la estructura atómica del vidrio, así como de las propiedades osteogénicas, angiogénicas y bactericidas de sus disoluciones. La estructura atómica de los vidrios de sílice está determinada por las propiedades electrónicas de los átomos de silicio que, al ser combinados con átomos de oxígeno, forman tetraedros conectados por medio de enlaces de oxígeno de la manera Si-O-Si [15]. Los cationes que modifican esta red (como el sodio o el calcio) pueden interrumpir la estructura estableciendo otro tipo de enlaces. En general, los BGs con un alto contenido en sílice tienen redes mejor interconectadas, lo cual conlleva a una disolución y una bioactividad más lenta. Además del uso de cationes para modificar la estructura atómica, la adición de fósforo puede inducir la repolimerización de la red de silicatos, produciendo efectos similares a la extracción de cationes, contrarrestando las cargas e induciendo una distribución heterogénea de ellos [16].

Un parámetro importante para la predicción de la bioactividad de un vidrio es la conectividad de la red, N_c , ésta indica el número de enlaces por átomo de silicio. Vidrios con valores de N_c mayores que 2.6 no son propensos a ser bioactivos, pues poseen una gran resistencia a disolverse [17]. En los vidrios sol-gel el valor de N_c es, generalmente, menor que el calculado a partir de la composición nominal debido a la

presencia de grupos hidroxilos en su composición [2]. A pesar de que el proceso de secado elimina la mayoría de los grupos $-OH$ provocando una mayor formación de enlaces O-Si-O, algunos permanecen atrapados en la red, reduciendo su conectividad.

BIOACTIVIDAD DEL BG: FORMACIÓN DE HCA

La capacidad del BG de adherirse al hueso es atribuida a diferentes procesos, como la formación de una capa de HCA capaz de interactuar fuertemente con las fibras de colágeno o con el propio hueso dañado, la absorción de proteínas, la incorporación de moléculas de colágeno y la inducción de diferenciación y adhesión de los osteoblastos [18]. La capa de HCA es formada como resultado de varias reacciones en la superficie del BG de la siguiente manera [19]: (1) incremento del pH debido a un rápido intercambio iónico entre los cationes de la propia estructura con H^+ de la solución, lo cual conlleva a una hidrólisis de los grupos de sílice y la creación de grupos de silanol (Si-OH); (2) el incremento de pH provoca el ataque de los iones OH^- a la estructura vítrea de SiO_2 , rompiendo los enlaces Si-O-Si; (3) la condensación y polimerización de una capa de 1-2 μm de SiO_2 amorfo exento de Na^+ y Ca^{2+} ; (4) fomento de la disolución del vidrio y migración del Ca^{2+} y del $(PO_4)^{3-}$ hacia la capa de SiO_2 amorfo, creando una capa de fosfato cálcico amorfo (ACP); y (5) a medida que el vidrio se va disolviendo, la capa de ACP integra los iones $(OH)^-$ y $(CO_3)^{2-}$ desde la disolución y cristaliza como una capa de HCA.

BIOACTIVIDAD DEL BG: PRODUCTOS DE LA DISOLUCIÓN IÓNICA

Los primeros estudios sobre las propiedades biológicas de los productos de la disolución iónica procedentes del BG se han centrado en el Si, Ca y P, y muestran cómo estos materiales pueden modificar la expresión génica de diferentes genes en células del tipo osteoblastos [20]. De esta manera, otros efectos han sido investigados, tanto *in vitro* como *in vivo*, haciendo especial hincapié en factores como la angiogénesis, la actividad bactericida y el proceso inflamatorio. Más adelante, los últimos estudios en este campo serán revisados para describir tales efectos (para ejemplos adicionales consultar [21]).

Estructuras macroporosas de MBG dopadas con Mg, Zn o Sr son producidas por medio de moldes de espuma de polímeros [22]. Como se ha demostrado con los estudios *in vivo* usando células mesenquimales de médula de hueso de rata (rBMSCs), esta adición introduce efectos no citotóxicos, con una liberación sostenida de Ca, P, Si, Mg, Zn y Sr desde las piezas hacia el medio de cultivo, favoreciendo la proliferación celular y la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP). En otro estudio, la liberación de B por medio de piezas de MBG funcionalizados con dexametasona bórica (DEX) conllevan un incremento de la actividad de la ALP y de la expresión de genes osteogénicos sinérgicamente con la liberación de DEX [23]. Las estructuras de MBG dopadas con Fe magnético, muy útiles como plataforma hipertérmica en el tratamiento de tumores óseos malignos, han sido desarrollados e investigados *in vitro*, mostrando una mejora en la actividad mitocondrial, así como en las expresiones génicas óseas (ALP y osteocalcina) en BMSCs humanos (hBMSCs) [24]. El incremento de la adhesión y de la viabilidad de los hBMSCs también es conseguido por medio de estructuras dopadas con Zr;

las cuales muestran una mayor resistencia a la compresión y menor solubilidad al ser comparadas con estructuras no dopadas, mientras que la capacidad de formar apatito se mantiene [25]. Un interesante y reciente estudio reporta que la introducción de Co en las piezas de MBG produce la inducción a un medio hipóxico para mejorar la angiogénesis a través de la secreción de mayores cantidades del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor 1α que induce a la hipoxia y expresiones génicas óseas de hBMSCs [26]. Resultados similares pueden ser logrados con la incorporación de Cu en piezas de MBG [27]. La introducción de Li en los implantes de MBG tiene un efecto específico en la formación del cemento dental, el tejido mineral producido por los cementoblastos durante la formación de la raíz dental. El cemento dental es el responsable de la unión del ligamento periodontal a las raíces y rodear el hueso alveolar influenciando la proliferación y la diferenciación cementogénica de las células derivadas del ligamento periodontal humano [28].

Además de los estudios de los efectos específicos del BG y el MBG en la regeneración ósea y la angiogénesis, varios artículos se han centrado en las propiedades bactericidas de los materiales BG, resultantes de su disolución y la liberación de iones al medio, para el tratamiento o prevención de infecciones periodontales [21,29]. Por ejemplo, partículas de BG dopadas con Ag_2O pueden ser sintetizadas por medio del método sol-gel y usadas no sólo como bacteriostático, sino también como material bactericida [30]. Estas propiedades antibacterianas son probablemente debidas a la lixiviación de los iones de plata desde la matriz vítrea y su acumulación por las bacterias, donde interfieren con diferentes mecanismos celulares que todavía no han sido completamente entendidos [30]. El-Kady y demás produjeron NPs de BG dopadas con Ag_2O mostrando una liberación continuada de iones de plata durante dos semanas, capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

REGENERACIÓN DE TEJIDOS DUROS

Los huesos y los dientes son órganos extremadamente complejos con una combinación de diferentes tejidos duros (hueso trabecular y compacto, esmalte dental, dentina o el cemento dental) y tejidos blandos (médula ósea, pulpa dental o el ligamento periodontal) en una estructura jerárquica única, donde la nano y la mesoescala son igual de importantes, con una gran combinación de fenómenos complejos como las interacciones biomoleculares, el intercambio de nutrientes o el transporte de fluidos. Autoinjertos, alotransplantes y xenotransplantes han sido utilizados como sustitutos óseos cuando el proceso de recuperación o remodelado biológico no era capaz de curar los defectos óseos causados por diferentes traumas, extracciones tumorales y distintas enfermedades congénitas. Para poder evitar las limitaciones que cada uno de estos tejidos de los diferentes donantes tienen, biomateriales como metales, polímeros y composites están siendo utilizados desde los años 50 [32]. Biomateriales de tercera generación, disponibles en forma de polvo, soluciones o partículas están actualmente siendo investigados con el objetivo de promover la rápida regeneración del tejido en el paciente [18].

Como ha sido descrito en la sección anterior, el BG es muy efectivo al provocar repuestas celulares específicas. Como resultado, estos materiales son ampliamente usados en ingeniería de tejidos duros, tanto como material aislado como fase inorgánica en composites híbridos [11, 12, 33, 34]. Recientemente, materiales nanoestruc-

turados con base de BG han sido creados con diferentes métodos de procesamiento (congelamiento unidireccional de suspensiones, *electrospinning*, procesado sol-gel, replicación de espuma polimérica, técnicas de microemulsión, o enlace térmico de partículas o fibras) en la forma de piezas tridimensionales (3D) como NPs o nanorecubrimientos, demostrando propiedades mecánicas similares y comparables a las del hueso natural [11,33]. El aumento de la superficie específica de los productos del BG nanoescalado tiene dos efectos importantes: una disolución más rápida y la consecuente liberación de iones; y una mayor adsorción proteica. Estos efectos tienen el potencial de desembocar en una mejora de la bioactividad así como en nuevas e inesperadas aplicaciones biomédicas.

BG COMO MATERIAL EN SOLITARIO

Para el tratamiento de defectos óseos de gran tamaño, es habitual el uso de moldes 3D como marco para guiar las células óseas en el proceso regenerativo con el objetivo de estimular los mecanismos de curado fisiológico dentro del cuerpo humano [35]. Este tipo de piezas suelen ser llenadas con MSCs antes de su implantación, y muestran una porosidad adecuada para permitir la formación de nuevos vasos sanguíneos, que son fundamentales para la supervivencia del hueso a regenerar. Estructuras tridimensionales con sobresalientes propiedades mecánicas (136 MPa como resistencia a la compresión, comparable a la del hueso cortical) y una alta porosidad (60%, también similar a la que presenta el hueso cortical) son fabricadas con vidrio 6P53B por medio de ensamblado directo de tinta, conservando una excelente bioactividad *in vitro* [39]. Después de la inmersión en fluido corporal simulado (SBF) durante 3 semanas, toda la pieza es recubierta por cristales de HA a nanoescala. La resistencia a la compresión desciende hasta valores de 77 MPa debido a la degradación del material, pero sus propiedades mecánicas siguen estando muy por encima del hueso trabecular, con lo que su aplicación sigue siendo plausible para el tratamiento de defectos óseos de baja carga mecánica [39,40]. La impresión 3D puede ser utilizada con suspensiones de MBG para la formación de estructuras porosas distribuidas jerárquicamente y con buena resistencia mecánica, que además preservan excelentemente la habilidad de mineralización del apatito y las propiedades de liberación sostenida de fármacos [42,50]. El congelamiento unidireccional de una suspensión de vidrio 13-93 con base de canfeno es empleada para fabricar estructuras anisotrópicas porosas en 3D con muy buenas propiedades mecánicas (47 MPa) y una alta porosidad (50%) [36]. Utilizando la técnica del moldeado de espuma de gel se producen estructuras de vidrio silicato ICIE 16, realizadas sin la cristalización del vidrio (con lo que no pierden bioactividad). El gran tamaño de poro que presentan (con una media de 379 μm) favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos, mientras que su resistencia mecánica a la compresión se reduce al mínimo del hueso trabecular (1.9 MPa) [41]. La misma técnica permite la fabricación de estructuras de silicato BG con porosidades similares (con una media de 372 μm) y con la capacidad de soportar la diferenciación de los tres diferentes tipos de células que están principalmente relacionadas con el buen desarrollo del sistema vascular óseo: macrófagos de ratón (línea celular C7), que se diferencian en osteoclastos multinucleados TRAP⁺_{ve}; preosteoblastos de ratón (MC3T3-E1), que depositan nódulos mineralizados en la superficie; y células endotélicas aórticas bovinas, que crean estructuras tubulares [51]. Recubrimientos de BG de nanotamaño están siendo es-

tudiadas por su potencial para mejorar la estabilidad de los implantes metálicos por medio del enlazamiento de éstos con el propio hueso, así se evitaría la formación de quistes fibrosos después de su implementación [52], aunque la rápida disolución del BG puede llevar a largo plazo a la inestabilidad del implante metálico.

Recientemente, la técnica de *microspinning* ha sido utilizada en un esfuerzo por imitar la arquitectura de la matriz extracelular (ECM) compuesta por haces de fibras de proteínas y glicanos de tamaños entre 100 y 500 nm. Con esta técnica, es posible producir estructuras de nanofibras de una manera rápida y controlable, permitiendo y dirigiendo a las células óseas a que proliferen y se diferencien en múltiples tipos [7, 53, 54]. Fibras de silicato BG de tamaño submicrométrico han sido producidas y sus propiedades mecánicas fueron estudiadas por medio de un nanoindentador y los resultados obtenidos muestran un relativamente alto módulo elástico (5.5 GPa), muy cerca del valor del hueso trabecular [55]. La zona hueca entre las fibras de MBG fue producida por medio del uso de una fase polimérica como núcleo del material, de fácil eliminación por incinerado durante la estabilización para dejar una entramado de puro BG [56, 57]. Nanofibras de BG 45S5 fueron también producidas por medio de tecnología láser de *spinning*, evitando el posterior tratamiento térmico o aditivos químicos para preservar su bioactividad en SBF.

Además del uso de estructuras tridimensionales, la posibilidad de utilizar gránulos o partículas para rellenar y reparar pequeños defectos de una manera rápida y controlable ha sido profundamente investigada por cirujanos ortopédicos y dentistas desde hace tiempo. Lanzado en 1993, para la reparación de defectos en la mandíbula en enfermedades periodontales, el Perioglass® (actualmente vendido por NovaBone Products LCC, Alachua, FL) fue el primer producto de BG 45S5 microparticulado que evitaba la resorción del hueso alveolar en la mandíbula después de haber sustraído un diente o para esterilizar el canal de la raíz antes de fijar nuevos implantes dentales [29]. En los últimos años esfuerzos significativos han sido dirigidos a la investigación de NP de BG producidas principalmente por medio de síntesis con llama o por medio del proceso sol-gel. El objetivo es aprovechar su extremadamente gran ratio de superficie específica por volumen, consecuencia de su estructura nanoescalada [2]. Las NPs del BG 45S5, con un tamaño medio de partícula entre 20 y 60 nm, han demostrado una gran actividad osteoblástica y una rápida transformación (después de un día) de BG a HCA nanocristalina [59]. NPs de silicato BG con diferentes tamaños medios de partículas (40-2000 nm) preservan una liberación de silicio estable y permiten la unión y proliferación de las MSCs, con NPs de tamaños entre 40-800 y 40-180 nm mostrando las mayores formaciones de apatito y las mayores velocidades de proliferación, respectivamente. NPs de BG y sus productos iónicos también han sido propuestos para la regeneración del cemento dental [60]. Es interesante la posibilidad de utilizar estas NPs de BG como nanobloques para la construcción de macroestructuras ensambladas jerárquicamente, manteniendo intactas sus propiedades bioactivas y su gran nivel de porosidad.

Disponible comercialmente desde 2004, el BG 45S5 de NovaMin® (actualmente vendido por GlaxoSmithKline, UK) fue el primer producto de BG usado en pasta de dientes para tratar la hipersensibilidad en la dentina. A diferencia de otras pastas de dientes que incorporan químicos que provocan la anestesia temporal del nervio dental para evitar el dolor, estas NPs se pueden adherir a la dentina. Estudios clínicos [62] demuestran que fomentan la formación de una capa de HCA que ocluye los conductos tubulares de la dentina ($\approx 1 \mu\text{m}$ de diámetro), permitiendo la remineralización de

la dentina y aliviando el dolor por periodos de tiempo mayores. Persiguiendo el mismo objetivo, algunos investigadores han conseguido producir silicato MBG con tamaños de partículas de 40 nm para el tratamiento de la hipersensibilidad en la dentina, obteniendo resultados con una significativa reducción de la permeabilidad en la dentina [63]. Además, como ya se ha discutido en la última parte del artículo, pequeños medicamentos y factores de crecimiento pueden ser introducidos dentro de las partículas de BG y liberadas en las células después de que éstas hayan establecido contacto con las NPs.

MATERIALES DE TIPO NANOCOMPOSITE DE BG Y POLÍMEROS

Los nanocomposites formados por BG y polímeros son unos materiales bioactivos relativamente nuevos, que combinan la bioactividad y las buenas propiedades mecánicas del BG con la gran flexibilidad y capacidad de deformación bajo cargas de los polímeros. Estas características están disponibles, principalmente, para aplicaciones como estructuras 3D o para rellenado del propio hueso [33].

Utilizando colágeno del tipo I (COL) como adhesivo imitando el componente ECM y la fosfatidilserina (PS) como material con una gran afinidad por los iones de calcio, estructuras altamente porosas de BG-COL-PS fueron fabricadas por medio de la técnica de congelado-secado y probadas *in vitro* e *in vivo* [45]. En estudios de cultivos de MSC de ratas, estas piezas trifásicas demostraron adhesión celular, crecimiento y diferenciación osteogénica mayores, comparadas con el sistema bifásico BG-COL y, a su vez, el mayor grado de curación cuando eran introducidas MSCs en defecto de fémur de rata. Además, una combinación de COL y BG en forma de NPs fue estudiada, implantada como una pieza de hidrogel mineralizable y con semillas celulares, demostrando que conservaba la estructura nanofibrilar del COL así como la bioactividad del BG [64]. Una composición de BG obtenida por medio de sol-gel puede ser sometida a *electrospinning* y combinarse con COL para producir una matriz de composite con nanofibras, obteniendo así una magnífica bioactividad *in vitro* y una alta ALP después del cultivo de células osteoblásticas [37]. Las NPs de MBG pueden ser integradas en una disolución polimérica (policaprolactona, PCL) y seguidamente ser sometidas a un proceso de *electrospinning*, consiguiéndose así una estructura nanofibrilar más bioactiva que la matriz de PCL, en términos de adhesión, crecimiento y diferenciación celular *in vitro* [65]. Piezas tridimensionales de poli(D,L-lactida) rellenas con partículas de micro y nanoescala, con una gran porosidad (81-93%) y buenos rangos de resistencia mecánica (0.4-1.6 MPa), dentro de los parámetros del hueso trabecular, han sido probadas exitosamente *in vivo* [46], éstas son piezas bien implantadas con nuevo tejido formado, y muestran una vascularización mayor que las piezas de PDLA, demostrando sus buenas propiedades osteogénicas y angiogénicas del BG.

Películas y recubrimientos de nanocomposites han sido desarrollados para mejorar las propiedades de materiales bioinertes como los metales, polímeros sintéticos o compuestos cerámicos. NPs de BG 45S5 (29 nm) fueron investigadas para preparar películas de composites poli(3-hidroxitirato) por medio de la formación de una capa uniforme de HCA, después de la inmersión en SBF, mejorando la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos humanos (MG-63) *in vitro* [44]. Una capa de nanocomposite compuesto de BG y NPs de PCL, con diferentes contenidos de BG (1-90% en peso) puede ser también aplicado sobre piezas de fosfato cálcico bifásico

para mejorar las propiedades mecánicas (resistencia a la compresión en el rango de 0.2-1.45 MPa y módulos en el rango de 19.3-49.4 MPa) y la bioactividad; incremento de la degradación; e inducir a la diferenciación osteogénica de células humanas *in vitro* [47]. En otro trabajo, sustratos de titanio puro comercial y cables Kirschner (K-wires) de acero inoxidable fueron recubiertos con nanocomposites de poli(lactida-co-glicolato)-BG-HA preparados por medio de la fundición de solvente [66]. Estos estudios *in vitro* ofrecieron unas propiedades biológicas excelentes, como biomineralización, adhesión de células madre y viabilidad. Por otra parte, no fue detectado ningún signo de fallo en la adhesión entre el recubrimiento y el sustrato después de la implantación de los K-wires recubiertos dentro de la tibia de conejo, demostrando una fuerte unión entre el nanocomposite y los materiales metálicos.

Los nanocomposites de polímeros y BG están asumiendo un papel importante como membranas barrera para aplicaciones periodontales, con el objetivo de fomentar la regeneración periodontal por medio de un bloqueo físico de la migración de células epiteliales hacia el tejido dañado [67]. NPs de BG y alginato fueron propuestas porque, en comparación con las membranas de alginato, presentaban mejores propiedades *in vitro*: poca inflamación del tejido, degradación limitada, mejor biomineralización, buena adsorción de proteínas, y buena proliferación y adhesión celular de ligamentos fibroblásticos de periodontal humano (hPDLF) [60]. La introducción de NPs de BG en membranas de quitosano disminuían sus propiedades mecánicas, pero el mismo estudio demostraba la mejora de la bioactividad, actividad metabólica y mineralización por hPDLF y hBMSC [48].

Nanocomposites híbridos de polímero y BG, con los dos componentes indistinguibles por encima de la nanoescala, fueron recientemente fabricados por medio de procesos sol-gel: por medio de la disolución de polímeros preformados dentro de una solución precursora de sol-gel o bien formando simultáneamente tanto la fase orgánica como la inorgánica, a través de la polimerización sincronizada del monómero orgánico y del precursor sol-gel [34, 68]. Dependiendo de las interacciones entre las dos fases, estos híbridos pueden ser clasificados dentro de los Tipo I, basados en conjuntos de redes, enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals; y los híbridos de Tipo II, que poseen enlaces covalentes entre fases, además de otras interacciones y que, normalmente, son sintetizados por medio de la activación del polímero a través de un agente de acoplamiento al principio [68]. Biopolímeros como la gelatina, el poli(γ -ácido glutámico) y el quitosano han sido investigados para fabricar polímeros para hacer híbridos del Tipo II con BG, mostrando un importante incremento en sus propiedades mecánicas cuando son comparados con las muestras monofásicas [49, 69, 70]. Utilizando gelatina e induciendo térmicamente a la separación de fases, pueden ser creados nanocomposites híbridos en estructuras nanofibrilares con contenido de sílice variable (0-30% peso), mostrando buenas propiedades biológicas *in vitro* en términos de biodegradabilidad estabilizada, formación de apatito y biocompatibilidad [43].

LIBERACIÓN DE FÁRMACOS

Además de las propiedades ya mencionadas del BG, se están haciendo esfuerzos científicos para explorar el potencial de liberación de fármacos que los sistemas basados en BG pueden tener. La técnica sol-gel es comúnmente empleada para producir sistemas de BG no mesoporoso y MBG para la liberación de medicamentos. Aplicaciones

futuras podrían emplear los sistemas basados en BG como portadores de cápsulas y de la liberación controlada *in situ* de las moléculas bioactivas y los fármacos [71-73]. Estas moléculas pueden ser atrapadas en la red vítrea durante su fabricación bajo condiciones suaves, al igual que por medio de la técnica sol-gel, y entonces liberadas gradualmente en la disolución de BG. Una aproximación más versátil es inmovilizar las moléculas en la superficie del vidrio remojando el material de BG en una disolución de moléculas/medicamentos [71]. En esta segunda aproximación, químicos basados en el silanol o la fisisorción son utilizados comúnmente.

SISTEMAS CONVENCIONALES DE BG

Diferentes clases de compuestos han sido estudiados para poder actuar como biomoléculas o fármacos integrables dentro de un sistema no mesoporoso de BG. El primer intento exitoso reportado fue de integración de antibióticos, la tetraciclina y la hidrocortisona, dentro de una solución sol-gel, y fue llevada a cabo a temperatura ambiente para no modificar las moléculas de los medicamentos [74, 75]. A pesar de que fue notable una liberación del 12% en las primeras 8 horas, tetraciclinas asociadas a β -ciclodextrinas seguían siendo liberadas después de 80 días *in vitro*, mientras que en los estudios *in vivo* mostraron una moderada reacción antiinflamatoria [74]. En otro estudio, la tetraciclina era incorporada con hidrocortisona. Los resultados mostraron diferentes velocidades de liberación para los dos fármacos, pero no se encontraron interacciones de velocidades de liberación de un medicamento al otro [75].

Trabajos recientes estudian la integración de proteínas morfológicas en el hueso (BMP-2 y BMP-9) así como otras proteínas usadas como modelos [57, 76, 77]. Microesferas de BG 45S5 fueron introducidas en un sistema de liberación de colágeno de base gel para BMPs [76]. Interesante, este sistema retiene más del 96% de BMP-2 después de 1 hora, mientras que una matriz de esponja de colágeno común sólo retiene el 75% después de 3 horas. Además, la versatilidad del sistema fue probada liberando otra molécula tipo BMP (BMP-9). El inhibidor de la tripsina, una molécula similar en tamaño a los BMPs, puede ser cargada dentro del BG en un proceso sol-gel de un solo paso, produciendo una liberación de dos etapas: una lenta inicial por unas horas y una segunda rápida durante semanas [77]. La BSA y la lisozima han sido introducidas satisfactoriamente como proteínas modelo en nanotubos de BG producidos por medio de electrospinning, conservando la bioactividad tanto del BG como de la lisozima [57].

SISTEMAS MBG

Las estructuras MBG están generando un especial interés para aplicaciones de liberación de fármacos, ya que su gran ordenación mesoporosa alberga una complicada red de cavidades que pueden albergar diferentes tipos de moléculas para su posterior liberación, demostrando su potencial como sistemas de liberación controlada [72, 73]. Para mejorar el control sobre los perfiles de carga y liberación es posible funcionalizar las paredes de los mesoporos con procesos basados en el silanol [78].

Los métodos de preparación son muy importantes para el control de las propiedades de los sistemas de liberación de medicamentos con base de MBG. Por ejemplo, probando diferentes compuestos como la metoclopramida o el triclosán como mo-

delos de fármacos, el uso de surfactantes (P123, F127 o CTAB) conlleva a diferentes resultados en términos de volumen de poro y área específica, ambas propiedades influyen de una manera significativa la eficiencia de carga de los medicamentos [80, 81]. La eficiencia de la carga y la velocidad de la liberación dependen de la composición de la pieza, como quedó demostrado con el perfil de liberación de la tetraciclina desde MBG con diferentes contenidos de CaO [79].

Considerando las muchas aplicaciones que podrían tener estos sistemas, pocos estudios se han centrado en las propiedades de estimulación de tejidos de las piezas 3D de MBG. En un modelo de ratón, el BMP-2 fue incorporado satisfactoriamente en una estructura macro/mesoporosa de BG dopada con Ca/Mg, mostrando mejores resultados que las piezas sin ninguna carga, refiriéndose a pruebas *in vitro* para la diferenciación osteogénica de rBMSCs e *in vivo* para la capacidad de formación de hueso ectópico [82]. Piezas de MBG que contienen boro han sido funcionalizadas con DEX, un conocido fármaco osteogénico, y analizadas *in vitro*, con resultados que muestran mayores actividades de ALP y mayores expresiones génicas de osteoblastos humanos relacionados con el proceso osteogénico (Col I, Runx2, ALP y BSP) [23]. En otro estudio, donde el VEGF era liberado desde estructuras de MBG [83], los resultados obtenidos mostraban una mejora en la viabilidad de las células endoteliales *in vitro*, lo que podría ser una buena estrategia para intentar evitar la limitada vascularización que se suele dar en el centro de los implantes ortopédicos.

La liberación sostenida de fármacos antibióticos desde estructuras de MBG ha sido extensamente investigada. Nanofibras de MBG producidas por medio de la técnica de *electrospinning* usando óxido de polietileno como agente separador de fases, mostraba unas prometedoras propiedades bioactivas y podría ser fácilmente utilizado como liberador de gentamicina [56]. Microesferas de MBG pueden ser fabricadas y empleadas para ser rellenas y, posteriormente liberar triclosán con perfiles de velocidades modificables, dependiendo del tamaño de poro, a su vez relacionado con el método de preparación utilizado [81]. La ampicilina puede ser cargada en NPs de MBG mientras se conservan sus propiedades bactericidas, y así podría ser potencialmente utilizada como desinfectante para la limpieza de las raíces en el sistema de canales en tratamientos de endodoncias [84].

Las NPs de MBG también han sido utilizadas como sistemas de liberación de genes. NPs cargadas con pequeñas moléculas de ARN pueden ser fácilmente tomadas por las células, donde son capaces de regular el gen objetivo [85]. Estos resultados validan la utilización de NPs de MBG como un nuevo nanosistema de liberación de fármacos con un gran potencial de aplicación en ingeniería de tejidos óseos.

CONCLUSIONES

Para mejorar la salud y la calidad de vida de pacientes con problemas ortopédicos o dentales, nuevas estrategias y materiales son necesarios para abordar las complejas cuestiones relacionadas con el medio dental y óseo. En este artículo, se han descrito brevemente materiales de BG nanoestructurados, resumiendo las propiedades químicas y los efectos potenciales de la disolución de productos en el comportamiento de las células. Sus aplicaciones potenciales como implantes de tejido duro y la liberación de fármacos fueron examinados con especial hincapié en la utilización del BG, tanto sólo como composite con otros componentes.

El incremento en el número de artículos relacionados con este material evidencia el interés en el BG y está en continuo crecimiento, aunque las primeras composiciones de BG fueron creadas hace más de 40 años [1]. Además de las capacidades de fuerte adhesión al hueso y su bien caracterizada bioactividad debido a su disolución y su liberación de iones, las estructuras de BG se han visto nuevamente impulsadas gracias a la fabricación de MBG en 2006. Nuevas aplicaciones para el BG son ideadas para el tratamiento de problemas dentales y óseos, como traumas, infecciones o enfermedades como el cáncer o la osteoporosis [3, 72, 73]. Combinando las oportunidades de los experimentos a diferentes escalas (nano, meso, micro y macro) puede ser la clave para el diseño de nuevos biomateriales capaces de interactuar con complejos celulares en el interior del organismo y tener así una completa y rápida recuperación del paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hench, L.L. "The story of bioglass". *J Mater Sci Mater Med*, 2006. 17(11): 967-78.
- [2] Jones, J.R. "Review of bioactive glass: From hench to hybrids". *Acta Biomater*, 2012.
- [3] Yan, X. *et al.* "Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior *in vitro* bone-forming bioactivities". *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. 43(44): 5980-4.
- [4] Tran, N. y T.J. Webster. "Nanotechnology for bone materials". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2009. 1(3): 336-351.
- [5] Tomsia, A.P. *et al.* "Nanotechnology approaches for better dental implants". *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 2011. 26(Suppl): 25-49.
- [6] Tomsia, A.P. *et al.* "Nanotechnology for dental implants". *Oral & Craniofacial Tissue Engineering*, 2012. 2(1): 23-34.
- [7] Dvir, T. *et al.* "Nanotechnological strategies for engineering complex tissues". *Nat Nanotechnol*, 2011. 6(1): 13-22.
- [8] Moghimi, S.M., A.C. Hunter, y J.C. Murray. "Nanomedicine: Current status and future prospects". *FASEB J*, 2005. 19(3): 311-30.
- [9] Li, R., A.E. Clark y L.L. Hench. "An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing". *J Appl Biomater*, 1991. 2(4): 231-9.
- [10] Sepulveda, P., J.R. Jones y L.L. Hench. "Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58S bioactive glasses". *J Biomed Mater Res*, 2001. 58(6): 734-40.
- [11] Fu, Q. *et al.* "Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives". *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2011. 31(7): 1245-1256.
- [12] Rahaman, M.N. *et al.* "Bioactive glass in tissue engineering". *Acta Biomater*, 2011. 7(6): 2355-73.
- [13] Wu, C. *et al.* "A comparative study of mesoporous glass/silk and non-mesoporous glass/silk scaffolds: physiochemistry and *in vivo* osteogenesis". *Acta Biomater*, 2011. 7(5): 2229-36.
- [14] Wu, C. *et al.* "The effect of mesoporous bioactive glass on the physiochemical, biological and drug-release properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) films". *Biomaterials*, 2009. 30(12): 2199-208.
- [15] Cormack, A.N., *The structure of bioactive glasses and their surfaces, in bio-glasses*. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. 65-74.

- [16] Mercier, C. *et al.* "Influence of P2O5 content on the structure of SiO₂-Na₂O-CaO-P2O₅ bioglasses by ²⁹Si and ³¹P MAS-NMR". *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2011. 357(24): 3901-3909.
- [17] Hill, R.G. y D.S. Brauer. "Predicting the bioactivity of glasses using the network connectivity or split network models". *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2011. 357(24): 3884-3887.
- [18] Hench, L.L. y J.M. Polak. "Third-generation biomedical materials". *Science*, 2002. 295(5557): 1014-7.
- [19] Hench, L.L. "Bioceramics". *Journal of the American Ceramic Society*, 1998. 81(7): 1705-1728.
- [20] Hench, L.L., I.D. Xynos y J.M. Polak. "Bioactive glasses for in situ tissue regeneration". *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2004. 15(4): 543-562.
- [21] Hoppe, A., N.S. Guldal y A.R. Boccaccini. "A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics". *Biomaterials*, 2011. 32(11): 2757-74.
- [22] Wang, X. *et al.* "Synthesis and characterization of hierarchically macroporous and mesoporous CaO-MO-SiO(2)-P(2)O(5) (M=Mg, Zn, Sr) bioactive glass scaffolds". *Acta Biomater*, 2011. 7(10): 3638-44.
- [23] Wu, C. *et al.* "Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds". *Biomaterials*, 2011. 32(29): 7068-78.
- [24] Wu, C. *et al.* "Multifunctional magnetic mesoporous bioactive glass scaffolds with a hierarchical pore structure". *Acta Biomater*, 2011. 7(10): 3563-72.
- [25] Zhu, Y. *et al.* "The effect of zirconium incorporation on the physicochemical and biological properties of mesoporous bioactive glasses scaffolds". *Microporous and Mesoporous Materials*, 2011. 143(2-3): 311-319.
- [26] Wu, C. *et al.* "Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering". *Biomaterials*, 2012. 33(7): 2076-85.
- [27] Wu, C. *et al.* "Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity". *Biomaterials*, 2013. 34(2): 422-33.
- [28] Han, P. *et al.* "The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/beta-catenin signalling pathway by Li⁺ ions released from bioactive scaffolds". *Biomaterials*, 2012. 33(27): 6370-9.
- [29] Hupa, L. y A. Yli-Urpo. *Dental applications of glasses, in bio-glasses*. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. 159-175.
- [30] Bellantone, M., H.D. Williams, y L.L. Hench. "Broad-spectrum bactericidal activity of Ag₂O-doped bioactive glass". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. 46(6): 1940-1945.
- [31] El-Kady, A.M. *et al.* "Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles". *Ceramics International*, 2012. 38(1): 177-188.
- [32] Navarro, M. *et al.* "Biomaterials in orthopaedics". *J R Soc Interface*, 2008. 5(27): 1137-58.
- [33] Boccaccini, A.R. *et al.* "Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review". *Composites Science and Technology*, 2010. 70(13): 1764-1776.

- [34] Valliant, E.M. y J.R. Jones. "Softening bioactive glass for bone regeneration: sol-gel hybrid materials". *Soft Matter*, 2011. 7(11): 5083.
- [35] Langer, R. y J. Vacanti. "Tissue engineering". *Science*, 1993. 260(5110): 920-926.
- [36] Fu, Q., E. Saiz, y A.P. "Tomsia, bioinspired strong and highly porous glass scaffolds". *Adv Funct Mater*, 2011. 21(6): 1058-1063.
- [37] Fu, Q., E. Saiz, y A.P. Tomsia. "Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration". *Acta Biomater*, 2011. 7(10): 3547-54.
- [38] Garcia, A. *et al.* "Preparation of 3-D scaffolds in the SiO₂-P₂O₅ system with tailored hierarchical meso-macroporosity". *Acta Biomater*, 2011. 7(3): 1265-73.
- [39] Wu, C. *et al.* "Three-dimensional printing of hierarchical and tough mesoporous bioactive glass scaffolds with a controllable pore architecture, excellent mechanical strength and mineralization ability". *Acta Biomater*, 2011. 7(6): 2644-50.
- [40] Liu, X. *et al.* "Porous and strong bioactive glass (13-93) scaffolds prepared by unidirectional freezing of camphene-based suspensions". *Acta Biomater*, 2012. 8(1): 415-23.
- [41] Wu, Z.Y. *et al.* "Melt-derived bioactive glass scaffolds produced by a gel-cast foaming technique". *Acta Biomater*, 2011. 7(4): 1807-16.
- [42] Midha, S. *et al.* "Bioactive glass foam scaffolds are remodelled by osteoclasts and support the formation of mineralized matrix and vascular networks *in vitro*". *Advanced Healthcare Materials*, 2012: n/a-n/a.
- [43] Drnovsek, N. *et al.* "Bioactive glass enhances bone ingrowth into the porous titanium coating on orthopaedic implants". *Int Orthop*, 2012. 36(8): 1739-45.
- [44] Liu, W., S. Thomopoulos y Y. Xia. "Electrospun nanofibers for regenerative medicine". *Adv Healthc Mater*, 2012. 1(1): 10-25.
- [45] Polini, A. *et al.* "Osteoinduction of human mesenchymal stem cells by bioactive composite scaffolds without supplemental osteogenic growth factors". *PLoS One*, 2011. 6(10): e26211.
- [46] Lu, H. *et al.* "Electrospun submicron bioactive glass fibers for bone tissue scaffold". *J Mater Sci Mater Med*, 2009. 20(3): 793-8.
- [47] Hong, Y. *et al.* "Fabrication and drug delivery of ultrathin mesoporous bioactive glass hollow fibers". *Advanced Functional Materials*, 2010. 20(9): 1503-1510.
- [48] Xie, J., E.R. Blough y C.H. Wang. "Submicron bioactive glass tubes for bone tissue engineering". *Acta Biomater*, 2012. 8(2): 811-9.
- [49] Quintero, F. *et al.* "Laser spinning of bioactive glass nanofibers". *Advanced Functional Materials*, 2009. 19(19): 3084-3090.
- [50] Maèkovia, M. *et al.* "Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: *in vitro* reactivity on nanoscale and biocompatibility". *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. 14(7).
- [51] Lei, B. *et al.* "Versatile fabrication of nanoscale sol-gel bioactive glass particles for efficient bone tissue regeneration". *Journal of Materials Chemistry*, 2012. 22(33): 16906.
- [52] Srinivasan, S. *et al.* "Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration". *Carbohydrate Polymers*, 2012. 87(1): 274-283.
- [53] Luz, G.M. y J.F. Mano. "A nanotectonics approach to produce hierarchically organized bioactive glass nanoparticles-based macrospheres". *Nanoscale*, 2012. 4(20): 6293-7.
- [54] Wang, Z. *et al.* "The dentine remineralization activity of a desensitizing bioactive glass-containing toothpaste: An *in vitro* study". *Aust Dent J*, 2011. 56(4): 372-81.

- [55] Chiang, Y.C. *et al.* "A novel mesoporous biomaterial for treating dentin hypersensitivity". *J Dent Res*, 2010. 89(3): 236-40.
- [56] Xu, C. *et al.* "Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic bioglass-collagen-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering". *Biomaterials*, 2011. 32(4): 1051-8.
- [57] Marelli, B. *et al.* "Accelerated mineralization of dense collagen-nano bioactive glass hybrid gels increases scaffold stiffness and regulates osteoblastic function". *Biomaterials*, 2011. 32(34): 8915-26.
- [58] Kim, H.W., J.H. Song y H.E. Kim. "Bioactive glass nanofiber-collagen nanocomposite as a novel bone regeneration matrix". *J Biomed Mater Res A*, 2006. 79(3): 698-705.
- [59] Lin, H.M., Y.H. Lin y F.Y. Hsu. "Preparation and characterization of mesoporous bioactive glass/polycaprolactone nanofibrous matrix for bone tissues engineering". *J Mater Sci Mater Med*, 2012.
- [60] Gerhardt, L.C. *et al.* "The pro-angiogenic properties of multi-functional bioactive glass composite scaffolds". *Biomaterials*, 2011. 32(17): 4096-108.
- [61] Misra, S.K. *et al.* "Effect of nanoparticulate bioactive glass particles on bioactivity and cytocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate) composites". *J R Soc Interface*, 2010. 7(44): 453-65.
- [62] Roohani-Esfahani, S.I. *et al.* "Effects of bioactive glass nanoparticles on the mechanical and biological behavior of composite coated scaffolds". *Acta Biomater*, 2011. 7(3): 1307-18.
- [63] Mehdikhani-Nahrkhalaji, M. *et al.* "Novel nanocomposite coating for dental implant applications *in vitro* and *in vivo* evaluation". *J Mater Sci Mater Med*, 2012. 23(2): 485-95.
- [64] Ivanovski, S. "Periodontal regeneration". *Aust Dent J*, 2009. 54 Suppl 1: S118-28.
- [65] Mota, J. *et al.* "Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration". *Acta Biomater*, 2012. 8(11): 4173-80.
- [66] Novak, B.M. "Hybrid Nanocomposite Materials? Between inorganic glasses and organic polymers". *Advanced Materials*, 1993. 5(6): 422-433.
- [67] Mahony, O. *et al.* "Silica-gelatin hybrids with tailorable degradation and mechanical properties for tissue regeneration". *Advanced Functional Materials*, 2010. 20(22): 3835-3845.
- [68] Poologasundarampillai, G. *et al.* "Bioactive silica-poly(γ -glutamic acid) hybrids for bone regeneration: effect of covalent coupling on dissolution and mechanical properties and fabrication of porous scaffolds". *Soft Matter*, 2012. 8(17): 4822.
- [69] Yang, B. *et al.* "Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold". *Carbohydrate Polymers*, 2010. 80(3): 860-865.
- [70] Lei, B. *et al.* "Nanofibrous gelatin-silica hybrid scaffolds mimicking the native extracellular matrix (ECM) using thermally induced phase separation". *Journal of Materials Chemistry*, 2012. 22(28): 14133.
- [71] Hum, J. y A.R. "Boccaccini, bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review". *J Mater Sci Mater Med*, 2012. 23(10): 2317-33.
- [72] Vallet-Regi, M., I. Izquierdo-Barba y M. Colilla. "Structure and functionalization of mesoporous bioceramics for bone tissue regeneration and local drug delivery". *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 2012. 370(1963): 1400-21.

- [73] Wu, C. y J. Chang. "Mesoporous bioactive glasses: Structure characteristics, drug/growth factor delivery and bone regeneration application". *Interface Focus*, 2012. 2(3): 292-306.
- [74] Domingues, Z.R. *et al.* "Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with β -cyclodextrin". *Biomaterials*, 2004. 25(2): 327-333.
- [75] Andrade, A.L. *et al.* "Tetracycline and/or hydrocortisone incorporation and release by bioactive glasses compounds". *Journal of Non-Crystalline Solids*, 2009. 355(13): 811-816.
- [76] Bergeron, E. *et al.* "Differentiation of preosteoblasts using a delivery system with BMPs and bioactive glass microspheres". *J Mater Sci Mater Med*, 2007. 18(2): 255-63.
- [77] Santos, E.M., S. Radin y D.P. "Sol-gel derived carrier for the controlled release of proteins". *Biomaterials*, 1999. 20(18): 1695-1700.
- [78] Hoffmann, F. *et al.* "Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials". *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. 45(20): 3216-51.
- [79] Zhao, Y.F. *et al.* "In situ SAXRD study of sol-gel induced well-ordered mesoporous bioglasses for drug delivery". *J Biomed Mater Res A*, 2008. 85(4): 1032-42.
- [80] Arcos, D. *et al.* "Ordered mesoporous microspheres for bone grafting and drug delivery". *Chemistry of Materials*, 2009. 21(6): 1000-1009.
- [81] Zhao, L. *et al.* "Mesoporous bioactive glasses for controlled drug release". *Microporous and Mesoporous Materials*, 2008. 109(1-3): 210-215.
- [82] Dai, C. *et al.* "Osteogenic evaluation of calcium/magnesium-doped mesoporous silica scaffold with incorporation of rhBMP-2 by synchrotron radiation-based μ CT". *Biomaterials*, 2011. 32(33): 8506-17.
- [83] Wu, C. *et al.* "Mesoporous bioactive glass scaffolds for efficient delivery of vascular endothelial growth factor". *J Biomater Appl*, 2012.
- [84] Fan, W. *et al.* "Porous Ca-Si-based nanospheres: A potential intra-canal disinfectant-carrier for infected canal treatment". *Materials Letters*, 2012. 81: 16-19.
- [85] El-Fiqi, A. *et al.* "Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules". *Nanoscale*, 2012.

Biofabrication



PAPER

Macro- and micro-designed chitosan-alginate scaffold architecture by three-dimensional printing and directional freezing

Stephanie Reed¹, Grace Lau², Benjamin Delattre², David Don Lopez², Antoni P Tomsia² and Benjamin M Wu^{1,3,4}

¹ Department of Bioengineering, University of California, Los Angeles, CA, USA

² Materials Science Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA

³ Division of Advanced Prosthodontics, University of California, Los Angeles, CA, USA

⁴ Author to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: benwu@ucla.edu

Keywords: 3D printing, directional freezing, cartilage regeneration, acellular scaffold, channeled architecture, native cell uptake, zonal cartilage

Abstract

While many tissue-engineered constructs aim to treat cartilage defects, most involve chondrocyte or stem cell seeding on scaffolds. The clinical application of cell-based techniques is limited due to the cost of maintaining cellular constructs on the shelf, potential immune response to allogeneic cell lines, and autologous chondrocyte sources requiring biopsy from already diseased or injured, scarce tissue. An acellular scaffold that can induce endogenous influx and homogeneous distribution of native stem cells from bone marrow holds great promise for cartilage regeneration. This study aims to develop such an acellular scaffold using designed, channeled architecture that simultaneously models the native zones of articular cartilage and subchondral bone. Highly porous, hydrophilic chitosan-alginate (Ch-Al) scaffolds were fabricated in three-dimensionally printed (3DP) molds designed to create millimeter scale macro-channels. Different polymer preform casting techniques were employed to produce scaffolds from both negative and positive 3DP molds. Macro-channeled scaffolds improved cell suspension distribution and uptake over randomly porous scaffolds, with a wicking volumetric flow rate of $445.6 \pm 30.3 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$ for aqueous solutions and $177 \pm 16 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$ for blood. Additionally, directional freezing was applied to Ch-Al scaffolds, resulting in lamellar pores measuring $300 \mu\text{m}$ and $50 \mu\text{m}$ on the long and short axes, thus creating micrometer scale micro-channels. After directionally freezing Ch-Al solution cast in 3DP molds, the combined macro- and micro-channeled scaffold architecture enhanced cell suspension uptake beyond either macro- or micro-channels alone, reaching a volumetric flow rate of $1782.1 \pm 48 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$ for aqueous solutions and $440.9 \pm 0.5 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$ for blood. By combining 3DP and directional freezing, we can control the micro- and macro-architecture of Ch-Al to drastically improve cell influx into and distribution within the scaffold, while achieving porous zones that mimic articular cartilage zonal architecture. In future applications, precisely controlled micro- and macro-channels have the potential to assist immediate endogenous bone marrow uptake, stimulate chondrogenesis, and encourage vascularization of bone in an osteochondral scaffold.

1. Introduction

Cartilage regeneration is a promising field with many attempts at creating a tissue-engineered cartilage substitute. While many tissue-engineered skin and bone products exist and continue to enter the market, there remains no FDA-approved, tissue-engineered

solution to regenerate the avascular, aneural cartilage tissue other than autologous chondrocyte implantation (ACI), which is both costly and requires weeks of cell culture time, not to mention healthy cartilage from which to harvest the chondrocytes [1–3]. Many attempts to create biomaterial scaffolds for implantation are being made, yet these technologies still often

require seeded cells [4–6]. Major problems persist with the cell-based approaches. Insufficient chondrogenic differentiation cues lead to un- or dedifferentiated cells, hypertrophy, osteogenesis, and senescence [7]. Another obstacle with current cell-based strategies is the uncontrolled loss of transplanted cells. Cell delivery is often inefficient and inhomogeneous, and furthermore stressors can induce chondrogenic apoptosis [7]. Moreover, distributing high densities of cells within scaffolds uniformly has remained a persistent challenge, yet the only Food and Drug Administration-approved cell seeding method involves using a Petri dish, which has yielded poor uniformity deep within the scaffold [8].

Several properties of articular cartilage render its repair and regeneration difficult. Since cartilage is an avascular tissue, nutrient delivery is limited to diffusion and convection during dynamic compression of the extracellular matrix (ECM) inducing hydrostatic pressure gradients, interstitial fluid flow, streaming potentials, and volumetric changes [9]. The metabolic activity of chondrocytes is limited, with ECM metabolism stimulated by cyclic loading and chondrocyte senescence increasing with age [10]. Moreover, chondrocyte mitoses are rare in normal mature cartilage [11]. Finally, the turnover of cartilage ECM proteins *in vivo* is very slow, with collagen type II exhibiting a half life of >100 years, aggrecan exhibiting a half life of 2 years, interterritorial proteoglycans exhibiting a half life of >95 days, pericellular and territorial proteoglycans exhibiting a half life of 15 days [10]. These tissue characteristics highlight the need to recruit progenitor cells and a nutrient source during the regeneration process, which is why surgeons frequently induce microfracture or use Pridie drilling as a primary standard of care for articular cartilage repair during arthroplasty and knee resurfacing to access blood and bone marrow stem cells [12–14].

To address the aforementioned challenges, instead of seeding cells prior to implantation, this paper proposes using channels within an osteochondral plug to wick up and distribute endogenous mesenchymal stem cells from the underlying bone marrow. Here, we investigate the role of designed macro- and micro-channels on scaffold pore architecture, and how that relates to improved cell suspension and blood uptake speeds as well as cell distribution throughout the scaffold.

When considering a material from which to fabricate an osteochondral tissue-engineered scaffold, chitosan-alginate (Ch-Al) was deemed an optimal selection due to its ability to promote both osteogenesis and chondrogenesis, both *in vitro* and *in vivo* [15–24]. Our previous work has also shown that Ch-Al supports chondrogenesis by chondrocytes and adipose-derived stem cells and serves as a template for sustained growth factor delivery [25]. Both chitosan and alginate are very hydrophilic polymers, whose contact angles have been shown to be 10° and 20°, respectively, as measured during layer-by-layer

assembly of Ch-Al films [26]. Lyophilizing Ch-Al creates porous, hydrophilic scaffolds with significant mechanical strength, approximately three times the compressive modulus and yield strength of pure chitosan [15]. Ch-Al scaffolds have been used in cartilage tissue engineering particularly because they are naturally occurring polysaccharides similar in chemical structure to articular cartilage ECM glycosaminoglycans (GAGs) like chondroitin sulfate, keratan sulfate, and hyaluronic acid that provide cartilage with its notable properties such as resistance to compression and swollen state [27]. Further, Ch-Al scaffolds can be prepared at neutral pH, allowing growth factors and drugs to be uniformly incorporated without denaturation [16].

Three-dimensional printing (3DP) was chosen as the fabrication method to create macro-channeled scaffolds. 3DP of scaffolds for tissue engineering offers many advantages over mold-based fabrication techniques since the resulting scaffolds can be tailored to be patient- and site-specific. Also, 3DP scaffolds, which are generated layer by layer, can have complex geometries such as undercuts, curvatures, and interconnecting channels, while maintaining a relatively high throughput fabrication process [28]. Two 3DP approaches, indirect and direct, were implemented to fabricate simple and more complex macro-channeled scaffolds, respectively. For negative molding using a 3DP preform (indirect 3DP), fused deposition modeling (FDM) was chosen due to its high resolution, ease of use, and strength of high aspect ratio parts. Specifically, we hoped to produce porous Ch-Al scaffolds with long, uniaxial or orthogonal macro-channels using FDM printed negative molds based on 3DP designs. For positive molding using a 3DP preform (direct 3DP), powder-based 3DP was selected due to its high resolution, fast printing time, use of sugar as a cost-effective preform material, and the ability to infuse in any polymer of choice into the sugar print. More explicitly, we hoped to fabricate Ch-Al scaffolds with complex, tri-orthogonal macro-channels from sugar preforms using a poly(L-lactic acid) (PLLA) coating to protect the sugar from dissolving in the aqueous environment of the Ch-Al solution. This positive molding method would allow the fabrication of any aqueous-based polymer scaffold by centrifuge infusion into the PLLA preform, followed by freeze-drying, thus creating a porous, channeled scaffold based on 3DP designs. The effects of aligned macro-channels created using either negative or positive molding techniques were evaluated in terms of pore architecture, cell distribution, and cell suspension and blood wicking.

To date, none of the present tissue-engineered cartilage replacement techniques have generated cartilage tissue that meets the functional demands of an *in vivo* environment [29]. The cartilage generated within tissue engineered implants—if there is proper cartilage regeneration and not fibrocartilage production—

often lacks the zonal organization that gives native cartilage its unique structural and functional properties [28]. No clinical trials have been performed with zonally engineering cartilage, and several of the most common approaches for regeneration, such as ACI, matrix-induced ACI, and microfracture, result in tissue that lacks zonal organization, as seen by 1 and 2 year follow up investigations [29]. A few research studies are moving toward a more zonal architecture, however, such as a 3DP osteochondral scaffold with two zones of different pore size and preferential binding of chondrocytes to the top cartilage zone during seeding [30]. A collagen gradient hydrogel that recruits mesenchymal stem cells to the center of the construct using haptotaxis has been implanted in the patellar groove in a rabbit knee model [31]. Other strategies of creating two separate cartilage and bone layers, joined after fabrication by suturing, gluing, press fitting, or external fixation have been limited by inferior integration between cartilage and bone tissues, resulting in eventual separation [32–35]. Single integrated, biphasic or multi-layered osteochondral scaffolds have been engineered, but they fail to capture the micro-scale features and properties of the cartilage zonal micro-environment [36–40].

Directional freezing of scaffolds prior to freeze-drying has been applied to a few different materials for a variety of applications, mostly to increase strength beyond simply porous scaffolds [41, 42]. By placing the scaffold solution (slurry) in a mold on a cold surface (cold finger) and controlling the rate ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$) at which that solution freezes using a thermocouple, heater, and liquid nitrogen cooling source, the direction of ice crystal growth in the freezing scaffold solution can be forced to be anisotropic [41]. This directional freezing is caused by phase separation at the freezing front between growing ice crystals and slurry particles, and it results in lamellar pores with an extremely high aspect ratio. The size and shape of the pores, as well as the compressive strength, can be altered by altering the exact freezing rate [42]. Another outcome of directional freezing is a complex micro-structure where the majority of the scaffold has lamellar pores aligned in the ice crystal growth direction, yet there is a seamless transition to a cellular or spherical pore zone at the scaffold base near the cold finger [42]. We hoped that by applying directional freezing to Ch-Al scaffolds, high aspect ratio micro-channels (lamellar pores) could be achieved, and the zonal architecture of articular cartilage could be captured in the scaffold structure. The effects of aligned micro-channels created using directional freezing were evaluated in terms of pore architecture, cell distribution, and cell suspension and blood wicking.

It was hypothesized that while both macro-channeled scaffolds or micro-channeled scaffolds would increase wicking and cell distribution over non-channeled scaffolds, combining both macro- and micro-

channeled architecture would further improve wicking and cell distribution beyond either one alone.

This work ultimately aims to develop an acellular scaffold implant with biomimetically designed micro- and macro-architecture that promote cartilage regeneration. This scaffold would serve as an implant for joint resurfacing and would facilitate the instant uptake of underlying bone marrow and residing mesenchymal stem cells. This system would address the many challenges facing cartilage tissue engineers today, such as cell loss upon delivery and lack of zonal architecture, and has the potential to become an off-the-shelf solution for cartilage regeneration.

2. Methods

2.1. Materials

Mouse bone marrow stromal cells (mBMSCs, C57BL/6 mouse mesenchymal stem cells from Bone Marrow, Cat # S1502-100), antibiotic-antimycotic (ABAM, Cat # 15240-062), and Vybrant DiI Cell-Labeling Solution (Cat # V22885) were obtained from Life Technologies (Grand Island, NY).

Chitosan (practical grade, Cat # 41763), alginate from brown algae (Cat # A7003), calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Cat # 12022), 50% sodium hydroxide in water (Cat # 415413), α -lactose monohydrate (Cat # L3625), and poly(acrylic acid) (PAA) (Cat # 535931) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Acetic acid (glacial, Cat # A38 SI-212), chloroform (Cat # C298-4), optimal cutting temperature Compound (OCT, Tissue-Tek, Cat # 4583), Dulbecco's modification of Eagle's medium w/4.5 g l^{-1} glucose, L-glutamine and sodium pyruvate (DMEM 1X, Cellgro, Cat # 10-013-CV), and fetal bovine serum (FBS, Cat # MT35015CV) were obtained from Fisher Scientific (Waltham, MA).

Pure cane granulated white sugar was obtained from C&H (Crockett, CA), and Zb7 clear binder solution (Part # 05392) was obtained from Z Corporation (Rock Hill, SC). Poly(L-lactic acid) (PLLA, Cat # B6002-2) was obtained from Lactel (Birmingham, AL).

2.2. Scaffold fabrication using negative molding

Negative molds were printed out of acrylonitrile butadiene styrene (ABS) plastic using a uPrint (Stratasys, Eden Prairie, MN) 3DP with 256 μm vertical step size. Cylindrical mold inner height was 20 mm, inner diameter was 16 mm, and outer diameter was 20 mm. For fabricating channeled scaffolds, cylindrical molds contained seven 1 mm diameter vertical struts running along the z axis, attached at the base. All six struts were spaced radially 3 mm apart from the center strut, which was located in the exact center of the mold cross-sectional area. Molds were macroscopically imaged using a digital microscope (Keyence, Itasca, IL).

Adapted and modified from Li *et al*, Ch-Al scaffolds were fabricated with 2% w/v chitosan dissolved in 2% v/v acetic acid in dH₂O and 2% w/v alginate dissolved in dH₂O, mixed at 1:1 ratio [15, 16]. The Ch-Al solution was ultrasonically homogenized for 1 min, titrated to pH 7.4 with 50% sodium hydroxide, ultrasonically homogenized for 5 min, poured into 3DP negative molds, and frozen at -80°C overnight. The resulting frozen scaffolds were lyophilized overnight, crosslinked for 15 min with 1% w/v CaCl₂, washed three times with dH₂O, and lyophilized overnight. Ch-Al scaffolds were imaged using a Nova Nano scanning electron microscope (SEM) 230 (FEI, Hillsboro, OR), with 10 keV accelerating voltage and 3.0 spot size. Scaffolds were also macroscopically imaged using a digital microscope (Keyence, Itasca, IL).

2.3. Scaffold fabrication using positive molding

Positive molds were printed out of a 1:1 sugar (50–106 μm sieved):lactose mixture using a Z402 (Z Corporation, Rock Hill, SC) 3DP with 178 μm vertical step size. Binder used to fuse the powder particles together was formulated from a 2:1 ratio of Zb7 clear binder solution:PAA pH 5. Cylindrical mold height was 20 mm, and diameter was 16 mm. Cylindrical molds contained 3 mm diameter channels running along the *x*, *y*, and *z* axes. Six *z* axis channels were spaced radially 4.5 mm apart from the center channel, which was located in the exact center of the mold cross-sectional area. *X* and *y* axis channels were spaced horizontally and vertically 4.5 mm apart, creating a 3 × 3 array of channels on four faces around the cylinder.

Positive sugar-lactose molds were dip coated with 7.5 w/v% PLLA in chloroform, allowed to dry overnight, and then soaked in water to leach out the sugar-lactose. Resulting PLLA preforms were laser cut (Versa Laser, Punchbowl, NSW, Australia) on all faces to produce 300 μm holes that allowed for Ch-Al solution, prepared as described above, infusion by centrifugation at $1125 \times g$ rcf for 10 min. Once Ch-Al solution was infused into the PLLA preform, preforms were frozen at -80°C overnight, lyophilized overnight, crosslinked for 15 min with 1% w/v CaCl₂, washed three times with dH₂O, and lyophilized overnight. Next, preforms were soaked in chloroform overnight to dissolve the PLLA, followed by washing three times with dH₂O and final lyophilization to obtain Ch-Al scaffolds. Ch-Al scaffolds were imaged using a Nova Nano SEM 230, with low vacuum detector, 10 keV accelerating voltage, and 3.0 spot size.

2.4. Scaffold fabrication with directional freezing

Ch-Al solution, prepared as described above, was poured into PTFE cylindrical molds with 20 mm inner diameter, 40 mm height, and a copper base. The Ch-Al solution was directionally frozen by placing the copper

base of the mold directly onto a copper cold finger that extended downward into a container of liquid nitrogen. The temperature of the freezing front was controlled using liquid nitrogen and a ring heater. A $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ cooling rate was selected based on previous studies of porosity and strength, and the Ch-Al solution was cooled to -100°C [42]. Frozen Ch-Al was lyophilized for 48 h, crosslinked for 15 min with 1% w/v CaCl₂, washed three times with dH₂O, and lyophilized overnight. For SEM, scaffolds were flash frozen using liquid nitrogen and cut in half either along the *z* axis, parallel to the freezing front, or across the *z* axis, perpendicular to the freezing front. Ch-Al scaffolds were imaged using a Nova Nano SEM 230, with low vacuum detector, 15 keV accelerating voltage, and 3.0 spot size.

2.5. Scaffold fabrication with directional freezing using negative molding

Ch-Al solution, prepared as described above, was poured into ABS cylindrical 3DP negative molds printed by the uPrint, which were inserted into PTFE cylindrical molds, which were then placed on the copper cold fingers. 3DP negative mold inner height was 20 mm, inner diameter was 16 mm, and outer diameter was 19.6 mm. To create axially channeled scaffolds, 3DP lids with seven 1 mm diameter vertical struts running along the *z* axis, attached at the base of lid, were placed on top of the cylindrical molds so the struts protruded into the scaffold solution. All six struts were spaced radially 3 mm apart from the center strut, which was located in the exact center of the mold cross-sectional area. Once the molds were filled and lids were put on to introduce channels if necessary, the Ch-Al solution was directionally frozen at $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ cooling rate. Frozen Ch-Al was lyophilized for 48 h, crosslinked for 15 min with 1% w/v CaCl₂, washed three times with dH₂O, and lyophilized overnight. To create orthogonally channeled scaffolds, the same ABS cylindrical 3DP negative mold dimensions were used, but with 1 mm diameter struts running along the *x*, *y*, and *z* axes. Six *z* axis struts were spaced radially 3 mm apart from the center strut, which was located in the exact center of the mold cross-sectional area. *X* and *y* axis struts were spaced horizontally and vertically 3 mm apart, creating a 3 × 3 array of struts on four faces within the cylinder. The molds were filled with Ch-Al solution and directionally frozen at $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ cooling rate. Frozen Ch-Al was lyophilized for 48 h, crosslinked for 15 min with 1% w/v CaCl₂, washed three times with dH₂O, and lyophilized overnight. To extract the scaffold from the orthogonal mold, the mold was dissolved in chloroform overnight, followed by washing three times with dH₂O and final lyophilization to obtain Ch-Al orthogonally channeled scaffolds.

2.6. Fluid uptake

Scaffolds with or without channels and with or without directional freezing were immersed in a 2 ml pool of 0.1% w/v SafraninO in dH₂O or C57BL/6 mouse blood (ethically collected by Dr Ronnie Sullins following an Institutional Animal Care and Use Committee approved animal use protocol), with the meniscus measuring 1 mm, so only 1 mm of the scaffold bottom was initially submerged. SafraninO was used as a stain to visualize fluid uptake and did not increase viscosity beyond that of water alone. Directionally frozen scaffolds were inverted before immersion into fluid. Dry scaffold heights and diameters were measured with a micrometer prior to fluid uptake. Additionally, a 0.5 mm increment ruler was secured next to the scaffold in parallel with its *z* axis, and the 50% and 100% scaffold height marks were noted on the ruler for each scaffold prior to fluid immersion. The time for fluid to wick 50% of the scaffold height, which was approximately the maximum wicking observed, and 100% of the scaffold height was measured using a centisecond precision digital timer. Volumetric flow rate and wicking velocity were calculated at these two heights. Statistical analysis was performed on the data using a single-tailed, independent two-sample Student's *t*-test that assumed equal variance between the two distributions.

2.7. Cell suspension uptake

Scaffolds with or without channels and with or without directional freezing were immersed in a 2 ml pool of DMEM with 10% FBS and 1% ABAM containing 1×10^6 mBMSCs fluorescently labeled with Vybrant DiI, with the meniscus measuring 1 mm. After cell suspension uptake, scaffolds were fixed, embedded in OCT, and sectioned for viewing by fluorescent microscopy.

3. Results

3.1. Macro-channels by 3D printed negative molds

Ch-Al scaffolds were cast in 3DP negative molds to be solid cylinders or have 1 mm macro-channels (figure 1). Figure 1(a) shows a computer aided design (CAD) model for a trial 3DP negative mold (10 mm diameter, 20 mm height, and 1 mm struts) and the resulting channeled Ch-Al scaffold, created to test feasibility. SEM images of channeled Ch-Al illustrated ~1 mm diameter macro-channels and overall high porosity with ~100 μ m pores in the internal region of the scaffold, as seen by taking the scaffold center cross-section (figures 1(b) and (c)). The top and bottom surfaces of scaffolds appeared as a denser fibrous region where scaffold struts ran perpendicular to the *z* axis (figures 1(d) and (e)). This was most likely due to surface tension effects during freezing. Figures 1(f)–(l) demonstrates the solid or channeled

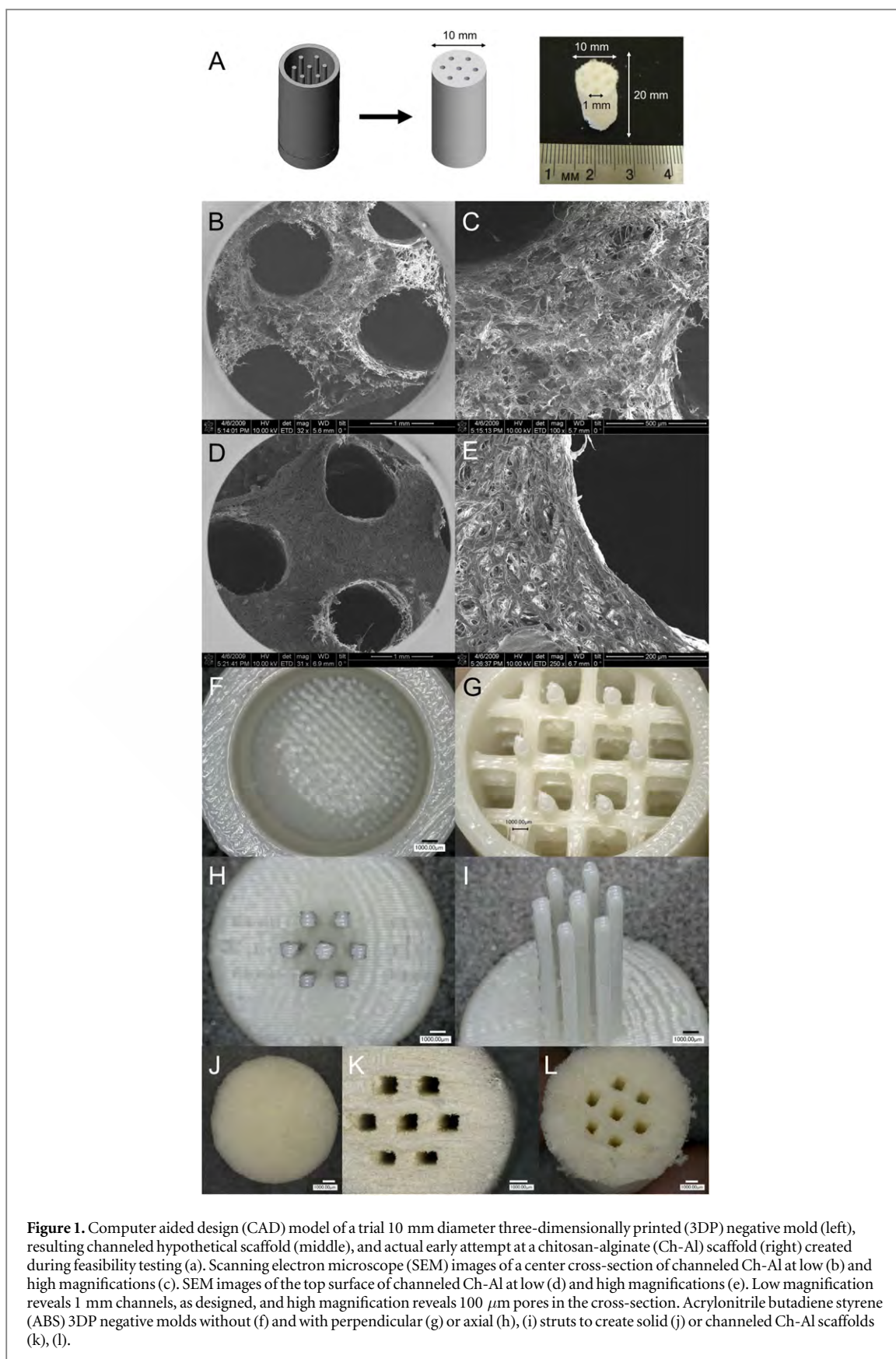
scaffolds as well as the 3DP cylindrical molds without or with axial or perpendicular struts in which scaffolds were created.

3.2. Macro-channels by 3D printed positive molds

In order to create more complex geometries beyond the capabilities of negative molding, Ch-Al scaffolds were fabricated from 3DP preforms in a positive molding process using centrifuge infusion, as shown in figure 2(a). 3DP sugar-lactose preforms with tri-directional 3 mm macro-channels were dip coated in PLLA to preserve the architecture of the preform while allowing for aqueous-based polymer infusion. The sugar-lactose was leached away in water, leaving open space for infusion of Ch-Al. PLLA preforms were laser cut with 300 μ m holes so that Ch-Al could successfully infuse into the preform during centrifugation (figures 2(b)–(d)). Without these laser cut holes, PLLA was not inherently porous enough to allow any Ch-Al to penetrate the outer shell. Frozen, lyophilized, and crosslinked Ch-Al-PLLA was prepared as any normal Ch-Al scaffold, except as a final processing step, PLLA had to be dissolved away in chloroform to reveal the final Ch-Al scaffold. Ch-Al scaffolds resulting from this 3DP positive molding process maintained the complex macro-channeled shape of the original CAD model.

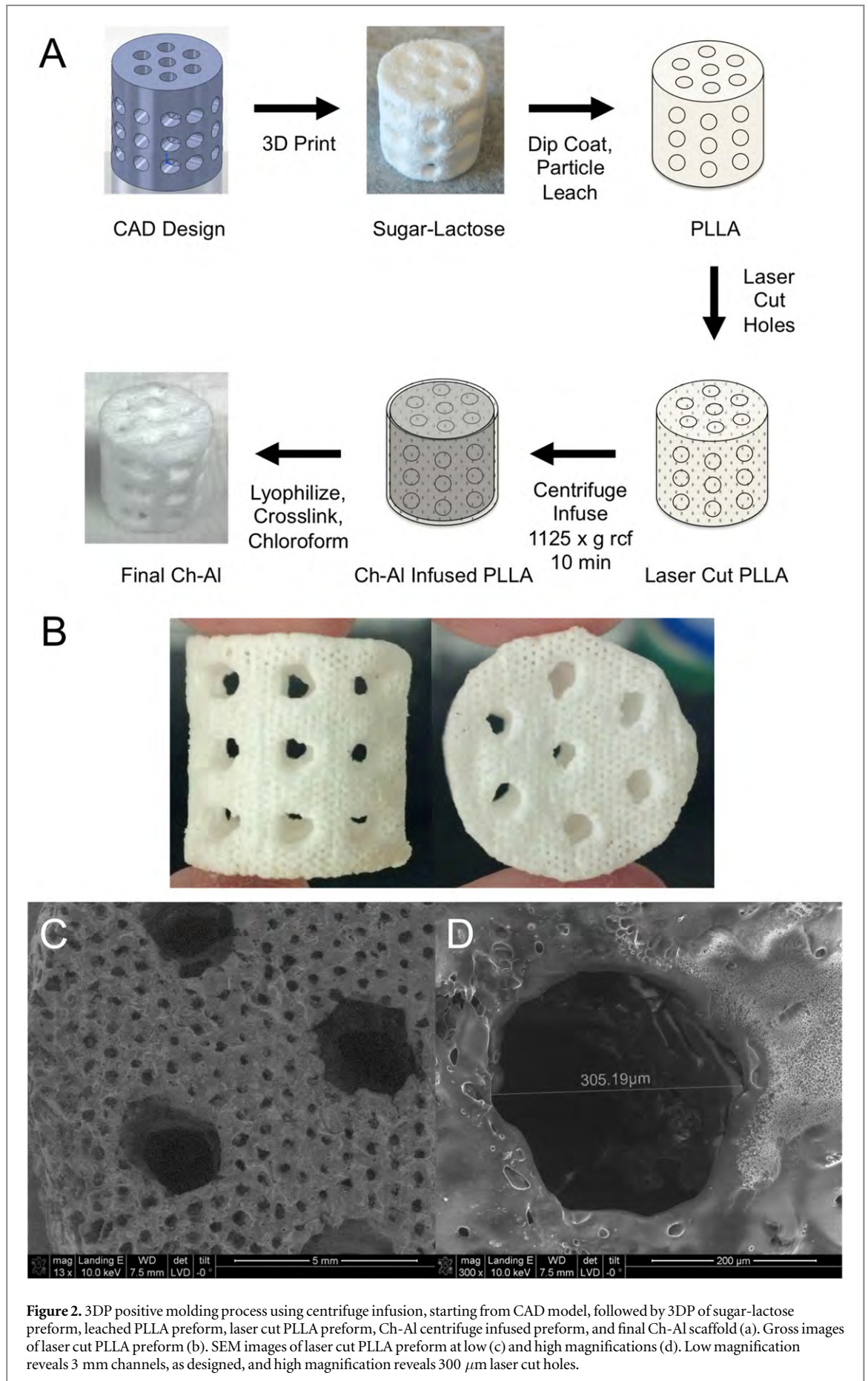
3.3. Cell suspension uptake and distribution by macro-channels

Macro-channels facilitate cell uptake and distribution, as seen in *in vitro* studies where 3DP negatively molded Ch-Al scaffolds with 20 mm height and 1 mm macro-channels wicked a fluorescently labeled mBMSC suspension within 2.5 s, consistent with wicking velocities seen with purely aqueous solutions (figure 3(a)). Improved cell suspension uptake and distribution were also observed in 3DP positively molded Ch-Al scaffolds with macro-channels, as shown in figure 3(b). Sectioning at the top 1 mm, center, and bottom 1 mm of negatively cast and positively cast macro-channeled scaffolds showed that the cells were distributed throughout the entire height and diameter of the scaffolds, not just around the channel edges or at the scaffold base. In scaffolds without any macro-channels, cells remained in the bottom $\frac{1}{4}$ of the scaffold (figure 3(c)), demonstrating that channels are required to deliver cells beyond a certain height in order to overcome filtering effects. Aqueous solution uptake volumetric flow rate and velocity were calculated for non-channeled scaffolds ($n = 3$), macro-channeled scaffolds cast from 3DP negative molds ($n = 3$), and macro-channeled scaffolds cast from 3DP positive molds ($n = 3$) (figures 3(d) and (e)). Since the channel geometries, or lack thereof, differed between solid scaffolds, negatively cast scaffolds, and positively cast scaffolds, the



volumetric flow rate data was normalized by each scaffold's cross-sectional area to calculate the wicking velocity. As demonstrated by cell distribution and fluid uptake results, the direct molding processing steps

such as PLLA coating and dissolution did not hinder the hydrophilicity of Ch-Al scaffolds, for example by altering the polymers' functional group chemistry or leaving residual PLLA.



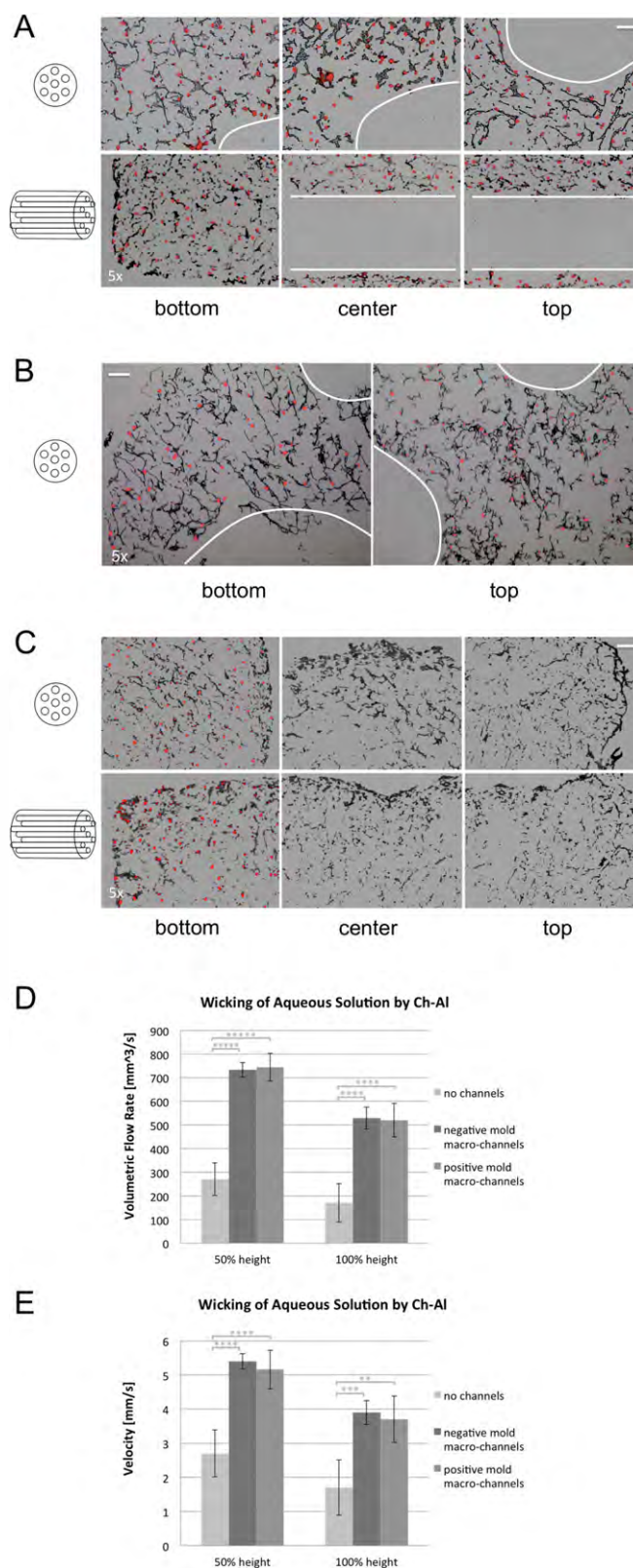
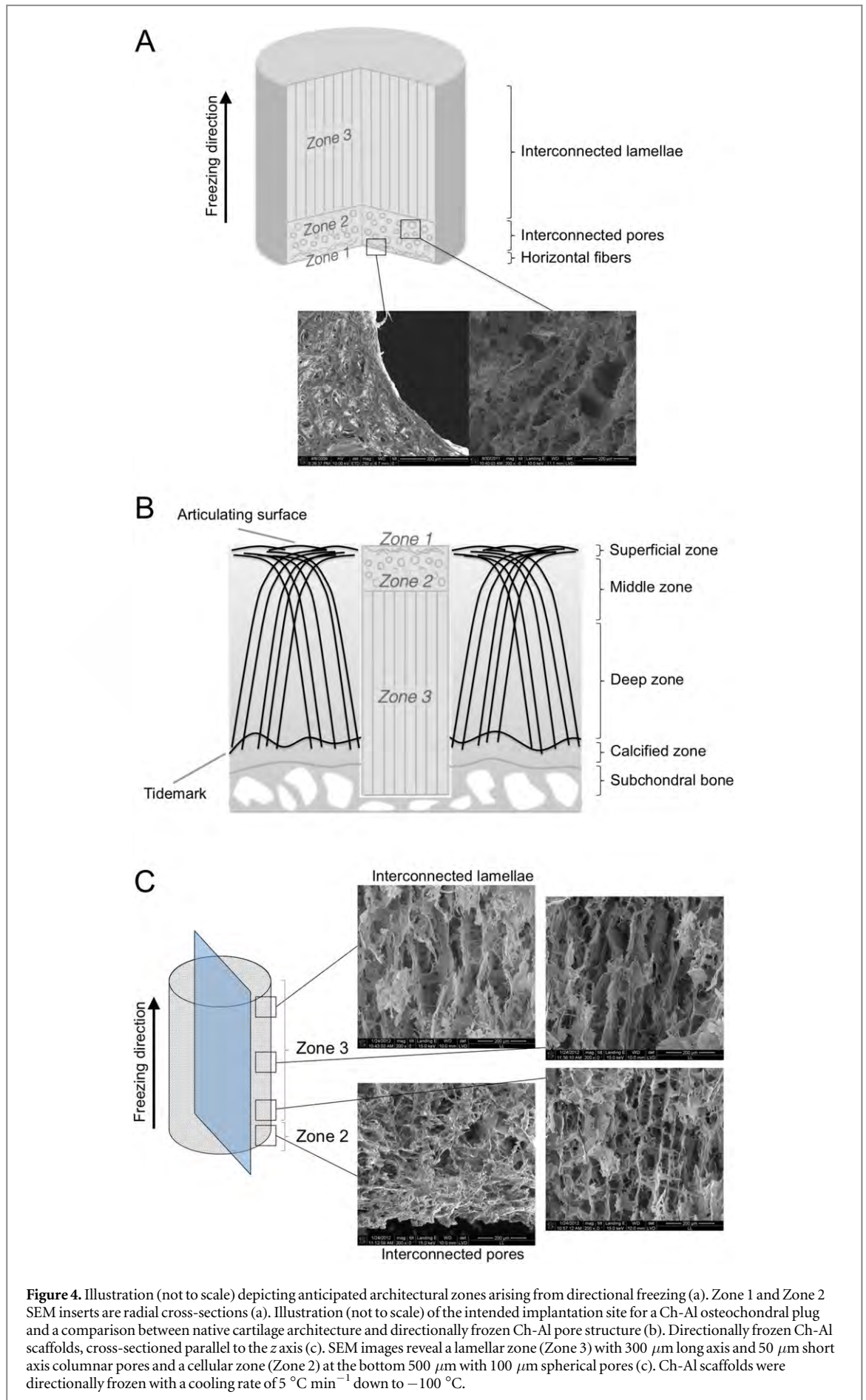


Figure 3. Cell suspension uptake and distribution by Ch-Al made from 3DP negative molds (a) or positive molds (b) with macro-channels only. Negative control of Ch-Al without channels is shown also (c). Scaffolds with or without macro-channels wicked 5×10^5 mBMSCs ml^{-1} cell suspension, where the cells were fluorescently labeled red with Vybrant DiI. Cross-sections both perpendicular and parallel to the z axis are shown in (a) and (c), while only cross-sections perpendicular to the z axis are shown in (b). Channels in (a) are 1 mm diameter, while channels in (b) are 3 mm diameter, as designed. Images shown are merged red fluorescence on top of bright field to show the scaffold structure. Magnification is $5\times$. Scale bar equals $250 \mu\text{m}$. Aqueous solution uptake by Ch-Al made from 3DP negative or positive molds (d), (e). Scaffolds with or without macro-channels wicked a 0.1% SafraninO aqueous solution. The time to wick 50% and 100% height was measured, and volumetric flow rate (d) and velocity were calculated (e). Statistical significance is denoted by * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.025$, *** for $p < 0.01$, **** for $p < 0.005$, and ***** for $p < 0.001$.



3.4. Micro-channels by directional freezing

Figure 4(a) illustrates the expected architectural zones (Zone 2 and Zone 3) caused by different freezing regimes during directional freeze casting and the expected perpendicular fibers (Zone 1) caused by surface tension at the freezing interface between the Ch-Al slurry and the mold. The perpendicular fibers in Zone 1, interconnected pores in Zone 2, and interconnected lamellae in Zone 3 are reminiscent of the tangential or superficial zone, the transitional or middle zone, and the radial or deep zone, respectively, of native cartilage. The change in scaffold pore orientation from perpendicular, to spherical, to parallel to the z axis mimics the change in cartilage's collagen fiber orientation from the articular surface to the subchondral bone. Figure 4(b) illustrates this architectural similarity between directionally frozen Ch-Al and native cartilage, and also the intended site of implantation for a Ch-Al osteochondral plug.

Directional freezing at $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ was applied to Ch-Al scaffolds, and scaffolds with lamellar pores, or micro-channels, measuring $300\text{ }\mu\text{m}$ on the long axis and $50\text{ }\mu\text{m}$ on the short axis were achieved. Cross-sectioning of both parallel and perpendicular (to the freezing front) planes of the scaffolds followed by SEM imaging yielded lamellar pores seen from the parallel cut (figure 4(c)) and cellular pores seen from the perpendicular cut (figure 5(a)), indicating successful directional freezing. This lamellar zone extended to the majority of the scaffold height. In addition, there was a zone of $100\text{ }\mu\text{m}$ cellular pores at the bottom $500\text{ }\mu\text{m}$ of the scaffolds, corresponding to the region of the scaffold closest to the cold finger, as expected. Moreover, the bottom $100\text{ }\mu\text{m}$ of scaffolds exhibited a denser fibrous morphology, as seen with traditionally cast and frozen scaffolds, where scaffold struts ran perpendicular to the z axis, likely due to surface tension effects.

3.5. Aqueous solution uptake by macro- and micro-channels

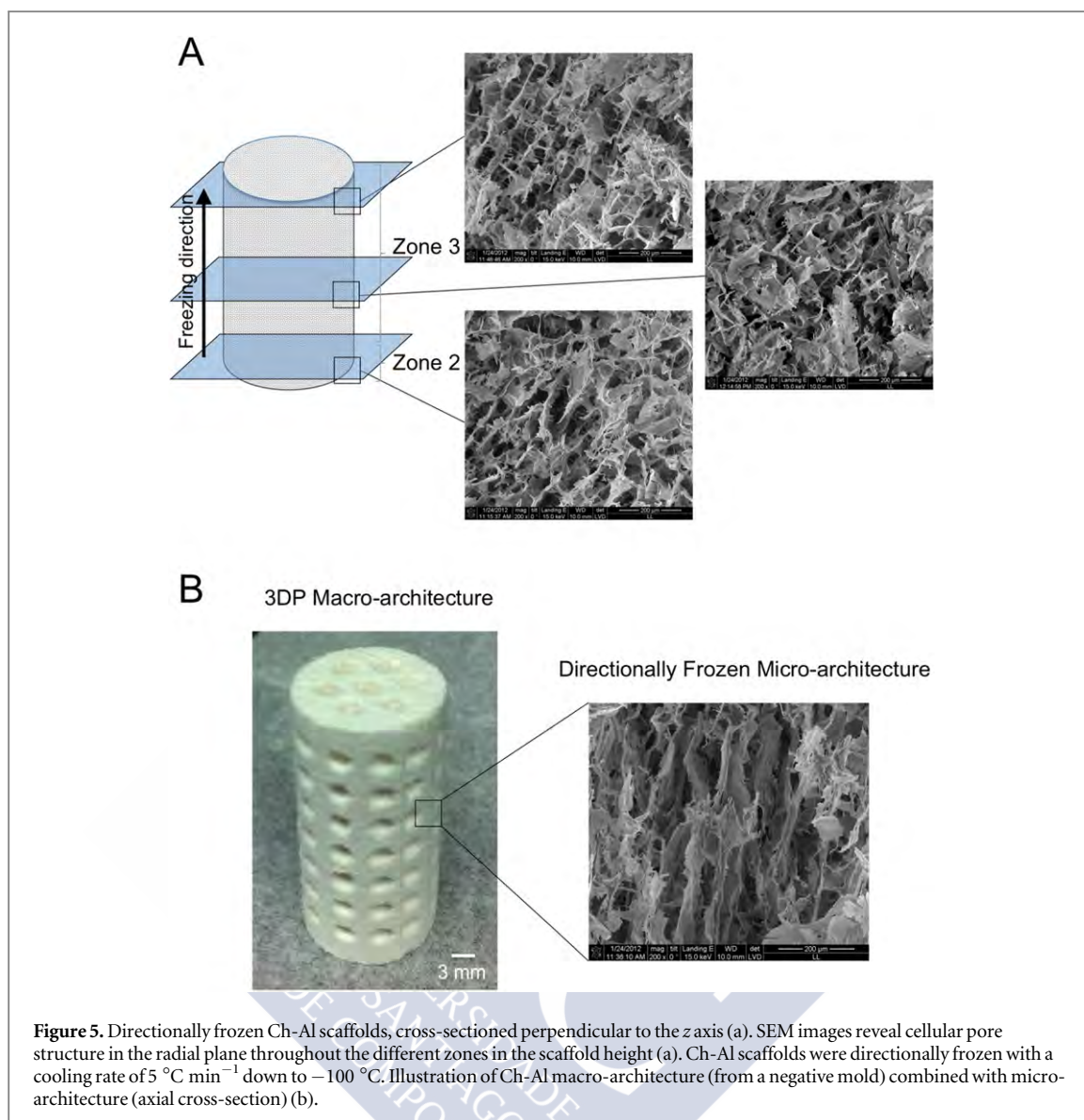
Ch-Al scaffolds were fabricated to have macro- and micro-channels by casting Ch-Al solution in a 3DP negative mold which was fitted on the cold finger during directional freezing (figure 5(b)). SEM showed that micro-channels were aligned with the z axis macro-channels and existed in between the orthogonal x and y axis macro-channels. This type of bimodal channel size distribution, where the micro-architecture was frequently interrupted by the macro-architecture yet still maintained alignment, has not been previously demonstrated. More specifically, Zone 1 and Zone 2 were not observed each time the channels were interrupted by the macroscopic 3DP mold. Instead, Zones 1 and 2 were confined to the bottom of the scaffold near the cold finger, thus allowing Zone 3 to continue through the orthogonal macro-channels,

uninterrupted by the 3DP mold, for the rest of the scaffold height.

Scaffolds with or without 3DP-molded 1 mm axial macro-channels, and with or without directionally frozen micro-channels, were immersed in 0.1% SafraninO aqueous solution. Only the bottom 1 mm of scaffolds were submerged, and the remaining height of the scaffold wicked the aqueous solution very quickly, with different rates depending on the channel architecture combination. Directionally frozen scaffolds were inverted before immersion into fluid, so that the lamellar pore zone and associated micro-channels at the scaffold top was placed directly into the 1 mm fluid meniscus. Macro-channels ($n = 3$) improved volumetric flow rate to 50% height from $291.4 \pm 89.5\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$ to $445.6 \pm 30.3\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$ compared to scaffolds without channels ($n = 3$), as shown in figure 6(a). However, micro-channels ($n = 3$) alone further improved volumetric flow rate to 50% height to $705.1 \pm 113.5\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$, and the combination of macro- and micro-channels ($n = 3$) resulted in an extreme increase in volumetric flow rate to $1782.1 \pm 48\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$. Once normalized by cross-sectional area with or without channels, the wicking velocity was only $2.9 \pm 0.85\text{ mm s}^{-1}$ for scaffolds without channels, $4.92 \pm 0.3\text{ mm s}^{-1}$ for macro-channeled scaffolds, $5.26 \pm 0.93\text{ mm s}^{-1}$ for micro-channeled scaffolds, and an impressive $15.5 \pm 0.34\text{ mm s}^{-1}$ for macro- and micro-channeled scaffolds (figure 6(b)). Both the volumetric flow rate and velocity started to plateau as fluid wicked beyond the 50% height mark, as evidenced by the decrease in these values when wicking to 100% height, but wicking was still fast enough even at 20 mm height to be beneficial.

3.6. Blood uptake by macro- and micro-channels

Ch-Al scaffolds created to have macro- and/or micro-channels using 3DP negative molds with or without 1 mm axial macro-channels, with or without directional freezing, were immersed in blood from C57BL/6 mice. Only the bottom 1 mm of the scaffold was submerged, and the remaining height of the scaffold wicked blood very quickly, with different rates depending on the channel architecture combination. However, wicking of blood was not as quick as the purely aqueous solution due to viscosity differences. Again, directionally frozen scaffolds were inverted before immersion into fluid, so that the lamellar pore zone and associated micro-channels at the scaffold top was placed directly into the 1 mm fluid meniscus. Macro-channels ($n = 3$) improved volumetric flow rate to 50% height from $18.2 \pm 0.45\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$ to $177 \pm 16\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$ compared to scaffolds without channels ($n = 3$), as shown in figure 7(a). However, micro-channels ($n = 3$) alone further improved volumetric flow rate to 50% height to $224.2 \pm 11.5\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$, and the combination of

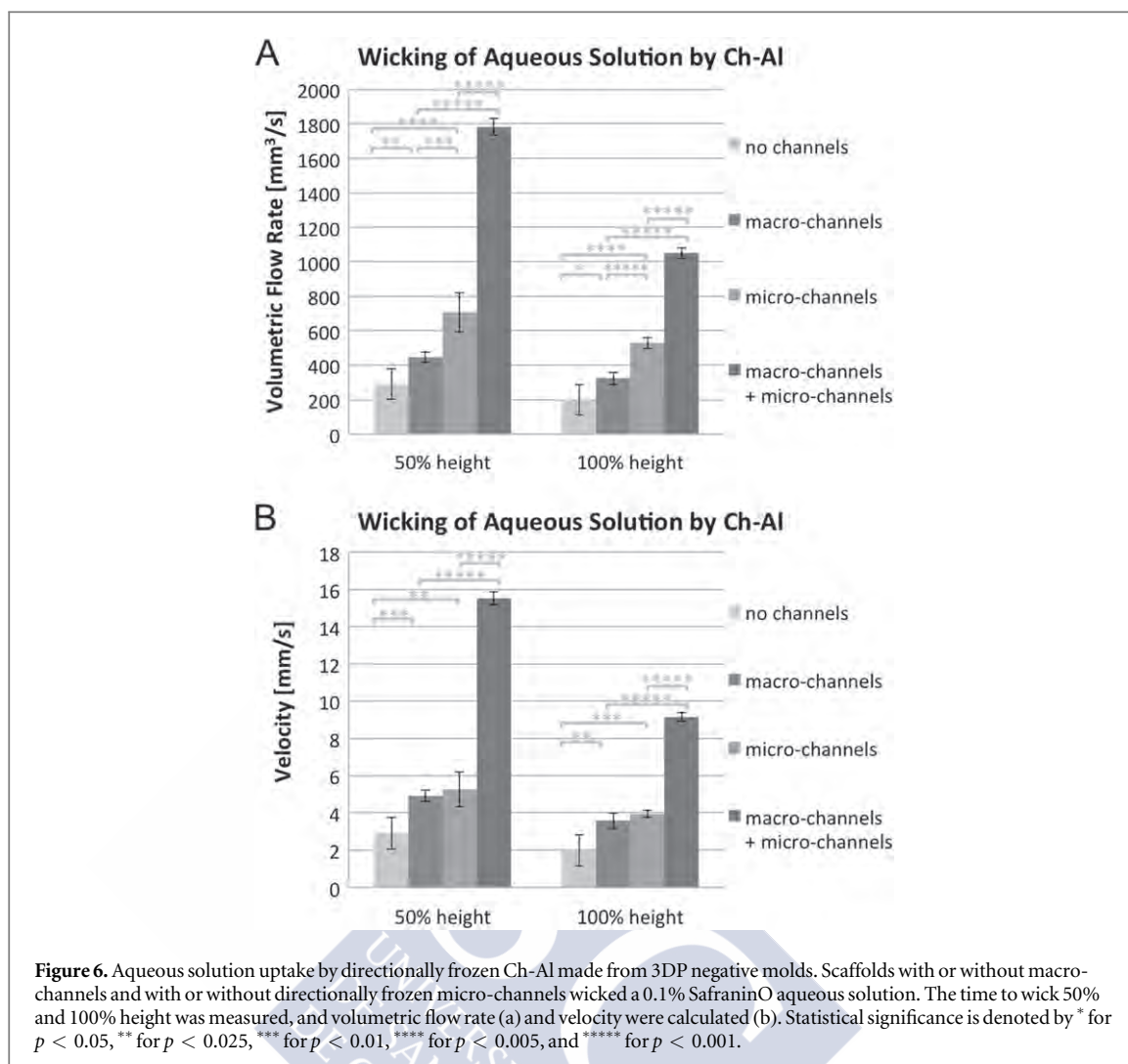


macro- and micro-channels ($n = 3$) resulted in an extreme increase in volumetric flow rate to $440.9 \pm 0.5\text{ mm}^3\text{ s}^{-1}$. Once normalized by cross-sectional area with or without channels, the wicking velocity was only $0.14 \pm 0.1\text{ mm s}^{-1}$ for scaffolds without channels, $1.68 \pm 0.15\text{ mm s}^{-1}$ for macro-channeled scaffolds, $1.85 \pm 0.1\text{ mm s}^{-1}$ for micro-channeled scaffolds, and a significant $3.64 \pm 0.1\text{ mm s}^{-1}$ for macro- and micro-channeled scaffolds (figure 7(b)). Both the volumetric flow rate and velocity started to plateau as blood wicked beyond the 50% height mark, as evidenced by the decrease in these values when wicking to 100% height similar to behavior seen in aqueous solution wicking, but blood wicking was still fast enough even at 20 mm height to be beneficial. As before, due to the high viscosity of blood compared to that of water, scaffolds without any channels showed very poor wicking from the start, and in all cases did not even wick the full 100% height, indicating that this system captured a condition in which macro- and micro-channels drastically improve

blood wicking. Without channels, Ch-Al scaffolds barely wicked blood beyond 50% height. These results point to the need for channels in physiological situations such as bone marrow uptake.

4. Discussion

While 3DP offers many advantages such as patient specificity, easily adjustable designs, and complex printable geometries, 3DP can be limited in resolution and limited to the few materials that are compatible with the printer type. Often sugars, starches, and plasters are the only materials used in some powder-based 3D printers, and only non-aqueous polymers dissolved in organic solvents can be used for porogen leaching without dissolving the 3DP mold. Selective laser sintering printers often implement more biologically relevant powders, such as β -tricalcium phosphate (β -TCP) or hydroxyapatite particles, but both these powders and the 3DP itself can be very

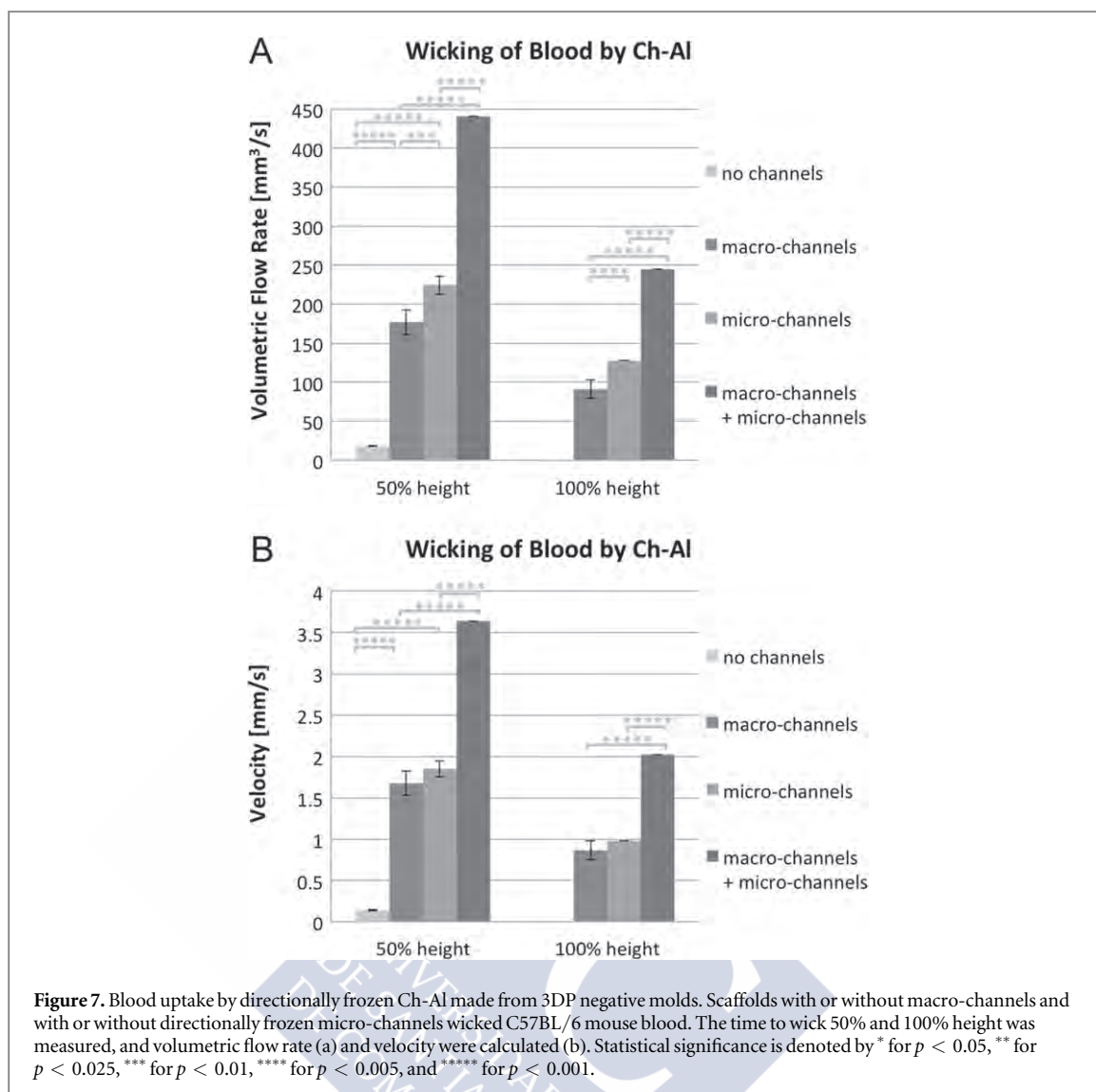


expensive [43–48]. Other types of 3D printers like FDM printers extrude plastics that have low porosity and thus poor cell infiltration. These limitations prompted the need to create a porogen leached PLLA positive mold from the 3D print and laser cut holes to allow Ch-Al infusion.

It was observed that the top and bottom surfaces of traditionally cast Ch-Al scaffolds exhibited denser fibers, oriented perpendicular to the z axis, than in the cross-sectioned scaffold center, where scaffold struts were randomly oriented. This is hypothesized to be due to surface tension effects during freezing and freeze-drying. Similar behavior was seen with pure chitosan lyophilized scaffolds, where SEM revealed an ionic complex membrane on the outer scaffold surface while the internal porous structure was retained [49]. If the temperature during lyophilization is not low enough, freeze-drying often results in the formation of a surface skin due to the collapse of the matrix at the scaffold-air or scaffold-solid interface, which is driven by interfacial tension during solvent evaporation [50]. Notably, directionally frozen Ch-Al scaffolds only displayed this surface skin behavior on the bottom surface (Zone 1), and not the top (Zone 3). This may be

explained by directional freezing kinetics. Lamellar ice crystal growth in Zone 3 involves an increasing build up of supercooling ahead of the freezing front and likely overshadows any surface tension skin effects between the slurry and ambient air, dominating pore formation.

Ch-Al scaffolds wicked both aqueous solution and blood extremely quickly. This can be explained by the extreme hydrophilicity of both Ch and Al [17]. Blood uptake was not as fast as aqueous solution uptake because of the difference in viscosity. The viscosity of blood, a non-Newtonian fluid, at 37 °C is normally 3–4 cP, while the viscosity of water is 0.91 cP at 25 °C and 1.0 cP at 20 °C [51]. Fluid uptake was maximum up to around 80% of the scaffold height, and then the volumetric flow rate and velocity started to plateau. To illustrate this, volumetric flow rate and velocity were calculated up to both 50% and 100% height. This is consistent with Darcy's law and Washburn's equation about imbibement by porous solids in non-steady state. Specifically, fluid uptake is driven by adhesive forces in capillary action but is nonlinear, decreases over time in the presence of gravity, and is slowed by viscous resistance that is proportional to the flow



velocity through a coefficient that increases with fluid column length [52]. This results in reduced flow velocity as the fluid front advances further into the porous media. Importantly, the slower speed after the 50% height mark was still faster than the time scale to activate plasma coagulation, ~30–45 s, which is the physiologically relevant parameter to be concerned with when considering what may hinder bone marrow uptake *in vivo* [53].

Many studies have demonstrated how the porous structure of a material, specifically pore size, connectivity, and tortuosity, affects cell penetration during seeding [54–58]. Scaffold architectures with high surface area to polymer mass ratio as well as high surface area to volume ratio allow for tissue ingrowth, uniform cell delivery, and proliferation to high cell density [54, 59, 60]. Pore size also affects cell metabolic activities, specifically matrix biosynthesis, and moreover, cell survival and chondrogenesis within the scaffold depend on pore size (though optimal ranges vary between studies and materials) [54, 59–64]. Ultimately, larger pore diameter, well interconnected

pores, and low tortuosity pores all lead to improved cell penetration during both seeding and ingrowth, and these pore characteristics also improve liquid uptake. By creating and controlling lamellar, interconnected pores on both the micro- and macro-scale, in combination with selecting exceptionally hydrophilic polymers, directionally frozen 3DP Ch-Al scaffolds can begin to tackle the issues of cell penetration and fluid uptake to achieve better cell distribution and delivery within the scaffold.

The region closest to the cold finger (Zone 2) exhibited cellular or spherical pore morphology, and this zone was located at the bottom 500 μm of the scaffold. Beyond this region, a lamellar zone (Zone 3) was maintained all the way through the remaining height. The cellular zone forms because directional freezing kinetics involves a progressive transition of the freezing front morphology from planar to cellular followed by cellular to lamellar or dendritic [42]. This transition is caused by the progressive build up of supercooling ahead of the freezing front and may also be influenced by morphological instabilities induced by the Ch-Al

slurry particles [42]. After the transition occurs, a steady regime is achieved, which was confirmed experimentally by the lamellar region persisting through the remaining height. The first region in contact with the cold finger demonstrates faster freezing kinetics, and at this point the heat transfer equilibrium has not yet been reached. This accounts for the unstable cellular morphology in this region of the scaffold [42].

Directional freezing is a competition between heat transfer and mass transfer kinetics, and the presence of dendrites achieved by directional freezing indicates the system resides in diffusion limited ice crystal growth since both heat and mass transfer are characterized by diffusion. At low crystal growth speeds, the solute is expected to diffuse away from the interface of growing ice crystal. At high crystal growth speeds, the solute is unable to diffuse away and is engulfed. The diffusion flux determines the solute gradient in the liquid at a given growth rate and, consequently, determines the value of constitutional supercooling. Freeze concentration, where solutes get more concentrated around a growing crystal as they get pushed out, of Ch-Al causes supercooling at the interface, leading to instability and ice crystal growth, where Ch-Al is concentrated between crystals.

The microstructural features can be controlled by exploiting the physics of ice formation. Specifically, the ice tip radius, which is physically determined by the magnitude of supercooling ahead of the freezing front, can be modified by increasing or decreasing the cooling rate during freezing. For fast cooling rates, supercooling becomes larger and the microstructure can be scaled down. On the other hand, under a very slow cooling regime, the pore thickness can be noticeably increased [42].

While previous work demonstrated directional freezing with a dispersed phase in a continuous phase, or ceramic particles distributed in water, this system is not colloidal and demonstrates directional freezing of a continuous phase in a continuous phase, or polymers dissolved in water [41, 42]. Instead of ceramic particles being pushed out of ice crystals during ice crystal nucleation and growth via phase separation, Ch-Al polymer is pushed out via phase separation and results in similar freeze concentration as the polymer becomes more concentrated around the growing ice crystal tip. This translation of directional freezing from ceramic particle slurries to dissolved polymer solutions demonstrates the versatility of directional freezing and its applicability to many polymeric scaffold fabrication techniques.

The presence of the 3DP mold, used to create axial or orthogonal channels in the scaffold, within the cold finger introduces a third material with a different thermal conductivity, and this third material could potentially affect heat transfer during directional freezing. However, the thermal conductivity of the 3DP ABS mold is very low ($0.17 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), similar to the

PTFE cylindrical mold of the cold finger ($0.25 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), so the heat transfer is preferential into the Ch-Al aqueous solution, which has a slightly higher thermal conductivity likely similar to that of water ($0.596 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ at 20°C) [65, 66]. Frozen Ch-Al thermal conductivity is likely similar to that of ice ($2.22\text{--}3.48 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ at 0°C to -100°C), which is much higher than either the aqueous solution or polymer molds, and so heat transfer is much more preferential through the forming ice crystals [67]. Taken together, the cold finger's thermal energy is transferred more easily to the aqueous solution initially, and once ice crystals form, thermal energy is transferred more easily to the ice and then to the solution. Additionally, since the thermal conductivities of the polymer molds and Ch-Al solution are not drastically different, the struts of the ABS mold do not act as severe insulators comparatively; heat transfer can continue through the ABS and allows ice crystal growth to continue on the other side of the strut. Thus it is likely that the 3DP mold did not negatively impact heat transfer from the cold finger to the Ch-Al slurry.

During ice crystal growth, Zone 2 is limited to the region closest to the cold finger, where freezing and crystal growth happen quickly and heat transfer kinetics dominate, causing spherical pore formation. Contrastingly, Zone 3 can continue growing for the remaining height of the scaffold, due to its distance away from the cold finger where freezing and crystal growth happen more slowly and mass transfer kinetics dominate, causing lamellar pore formation. This freezing regime behavior relative to the cold finger explains why the presence of the 3DP mold did not interfere with lamellar pore formation.

The next phase of this research naturally entails applying directional freezing to 3DP positive molding by implementing directional freeze casting after centrifuge infusion. With these two approaches, complex, patient-specific macro-geometry and finely controlled, biomimetic micro-geometry can be achieved. In the future, 3D printed, directionally frozen Ch-Al scaffolds can be translated to an *in vivo* knee joint animal model for further evaluation. A macro- and micro-designed osteochondral implant may enhance vascularization of the bone portion due to the channeled structural cues and may improve chondrogenesis in the cartilage region due to the zonal structural cues. By combining this scaffold fabrication technology with a spatiotemporal, sustained, dual growth factor delivery system, an acellular implant can be devised to wick up mesenchymal stem cells from the underlying bone marrow using controlled macro- and micro-channeled architecture, and the stem cells can then be guided by both biochemical and micro-environmental cues to chondrogenically and osteogenically differentiate where appropriate.

As 3D printing resolution improves and a wider selection of materials become printable, we will be able to print biomaterial scaffolds directly without the

additional infusion, laser cutting, and directional freezing processes. Until then, this work motivates the simultaneous control over scaffold macro- and micro-architecture.

5. Conclusion

Macro- and micro-designed Ch-Al scaffolds, based on 3DP and directional freezing, were successfully fabricated to increase aqueous solution uptake, blood uptake, and cell distribution. Macro-channels were created using both 3DP negative molds and more complex 3DP positive molds, which utilized a centrifuge infusion process into a PLLA preform made from the original sugar 3D print. Micro-channels parallel to the z axis were obtained by directional freezing using a cold finger apparatus, and the resulting lamellar pores were 300 μm long by 50 μm diameter. A 100 μm diameter cellular pore zone was seen at the bottom 500 μm of the scaffold, with an integrated transition from lamellar to spherical pore regions. The top and bottom surfaces of scaffolds traditionally cast and frozen as well as the bottom surfaces of directionally frozen scaffolds demonstrated a denser fibrous morphology where scaffold struts ran perpendicular to the z axis. The combination and orientation of parallel lamellar pores, cellular pores, and perpendicular scaffold struts in a single integrated scaffold may serve to mimic the zonal architecture seen in native articular cartilage. Further, the remarkable fluid uptake ability by scaffolds with macro- and micro-channels may allow for an off-the-shelf, acellular osteochondral implant that does not require cell seeding but rather endogenous cell uptake to achieve desired homogeneous cell distribution.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

- [1] Gomoll A H *et al* 2014 Autologous chondrocyte implantation (ACI) *Cartilage Restoration* ed A H Gomoll and J Farr (New York: Springer) pp143–52
- [2] McGowan K B and Stigman G 2013 Regulatory challenges for cartilage repair technologies *Cartilage* **4** 4–11
- [3] Ruano-Ravina A and Jato Diaz M 2009 Autologous chondrocyte implantation: a systematic review *Osteoarthritis Cartilage* **14** 47–51
- [4] Diekmann B O and Guilak F 2013 Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities *Curr. Opin. Rheumatology* **25** 119–26
- [5] Gardner O F *et al* 2013 Chondrogenesis of mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering *Histol. Histopathol.* **28** 23–42
- [6] Roelofs A J, Rocke J P J and De Bari C 2013 Cell-based approaches to joint surface repair: a research perspective *Osteoarthritis Cartilage* **21** 892–900
- [7] Steinert A F *et al* 2007 Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage *Arthritis Res. Ther.* **9** 213–27
- [8] Yeong W Y *et al* 2004 Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential *Trends Biotechnol.* **22** 643–52
- [9] Lee C *et al* 2006 The influence of mechanical stimuli on articular cartilage tissue engineering *Topics in Tissue Engineering* vol 2 ed N Ashammakhi and R L Reis pp 1–32
- [10] Hauselmann H J *et al* 1996 Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage *Am. J. Physiol.—Cell Ph.* **271** C742–52
- [11] Martin J A and Buckwalter J A 2001 Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis *Iowa Orthop. J.* **21** 1–7
- [12] Mithoefer K *et al* 2005 The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee *J. Bone Joint Surg. Am.* **87** 1911–20
- [13] Johnson L L 1986 Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathological perspective: present status *Arthroscopy* **2** 54–69
- [14] Pridie K 1959 A method of resurfacing osteoarthritic knee joints *J. Bone Joint Surg.* **41B** 618–9
- [15] Li Z *et al* 2005 Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **26** 3919–28
- [16] Li Z and Zhang M 2005 Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering *J. Biomed. Mater. Res.* **75A** 485–93
- [17] Choi B *et al* 2014 Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6** 20110
- [18] Choi B *et al* 2015 Covalently conjugated transforming growth factor- β 1 in modular chitosan hydrogels for the effective treatment of articular cartilage defects *Biomater. Sci.* **3** 742–52
- [19] Choi B *et al* 2015 Visible-light-initiated hydrogels preserving cartilage extracellular signaling for inducing chondrogenesis of mesenchymal stem cells *Acta Biomaterialia* **12** 30
- [20] Zeng L *et al* 2014 Effects of microcavitary alginate hydrogel with different pore sizes on chondrocyte culture for cartilage tissue engineering *Mater. Sci. Eng. C* **34** 168
- [21] Yan S *et al* 2015 Injectable *in situ* self-cross-linking hydrogels based on poly(L-glutamic acid) an alginate for cartilage tissue engineering *Biomacromolecules* **15** 4495
- [22] Siu R K *et al* 2012 NELL-1 promotes cartilage regeneration in an *in vivo* rabbit model *Tissue Eng. A* **18** 252
- [23] Hsu S *et al* 2004 Evaluation of chitosan-alginate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration *Artif. Organs* **28** 693
- [24] Pound J C *et al* 2006 Strategies to promote chondrogenesis and osteogenesis from human bone marrow cells and articular chondrocytes encapsulated in polysaccharide templates *Tissue Eng.* **12** 2789
- [25] Reed S and Wu B M 2015 Biological and mechanical characterization of chitosan-alginate scaffolds for growth factor delivery and chondrogenesis *J. Biomed. Mater. Res. B* **00B** 000–000
- [26] Yuan W *et al* 2007 pH-controlled construction of chitosan/alginate multilayer film: characterization and application for antibody immobilization *Langmuir* **23** 13046–52
- [27] Wan Y, Wu H and Wen D 2004 Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering: I. Preparation and characterization *Macromol. Biosci.* **4** 882–90
- [28] Lee M and Wu B M 2012 Recent advances in 3D printing of tissue engineering scaffolds *Computer-Aided Tissue Engineering* ed M A K Liebschner (New York: Springer) pp 257–67
- [29] Klein T J *et al* 2009 Tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones *Tissue Eng. B* **15** 1–15
- [30] Sherwood J *et al* 2002 A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair *Biomaterials* **23** 4739–51
- [31] Mimura T *et al* 2008 A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair *Osteoarthritis Cartilage* **16** 1083–91
- [32] Brittberg M *et al* 1997 Influence of fibrin sealant (Tisseel®) on osteochondral defect repair in the rabbit knee *Biomaterials* **18** 235–42

- [33] Shao X X *et al* 2006 Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits *Biomaterials* **27** 1071–80
- [34] Schaefer D *et al* 2002 Tissue-engineered composites for the repair of large osteochondral defects *Arthritis Rheum.* **46** 2524–34
- [35] Kreklau B *et al* 1999 Tissue engineering of biphasic joint cartilage transplants *Biomaterials* **20** 1743–9
- [36] Holland T A *et al* 2005 Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered, degradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds *J. Biomed. Mater. Res. A* **75A** 156–67
- [37] Chen G P *et al* 2006 Preparation of a biphasic scaffold for osteochondral tissue engineering *Mater. Sci. Eng. C* **26** 118–23
- [38] Levingstone T J *et al* 2014 A biomimetic multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair *Acta Biomaterialia* **10** 1996–2004
- [39] Harley B A *et al* 2010 Design of a multiphase osteochondral scaffold III: fabrication of layered scaffolds with continuous interfaces *J. Biomed. Mater. Res.* **92** 1078–93
- [40] Shimomura K *et al* 2014 Osteochondral tissue engineering with biphasic scaffold: current strategies and techniques *Tissue Eng. B* **20** 468–76
- [41] Deville S *et al* 2006 Freezing as a path to build complex composites *Science* **311** 515–8
- [42] Deville S, Saiz E and Tomsia A P 2006 Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **27** 5480–9
- [43] Shuai C *et al* 2013 *In vitro* bioactivity and degradability of β -tricalcium phosphate porous scaffold fabricated via selective laser sintering *Biotechnol. Appl. Biochem.* **60** 266–73
- [44] Simpson R L *et al* 2008 *J. Biomed. Mater. Res.* **84B** 17–25
- [45] Shuai C, Gao C and Peng S 2011 Structure and properties of nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering with a selective laser sintering system *Nanotechnology* **22** 285703
- [46] Shuai C *et al* 2013 Development of composite porous scaffolds based on poly(lactide-co-glycolide)/nano-hydroxyapatite via selective laser sintering *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **69** 51–7
- [47] Eosoly S *et al* 2010 Selective laser sintering of hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds *Acta Biomaterialia* **6** 2511–7
- [48] Zhou W Y *et al* 2008 Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19** 2535–40
- [49] Madhally S V and Matthew H W T 1999 Porous chitosan scaffolds for tissue engineering *Biomaterials* **20** 1133–42
- [50] Ho M H *et al* 2004 Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods *Biomaterials* **25** 129–38
- [51] Elert G 2014 The Physics Hypertextbook, Viscosity (<http://physics.info/viscosity/>)
- [52] Anderson D M and Siddique J I 2013 Modelling wicking in deformable porous media using mixture theory *Traditional and Modern Modeling Approaches* ed R Masoodi and K M Pillai (Boca Raton, FL: CRC Press) p 317
- [53] Oslakovic C *et al* 2012 Polystyrene nanoparticles affecting blood coagulation *Nanomedicine: Nanotechnology Biol. Med.* **8** 981–6
- [54] Agrawal C M and Ray R B 2001 Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal engineering *J. Biomed. Mater. Res.* **55** 141–50
- [55] Wald H L *et al* 1993 Cell seeding in porous transplantation devices *Biomaterials* **14** 270–8
- [56] Sachlos E and Czernuszka J T 2003 Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds *Eur. Cells Mater.* **5** 29–40
- [57] Jukes J M *et al* 2008 Critical steps toward a tissue engineered cartilage implant using embryonic stem cells *Tissue Eng. A* **14** 135–47
- [58] Melchels F P W *et al* 2010 Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing *Acta Biomaterialia* **6** 4208–17
- [59] Murphy C M, Haugh M G and O'Brien F J 2010 The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering *Biomaterials* **31** 461–6
- [60] Oh S H *et al* 2010 Investigation of pore size effect on chondrogenic differentiation of adipose stem cells using a pore size gradient scaffold *Biomacromolecules* **11** 1948–55
- [61] Griffon D J *et al* 2006 Chitosan scaffolds: interconnective pore size and cartilage engineering *Acta Biomaterialia* **2** 313–20
- [62] Amos M *et al* 2015 Scaffold mean pore size influences mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation and matrix deposition *Tissue Eng. A* **21** 486–97
- [63] Duan P *et al* 2014 The effects of pore size in bilayered poly(lactide-co-glycolide) scaffolds on restoring osteochondral defects in rabbits *J. Biomed. Mater. Res. A* **102** 180–92
- [64] Zhang Q *et al* 2014 Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration *Acta Biomaterialia* **10** 2005–13
- [65] Kaye and Laby 2015 Tables of Physical & Chemical Constants, Physical properties of sea water (http://kayelaby.npl.co.uk/general_physics/2_7/2_7_9.html)
- [66] The Engineering ToolBox 2015 Ice—Thermal Properties (http://engineeringtoolbox.com/ice-thermal-properties-d_576.html)
- [67] Professional Plastics 2015 Thermal Properties of Plastic Materials (<http://professionalplastics.com/professionalplastics/ThermalPropertiesofPlasticMaterials.pdf>)