



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN METALURGIA Y MATERIALES

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

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOFUNCIONALIZACIÓN DE ANDAMIOS
BIOMIMÉTICOS DE BIOVIDRIO NANOESTRUCTURADO POR LA TÉCNICA
SOL-GEL ACOPLADA A SECADO POR ASPERSIÓN

Tesis que para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales presenta:

MC MARIO EDUARDO ABAD JAVIER

Director de Tesis

DC MARÍA EUGENIA CONTRERAS GARCÍA

Co-Director de Tesis

DC MARCOS CAJERO JUÁREZ

Morelia, Michoacán

febrero de 2019

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOFUNCIONALIZACIÓN DE ANDAMIOS
BIOMIMÉTICOS DE BIOVIDRIO NANOESTRUCTURADO POR LA TÉCNICA
SOL-GEL ACOPLADA A SECADO POR ASPERSIÓN

Of. Núm. IIM-ST-007-2019.

Morelia, Mich., Enero 10 del 2019.

M. C. MARIO EDUARDO ABAD JAVIER
Presente

Por medio de la presente, esta dirección del Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, tiene a bien informarle que para presentar su examen de grado de Doctor en Ciencias en Metalurgia y Ciencias de los Materiales, con la tesis titulada **“SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y BIOFUNCIONALIZACIÓN DE ANDAMIOS BIOMIMÉTICOS DE BIOVIDRIO NANOESTRUCTURADO POR LA TÉCNICA SOL-GEL ACOPLADA A SECADO POR ASPERSIÓN”**, le ha sido asignada la siguiente mesa sinodal:

7600546-1	DRA. MA. EUGENIA DE LA SALUD CONTRERAS GARCÍA	(Presidente)
0500346-6	DR. MARCO CAJERO JUÁREZ	(Vocal)
9700358-1	DR. JUAN ZÁRATE MEDINA	(Vocal)
0200033-4	DR. ARIOSTO MEDINA FLORES	(Vocal)
0100153-1	DR. JOSÉ LEMUS RUÍZ	(Vocal)
1300141-8	DRA. ROSA ELVIRA NUÑEZ ANITA	(Suplente)

Agradeciendo de antemano las atenciones que se sirva prestar a la presente, aprovecho para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Alberto Ruiz Marines
Director

Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

U. M. S. N. H.



Instituto de Investigación en Metalurgia y Materiales

ARM/cea

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Agradezco profundamente a la Doctora María Eugenia Contreras García, sin su dirección este trabajo no habría sido posible, a lo largo de estos años de relación profesional he llegado a considerarla no solo mi asesora sino una amiga con la cual puedo contar y acudir para pedir consejo. Le estoy muy agradecido por escuchar mis ideas y encaminarlas, ya que son pocos los investigadores que analizan y ayudan a forjar la mente de sus sucesores a través del diálogo.

A la doctora Rosa Elvira Núñez Anita le agradezco por toda la atención que ha tenido conmigo, su apoyo en la parte académica y profesional ha sido vital para mi desarrollo, sin su apoyo no tendría la mayoría de los resultados que hoy puedo presentar, su confianza en mi hace que busque superarme constantemente.

Al doctor Marcos Cajero Juárez le agradezco por toda la experiencia y los constantes desafíos, estos me ayudaron a fortalecerme como profesionista y a aprender que es nuestra tarea lograr hacer ciencia y generar conocimiento, aun cuando las situaciones sociopolíticas del país e instituciones son contraproducentes para el quehacer científico.

Al doctor Juan Zarate Medina quien me guio y resolvió aún mis dudas más simples, es un excelente investigador y un gran modelo a seguir, su modestia y humildad aún siendo tan gran investigador me hace creer que los resultados siempre demostrarán más que cualquier palabra que pueda yo pronunciar para enaltecerme.

Al doctor Ariosto Medina Flores cuya paciencia con mis preguntas es admirable, pero sobre todo sus preguntas y enfoque respecto a mi proyecto me hacían reflexionar y vislumbrar un panorama completamente diferente sobre las propuestas y resultados que se han generado en las diferentes etapas de la investigación.

Al D.C. Aureliano Juárez Caratachea cuyo apoyo fue de vital importancia para el desarrollo de las pruebas de citotoxicidad *in ovo*, sin su apoyo y la de sus estudiantes no se habrían determinado algunos de los puntos más fuertes de la investigación.

A la M.C. María Remedios Cisneros Magaña, la M.C. Victoria Luke Valdivia, el M.C. Héctor Damián Orozco Hernández y el M.C. José Antonio Rodríguez Torres, cuyo apoyo técnico fue de excelente, ustedes son el mejor y más eficiente equipo de trabajo que he conocido.

A mi compañero el Ingeniero Francisco Perez Duran, que se convirtió en un gran apoyo, su optimismo y puntos de vista me permitieron encontrar solución a una gran cantidad de problemas técnicos.

A mi compañero el Doctor Gerardo Manuel Rodríguez Torres, cuya motivación me impulso en los momentos de mayor frustración, es un gusto haber compartido tanto tiempo con un gran profesionista y excelente jefe de familia.

Al Doctor Samuel Torres Cadenas cuyos consejos y ayuda me permitieron comenzar el trabajo en el laboratorio, toda esa información fue excelente para mi emprendimiento en una nueva área de la ciencia.

A los compañeros del laboratorio de Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, que poco a poco se volvieron parte de mi vida, aunque no somos de la misma área es un gusto haber compartido tanto tiempo y experiencias a su lado.

Quiero agradecer también al Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Ciencias de los Materiales por todo el apoyo tanto técnico como personal, es un honor para mí haber sido formado en esta institución de tan alta calidad.

Quiero agradecer al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales y al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología por haberme permitido el desarrollo de una gran parte del proyecto en sus instalaciones.

Quiero agradecer a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo los diferentes apoyos económicos y al personal académico que la conforma, gracias a ello se ha hecho posible la realización y conclusión de mi proyecto.

Quiero agradecer al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el soporte económico para la realización de este proyecto, específicamente por el apoyo número 384981 que financió mi manutención en el periodo que abarca del 1 de septiembre de 2014 al 31 de agosto de 2018.

Esta tesis, así como todo el esfuerzo que requirió están dedicados a mi familia:

Mis hijos Eduardo David y Daniel Elías, que son mi razón para seguir adelante, sin ellos todo aquello que se ha logrado con esta investigación carecería de sentido.

Mi esposa Edith, que se ha convertido en una parte fundamental de mí, gracias a ella y todo su apoyo incondicional es que he logrado el desarrollo de cada una de las metas propuestas en este proyecto.

Mis padres a quienes debo todo, ellos me han impulsado desde antes de siquiera nacer y han sido los mejores padres que un hijo puede desear; su amor, su paciencia y todos sus sacrificios me han enseñado que lo más importante es la familia y el apoyo mutuo.

Mi suegra Abigail, quien me ha apoyado en las tareas diarias, permitiéndome alcanzar esta meta al permanecer y hacerse cargo del hogar mientras mi esposa y yo trabajamos arduamente para superarnos.

Finalmente, pero no menos importante, quiero dedicar este trabajo a Dios que me bendijo con la vida, con mi familia y con la capacidad suficiente para alcanzar mis metas.

Este trabajo está dedicado a ellos, que me han permitido alcanzar uno de mis más grandes sueños.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Justificación	1
1.2 Objetivo general.....	1
1.2.1 Objetivos Particulares	1
1.3 Hipótesis	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	3
2.1 Biomateriales	3
2.1.1 Clasificación de los biomateriales en base a su composición	5
2.1.1.1 Biomateriales metálicos.....	5
2.1.1.2 Biomateriales poliméricos	5
2.1.1.3 Biomateriales cerámicos.....	5
2.1.1.4 Biomateriales compuestos	6
2.1.2 Clasificación de los biomateriales en base al tipo de aplicación	6
2.1.2.1 Reemplazo de tejido dañado o enfermo	6
2.1.2.2 Agentes coadyuvantes	7
2.1.2.3 Corrector de funciones.....	7
2.1.2.4 Corrección cosmética	7
2.1.2.5 Ayudante en diagnósticos y tratamientos	8
2.1.3 Clasificación de las interacciones organismo-biomaterial	8
2.1.3.1 Reacción bioactiva.....	8
2.1.3.2 Reacción biológica casi inerte	8
2.1.3.3 Reacción tóxica.....	9
2.1.3.4 Disolución del implante.....	9
2.2 Biovidrio 45s5.....	9
2.2.1 Clasificación de los biovidrios	10
2.2.1.1 Biovidrios base silicio	10
2.2.1.2 Biovidrios base boro.....	11
2.2.1.3 Biovidrios base fosfato	11
2.2.2 Técnicas de síntesis sol-gel para partículas de biovidrio	12
2.2.2.1 Catálisis alcalina	13
2.2.2.2 Catálisis ácido/base.....	13
2.2.2.3 Post-modificación en derivados sol-gel.....	14

2.2.2.4	Técnica sol-gel asistida por microemulsión	14
2.2.2.5	Técnica sol-gel asistida por aerosol.....	15
2.2.2.6	Otros métodos basados en síntesis sol-gel.....	16
2.2.3	Propiedades antimicrobianas de agentes dopantes.....	16
2.3	Aplicaciones del biovidrio 45s5 a tratamiento de enfermedades	18
2.3.1	Osteomielitis necrosante	19
2.3.2	Enfermedad arterial periférica.....	20
2.4	Sistema óseo humano.....	22
2.4.1	Células óseas	24
2.4.1.1	Osteoclastos	24
2.4.1.2	Osteoblastos.....	25
2.4.1.3	Osteocitos	26
2.4.2	Fracción mineral del hueso	26
2.4.3	Fracción orgánica del hueso.....	27
2.5	El tejido vascular (vasos sanguíneos).....	29
2.5.1	Células endoteliales.....	29
2.5.2	Requerimientos tridimensionales de las células endoteliales.....	31
2.6	Andamios biomiméticos	31
2.6.1	Propiedades de los andamios	32
2.6.1.1	Porosidad	32
2.6.1.2	Biocompatibilidad	33
2.6.1.3	Bioresorbilidad	33
2.6.1.4	Estructura tridimensional.....	33
2.6.1.5	Propiedades mecánicas	34
2.6.2	Técnicas de síntesis de andamios de biovidrio	34
2.6.2.1	Enlace térmico de partículas y fibras.....	34
2.6.2.2	Replicación de espumas poliméricas	35
2.6.2.3	Fabricación de sólidos de forma directa	35
2.6.2.4	Secado por liofilización.....	36
2.6.2.5	Procesamiento sol-gel.....	36
2.6.2.6	Espumado por gas.....	36
2.7	Ensayos <i>in vitro</i>	37

2.7.1 Fluido corporal simulado	37
2.7.2 Suero sanguíneo de conejo.....	38
2.7.3 Actividad antimicrobiana	39
2.7.3.1 Escherichia coli.....	40
2.7.3.2 Medio LB.....	41
2.7.4 Citotoxicidad	42
2.7.4.1 Tipos de ensayos de citotoxicidad in vitro.	42
2.7.4.1.1 Pruebas de extractos.....	42
2.7.4.1.2 Pruebas de contacto indirecto	43
2.7.4.1.3 Pruebas de contacto directo	43
2.7.4.2 Células RPMI 8226	43
2.8 Ensayos <i>in ovo</i>	44
2.8.1 La membrana corialantoidea	45
2.8.2 Angiogénesis	46
2.9 Biofuncionalización	47
2.9.1 Colágeno Tipo I.....	48
2.9.2 Vitamina D3	49
2.10 Estado del arte.....	50
CAPÍTULO 3. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS	53
3.1 Reactivos.....	53
3.2 Metodologías	54
3.2.1 Síntesis de biovidrio por la técnica sol-gel	54
3.2.2 Secado por aspersión.....	54
3.2.3 Tratamientos térmicos.....	54
3.2.4 Biofuncionalización del biovidrio.....	55
3.2.5 Caracterización cristalográfica por difracción de rayos X.	55
3.2.6 Caracterización de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo.....	56
3.2.7 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido.	56
3.2.8 Caracterización semicuantitativa por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X.....	56
3.2.9 Ensayos de bioactividad in vitro.	57
3.2.10 Preparación del fluido corporal simulado.	57
3.2.11 Obtención de plasma sanguíneo de conejo	58

3.2.12 Cuantificación de contenido de proteína por el método de Bradford	58
3.2.13 Ensayos de bioactividad in ovo.....	58
3.2.14 Ensayos de citotoxicidad con células RPMI 8226	59
3.2.15 Conteo celular y viabilidad de células linfocíticas.....	60
3.2.16 Ensayos de actividad antimicrobiana.	62
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4.1 Síntesis de aglomerados esféricos de biovidrio por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión.	63
4.1.1 Caracterización morfológica de las microesferas de biovidrio.	65
4.1.2 Caracterización semicuantitativa de las microesferas de biovidrio.	66
4.1.3 Caracterización cristalográfica de las microesferas de biovidrio.....	68
4.2 Síntesis de biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre	69
4.2.1 Caracterización morfológica de biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre.....	70
4.2.2 Caracterización semicuantitativa del biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre.....	71
4.2.3 Caracterización cristalográfica del biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre.....	73
4.3 Actividad antimicrobiana.....	75
4.4 Síntesis de andamios miméticos de biovidrio nanoestructurado empleando microesferas de poliestireno como agente templante.	78
4.5 Efecto de la temperatura en la síntesis de andamios miméticos de biovidrio nanoestructurado empleando microesferas de poliestireno como agente templante	83
4.5.1 Caracterización morfológica de los bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.....	83
4.5.2 Caracterización semicuantitativa de bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.....	85
4.5.3 Caracterización cristalográfica de bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.....	85
4.6 Ensayos de bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.	88
4.6.1 Caracterización morfológica de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.....	88
4.6.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.....	95

4.6.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.	100
4.7 Análisis de la interconectividad de poro	102
4.8 Comparabilidad de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal	111
4.8.1 Caracterización morfológica de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.	111
4.8.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.	115
4.8.3 Caracterización espectroscópica de infrarrojo de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.	117
4.8.4 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado y en la membrana corialantoidea.	120
4.9 Comparabilidad de la evaluación de bioactividad en biovidrio 45s5 en la membrana corialantoidea, el plasma de sangre de conejo y el fluido corporal simulado.	122
4.9.1 Caracterización morfológica de la evaluación de bioactividad en biovidrio 45s5 en la membrana corialantoidea, el plasma de sangre de conejo y el fluido corporal simulado.	122
4.9.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X.	125
4.9.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado y en la membrana corialantoidea.	128
4.9.4 Modificaciones morfológicas en la fase de hidroxapatita.....	129
4.10 Ensayos de citotoxicidad	133
4.11 Actividad angiogénica	136
4.12 Biofuncionalización de la superficie de los andamios miméticos de biovidrio 45s5.	139
4.13 Efecto de la biofuncionalización con vitamina D3 y colágeno tipo I en la bioactividad del biovidrio 45s5 nanoestructurado.....	143
4.13.1 Caracterización morfológica de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y colágeno tipo I	143
4.13.2 Caracterización semicuantitativa de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y colágeno tipo I.....	152

4.13.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y con colágeno tipo I.....	155
4.14 Alcances generales del proyecto.....	158
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	161
CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO.....	164
CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	165
CAPÍTULO 8. ANEXOS	187
Premio CANIFARMA 2017.....	187
M.E. Abad-Javier, M. Cajero-Juárez, M.E. Contreras García, 45S5 Bioglass porous scaffolds: structure, composition and bioactivity characterization, Epa. - J. Silic. Based Compos. Mater. 68 (2016) 124–128. doi:10.14382/epitoanyag-jsbcm.2016.22.	188
M.E. Abad-Javier, R.E. Nuñez-Anita, M. Cajero-Juárez, M.E. Contreras-García, Comparability in bioactivity assays of 45s5 bioglass scaffolds using simulated body fluid and rabbit blood plasma, IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 13 (2018) 13–23. doi:10.9790/3008-1304061323.....	189

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ECUACIONES

Figura 2.1 Anatomía del hueso [66].	23
Figura 2.2 Membrana corialantoidea. a) Imagen tomada desde la parte superior de un embrión en el 10 EDD, b) localización de la membrana corialantoidea (rojo) en el 12 EDD, c) ilustración del corte transversal de la membrana corialantoidea que está en contacto con el cascarón [118].	45
Figura 3.1 Tratamientos térmicos empleados en la fabricación de diferentes productos de biovidrio.	55
Figura 4.1 Distribución de diámetro de aglomerados de partículas en 5 lotes de biovidrio 45s5 con tratamiento térmico y sin tratamiento térmico.	64
Figura 4.2 Micrografías (MEB) de diferentes muestras de biovidrio obtenidas por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión del lote BGs1:3 previo al tratamiento térmico (A), el lote BGs1:3 tratado a 500 °C (B), el lote BGs1:3 tratado a 700°C (C) y el lote BGs1:12 tratada a 700 °C (D). Columna izquierda aumento de 2500X y columna derecha aumento de 10000X.	66
Figura 4.3 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra BGs1:3 previa al tratamiento térmico (A), muestra BGs1:3 tratada a 500 °C (B), muestra BGs1:3 tratada a 700°C (C), muestra BGs1:12 tratada a 700 °C (D).	67
Figura 4.4 Patrón de difracción de rayos X: (A) de la muestra BGs1:3 previa al tratamiento térmico, (B) muestra BGs1:3 tratada a 700 °C, (C) muestra BGsP3 tratada a 700 °C.	69
Figura 4.5 Micrografías (MEB) de muestras de biovidrio obtenidas por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión de los lotes BGsAg1, BGsAg2, BGsAg3, BGsCu1, BGsCu2 y BGsCu3.	71
Figura 4.6 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra Control (A), BGsCu1 (B), BGsCu2 (C) y BGsCu3 (D) posteriores al tratamiento térmico.	72
Figura 4.7 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra Control (A), BGsAg1 (B), BGsAg2 (C) y BGsAg3 (D) posteriores al tratamiento térmico.	73

Figura 4.8 Patrón de difracción de rayos X de biovidrio 45s5 (A), biovidrio 45s5 dopado con plata (BGsAg3) antes (B) y después (C) del tratamiento térmico, biovidrio 45s5 dopado con cobre (BGsCu3) antes (D) y después (E) del tratamiento térmico.	75
Figura 4.9 Curva de calibración entre unidades formadores de colonia y número de células en suspensión de cultivo.	76
Figura 4.10 Micrografías (MEB) de los andamios de biovidrio: BGsHw1(A), BGsHw2(B), BGsHw3(C), BGsHw4 (D) y BGsHw5 (E) adicionados con microesferas de poliestireno en la solución precursora, secadas por aspersión, formados por prensado y tratados a 700 °C.....	79
Figura 4.11 Curva de distribución de diámetro de poros en andamios biomiméticos de biovidrio 45s5.....	81
Figura 4.12 Fotografías de microscopio óptico de los bioandamios de biovidrio porosos: BGsHw1(A), BGsHw2(B), BGsHw3(C), y BGsHw4 (D) adicionados con microesferas de poliestireno en la solución precursora.....	82
Figura 4.13 Micrografías (MEB) de los bioandamios obtenidos a partir de los diferentes tratamientos térmicos (A) 600, (B) 700, (C) 800, (D) 900 y (E) 1000 °C. Imágenes tomadas a 250X aumentos.	84
Figura 4.14 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de diferentes bioandamios tratados a (a) 600, (b) 700, (c) 800, (d) 900 y (e) 1000 grados centígrados.....	85
Figura 4.15. Difractogramas de rayos X de los diferentes bioandamios tratados a 600 °C(A), 700 °C (B), 800 °C (C), 900 °C (D) y 1000 °C (E).	87
Figura 4.16 Índice de cristalinidad de los diferentes bioandamios tratados a (a) 600, (b) 700, (c) 800, (d) 900 y (e) 1000 grados centígrados.	88
Figura 4.17 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 600 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	89
Figura 4.18 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en	

fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	90
Figura 4.19 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 800 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	91
Figura 4.20 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 900 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	93
Figura 4.21 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 1000 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	94
Figura 4.22 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 600 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.....	96
Figura 4.23 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 700 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.....	97
Figura 4.24 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 800 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.....	98
Figura 4.25 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 900 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.....	99
Figura 4.26 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 1000 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.....	100

Figura 4.27 Difractogramas de Rayos X de hidroxiapatita porcina (A) y diferentes bioandamios tratados a 600 (B), 700 (C), 800 (D), 900 (E) y 1000 (F) grados centígrados, tras un tratamiento de 8 días en fluido corporal simulado.....	102
Figura 4.28 Micrografías electrónicas de barrido de andamio de biovidrio 45s5.....	103
Figura 4.29 Microscopías ópticas del andamio de biovidrio 45s5.....	104
Figura 4.30 Cortes virtuales 2D de la muestra de biovidrio, a) corte radial, b) corte perpendicular y c) cortes en los tres planos principales.....	105
Figura 4.31 Cortes virtuales 2D del volumen analizado que ilustran el proceso de análisis de imágenes, a) imagen inicial, b) imagen binaria del sólido y c) imagen binaria de los poros.....	106
Figura 4.32 Representación tridimensional de la fase sólida (A) y la porosidad contenida (B) en el interior del andamio de biovidrio.....	107
Figura 4.33 Representación tridimensional del volumen sólido y las líneas de flujo obtenidas de la simulación numérica: volumen y líneas de flujo al interior (A), recorte del volumen tridimensional que permite observar por donde pasa el fluido (B) y líneas de flujo que indican los cambios de velocidad del fluido (C).....	108
Figura 4.34 Distribución de tamaño de poros en el andamio.....	110
Figura 4.35 Micrografía electrónica de barrido de un andamio de biovidrio 45s5 a 50000X (A) y 100000X (B) aumentos.....	111
Figura 4.36 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de (A1-A2) 2 días, (B1-B2) 4 días, (C1-C2) 6 días y (D1-D2) 8 días de incubación en fluido corporal simulado (SBF). Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	113
Figura 4.37 Micrografías (MEB) de las alícuotas de biovidrio no poroso después de (A1-A2) 2 días, (B1-B2) 4 días, (C1-C2) 6 días y (D1-D2) 8 días de incubación en fluido corporal simulado (SBF). Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	114
Figura 4.38 Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6(D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.....	116

Figura 4.39 Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del biovidrio no poroso después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6(D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.	117
Figura 4.40 Espectro de absorción de infrarrojo del biovidrio en incubación en fluido corporal simulado (<i>in vitro</i>). (A) bioandamio mimético de biovidrio nanoestructurado y (B) biovidrio no poroso. (a) control de hidroxiapatita, (b) día 8 del tratamiento, (c) día 6 del tratamiento, (d) día 4 del tratamiento, (e) día 2 del tratamiento y (f) sin tratamiento.	119
Figura 4.41 Espectro de absorción de infrarrojo del biovidrio en incubación en fluido corporal simulado (<i>in vitro</i>). (A) bioandamio mimético de biovidrio nanoestructurado y (B) biovidrio no poroso. (a) control de hidroxiapatita, (b) día 8 del tratamiento, (c) día 6 del tratamiento, (d) día 4 del tratamiento, (e) día 2 del tratamiento y (f) sin tratamiento.	120
Figura 4.42 Espectros de difracción de rayos X de hidroxiapatita control (A), biovidrio no poroso obtenido por síntesis convencional tradicional tras 8 días de inmersión en fluido corporal simulado (B), andamio mimético de biovidrio tras 8 días de inmersión en fluido corporal simulado (C) y biovidrio control sin tratamiento de inmersión.	121
Figura 4.43 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de 2 días (A), 3 días (B), 4 días (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	123
Figura 4.44 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 4(B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en suero sanguíneo de conejo. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	124
Figura 4.45 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 4(B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	125

Figura 4.46	Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) y 5 (E) días de incubación en la membrana corialantoidea.....	126
Figura 4.47	Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de incubación en suero sanguíneo de conejo.....	127
Figura 4.48	Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.	128
Figura 4.49	Difractogramas de rayos X de hidroxiapatita de origen porcino, andamios de biovidrio 45s5 elaborados a 700 °C y después de 8 días de incubación en la membrana corialantoidea (A), suero sanguíneo de conejo (B) y fluido corporal simulado (D), andamio de biovidrio sin tratamiento de incubación (E).	129
Figura 4.50	Micrografías (MEB) de bioandamios elaborados a 700 °C después de 8 días de incubación en suero sanguíneo de conejo (A), incubación en suero sanguíneo en atmósfera controlada con 5% de CO ₂ (B) e incubación en suero sanguíneo previamente incubado 24 horas en atmósfera controlada con 5% de CO ₂	131
Figura 4.51	Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio inmersos en plasma de conejo por 8 días e incubadas en: atmosfera no controlada (A), atmósfera controlada con 5% de CO ₂ (B) y atmósfera controlada con plasma de conejo previamente incubado durante 24 horas también en atmósfera controlada con 5% de CO ₂ (C).....	132
Figura 4.52	Difractogramas de rayos X de andamios las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio inmersos en plasma de conejo por 8 días e incubadas en: atmosfera no controlada (A), atmósfera controlada con 5% de CO ₂ (B) y atmósfera controlada con plasma de conejo previamente incubado durante 24 horas también en atmósfera controlada con 5% de CO ₂ (C).	133
Figura 4.53	Viabilidad y proliferación de las células RPMI 8226 tratadas con diferentes biovidrio particulados. A y B) BG 45s5 a 24 y 72 h; C y D) BG 45s5Ag a 24 y 72 h; E y F) BG 45s5 Nanoestructurado a 24 y 72 h y G y H) BG 45s5Ag Nanoestructurado a 24 y 72 h.....	135

Figura 4.54 Imágenes de la membrana corialantoidea de embriones de pollo después de quince días de fertilización y 5 días de tratamiento. Sin adición de biovidrio (A) y con 0.008 mg (B), 0.011 mg (C), 0.014 mg (D), 0.017 mg (E) y 0.02 (F) mg de biovidrio 45s5Ag por cada 60 gramos de peso total. Izquierda 2X aumentos y derecha 10X aumentos.	137
Figura 4.55 Análisis de la densidad de los vasos capilares en la membrana corialantoidea de embriones de pollo después de quince días de fertilización y 5 días de tratamiento con biovidrio 45s5Ag a diferentes concentraciones.	138
Figura 4.56 Mapeos EDS en el biovidrio biofuncionalizado con soluciones de vitamina D3 a 0.00 mg/mL, 0.005 mg/mL (B), 0.01 mg/mL (C), 0.015 mg/mL (D), 0.02 mg/mL (E) y 0.03 mg/mL (F).	140
Figura 4.57 Mapeos EDS en el biovidrio biofuncionalizado con colágeno a =.0% (A), 0.3% (B), 0.75% (C), 1.5 % (D), 2.25 % (E) y 3 % (F).	141
Figura 4.58 Espectros de infrarrojo de biovidrio 45s5 biofuncionalizado con colágeno (A), biovidrio biofuncionalizado con colecalciferol (B) y biovidrio sin biofuncionalizar (C).	142
Figura 4.59 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	144
Figura 4.60. Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con colágeno tipo I después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	145
Figura 4.61 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con vitamina D3 después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.	146
Figura 4.62 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio control (sin funcionalizar) tratado a 700 °C después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8	

	(D) días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	148
Figura 4.63	Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con colágeno tipo I después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	150
Figura 4.64	Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con vitamina D3 después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.....	152
Figura 4.65	Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C incubado en la membrana corialantoidea, sin biofuncionalizar (A) y biofuncionalizado con colágeno tipo I (B) y con vitamina D3 (C).....	154
Figura 4.66	Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C incubado en fluido corporal simulado, sin biofuncionalizar (A) y biofuncionalizado con colágeno tipo I (B) y con vitamina D3 (C).....	155
Figura 4.67	Espectros de difracción de rayos X de bioandamios de biovidrio injertado en la membrana corialantoidea durante 5 días sin biofuncionalizar (A), biofuncionalizado con colágeno tipo I (B), biofuncionalizado con colágeno tipo I y vitamina D3 y biofuncionalizado con vitamina D3 (E), biovidrio control sin proceso de incubación.	156
Figura 4.68	Espectros de difracción de rayos X de bioandamios de biovidrio incubado en fluido corporal simulado durante 8 días sin biofuncionalizar (A), biofuncionalizado con colágeno tipo I (B), biofuncionalizado con colágeno tipo I y vitamina D3 (C) y biofuncionalizado con vitamina D3 (D), biovidrio control sin proceso de incubación (E).	158
Tabla 2.1	Proteínas de la matriz extracelular ósea [64].....	28
Tabla 4.1	Composición nominal de soluciones de alimentación.....	63

Tabla 4.2 Distribución de diámetro nominal de partícula en los microagregados de biovidrio dopado con plata y cobre.	70
Tabla 4.3 Cuantificación de unidades formadoras de colonia de <i>Escherichia coli</i> en presencia de diferentes concentraciones de biovidrio dopado con plata (BGsP1, BGsP2 y BGsP3) y dopado con cobre (BGsC1, BGsC2 y BGsC3).....	77
Tabla 4.4 Valores de la porosidad	109
Ecuación 1 Determinación de porcentaje de viabilidad con respecto al control	60
Ecuación 2 Factor de dilución	61
Ecuación 3 Cálculo de concentración de suspensiones celulares	61

LISTA ABREVIATURAS Y TABLA DE SÍMBOLOS

2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
°C	Grados centígrados
abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
AM	Referente a la Acetoximetil Caseína
AMPK	Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato
BGs	Biovidrio
BMPs	Proteínas morfogenéticas del hueso
cbp	Cuanto baste para
cel	Célula(s)
cm ⁻¹	Centímetros a la potencia "menos uno"
cm ²	Centímetros a la segunda potencia
CpG	Regiones de ADN donde existe una gran cantidad de pares de citosina/guanina
CRC	Células cancerígenas colorrectales
D9K	Referente a calvidina encontrada en sitios específicos como riñón y útero
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRX	Difracción de rayos X
EBV	Epstein-Barr Virus
EDD	Embryonic Development Day (Día del desarrollo embrionario)
EDS	Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ESIQIE	Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas
F	Factor de dilución
FACIT	Colágenos asociados a fibrillas interrumpidos con triple hélice
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FRX	Microanálisis de Rayos X
g	Gramos
Gly-X-Y	Tipo de secuencia de aminoácidos en proteínas

HIF-1 α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HIF-1 β	Factor inducible por hipoxia 1 beta
HREs	Elementos de respuesta a hipoxia
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IPN	Instituto Politécnico Nacional
K12	Aislado de la Bacteria <i>Escherichia coli</i> empleado como modelo de estudio
KDR	Dominio inserto/quinasa
keV	Kiloelectrovolt
LB	Referente al medio Luria-Bertani
M	Molar
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
M-CSF	Factor de estimulación de colonias macrófagas
MEPE	Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular
mg	Miligramos
MIC	Minimal inhibitory concentration (concentración mínima inhibitoria)
min	Minutos
ml	Mililitro
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP9	Metaloproteinasa 8 de la matriz extracelular
MnSOD	Enzima superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso
MPa	Megapascales
MTT	Metil tiazol tetrazolio
nm	Nanómetros
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
Pa	Pascales
PBS	Phosphate Buffer Solution (solución amortiguadora de fosfatos)
pH	Valor p de la concentración de H ⁺
PHD2	Dominio 2 de la prolin-hidroxilasa

RANKL	ligando receptor activador para el factor nuclear K-B
RecA	Proteína multifuncional implicada en la reparación y mantenimiento del ADN.
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI 1640	Medio de cultivo celular estandarizado
RPMI 8226	Línea celular linfocítica inmortalizada
S/T	Sin tratamiento
SBF	Simulated body fluid (Fluido Corporal Simulado)
SIRT1	Sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD
TEOS	Tetraetilosrtosilicato
TEP	Trietil fosfato
u.a.	Unidades arbitrarias de cuantificación
UFC	Unidades formadoras de colonia
UMR 106-08	Línea celular de osteosarcoma
v/v	Relación volumen con volumen
VDR	Receptor de calcitriol
VEFG	Factor de crecimiento vascular endotelial
Vol o Vol.	Volumen

RESUMEN

Los biomateriales son una prometedora área dentro de la medicina regenerativa; sin embargo, aunque ya existen diferentes tipos de biomateriales con características viables para la regeneración de tejido es necesaria la mejora y optimización de estos; esta necesidad es dependiente de la naturaleza del tejido que se requiere recuperar, siendo el objetivo que estos biomateriales sean fácilmente asimilables y favorezcan una rápida recuperación. En el presente trabajo se analizaron diferentes pautas relacionadas con el desarrollo de un bioandamio a partir de biovidrio nanoestructurado, cuyos parámetros de síntesis se determinaron para la obtención de estructuras estables de alta área superficial. Se calculó y analizó el efecto que el grado de cristalización tiene sobre la actividad del biovidrio nanoestructurado, además se evaluó un nuevo modelo para el análisis de la actividad del biovidrio: el suero sanguíneo de conejo, paralelamente se empleó un modelo *in ovo* el cual permite analizar la respuesta citotóxica y la formación de hidroxiapatita empleando la membrana corialantoidea de los embriones de pollo, además se manejó un modelo *in vitro* como control el cual consiste en la reproducción de la concentración de iones en sangre conocido como fluido corporal simulado. Se obtuvieron diferentes lotes de biovidrio 45s5 nanoestructurado dopado con diferentes elementos mediante el diseño de técnicas de síntesis y micro procesamiento cerámico empleando templatantes, los cuales se emplearon para la elaboración de andamios biomiméticos con porosidad hierárquica, los cuales recrean la estructura del hueso en proceso de remodelación. De forma simultánea se buscó el conferir propiedades antimicrobianas al material para evitar procesos infecciosos mediante el dopaje de la estructura. Se estudió el efecto en la bioactividad de la biofuncionalización en los andamios biomiméticos con colágeno tipo I y vitamina D3, analizando los cambios en la estructura y la viabilidad de condensación de la capa de hidroxiapatita en la superficie, además del límite de la biofuncionalización sin el empleo de agentes entrecruzantes. Del mismo modo se analizó la respuesta citotóxica que el biovidrio nanoestructurado desencadena en una línea inmortalizada de células linfocíticas tipo B, para determinar el grado de citotoxicidad que este material presenta en el cuerpo humano en diferentes cantidades. A partir de estos ensayos se obtuvieron diferentes alícuotas que fueron analizadas por diferentes técnicas de caracterización como difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido, microscopía óptica clásica y análisis elementales por dispersión de energía de rayos X.

ABSTRACT

Biomaterials have become a promising area within regenerative medicine; although there are already different types of biomaterials with viable characteristics for tissue regeneration, it is necessary to improve and optimize them; this need is dependent on the tissue nature that is required to recover, and the goal is to design easily assimilated biomaterials to promote a faster recovery. In this work, different patterns related to the development of bioscaffolds from nanostructured bioglass were analyzed, whose synthesis parameters were determined in order to obtain stable structures with a high surface area. In this work the crystallization index effect of the nanostructured bioglass on the bioactivity have been determined: also it has been proposed the rabbit blood serum as a new bioactivity test medium, using the simulated body fluid as a control, parallelly it has been analyzed the *in ovo* model which allows analyzing the cytotoxic response and hydroxyapatite formation by employing the corialantoic membrane in the chick embryo, also an *in vitro* model has been used as a control assay which consists of the reproduction of the blood ions concentration termed as simulated body fluid. Different nanostructured 45s5 bioglass batches doped with different elements were obtained by the design of synthesis techniques and ceramic micro processing using templates, used for the elaboration of nanostructured biomimetic scaffolds with hierarchical porosity to recreate the bone structure at the remodeling process. Also, we developed a process to confer antimicrobial properties to the material to avoid infectious processes by doping the structure. The effect of biofunctionalization in biomimetic scaffolds with type I collagen and vitamin D3 was studied, analyzing the changes in the structure and viability of the hydroxyapatite layer condensation on the surface, in addition to the limit of biofunctionalization without the use of cross-linking agents. In the same way, the nanostructured bioglass cytotoxic response has been studied in an immortalized B lymphocytic cell line to determine the cytotoxicity degree that this material presents in the human body at different amounts. For these tests, different aliquots were obtained and analyzed by different characterization techniques such as X-ray diffraction, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, optical microscopy and elemental analysis by X-ray dispersive energy.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Justificación

Desde la década de los años sesenta existe un continuo interés en el desarrollo de biomateriales sustitutos de injertos óseos, para llevar a cabo la reparación de diferentes secciones del tejido óseo humano, especialmente para corrección de defectos postraumáticos o incluso congénitos. Aunque se han diseñado metodologías para realizar injertos autólogos muy eficientes, existe un límite considerable en cuanto a la poca cantidad que se puede obtener para cubrir un defecto óseo grande, además de la recuperación que conlleva la obtención de este.

1.2 Objetivo general

Diseñar, sintetizar y caracterizar una matriz de biovidrio con propiedades osteoinductivas y angiogénicas cuyas propiedades estructurales optimicen la bioactividad, disminuyendo el tiempo de bioasimilación y formación de tejido óseo maduro o tejido vascular endotelial respectivamente.

1.2.1 *Objetivos Particulares*

Sintetizar biovidrio 45s5 nanoestructurado mediante la técnica sol-gel acoplada a secado por aspersion.

Analizar las propiedades antimicrobianas del biovidrio 45s5 adicionado con diferentes porcentajes de plata y cobre.

Determinar la citotoxicidad del biovidrio 45s5 nanoestructurado comparando contra el biovidrio 45s5 de síntesis normal no particulado.

Diseñar un proceso de preparación de andamios biomiméticos a partir del biovidrio 45s5 nanoestructurado.

Determinar el efecto de las variables de temperatura y porcentaje microsferas de poliestireno en la preparación de andamios biomiméticos a partir del biovidrio 45s5.

Establecer un modelo de prueba biológica para evaluar la citotoxicidad y bioactividad mediante el uso de la membrana corialantoidea de embriones de pollo.

Establecer los parámetros para el análisis de bioactividad del biovidrio 45s5 en modelos *in vitro* como el fluido corporal simulado y el plasma de sangre de conejo.

Diseñar y evaluar un método adecuado para la fijación de proteínas y otras biomoléculas en los andamios biomiméticos de biovidrio.

Estudiar la estructura e interfaces de la matriz de biovidrio cargada con agentes colágeno tipo I y vitamina D3.

Evaluar la actividad de osteogénesis en sistemas *in vitro* e *in ovo* de la matriz de biovidrio diseñada.

Evaluar la actividad angiogénica en un sistema *in ovo* del biovidrio 45s5 particulado.

Determinar efecto citotóxico en modelos *in vitro* e *in ovo*.

1.3 Hipótesis

Es posible diseñar una matriz de reconstrucción ósea capaz de satisfacer la osteoconducción, la osteoinducción y la osteointegración para optimizar el proceso de osteogénesis y evitar procesos infecciosos, empleando agregados de nanopartículas de biovidrio con interconectividad de poro, siendo bioactivado a partir de células, proteínas y otras biomoléculas características del proceso de reconstrucción ósea, obteniendo actividad antibiótica a partir de dopaje con plata.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

A través de los años la ingeniería de tejido ha emergido como una opción prometedora para la regeneración de órganos que han sido perdidos parcial o totalmente como resultado de accidentes, enfermedades o envejecimiento, entre otros, además de resolver el tiempo de viabilidad tan corto que los tejidos donados presentan e incluso la escasez de donadores [1,2]. En términos generales un biomaterial es definido como cualquier material, de origen natural o sintético que presenta bioactividad, es decir, puede unirse químicamente formando enlaces con tejido vivo, reemplazar un tejido natural o ser asimilado durante la formación de tejido nuevo [3,4]. Mientras que un bioandamio es una estructura tridimensional porosa elaborada con un biomaterial, que puede actuar como un soporte que guíe la proliferación celular, reduciendo la limitación de disponibilidad y utilización de nutrientes y oxígeno al interior de este. Además, la estructura tridimensional de éstos permite que sean incorporados otros componentes esenciales necesarios para la regeneración del tejido, tales como los factores de crecimiento u otras biomoléculas que se encuentran involucradas con el desarrollo [1,5]. Los retos de la investigación para la generación de sustitutos biológicos está relacionado con la posibilidad de generar un producto con las características necesarias para lograr que sean compatibles con los procesos celulares, de tal modo que diversos aspectos deben ser considerados y meticulosamente estudiados, tales como la dosis, el tiempo de exposición, el tamaño, la forma, la superficie de interacción con los tejidos, entre otros, los cuales son determinantes para generar el efecto deseado sin provocar daño.

2.1 Biomateriales

Los biomateriales han sido desarrollados alrededor del mundo con el objetivo de mejorar la calidad de vida de un número creciente de personas que requieren del remplazo parcial o total de órganos debido a defectos congénitos, enfermedades crónico-degenerativas y traumatismos, además, conforme la población envejece este tipo de requerimientos se incrementa. Así, la meta principal de la investigación en biomateriales es la combinación apropiada de propiedades físicas y químicas, para lograr una correcta interacción con el cuerpo. Existe una gran gama de biomateriales desarrollados para el remplazo de diferentes tejidos entre los que se encuentra la piel, el esqueleto, las arterias, entre otros. A diferencia de los biomateriales tradicionales o inertes, donde los principales objetivos son evitar la formación de tejido de cicatrización y la corrosión, en los biomateriales inteligentes se busca la interacción química y fisiológica entre los implantes y el

tejido vivo, con la finalidad de regenerar el tejido perdido o dañado, logrando la recuperación del organismo y evitando posteriores cirugías debido al deterioro de los implantes [6].

La evolución de los biomateriales ha sido dividida en 4 generaciones, cada una con diferentes objetivos y diseños, aunque su aparición fue en diferentes tiempos, eso no impide que hoy en día sigan siendo desarrollados. La primera generación se refiere al desarrollo de materiales cuya combinación de propiedades físicas sean similares al tejido que buscan reemplazar con una respuesta tóxica mínima en el organismo hospedero, normalmente referido a prótesis o implantes metálicos, cerámicos, vidrios o polímeros inertes [7]. La segunda generación hizo énfasis en la generación de acciones y reacciones controladas en el ambiente fisiológico, tal es el caso de los geles de sílice como los vidrios bioactivos, cuya estructura química y física permite la liberación de iones al ambiente y la consecuente nucleación y cristalización de apatitas en la superficie del implante, generando un entorno adecuado para la proliferación de células características del tejido que se busca reestructurar [7,8]. La tercer generación abarca el desarrollo de biomateriales involucrados en la estimulación de respuestas celulares a un nivel molecular, el diseño de este tipo de materiales ha involucrado la modificación de biomateriales previamente establecidos, los vidrios bioactivos y otros polímeros como el quitosano han sido dotados de la propiedad de establecer una serie de estímulos que conllevan a la proliferación celular, la diferenciación e incluso la producción y organización de la matriz extracelular. Para ello se han diseñado procesos como el sembrado de líneas celulares específicas o la funcionalización de la estructura de los biomateriales, con la finalidad de liberar moléculas o iones como la hormona de crecimiento o el silicio, a fin de estimular respuestas intracelulares y extracelulares [8]. En los últimos 5 años una cuarta generación fue propuesta por diferentes autores aunque la definición de esta aún es dependiente del área de especialización de cada grupo, dichas definiciones coinciden en la modificación de la superficie de los biomateriales para la optimización de la interacción biomaterial-organismo, ya sea a través de la adición de estructuras como nanocables de silicón para el monitoreo de los procesos bioeléctricos [9], la funcionalización de estructuras a partir de materiales bioactivos [10] o el diseño en forma de agentes particulados con una mayor área superficial [11].

2.1.1 Clasificación de los biomateriales en base a su composición

A lo largo del tiempo en que han sido desarrollados, los biomateriales han sido clasificados a partir de sus propiedades, así como de su función, el tejido que buscan reconstituir o su composición, a partir de esta última los biomateriales se dividen en las siguientes categorías:

2.1.1.1 Biomateriales metálicos

En esta categoría se encuentran diferentes metales como los aceros inoxidables con cromo, el cobalto, el níquel y/o niobio, entre otros, además de aleaciones especialmente diseñadas como el acero al vanadio, elaborado para la fabricación de placas y tornillos de fijación. Sin embargo, el uso de metales se ve limitado debido a la cantidad máxima de cada uno de estos elementos que es tolerada por el organismo. Uno de los factores primordiales en la biocompatibilidad de los implantes metálicos es su resistencia a la corrosión en ambientes vivos, debido a que las consecuencias de la corrosión son la desintegración del implante y por lo tanto el debilitamiento y la liberación de iones en altas concentraciones, pudiendo comprometer la salud e integridad de los órganos adyacentes [12,13].

2.1.1.2 Biomateriales poliméricos

Los biomateriales poliméricos se caracterizan por su amplia gama de formas, ya sea como espumas, membranas o incluso suspensiones coloidales. Su constitución química es muy variable dependiendo de su origen, siendo posible su síntesis o su purificación a partir de otros organismos, como el poliuretano y el colágeno respectivamente. Su principal función es en la cicatrización, donde se busca acelerar el proceso de restauración e incluso evitar procesos de infección a través de la generación de una capa protectora o la liberación de agentes antimicrobianos. No obstante su uso en la regeneración de tejidos rígidos se encuentra también en desarrollo, donde algunos materiales poliméricos como los fosfacenos, ácido poliláctico y los poliortoésteres, han sido empleados para la reconstitución de tejido óseo y cartilaginoso [14,15].

2.1.1.3 Biomateriales cerámicos

Estos biomateriales poseen una gran cantidad de propiedades que los vuelven adecuados para el desarrollo de materiales protésicos como su baja toxicidad, hipoalergenicidad, baja o nula respuesta inflamatoria, alta capacidad de biofuncionalización, biocompatibilidad, bioactividad y la capacidad de adquirir diferentes morfologías dependientes del método de síntesis. Debido a la naturaleza de su composición basada en óxidos como el óxido de silicio, el óxido de zirconio, el

óxido de calcio, entre otros, la estructura química puede ser modificada a partir de la formulación adecuada de la solución precursora, permitiendo determinar las mejores composiciones para la regeneración de tejidos, además, en base a las metodologías de secado se pueden obtener biomateriales cerámicos particulados, andamios o incluso recubrimientos para otros biomateriales. Sin embargo, el uso de estos se ve limitado en base a sus propiedades mecánicas debido a bajos niveles en resistencia a fatiga [12,16–18].

2.1.1.4 Biomateriales compuestos

La definición de material compuesto se refiere a la combinación heterogénea (en la escala macroscópica) de dos o más materiales cuya composición, morfología y propiedades físicas, se conjuntan para producir características físicas, químicas y mecánicas controladas. Este tipo de biomateriales tiene la propiedad de emplear las mejores características de los constituyentes, compensando las desventajas de un compuesto a partir de su conjugado, de forma similar a los materiales cerámicos, los materiales compuestos tienen la particularidad de ser ampliamente adaptables, debido a la gran cantidad de combinaciones como es el caso del uso de polímeros sintéticos y naturales para la fabricación de implantes cardiovasculares a partir de poliuretano impregnado de gelatina o colágeno. A pesar de las grandes opciones que estos materiales poseen aún existen limitantes como el fenómeno de delaminación en donde las fracciones del compuesto se separan ocasionando que los implantes deban ser removidos [16,19].

2.1.2 Clasificación de los biomateriales en base al tipo de aplicación

Los diferentes biomateriales poseen diferentes aplicaciones dependientes de las características físicas y químicas que estos poseen, no obstante, aunque la mayoría de los biomateriales de segunda, tercera y cuarta generación se encuentran enfocados en el reemplazo, asistencia en la sanación y ayuda en el diagnóstico, esto no limita que puedan ser empleados en áreas como la cirugía plástica.

2.1.2.1 Reemplazo de tejido dañado o enfermo

Actualmente esta es el área prioritaria en el desarrollo de nuevos biomateriales, a partir del desarrollo de la medicina regenerativa se busca la producción de implantes con características como la biodegradabilidad, permitiendo que el organismo eventualmente reemplace el biomaterial con una matriz de naturaleza biológica, haciendo uso de líneas celulares y las mismas propiedades fisicoquímicas del injerto. En este tipo de materiales se busca de forma simultánea el reproducir la

estructura tridimensional del tejido a reemplazar en el implante, facilitando así la asimilación por parte del organismo [20].

2.1.2.2 Agentes coadyuvantes

Son aquellos materiales que aceleran o ayudan en ciertos procesos biológicos de los cuales depende la reconstitución del tejido, dentro de esta categoría se clasifican los biomateriales empleados en la fabricación de suturas, placas óseas y tornillos. Dependiendo de la naturaleza del material estos agentes pueden o no tener bioactividad o ser asimilados por el cuerpo humano [21,22].

2.1.2.3 Corrector de funciones

Una gran cantidad de biomateriales son desarrollados para la reconstitución de funciones biológicas, tal es el caso de los marcapasos y las lentes ópticas intraoculares, en este último existen destacan lentes elaborados a partir de silicón, acrílico y polimetilmetacrilato, cada uno con diferentes ventajas y desventajas pero con la característica común de ser biocompatibles, evitar la generación de tejido cicatrizante y principalmente tener propiedades ópticas adecuadas [23], por otro lado, en el caso de los biomateriales empleados en el diseño de marcapasos existen diferentes características deseadas para cada parte, se requieren metales bioinertes altamente resistentes a la corrosión por urea que además sean capaces de convertir eficientemente una corriente eléctrica en una señal eléctrica, al mismo tiempo se requieren biomateriales flexibles y resistentes a estrés mecánico y químico para conducir la corriente eléctrica como el poliuretano [24,25].

2.1.2.4 Corrección cosmética

Debido a la variedad de defectos cosméticos que pueden existir, en esta área se involucran tanto biomateriales implantados dentro del cuerpo humano como aquellos que buscan solo reemplazar alguna imperfección física, teniendo en común el requerir de una mínima respuesta del cuerpo humano hacia este, del mismo modo en esta categoría se hace uso tanto de biomateriales inertes como bioactivos, ya sea el caso de implantes mamarios desarrollados a partir de materiales poliméricos como el polidimetilsiloxano en conjunto con una matriz dérmica acelular, para así evitar la respuesta cicatrizante de los fibroblastos del estroma mamario [26,27], o algo de uso externo como prótesis de silicona sujetadas con sustancias adhesivas de composición también basada en silicio [28].

2.1.2.5 Ayudante en diagnósticos y tratamientos

Existen diversos dispositivos basados en biomateriales para ayudar al diagnóstico y tratamiento de enfermedades y traumatismos, desde los más simples y comunes como lo son las agujas cuya composición evita respuestas alérgicas al introducirse en el tejido vivo, hasta aquellos tipos de biomateriales que han sido desarrollados para la evaluación del crecimiento y viabilidad celular a partir del monitoreo de señales eléctricas, tal es el caso de los materiales híbridos desarrollados a partir de colágeno y andamios conformados de nanocables nanoelectrónicos, cuya función es analizar cualquier cambio eléctrico en el entorno a partir de dosificaciones de medicamentos o cambios en el pH [29].

2.1.3 Clasificación de las interacciones organismo-biomaterial

En el desarrollo de biomateriales se ha categorizado en 4 grupos principales los tipos de reacción que pueden ocurrir entre un biomaterial y el organismo una vez que este ha sido implantado, el tipo de respuesta es dependiente de las propiedades físicas y químicas del implante además del lugar en el organismo donde fue implantado.

2.1.3.1 Reacción bioactiva

Este tipo de reacciones ocurre cuando se forma un enlace que une químicamente al implante con el tejido. Este enlace interfacial evita el desplazamiento entre ambas superficies y además mimetiza el tipo de interfase que es formada cuando el tejido vivo se repara a sí mismo. El diseño de materiales que generen este tipo de reacción requiere del análisis de la reactividad química, ya que en el organismo la formación de estas interfaces se encuentra en una constante reestructuración alcanzándose un equilibrio dinámico [30,31].

2.1.3.2 Reacción biológica casi inerte

También definida como reacción aproximadamente inerte, se refiere a aquellos materiales que no ocasionan cambios significativos en los tejidos próximos, sin embargo, su presencia sí ocasiona el desarrollo de cápsulas fibrosas en su interfase. El grosor de esta capa se encuentra determinado principalmente por la porosidad, la superficie y la composición del implante, por ejemplo, debido a las propiedades inertes de la alúmina la capa fibrosa que se genera es delgada, en contraste con los implantes metálicos, cuya alta reactividad ocasiona el desarrollo de capas más gruesas. Además, características como la tasa de movimiento a la cual será sometido el implante también ocasiona la formación de capas más profundas [31].

2.1.3.3 Reacción tóxica

Las respuestas tóxicas son el principal problema a evitar durante el diseño de biomateriales e implantes, esto debido a que la liberación de iones o nanopartículas tóxicas a partir de la corrosión o del proceso de absorción-resorción puede ocasionar la muerte celular del tejido próximo al implante, además, al tratarse de organismos con sistemas dinámicos estos iones o nanopartículas pueden migrar a través de los fluidos ocasionando un daño sistémico al paciente [31,32].

2.1.3.4 Disolución del implante

De forma similar a la reacción bioactiva, en este tipo de interfaces intervienen cambios químicos que pueden llevar a la disolución o resorción del material, siendo reemplazado por tejido vivo. De este modo, este tipo de interacciones se logran cuando el material posee una composición que permite su degradación al entrar en contacto con fluidos corporales o líneas celulares específicas como macrófagos u osteoclastos. Como un requerimiento adicional es necesario que los productos generados a partir de la degradación del material no sean tóxicos y tampoco ocasionen daños parciales a las células circundantes [31,33].

2.2 Biovidrio 45s5

El comienzo en la investigación de los materiales cerámicos bioactivos ocurrió en la década de los años sesenta, un grupo de investigación diseñó un sistema basado en óxido de sodio, óxido de fósforo, óxido de silicio y óxido de calcio, con un alto contenido de este último. A partir de esta composición se elaboraron diferentes sistemas con variaciones en sus proporciones, siendo la más efectiva la alícuota con una proporción de 46.1 % de óxido de silicio, 24.4 % de óxido de sodio, 26.9% de óxido de calcio y 2.6 % de óxido de fósforo, dicha efectividad radica en la formación de una unión con el hueso, siendo solamente removible a partir de la fractura del hueso donde se ha unido, a este biomaterial se le denominó como biovidrio 45s5 y ocasionó la entrada de los materiales cerámicos en la medicina regenerativa y la ingeniería de tejido [13,34].

Los biovidrios poseen bioactividad en base a dos mecanismos químicos, la unión del implante de biovidrio con el hueso se atribuye a la formación de una capa de hidroxiapatita, la cual interactúa con las fibras de colágeno del tejido dañado para formar un enlace. El proceso químico en la formación de la capa de hidroxiapatita ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, la interacción biológica de dicha capa con el hueso del organismo hospedero no ha sido completamente dilucidada. Las teorías más aceptadas por los diferentes grupos de investigación indican que la capa

de hidroxiapatita depende de la adsorción de proteínas, la incorporación de fibras de colágeno, el anclaje de líneas celulares características de la osteogénesis (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos principalmente), la secreción de matriz extracelular ósea y finalmente su mineralización, no obstante, dicha información aún debe ser confirmada [30].

El proceso químico de la formación de la capa de hidroxiapatita comienza con la liberación e intercambio de cationes de sodio, fósforo y calcio por protones del entorno, formando grupos silanol en la superficie del biovidrio. El pH de la solución incrementa y la proporción de silicio comienza a incrementarse en el material. El pH local permite que los iones hidroxilo comiencen a romper los enlaces Si-O-Si, generando la aparición de moléculas de hidróxido de silicio en la solución y una mayor cantidad de silanoles en la interfase del vidrio y el medio. Dicho incremento ocasiona que los grupos silanoles comiencen a repolimerizarse formando una capa rica en sílice, posteriormente los cationes de calcio y el fosfato que se liberaron en el entorno comienzan a migrar hacia la nueva capa de sílica condensándose y formando una segunda capa de CaO-P₂O₅, finalmente, dependiendo del tipo de medio en que se encuentre y de la disponibilidad de iones, dicha capa comienza la incorporación de grupos hidroxilo, carbonato o incluso cloruro desde la solución, ocasionando un proceso de cristalización de la capa de hidroxiapatita [30,35].

2.2.1 Clasificación de los biovidrios

A partir del desarrollo del biovidrio diferentes composiciones han sido propuestas, aunque todas manteniendo en común la formación del enlace entre hueso y biomaterial a partir del proceso de formación de hidroxiapatita en la superficie, así tres categorías se han posicionado como las principales en este tipo de materiales cerámicos.

2.2.1.1 Biovidrios base silicio

Como se ha mencionado previamente esta composición es el primer diseño elaborado para los vidrios bioactivos, su estructura es prioritariamente óxido de silicio y suelen adicionarse los óxidos de sodio, calcio y fósforo, además de otros elementos para conferir nuevas propiedades al material como la plata o el cobre. La biocompatibilidad de estos compuestos ha sido estudiada en busca de determinar el efecto que sus constituyentes generan en el cuerpo. La mayor parte de los iones liberados como el calcio y el fósforo se condensan dando lugar a la formación de la capa de hidroxiapatita, mientras que el silicio liberado es tan abundante que aunque una fracción de este se convierte en una nueva capa de óxido de silicio para permitir la nucleación de la hidroxiapatita,

otra fracción de hidróxido de sodio e incluso fragmentos pequeños del implante se mantienen en el medio hasta que son consumidos por fagocitos y finalmente excretados[36,37]. A raíz de trabajos donde durante la implantación de alícuotas de biovidrio 45s5 en periodos de hasta 7 meses en conejos, se ha determinado una tasa de excreción de 5.4 miligramos por día, siendo el límite máximo tolerable de 93 miligramos por día, asegurando el evitar cualquier fallo de tipo renal en los organismos debido a una sobrecarga de iones[38].

2.2.1.2 Biovidrios base boro

Una serie de biovidrios han sido desarrollados a partir del óxido boro, este elemento no suele encontrarse en el tejido óseo, pero ha demostrado que posee las características necesarias para presentar bioactividad. La incorporación de este elemento ocasiona una hidrólisis más rápida y completa del implante, esto se debe principalmente a la baja durabilidad de este compuesto en los medios fisiológicos, llevando a la formación de hidroxiapatita a partir de un proceso similar al del biovidrio 45s5 pero sin la formación de la capa de óxido de silicio. El boro y su rápida hidrólisis hace de estos materiales buenos candidatos para la liberación de medicamentos en zonas controladas, sin embargo debido a que no es un elemento propio del organismo existe cierta controversia en cuando a sus propiedades citotóxicas, su rápida hidrólisis ocasiona un efecto citotóxico muy alto en modelos estáticos pero en modelos dinámicos este efecto se ve disminuido, tal es el caso de injertos implantados en tejido subcutáneo de ratón donde no se detectó ningún tipo de respuesta tóxica en el organismo [1,37,39].

2.2.1.3 Biovidrios base fosfato

Este tipo de vidrios como su nombre lo indica esta principalmente conformado por óxido de fósforo (P_2O_5), el cual forma una red cristalina que puede poseer sustituciones como óxido de calcio y óxido de sodio, debido a que los elementos que conforman este tipo de biovidrio también se encuentran en los huesos, se garantiza una afinidad total con el hueso a diferencia de los materiales que contienen óxido de silicio y óxido de boro, cuyos efectos a largo plazo aún no han sido determinados del todo. Este tipo de materiales permite además modificar la solubilidad del material y por lo tanto la tasa de formación de hidroxiapatita, esto a partir de la modificación en las fracciones estequiométricas de fósforo, calcio y sodio, lo que ocasiona la aparición de diferentes fases cristalinas con diferentes solubilidades, donde el incremento en la fracción de óxido de calcio disminuye la solubilidad y el incremento de óxido de sodio aumenta dicha propiedad [40,41].

2.2.2 Técnicas de síntesis sol-gel para partículas de biovidrio

Los materiales cerámicos particulados han sido de gran utilidad clínica en el desarrollo de uniones, refuerzo de uniones, relleno de cavidades y para el desarrollo de prótesis más complejas para el reemplazo de hueso perdido ya sea de forma parcial o total, en particular los biovidrios han demostrado una alta bioactividad con respecto a otros materiales cerámicos e incluso superior a la propia fase mineral del hueso aún tratándose de injertos autólogos disminuyendo tiempos de aproximadamente dos meses a solo dos semanas, dependiendo del tipo de síntesis, esta reactividad puede atribuirse al método por el cual se pueden obtener, dotándose de diferentes propiedades físicas, lo cual ha dado lugar a diferentes técnicas cada una con diferentes ventajas y desventajas [42].

El método sol-gel es un proceso químico que se realiza en condiciones acuosas para producir materiales a partir de bloques como lo es el silicato tetrahédrico y otros iones como el fósforo, calcio y sodio, este proceso involucra un proceso de hidrólisis y un proceso de condensación de los precursores, posteriormente una etapa de secado y otra de estabilización. Es posible controlar propiedades como la morfología y la composición mediante un diseño adecuado en los parámetros de procesamiento, entre los que se incluyen las fracciones de los precursores, acidez del medio de reacción, factor de dilución, temperatura, entre otros. Comúnmente se emplea Tetraetil ortosilicato (TEOS) para la síntesis de biovidrios cuya estructura se fundamenta en óxido de silicio, así los procesos de síntesis suelen realizarse en medio acuosos o etílicos. Los procesos de síntesis sol-gel suelen efectuarse en condiciones ácidas o alcalinas, donde un exceso de iones H_3O^+ favorece el proceso de hidrólisis pero limita la tasa de condensación, siendo el caso contrario en un medio alcalino donde se favorece la condensación pero se limita la tasa de hidrólisis dando lugar a la formación de estructuras relativamente grandes, indicando las condiciones de síntesis ácidas como las más adecuadas para materiales nanoestructurados con altas áreas superficiales [43].

En una síntesis sol-gel normal se comienza con la hidrólisis de TEOS el cual posteriormente se condensa formando nanopartículas de óxido de silicio (SiO_2) que darán lugar a la producción de soles, a los cuales se agregarán otros precursores que se hidrolizarán de forma consecutiva, condensándose simultáneamente con más óxido de silicio y los precursores anteriores, generando así estructuras conformadas de una red continua de diferentes átomos entrelazados mediante puentes oxo (-O-), las cuales se pueden encontrar de forma unitaria o de forma aglomerada. Estos

productos suelen ser sometidos a procesos de secado posteriores para eliminar productos secundarios y diferentes tipos de contaminación que se puedan adquirir del medio, denominada como contaminación de co-condensación, donde iones pueden quedar atrapados o adheridos mediante interacciones químicas durante el proceso de crecimiento de los soles [42,44].

2.2.2.1 Catálisis alcalina

Este proceso de síntesis es también conocido como el método Stöber, comúnmente se ha empleado para la formación de construcciones esféricas monodispersas de óxido de silicio, aunque es posible su implementación en otro tipo de materiales cerámicos en base a titanio o carbono o híbridos como el biovidrio. En este método los precursores como el TEOS se mezclan en un medio compuesto por agua, alcohol e hidróxido de amonio en condiciones de agitación, lo que da lugar a un medio altamente alcalino. La formación de partículas dispersas se atribuye principalmente a las fuerzas repulsivas que se generan entre las partículas debido a la presencia de iones OH⁻. Debido a que la síntesis de biovidrio requiere de la adición de otros precursores en el proceso de síntesis (además del TEOS) que finalmente conformarán parte del biovidrio, es necesario realizar un escrutinio adecuado de las condiciones de pH y la relación TEOS/H₂O, debido a que la presencia de estos átomos da lugar a modificaciones de carga, ocasionando que la repulsión generada por los iones OH⁻ no sea suficiente y comience un proceso de agregación no controlada que desencadenaría situaciones de heterogeneidad en la dispersión de diámetro de partícula, formas irregulares, entre otras [44].

2.2.2.2 Catálisis ácido/base

Es posible la elaboración de nanopartículas de biovidrio mediante procesos catalizados por ácido, sin embargo, debido a la lenta condensación que conlleva es necesaria la adición de un catalizador básico que evite la formación de estructuras aglomeradas, en esta estrategia se emplea un proceso de hidrólisis en condiciones ácidas de TEOS y el resto de precursores, para posteriormente cambiar el entorno a un medio alcalino en el cual se acelera la formación de nanopartículas, sin embargo, durante este proceso es prácticamente imposible evitar la desestabilización de una fracción de nanopartículas lo cual da lugar a dispersiones de diámetro en el producto final. Para evitar este proceso de desestabilización se suele emplear este método en conjunto con métodos complementarios como el uso de surfactantes como el polietilén glicol, cuya función es mantener el tamaño y dispersión de las nanopartículas conformadas durante el proceso de cambio en el pH y

hasta que se dé el proceso de secado, otra desventaja en este tipo de síntesis es que en caso de manejarse precursores metálicos es posible que estos se adhieran a las nanopartículas de biovidrio en forma de nanopartículas más pequeñas de este, es decir, no se incorporan como iones sino en una estructura definida [44,45].

2.2.2.3 Post-modificación en derivados sol-gel

En este tipo de metodología se requiere de la previa obtención de nanopartículas de óxido de silicio, las cuales son relativamente más sencillas de sintetizar por métodos como la catálisis alcalina o la catálisis ácida/alcalina, dichas nanopartículas son posteriormente modificadas con otros elementos mediante tratamientos como la inmersión de estas en sales precursoras por periodos de tiempo suficientes para que se desencadene el proceso de absorción de estos elementos en las nanopartículas, posteriormente se realizan tratamientos de calcinación a alta temperatura para conducir los iones en la red de silicato de las partículas. La ventaja de esta estrategia es el evitar la formación de nanopartículas a partir de solamente precursoras, aunque existen desventajas como la cantidad limitada de espacios en las nanopartículas de biovidrio donde los elementos puedan absorberse e incluso la formación de un nanocomposito con diferentes propiedades de disolución en cada uno de sus componentes, dando lugar a materiales cuya bioactividad puede verse afectada debido a la tasas de solubilización más altas en los elementos agregados durante la post-modificación y una tasa menor en la nanopartícula base debido a los dos tratamientos térmicos que esta ha recibido [40,44,46][44][44][44][44][44][44][44][44][44][44][44][44][44][44].

2.2.2.4 Técnica sol-gel asistida por microemulsión

Las microemulsiones son mezclas líquidas isotrópicas de una fase oleosa, una fase acuosa y surfactantes, que además se consideran estables termodinámicamente. Al contrario de las emulsiones convencionales, las microemulsiones requieren de procesos de mezclado para la formación de microgotas que se estabilizan finalmente mediante los surfactantes. Estas pueden ser clasificadas en tres tipos: fase oleosa dispersa en agua, agua dispersa en una fase oleosa y microemulsiones bicontinuas. En el caso particular de la síntesis de nanopartículas de biovidrio por microemulsión, el producto final es una nanopartícula con la composición del biovidrio, pero se encuentra contaminada por surfactantes, parte de la fase dispersante y catalizadores. Los procesos de hidrólisis y condensación propios de la síntesis sol-gel se realizan dentro de las microgotas de precursores formadas en la microemulsión, las cuales se encuentran rodeadas de un surfactante el

cual funciona como un reactor miniatura. En esta metodología es necesario estandarizar adecuadamente las condiciones de agitación, temperatura y fracción de surfactante ya que, debido a los procesos químicos además de la dicha agitación mecánica, dan lugar a una suspensión de tipo dinámico, donde las microgotas colisionan frecuentemente mediante un movimiento Browniano, formando gotas más grandes incrementando la variabilidad en la dispersión de diámetro y perdiendo la característica nanoestructurada de sus productos. Un posterior proceso de lavado para la eliminación de las especies orgánicas como el surfactante ayuda a mantener la individualidad de las nanopartículas debido a que, de no retirarse las especies orgánicas, se da lugar a procesos de agregación de las nanopartículas, lo cual permite que se pueda realizar el proceso de secado o calcinación sin sacrificar la morfología, eliminando la última fracción de estos compuestos que no se encuentran relacionados con la composición del biovidrio. Una ventaja adicional de este proceso es la facilidad con la cual se obtienen sistemas aislados que forman nanopartículas y la forma de evitar los procesos de aglomeración cuando no son requeridos [44].

2.2.2.5 Técnica sol-gel asistida por aerosol

En esta técnica se aborda la producción de materiales dentro de la escala nanométrica mediante el uso de una flama que desencadena la combustión de los precursores para formar un aerosol, que en conjunto con la síntesis sol-gel da lugar a materiales de estructura mesoporosa. Particularmente, en la síntesis sol-gel asistida se parte de la preparación de una solución donde los reactivos precursores se hidrolizan en un medio acuoso adecuado, posteriormente, esta fase será llevada a una fase de aerosol, donde las microgotas que lo conforman actuarán cada una como un reactor individual (de forma parecida a la síntesis de microemulsión), con la característica de que, en un principio la concentración de los precursores será menor a la final, debido al proceso térmico que da lugar a la evaporación del solvente alcanzándose una concentración denominada como concentración crítica de micelas, el producto después de la aspersion es secado por contacto con una corriente de aire caliente entre 80 y 90 °C, dando lugar a la formación de agregados esféricos mesoporosos de aerogel, posteriormente se realiza una etapa de combustión durante la cual se eliminan las especies orgánicas y las nanopartículas en los agregados finalmente quedan estabilizadas. Esta técnica suele ser combinada con técnicas como la microemulsión lo que da lugar a la formación de micelas aún más definidas limitando el crecimiento del tamaño e partícula, esto debido a que la producción de las gotas suele ser mediante un proceso en condiciones turbulentas

lo que da lugar a una dispersión de diámetro muy grande que se ve reflejada en productos con agregados de partículas con diámetros diversos [43,47].

2.2.2.6 Otros métodos basados en síntesis sol-gel

Debido a la versatilidad de la técnica sol-gel para ser acoplada a otros métodos se han diseñado diversos procedimientos como el secado por aspersion cuya temperatura de estabilización para las partículas puede involucrar altas temperaturas (180 °C) o bajas temperaturas (-190 °C) denominándose como Spray Dryer o Freeze Dryer respectivamente, en estas técnicas se tiene como un procedimiento común la preparación de una solución de los reactivos precursores, donde se hidrolizarán y se dará lugar a la formación de los primeros soles, en esta metodología se favorece la erradicación de construcciones de un solo elemento, es decir, da lugar a partículas de composición homogénea. Debido a la naturaleza del proceso se da preferencia a síntesis catalizadas por ácido, donde se obtienen tasas de hidrólisis superiores a la tasa de condensación, evitando la necesidad de un cambio de medio a alcalino mediante los procesos térmicos posteriores que estabilizan las nuevas partículas, en esta técnica también se genera un aerosol donde cada gota funciona como un reactor individual, debido al proceso de estabilización inmediato no es indispensable el uso agentes surfactantes y las partículas no suele presentar grandes distribuciones de tamaño, aunque es necesario que una serie de condiciones sean previamente establecidas como la concentración de los precursores, la tasa de flujo, la temperatura del tratamiento térmico, la presión de la fase dispersante (gas), el pH e incluso la naturaleza de los materiales, donde algunos suelen presentar procesos de aglomeración aún después de haber sido estabilizados. Este tipo de tratamientos da lugar a ventajas adicionales como la posibilidad de formar mezclas con otros materiales con morfologías y composiciones específicas, como agregados que forman construcciones complejas que no pueden ser logradas mediante otro tipo de síntesis [44,48].

2.2.3 Propiedades antimicrobianas de agentes dopantes

Los agentes dopantes metálicos como la plata y el cobre han demostrado capacidades antimicrobianas las cuales han sido explotadas por diferentes culturas a lo largo del tiempo, en el caso particular de la plata se han estudiado una gran variedad de mecanismos para su empleo, siendo principalmente usada en su forma ionizada mediante soluciones acuosas o como polvos como suspensiones de compuestos de ésta como la sulfadiazina de plata- Por otro lado el cobre ha sido empleado principalmente como polvos que se adicionan a los nutrientes de las plantas para

que este inhiba el desarrollo tanto de bacterias como de hongos patógenos. Aunque este tipo de tratamientos han caído en desuso, su empleo ha emergido nuevamente debido a procesos de resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos, siendo identificados al día de hoy solo dos plásmidos, uno denominado pMG101 aislado de *Salmonella typhimurium* el cual contiene 7 genes con dos marcos de lectura abiertos cuya función aún no ha sido completamente dilucidada, y otro denominado pUPI199 el cual se aisló de *Acinetobacter baumannii* [49].

Debido a que la plata en estado metálico se oxida inmediatamente y su óxido es prácticamente inerte, se requiere de un proceso de activación en el cual se lleva a un estado ionizado o conjugado con algún otro compuesto como triptófano, la función antimicrobiana de la plata consiste en su interacción con los elementos propios de las células bacterianas. Por ejemplo, en *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus*, mediante microanálisis de rayos X (FRX), se ha determinado que la plata ionizada puede ingresar a través de la membrana celular para posteriormente interactuar con el azufre contenido en las diferentes biomoléculas que se encuentran en el citoplasma dando lugar a la desestabilización del equilibrio osmótico y la desnaturalización de proteínas cuya estructura secundaria, terciaria y cuaternaria se encuentran estabilizadas mediante puentes disulfuro ocasionando la condensación de gránulos que finalmente desencadenan la apoptosis; paralelamente en el análisis FRX de *Staphilococcus aureus* se ha encontrado una desestabilización de la unión de la pared celular con la membrana plasmática, donde la membrana se encontraba encogida y arrugada con altos niveles de plata y fósforo, lo cual en conjunto con ensayos de comparativos con *Escherichia coli* demostró que la cantidad de plata que logra ingresar al citoplasma e interactúa con las biomoléculas es dependiente del grosor de la capa de péptido glicano que estas poseen, siendo un porcentaje de los iones atrapados en la membrana dando lugar a modificaciones morfológicas que no necesariamente conllevan a la muerte celular. Otro mecanismo propuesto es el ingreso de los iones de plata y su interacción con el material genético, dando lugar a la formación de una estructura altamente condensada la cual puede reaccionar con los grupos tiol de las proteínas dando lugar a la muerte celular, debido a su interferencia con la replicación, la transcripción y por lo tanto la traducción a proteínas [49–52].

El cobre es capaz de desencadenar procesos que conllevan a la muerte celular de una forma similar a la plata, se ha demostrado que los iones de cobre son capaces de desestabilizar las membranas plasmáticas de *Escherichia coli* dando lugar a la pérdida de la permeabilidad, que conlleva a la

liberación de metabolitos como aminoácidos o iones de potasio hacia el entorno, esta desestabilización por parte del cobre hacia la membrana es infundada en la capacidad del cobre para generar radicales libres que promueven la peroxidación de los lípidos que conforman la membrana. De forma análoga a la plata el cobre también puede interactuar con los ácidos nucleicos, debido a que posee una alta afinidad a las hebras de ácido desoxirribonucleico (ADN) desestabilizando los puentes de hidrógeno que dan la especificidad entre los nucleótidos, desnaturalizando la doble cadena e inhibiendo la replicación y otros procesos metabólicos. El cobre además de reaccionar con el azufre contenido en las proteínas como lo hace la plata, es capaz de modificar los aminoácidos que la conforman, dando lugar a la formación de ácido aspártico en aminoácidos cuya sustitución originalmente era una histidina, este mecanismo aunque no se encuentra dilucidado por completo se ha demostrado que es realizado por el cobre mediante la formación de radicales libres, modificando así la estructura primaria y, consecuentemente, perdiendo la actividad original de dicha proteína [53–55].

Uno de los métodos más aceptados para el suministro de iones de plata es mediante un agente sólido, ésta tecnología emergió del uso de zeolitas de plata a partir de la cual en condiciones líquidas se da una liberación paulatina de iones de plata los cuales son adquiridos por las bacterias que se encuentran cercanas a esta, dañando la membrana celular y posteriormente incorporándose al citoplasma, este tipo de tecnologías puede y ha sido extrapolado a su uso en biomateriales, donde se emplea a la plata u otros metales como un agente dopante que se intercala en la estructura del implante, liberando de forma paulatina los iones de dicho material mediante procesos de hidrólisis, ya sea para la condensación de fases minerales o la incorporación de estos en agentes patógenos como bacterias u hongos [56].

2.3 Aplicaciones del biovidrio 45s5 a tratamiento de enfermedades

Existen diferentes padecimientos cuyo tratamiento se puede abordar desde el punto de vista de los biomateriales o los materiales nanoestructurados, ya sea para la liberación controlada de fármacos, el reemplazo de tejido enfermo o incluso la estimulación de ciertas respuestas por parte del organismo, tal es el caso de la diabetes. El día de hoy la población mexicana experimenta una grave problema en cuanto a enfermedades de tipo crónico como la diabetes, siendo esta una de las principales causas de muerte en el país, apenas en el 2008 un análisis elaborado por el INEGI determinó que debido a esta enfermedad se reportaron 75572 muertes que corresponde al 14 por

ciento de las muertes totales registradas en ese año, siendo todas y cada una de estas personas susceptible a la pérdida de extremidades debido a las complicaciones que esta ocasiona, además, se unen a esta estadística todas las personas que tienen que vivir día a día con esta terrible enfermedad, siendo reportado un 9.8 por ciento de la población total, personas que aunque no han visto finalizada su vida, si han sufrido una disminución en cuanto a la calidad de esta, siendo más severa conforme avanza la edad del paciente. Es así, que el uso de biomateriales nanoestructurados en la medicina es de vital importancia en la búsqueda de tratamientos nuevos que no solo prolonguen la vida, sino que mejoren la calidad de vida del paciente, haciendo de este nuevamente un integrante productivo no solo para la sociedad o su familia, sino para sí mismo.

2.3.1 *Osteomyelitis necrosante*

La osteomyelitis es un padecimiento infeccioso en los huesos que es ocasionado por microorganismos piogénicos, debido a que el hueso es un tejido altamente resistente a la infección estos procesos son poco comunes en pacientes sanos, sin embargo, existe una alta incidencia en pacientes con desordenes metabólicos y traumatismo por presencia de objetos extraños que dañan la integridad del hueso. Esta puede ser de origen hematógeno (a través de la sangre), infecciones continuas o insuficiencia vascular, donde la diabetes es un factor de alto riesgo para el desarrollo de este tipo de padecimientos.

El principal agente causante de este padecimiento es el *Staphylococcus aureus* el cual es capaz de sobrevivir de manera intracelular en los osteoblastos, además, el proceso de respuesta del organismo mediante fagocitos los cuales producen radicales libres de oxígeno y enzimas proteolíticas, las cuales en conjunto con las biomoléculas producidas por las diferentes líneas celulares que se encuentran en el hueso (osteoblastos, osteoclastos y osteocitos) para la remodelación del hueso, dan lugar a la lisis del tejido óseo circundante, facilitando que los productos piogénicos del patógeno se dispersen por los canales vasculares y aumente la presión intraósea, causando alteración en el flujo sanguíneo, isquemia y posteriormente necrosis dando lugar a la osteomyelitis aguda. Actualmente, los tratamientos para este padecimiento consisten en la atención rápida con antibioticoterapia empírica, para posteriormente realizar un análisis microbiológico para la adecuación en la administración del antibiótico seguido de un proceso denominado desbridamiento donde en caso de ser viable elimina la fracción comprometida del tejido óseo, siendo necesario manejar el espacio vacío mediante mioplastia, transferencia de tejido

libre y altas dosis de antibiótico localizado en el área específica o se opta por la amputación en casos de necrosis donde la estructura completa del hueso se encuentra comprometida [57,58], este tipo de esquemas en los tratamientos da lugar al empleo de materiales como el biovidrio cuyas características permiten realizar tratamientos integrales donde, a partir de un solo biomaterial se puede realizar la corrección del tejido perdido o en un caso más drástico podría ser empleado para la producción de implantes para reemplazar huesos enteros, además de obtener actividad antibiótica mediante iones de metales cuyas propiedades permiten eliminar procesos infecciosos como los producidos por *Staphylococcus aureus* los cuales pueden desarrollar resistencia a los antibióticos al tratarse de infecciones arraigadas durante mucho tiempo en ciertos casos.

2.3.2 Enfermedad arterial periférica

Es un conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos que se derivan de una enfermedad arterial oclusiva, el cual limita el flujo sanguíneo hacia y en las extremidades, mayoritariamente el proceso patológico subyacente es la enfermedad arterioesclerótica y afecta preferentemente a la vascularización de las extremidades inferiores, clasificándose en isquemia funcional e isquemia crítica, donde la primera se refiere a cuando existe una correcta irrigación sanguínea en condiciones de reposo pero esta es insuficiente en condiciones de exigencia como el ejercicio, contrario al a isquemia crítica en la cual existe una reducción en el flujo sanguíneo aún en estado de reposo lo que da lugar a dolor o lesiones tróficas.

El mecanismo mediante el cual se desarrolla esta condición es la presencia de estenosis arteriales que se desarrollan hasta formar una oclusión arterial completa, lo cual se traduce en un mayor o menor grado de desarrollo de vías colaterales de suplencia. Cuando el desajuste entre las necesidades de los tejidos periféricos y el aporte de sangre se produce de manera abrupta se genera una estructura conocida como placa de alto riesgo que consiste en un depósito excesivo de lípidos y tejido conectivo, lo cual se define como un cuadro de isquemia aguda de origen trombótico [59].

Las placas de alto riesgo de las arterias encontradas en las extremidades inferiores son muy estenóticas y fibrosas, lo cual se relaciona con un estado de coagulabilidad extremadamente alto que influye en gran forma en el desarrollo de dichos eventos de isquemia aguda. Estas lesiones al igual que las encontradas en arterias coronarias, se encuentran normalmente compuestas por un gran núcleo lipídico extracelular además de un gran número células espumosas, recubierto por una fina cubierta fibrosa susceptible de rotura. Donde las zonas donde la capa fibrosa es más delgada

y hay un mayor número de células espumosas es también la más vulnerable y dada a generar los eventos de carácter agudo [59].

Las estrategias propias del organismo para evitar este tipo de complicaciones se basan en el aprovechar la evolución paulatina de las estenosis arteriales para la generación de vías colaterales de suplencia, sin embargo, esta estrategia solo es viables para pacientes cuya afectación arterial es en una única zona, mientras que en pacientes que presentan varias áreas afectadas no esta no es suficiente para lograr el reabastecimiento de nutrientes y normalmente desencadena isquemia crítica u oclusiones infrapoplíteas (en el caso específico de los pies) que en conjunto con los hábitos diarios como el caminar, estar de pie o incluso el tipo de calzado dan lugar a condiciones de presión que finalmente ocasionan la formación de úlceras y gangrena, que suelen ocurrir sobre la parte plantar media del pulgar, bajo las cabezas meta tarsales y sobre el dorso de los dedos de garra [59,60].

Dentro de las estrategias abordadas para resolver esta problemática se encuentra el uso de medicamentos para deteriorar la placa aún madura, sin embargo este procedimiento solamente viable en individuos normales que no presentan algún tipo de síndrome metabólico como la diabetes, en los cuales se encuentran alteradas las funciones hematológicas que conducen a la agregación eritrocitaria, altos niveles de hemoglobina, adhesividad aumentada de las plaquetas e incluso exceso de producción de proteínas plasmáticas y algunos factores de coagulación, debido a lo cual no se considera posible y adecuado buscar la restauración de los vasos capilares dañados, lo que da lugar a la búsqueda de estrategias distintas entre la cual se puede encontrar la estimulación de la formación de vasos capilares nuevos mediante procesos de angiogénesis controlada, dichas estrategias han abordado la estimulación de la formación de estas estructuras, lo cual se puede lograr mediante el uso de biomoléculas como el factor de crecimiento vascular endotelial, L-lisina e incluso materiales bioactivos, entre otros [60].

En el caso del desarrollo de tejido vascular y al hecho de que los tratamientos para el restablecimiento de la estructura vascular son de poca eficacia en pacientes con diabetes, se han propuesto diferentes tratamientos, sin embargo muchos de estos no logran el desarrollo adecuado del tejido nuevo ya que la deficiencia de irrigación de oxígeno limita la respuesta de las células a los tratamientos, así, el uso de tratamientos como el uso de factores proteínicos del crecimientos han cobrado importancia, no obstante es complicado definir si el tejido formado es viable debido

a que suele ser poco ordenado, por otro lado, el uso de materiales como el biovidrio particulado puede ser viable en el desarrollo de tejido nuevo, esto debido a que el proceso de reestructuración es logrado por medio de la estimulación de diferentes procesos, que aún hoy en día no se entienden por completo, sin embargo se ha determinado que la liberación de iones característicos del biovidrio da como resultado un entorno amigable y adecuado para la diferenciación de células como los osteoblastos, e incluso se ha encontrado correlación en la expresión de grupos de genes relacionados con la angiogénesis como lo es el factor de crecimiento vascular endotelial y el factor de crecimiento de fibroblastos, esto sin la necesidad de biomoléculas o factores específicos para la expresión de dichos genes [61,62].

Los biomateriales cerámicos como el biovidrio ofrecen alternativas como el uso de agentes dopantes con los cuales se puede evitar el uso de antibióticos, esto es particularmente útil debido a que en el caso de la osteomielitis necrosante, los microorganismos gram negativos suelen generar capas que rodean el área infectada y la erradicación de estos mediante antibióticos de administración oral o intramuscular es complicada, requiriendo del uso de tratamientos paralelos como el uso de rifampicina para desestabilizar las capas de microorganismos o la erradicación por medio de procedimientos quirúrgicos [63],

2.4 Sistema óseo humano

El esqueleto humano está conformado por 213 huesos sin contar los huesos sesamoideos, cada uno de estos huesos se encuentra en un proceso de remodelación constante para ayudarle a adaptarse a las diferentes fuerzas biomecánicas que un cuerpo en desarrollo presenta, además al ser un compuesto de diferentes fases ésta continua remodelación permite la reparación de hueso dañado o envejecido, para mantener una estructura adecuada [64].

Los huesos se dividen en cuatro categorías principales: largos como las clavículas o el húmero, cortos como los huesos tarsales o los huesos sesamoideos, planos como el cráneo y las costillas e irregulares como las vértebras y el coxis. Los huesos planos se encuentran formados principalmente por formaciones óseas membranosas, mientras que el resto de los huesos se componen de una combinación entre las formaciones óseas membranosas y endocondral. Esta variedad de morfologías da lugar a diferentes funciones siendo la principal el proveer de un soporte estructural, permitiendo el movimiento y brindando protección a los diferentes órganos, además de estas, posee funciones como el actuar de reservorio para minerales, proveer de factores de crecimiento y citocinas, además

de proveer un entorno adecuado para procesos de formación de glóbulos rojos en su interior (hematopoyesis) [64].

Estructuralmente el hueso se compone de tres partes principales llamadas diáfisis, epífisis y metáfisis. La diáfisis se encuentra compuesta principalmente por hueso cortical (tejido óseo compacto) formando una estructura con una fracción porosa de estructuras cónicas menor a la epífisis, constituyendo la parte alargada del hueso, mientras que la metáfisis y la epífisis está compuesta principalmente de hueso trabecular (tejido óseo esponjoso) rodeado de una capa delgada de tejido cortical denso, la epífisis conforma los extremos de los huesos siendo unida a la diáfisis mediante la metáfisis (Figura 1) [64,65].

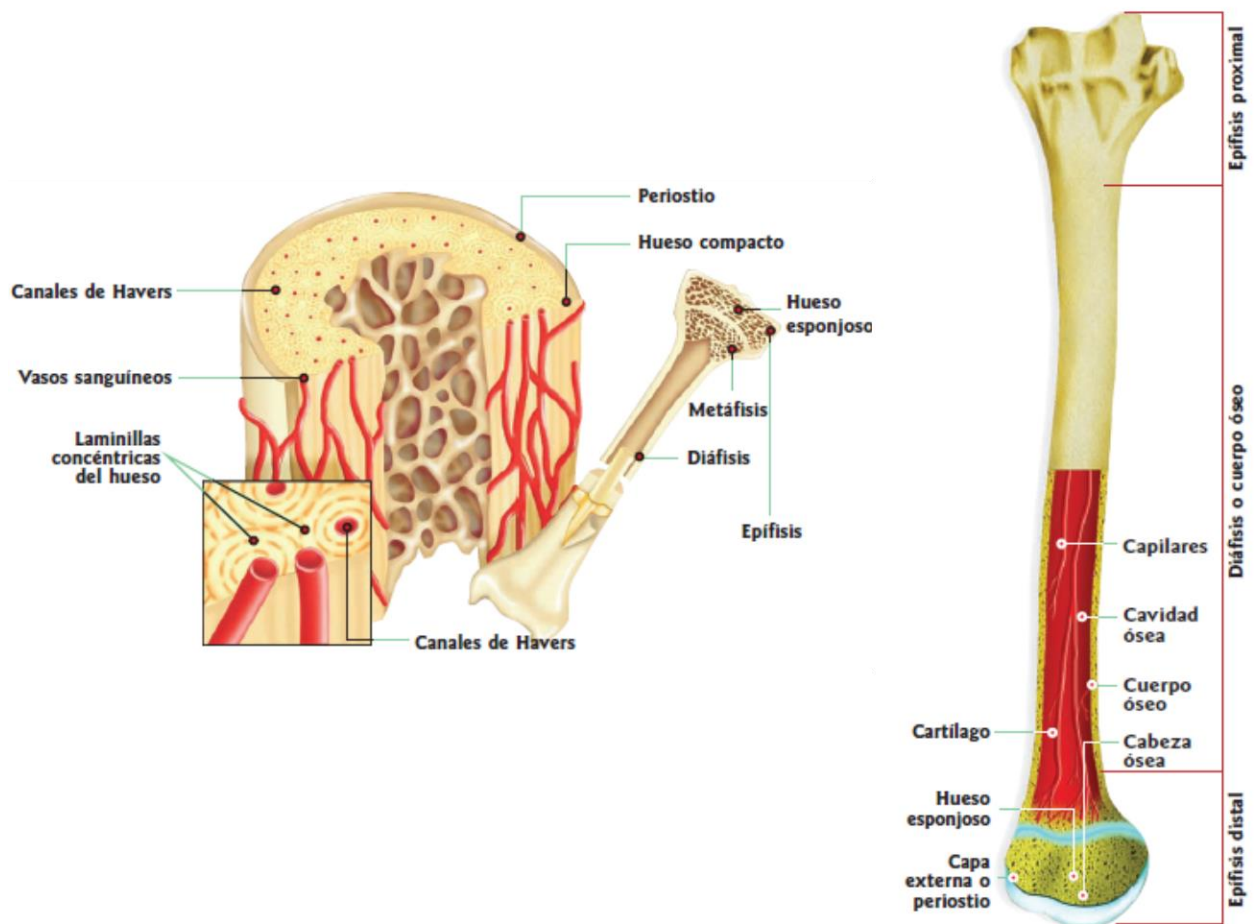


Figura 2.1 Anatomía del hueso [66].

2.4.1 Células óseas

El hueso es un órgano en constante cambio integrado por diferentes células con funciones específicas que complementan unas a otras, las tres líneas celulares principales son los osteoclastos, los osteoblastos y los osteocitos.

2.4.1.1 Osteoclastos

Los osteoclastos son la única línea celular con la capacidad de resorber hueso, los osteoclastos activos son una línea multinucleada derivada de una línea macrófaga mononuclear la cual, aunque es posible encontrarla en diferentes tejidos, principalmente proviene de la médula ósea. Existe una correlación directa entre estas células y dos citocinas críticas en su formación y desarrollo, RANKL la cual es un ligando receptor activador para el factor nuclear K-B cuya presencia da lugar a la diferenciación de células precursoras y M-CSF la cual es un factor de estimulación de colonias macrófagas necesaria para la proliferación y sobrevivencia de los osteoblastos, diferenciación de células precursoras y reacomodo del citoesqueleto, el cual es un paso necesario para la resorción de hueso. Dicha resorción es dependiente de la secreción de ácido hidro clorhídrico y proteasas como la catepsina K desde los osteoclastos, donde los iones de hidrógeno acidifican el medio permitiendo la disolución de los componentes de la matriz mineral del hueso mientras que la catepsina K hidroliza la matriz proteínica principalmente conformada por colágeno tipo I [67].

Los osteoclastos requieren de unirse al hueso para realizar el proceso de resorción, para lo cual cuenta con estrategias como la unión a la matriz del hueso mediante receptores tipo integrina en la membrana que se une a los péptidos de la matriz proteínica del hueso, particularmente la familia de receptores tipo integrina $\beta 1$ fijan a los osteoclastos al colágeno, fibronectina, laminina, mientras que la familia de receptores tipo integrina $\alpha_v\beta_3$ unen al osteoclasto a la osteopontina y la sialoproteína también del hueso [64,67]. Una vez unido el osteoclasto al hueso mediante el citoesqueleto, se inicia un proceso de transporte de vesículas acidificadas hacia el lado de la membrana que se encuentra unido al hueso, la inserción de estas vesículas en el plasmalema da lugar a una morfología corrugada denominada membrana de volantes. Este nuevo organelo resorbente contiene una gran cantidad de transportadores de protones para la formación de un microentorno acidificado sirviendo también como una vía para la exocitosis de catepsina K. Adicionalmente la membrana ondulada da lugar a la polarización de la actina fibrilar en forma de estructuras circulares conocidas como anillos de actina, estos rodean y aíslan el nuevo

microentorno acidificado permitiendo una mejor resorción de la fase mineral y proteínica del hueso.

2.4.1.2 Osteoblastos

Los osteoblastos son células especializadas en la producción de biomoléculas de la matriz ósea, estos se producen a partir de células precursoras las cuales provienen de líneas celulares pluripotentes que dan lugar a preosteoblastos que posteriormente se diferenciarán en los osteoblastos, los cuales una vez que el hueso se encuentra correctamente estructurado se diferencian de nuevo para dar lugar a osteocitos. Se pueden encontrar diferentes poblaciones de osteoblastos con diferentes características y expresando diferentes genes de forma simultánea, aunque existe poco entendimiento sobre este fenómeno, se puede inferir que esta variabilidad es consecuencia o necesidad de la gran heterogeneidad de morfologías de la matriz ósea [64].

Los osteoblastos sintetizan y secretan principalmente colágeno tipo I (uno de los principales componentes de la matriz ósea) y otras proteínas no colagenosas, entre las cuales se encuentran proteoglicanos, proteínas glicosiladas y proteínas gama-carboxiladas. Aunque la mayoría de estas proteínas no han sido asociadas con una función determinada, se ha estipulado que se encuentran involucradas en la regulación de la deposición de la fase mineral del hueso y la regulación de la actividad celular de otras líneas. Por ejemplo, se ha determinado que existe regulación de los procesos de remodelación de hueso a partir de los niveles de osteocalcina, donde altos niveles de esta biomolécula dan lugar a una menor cantidad de tejido óseo, lo cual sugiere que los osteoblastos poseen un proceso de control de la resorción mediante la producción de la osteocalcina, ya sea en forma libre o adherida a la matriz del hueso, donde una alta actividad por parte de los osteoclastos liberará a esta biomolécula de la matriz, evitando así una sobreproducción de hueso o una hidrólisis excesiva de este. Otra proteína de gran importancia es la fosfatasa alcalina, la cual es producida en los osteoblastos y puede ser secretada en forma libre o unida a su superficie mediante un enlace fosfoinositol, esta fosfatasa se encuentra relacionada de forma indirecta con la mineralización de hueso debido a que es un factor de diferenciación de los osteoclastos, además de estos procesos de control en otras líneas celulares, los osteoblastos también poseen mecanismos de auto control como lo es la osteonectina, una proteína relacionada con el crecimiento y proliferación de los mismos osteoblastos [64,68].

2.4.1.3 Osteocitos

Los osteocitos son una línea celular derivada de los osteoblastos los cuales han perdido la capacidad de realizar mitosis, estos forman una red de células dentro de la matriz mineralizada del hueso comunicándose mediante estructuras denominadas dendritas que se extienden a través de los diferentes canales porosos del hueso, su función principal consiste en la entrega de nutrientes, oxígeno y biomoléculas de señalización. El mecanismo de señalización que da lugar a la diferenciación de osteoblastos en osteocitos no ha sido dilucidado por completo, aunque se ha encontrado cierta correlación de este proceso con la expresión diferenciada de productos génicos como la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE), esclerostina y factor de crecimiento 23 de fibroblastos (FGF-23), siendo este último un factor determinante de la homeostasis del fósforo en el organismo. Los osteocitos funcionan como un sensor integral en el hueso, regulando la masa de este en respuesta a cargas mecánicas y traumatismos, aunque el mecanismo que censa el estrés mecánico no ha sido exactamente descrito existen hipótesis que indican que las dendritas juegan un papel importante en su estimación, por otro lado, el estrés se ve reflejado en el nivel de expresión bajo de esclerostina, la cual se encuentra relacionada con procesos de apoptosis de los osteoblastos dando lugar a una disminución de la masa del tejido óseo. De forma similar, la producción de prostaglandinas en los osteocitos se ha correlacionado con altas cargas o estrés mecánico en los huesos, inhibiendo la producción de esclerostina, evitando la inhibición de la osteogénesis al evitar la apoptosis de las células que intervienen en el proceso [69,70].

2.4.2 Fracción mineral del hueso

La fase mineral del hueso se encuentra conformada principalmente por apatita conformada por calcio y fósforo teniendo dos funciones principales, las cuales dependen en gran medida de la forma, tamaño, composición y química y estructura cristalina; sus funciones son actuar como un reservorio de iones y proveer la estructura mecánica a los huesos. La primer función se encuentra fundamentada en que aproximadamente el 99% del calcio, el 85% del fósforo, 90% del sodio y 50% del magnesio total de un cuerpo humano se encuentran en los huesos, dando lugar a un reservorio distribuido a lo largo del cuerpo facilitando la disponibilidad de estos elementos donde la concentración de estos iones en los fluidos corporales se controla mediante la formación de cristales, dicho control es importante para mantener procesos en el organismo o in incluso para limitar las concentraciones fisiológicas máximas para mantener la viabilidad celular. Desde el punto de vista estructural, las propiedades mecánicas del hueso son el resultado de la impregnación

de fases orgánicas suaves en los cristales de apatita, conformando un compuesto natural, donde la fase mineral forma hasta un 60 por ciento de la materia sólida de este, mientras que el resto se conforma por biomoléculas y células. Esta fracción mineral es también responsable de mantener la arquitectura microscópica en la cual las células pueden habitar, desarrollarse y nutrirse [67]. Es posible encontrar también minerales que no son apatitas en el hueso como los iones CO_3^{2-} y HPO_4^{2-} , estos se encuentran principalmente en las superficies hidratadas de los cristales de apatita, sin embargo, debido a que estas especies son principalmente encontradas en dichas regiones hidratadas y es difícil mantener estas condiciones de forma estática, se incrementa la incertidumbre al momento de realizar los análisis. En el caso de las diferentes metodologías de espectroscopía como Raman e infrarrojo la muestra suele presentar un comportamiento amorfo debido a la presencia de agua en la muestra, limitando la determinación de las bandas picos características de los compuestos ubicados en regiones hidratadas, por otro lado, mediante difracción de rayos X los ángulos de difracción son difíciles de determinar debido a la poca cantidad de estos compuestos [67]. Otros elementos como el magnesio y el sodio se encuentran embebidos en la estructura mineral de la hidroxiapatita, donde su liberación o almacenamiento se encuentran vinculados, funcionando también como un reservorio para asegurar la disponibilidad de estos elementos a lo largo del cuerpo.

2.4.3 Fracción orgánica del hueso

La matriz extracelular del hueso que acompaña a las diferentes células y la fracción mineral es prioritariamente compuesta de proteínas colagenosas (Tabla 2.1), abarcando desde un 85 hasta un 90 por ciento, la principal de estas es el colágeno tipo I encontrándose trazas de colágeno tipo III, V y FACIT, siendo estos últimos colágenos asociados a fibrillas con su triple hélice interrumpida cuya función es estabilizar las matrices extracelulares, encontrándose en esta categoría el colágeno de los tipos IX, XII, XIV, XIX, XX y XXI. Por otro lado, las proteínas no colagenosas componen desde un 10 hasta un 15% de la proteína total, donde aproximadamente un 25% de estas es derivada exogenicamente, como la albúmina, la glicoproteína α_2 -HS, factores de crecimiento, entre otras moléculas y biomoléculas, dando lugar a la regulación de procesos de desarrollo celular y mineralización del hueso. Particularmente, algunas líneas celulares como los osteoblastos producen estas proteínas, tales como los proteoglicanos, proteínas glicosiladas, proteínas glicosiladas con capacidades de adhesión y proteínas β -carboxiladas, mientras que los osteoblastos producen otras proteínas como la osteocalcina [64,71].

Tabla 2.1 Proteínas de la matriz extracelular ósea [64].

Proteína	Función
Proteínas colágenas	
Tipo I	Proteína estructural
Tipo X	Componente del cartílago hipertrófico
Tipo II	Puede regular el diámetro de fibrillas colágenas
Tipo V	Puede regular el diámetro de fibrillas colágenas
Proteínas de suero	
Albúmina	Disminuye el crecimiento de cristales de apatita
Glicoproteína a2-HS	Estimula la mineralización por vesículas
Glicoproteínas	
Fosfatasa alcalina	Hidroliza inhibidores de la deposición mineral
Osteonectina	Regula el diámetro de fibras de colágeno
Proteínas SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand)	
Osteopontina	Regula el diámetro de fibras de colágeno
Sialoproteína de hueso	Inicia la mineralización
Fosfoglicoproteína de la matriz extracelular	Regula el metabolismo del fosfato
Glicoproteínas RGD	
Trombospondinas	Unión celular
Fibronectina	Ligado a células
Vitronectina	Unión celular
Fibrilina 1 y 2	Regula la formación de fibras elásticas
Proteínas ácido g-carboxi glutámico	
Proteína Gla	Inhibe la mineralización
Osteocalcina	Regula osteoblastos e inhibe la mineralización
Proteína S	No determinada
Factores de crecimiento	
IGF-I E IGF-II	Inhibe la mineralización
TGF- β	Inducción de hueso y colágeno en respuesta a fracturas

2.5 El tejido vascular (vasos sanguíneos)

Este tipo de tejido se encuentra rodeado de una matriz extracelular compuesta por proteínas grandes, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, estas proteínas son principalmente de forma fibrilar, confiriendo propiedades de fuerza de tensión y resistencia a la compresión. Las proteínas más abundantes son el colágeno y la elastina, en sus diferentes formas, con una menor cantidad de fibronectina, vitronectina, entre otras. Este tejido contiene tipos específicos de células que pueden producir y secretar proteínas además de soportar funciones mecánicas como la contracción y la migración celular. Los vasos sanguíneos tienen estructuras concéntricas con diferentes capas, cada una con diferentes tipos de células y diferentes tipos de proteínas. La sección interna consiste de una monocapa de células endoteliales la cual forma una apretada barrera no trombogénica entre el lumen del vaso y el resto de la pared del vaso sanguíneo, esta capa no solo es necesaria para evitar la formación de coágulos sino también para la prevención de infecciones e inflamación del tejido adyacente, esta capa se encuentra estabilizada por una capa rica en laminina y colágeno tipo IV, seguida de una capa libre de células conformada por elastina llamada la lámina elástica interna. En seguida de esta capa se encuentra la capa muscular que se encuentra conformada por células musculares suaves (SMCs) o pericitos en el caso de los microvasos capilares, los cuales se han especializado en funciones contráctiles, se puede encontrar colágeno tipo I y III principalmente, paralelamente los movimientos de contracción de las SMCs y los pericitos se encuentran regulados por las células endoteliales del centro del vaso sanguíneo o directamente por el sistema nervioso. Posterior a esta capa muscular nuevamente se encuentra una capa libre de células conformada por elastina y cubre al tejido interno separándolo de la adventicia, que es la última capa del vaso sanguíneo que se encuentra conformada principalmente por fibroblastos y una matriz de colágeno, siendo responsable de soporte estructural adicional mediante el anclaje del vaso sanguíneo al tejido circundante y de proporcionar un sustrato para la circulación de los mismos vasos sanguíneos de menor diámetro (*Vasa vasorum venarum*) a otros de mayor diámetro [72].

2.5.1 Células endoteliales

Las células endoteliales que conforman la capa más interna de los vasos sanguíneos han sido reconocidas como un aspecto crítico en la homeostasis vascular, cuyas funciones controlan el tono vascular, la presión sanguínea, el tráfico de leucocitos desde la sangre hacia los músculos, además de mantener balanceada la relación antitrombótica/anticoagulante. Sin embargo, una de las

funciones menos reconocidas es su relación con la angiogénesis, donde se ha determinado que las células endoteliales dirigen la adquisición de pericitos a partir de tejido muscular mediante la secreción de señales moleculares que agrupan células mesenquimales indiferenciadas conllevando a la maduración de los vasos, estimulando directamente la mitogénesis de los pericitos que se encuentran en el tejido muscular adulto, con la finalidad de que estos pericitos conformen la capa externa del vaso capilar o sanguíneo, madurando y completando la fracción celular de los vasos capilares [73,74].

Las células endoteliales se encuentran estrechamente relacionadas con trastornos metabólicos como la diabetes debido a un fenómeno denominado como “memoria metabólica”, mediante el cual se sugiere que condiciones de estrés oxidativo derivado de la hiperglicemia (niveles excesivos de glucosa) da lugar a efectos detrimentales altamente conservados incluso después de la restauración de los niveles glicémicos mediante mecanismos epigenéticos aberrantes perpetuando la disfunción de las células endoteliales, encontrándose una correlación entre los niveles de la proteína p66 (enzima redox) y este proceso, cuya producción se ve relacionada con altos niveles de estrés oxidativo, reducción en la disponibilidad de óxido nítrico, muerte celular, inflamación e incluso resistencia a insulina. La alta cantidad de la proteína p66 se encuentra a su vez relacionada con modificaciones epigenéticas persistentes como un alto nivel de acetilación de la proteína histona 3 y la hipometilación del promotor CpG, al mismo tiempo la hiperglicemia se encuentra relacionada con la inhibición de la producción de la proteína SIRT1 (sirtuina-1 deacetilasa dependiente de NAD), la cual al ser suministrada de forma alterna y mediante su actividad deacetilasa, permite restaurar los niveles de AMPK (proteína quinasa activada por adenosin monofosfato de respuesta a estrés hipotóxico), MnSOD (enzima superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso de respuesta a estrés oxidativo) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), devolviendo el desarrollo normal a las células endoteliales [75,76], dicho efecto de SIRT1 es posible de emular mediante diferentes moléculas sintéticas y biomateriales como la metformina y el biovidrio 45s5, aunque el primero mediante la activación directa de SIRT1 y el segundo mediante la estimulación de la producción de factores angiogénicos en células específicas como se describirá posteriormente [77,78].

2.5.2 Requerimientos tridimensionales de las células endoteliales

El comportamiento metabólico de las células endoteliales es dependiente del microentorno tridimensional en que se encuentra, diferentes trabajos han dado lugar a datos que soportan diferentes perfiles de expresión de productos de genes los cuales aparecen dependiendo de la forma en que se realiza el tejido, siendo evidente la diferencia entre modelos de crecimiento tradicionales en dos dimensiones y modelos modernos como lo son los andamios biomiméticos tridimensionales, por ejemplo en células cancerígenas de ovario se encontraron diferencias en la cantidad de RNA mensajero codificante para los receptores de superficie tipo integrina $\alpha 3/\alpha 5/\beta 1$ y la proteasa MMP9 (metaloproteína 8 de la matriz extracelular), por otro lado, en células CRC (células cancerígenas colorrectales) se ha demostrado también que existe un incremento en la producción de EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), AKT (proteína quinasa B) y MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), que finalmente se ven reflejados en el metabolismo en diferentes partes como las cascadas de señalización en el transporte de glucosa o incluso en la inhibición de procesos apoptóticos. Otro factor importante en el desarrollo de células en un ambiente tridimensional es la adquisición de nutrientes, a diferencia de los cultivos monocapa donde las células se desarrollan adheridas a un entorno bidimensional en contacto con medio rico en nutrientes e incluso factores de crecimiento ambos de forma homogénea, la monocapa producida es normalmente homogénea en células viables debido a que las células necróticas suelen separarse de la superficie y en condiciones *in vitro* e *in vivo* estas se eliminan durante los cambios de medio o mediante la dinámica de fluidos del microentorno, lo que en conjunto, con las diferencias en la expresión génica previamente mencionada, da lugar a diferencias en la morfología, tasa de proliferación, diferenciación, apoptosis y productos génicos, alterando la forma del tejido que se busca regenerar o reemplazar [52,79], de esta forma el uso de andamios biomiméticos que emulan el entorno natural de las células permite que se mantengan las condiciones naturales de oxigenación, flujo de nutrientes y moléculas de señalización, además de la remoción de residuos, dando lugar a los fenotipos característicos de las células que se busca desarrollar con los productos génicos que se producen de forma nativa [52].

2.6 Andamios biomiméticos

A diferencia de los implantes tradicionales en los implantes fabricados con biomateriales se busca el reemplazar el tejido, su función o detectar ciertos estímulos, entre otras funciones. Así, es necesario el uso de estos en forma de andamios que imiten al tejido o que funcionen como una

matriz extracelular. A partir de esto se pueden crear sustitutos para diferentes tejidos como la piel, ligamentos, cartílago y tejido óseo, permitiendo mejorar la calidad de vida en pacientes con trastornos crónico degenerativos como la diabetes o el cáncer en sus distintas convenciones. En particular en el desarrollo de los implantes para la sustitución de partes del sistema esquelético, se busca reproducir la arquitectura del tejido óseo esponjoso, debido a que es la forma nativa en la cual el tejido se encuentra en una dinámica de remodelación constante, permitiendo la proliferación de células y también su sembrado de forma *in vitro*. Estos andamios deben tener propiedades como el facilitar la propagación de células, la diferenciación de tejidos y la optimización de las propiedades mecánicas del tejido regenerado.

2.6.1 Propiedades de los andamios

El objetivo principal en el uso de andamios por parte de la ingeniería de tejido es el desarrollo de sustitutos de tejido para mantener, mejorar o restaurar las funciones biológicas. Los andamios han sido desarrollados con la finalidad de funcionar como ambientes amigables para la adhesión, la proliferación y la migración celular, siendo capaces de satisfacer la necesidad inmediata de un sustituto y el eventual reemplazo por tejido nuevo.

2.6.1.1 Porosidad

El diseño de andamios funcionales requiere de la generación de estructuras dentro del rango de 50 a 90 por ciento de porosidad, con un diámetro mínimo de 100 micrómetros. Sin embargo, los diámetros adecuados se dividen en dos rangos: el macroporoso y el microporoso, sin que sea descartado un grupo de poros de otro en un mismo andamio, el rango de los macroporos se refiere a aquellos cuyo diámetro es superior a los 50 nanómetros o 0.5 micrómetros, estos poros son esenciales para la difusión de nutrientes, iones y desechos generados por la red celular que se busca desarrollar para la población del implante. Por otro lado, los microporos son aquellos que tienen un diámetro de menos de 2 nanómetros y los mesoporos cuyo diámetro es entre los 2 y los 50 nanómetros [80], ayudan en la capilaridad, la vascularización y las interacciones de la matriz celular. De forma óptima ambas distribuciones deben ser lo más uniformes posibles en toda la extensión del andamio, para así generar una correcta unión e interacción celular en todo el implante [81,82].

2.6.1.2 Biocompatibilidad

Como se ha mencionado previamente, la bioactividad es un requisito esencial en el diseño de biomateriales y por lo tanto, también en los andamios fabricados a partir de biomateriales, en este sentido se define la biocompatibilidad de un andamio a la capacidad de ser aceptado dentro de un organismo sin la generación de respuestas tóxicas o la formación de tejido de cicatrización, fomentando la adhesión de células en su superficie permitiéndoles proliferar, formar redes y diferenciarse. Esta propiedad es altamente dependiente de la composición debido a la forma en que ciertos compuestos generan respuestas en los organismos aún en bajas dosis [82,83].

2.6.1.3 Bioresorbilidad

Los andamios deben tener la capacidad de ser hidrolizados de forma similar a los tejidos propios del organismo, ya sea por el medio acuoso como por células especializadas, a diferencia de los biomateriales donde dicha actividad es principalmente para permitir la liberación de iones para la consecuente formación de hidroxiapatita, en un andamio para regeneración ósea, tiene además la función de crear espacios para la formación del nuevo tejido, tanto de la fracción mineral como la fracción orgánica. El cálculo de la velocidad óptima de la resorción de los andamios de regeneración ósea aún no se ha determinado de forma concreta, existiendo aún un amplio rango que varía entre los 3 y 9 meses, debido a las complicaciones renales que una tasa de resorbilidad podría ocasionar debido a la gran cantidad de iones foráneos que el organismo debe procesar [82,84].

2.6.1.4 Estructura tridimensional

Un componente clave en el diseño de andamios es la biomimeticidad, referida como la reproducción de estructuras tridimensionales propias de los organismos y del tejido a reemplazar. Particularmente en el diseño de materiales de regeneración ósea se busca facilitar el transporte de nutrientes y oxígeno, procesos generalmente alcanzados en base a la formación de poros interconectados cuya forma geométrica es prescindible, sin embargo, para que un andamio se considere biomimético debe cumplir con características geométricas como la formación de esta misma red porosa a partir de topografías y porosidades onduladas. Dichas características dan lugar a sitios o áreas con fuerzas mecánicas que permiten un correcto desarrollo del citoesqueleto celular, el cual a su vez participa en la organización de la matriz y las colonias celulares, además, a partir de la biofuncionalización de la superficie de los andamios con biomoléculas como el colágeno, se

puede adecuar el entorno para acelerar el proceso de proliferación celular a través del estímulo, la adhesión mediante la unión de receptores específicos tipo integrina con dicho colágeno en la superficie del andamio [85,86].

2.6.1.5 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de un andamio para sustitución ósea debe corresponder con las del tejido natural, siendo requerida tanto elasticidad y como fuerza de compresión, sin embargo, aún en el tejido natural este tipo de características son difíciles de determinar debido a la gran variación que existe, existiendo variaciones en la fuerza compresiva desde los 100 hasta los 200 mega pascales para el tejido cortical y desde los 2 hasta los 20 mega pascales en el tejido esponjoso (canceloso), haciendo que sea complicado el estandarizar este tipo de características en el desarrollo de implantes [84]. A esto se une las limitaciones en las propiedades de compresibilidad que los biomateriales que se emplean normalmente en el desarrollo de andamios bioactivos, optándose por el uso de materiales en conjunto que permitan compensar las desventajas de cada uno [12].

2.6.2 Técnicas de síntesis de andamios de biovidrio

En la fabricación de biovidrios no solo las propiedades químicas afectan la funcionalidad de los implantes elaborados, variables como la morfología del implante también se ven involucradas debido a la necesidad de un entorno amigable y funcional para las células que poblarán el andamio, permitiendo su población a partir de la generación de poros con diámetros adecuados o la comunicación celular a partir de poros interconectados que permitan la migración de biomoléculas de un lado a otro, simultáneamente el área superficial puede ser alterada debido a la porosidad incrementando la cantidad de iones que pueden ser liberados al entorno y al mismo tiempo los sitios de nucleación donde se condensan las nuevas fases necesarias para el enlace del biomaterial con el organismo. Para satisfacer estos requisitos han sido desarrollados diferentes metodologías que permiten controlar dichas características cuya aplicación permite obtener una gran cantidad de diseños hasta alcanzar uno adecuado [87].

2.6.2.1 Enlace térmico de partículas y fibras

En este tipo de procesos los andamios son elaborados a partir de el empaquetamiento de partículas que pueden o no ser de forma irregular o esférica, dicho empaquetamiento suele ser elaborado a partir de partículas con formas determinadas. De forma adicional se suele agregar un agente

denominado como porógeno o templante, este agente varía desde compuestos sencillos como granos de cloruro de sodio hasta microesferas de poliestireno, la función de este es el mezclarse con las partículas de biovidrio como una fase que tras ser eliminada mediante disolución o calcinación, dejará como huella un poro [88]. Esta técnica posee la ventaja de permitir controlar de forma directa la cantidad de poros y el tamaño del poro generado, a partir de modificaciones en el agente porógeno como su cantidad y su tamaño. Pese a que es posible manipular dichas propiedades de forma controlada, la principal limitación radica en la formación de estructuras porosas interconectadas [37].

2.6.2.2 Replicación de espumas poliméricas

Originalmente se desarrolló esta técnica para la producción de materiales cerámicos macroporosos, en este método se emplea una espuma sintética o natural a partir de matrices orgánicas como la estructura interna de plantas como la luffa [89], esta matriz es inmersa en la suspensión de precursores hasta lograr un recubrimiento uniforme permitiendo que el proceso de gelificación avance hasta alcanzar una forma estable y en seguida se realizan los tratamientos térmicos pertinentes para eliminar la matriz y densificar la estructura, dicho tratamiento normalmente se realiza en dos etapas siendo la primera la temperatura en la cual la matriz se elimina y la segunda en la cual el material alcanza las fases cristalinas buscadas. La principal ventaja de este método es que a través del uso de matrices orgánicas se pueden alcanzar morfologías altamente interconectadas en rangos de 40 a 95 por ciento, aunque disminuyendo su estabilidad mecánica[37].

2.6.2.3 Fabricación de sólidos de forma directa

Se refiere a un grupo de técnicas empleados en la manufactura de objetos capa-por-capita, cuya estructura es determinada mediante modelos computarizados. Se caracteriza por la carencia de moldes en la elaboración de bioandamios, debido al uso de equipos como impresoras tridimensionales, modelado por deposición de fusión, estereolitografía y sinterizado láser selectivo, entre otros. Debido a la naturaleza de estas técnicas, donde generalmente se aplica un sistema de extrusión, la arquitectura y la interconectividad se pueden determinar de forma directa ya que las líneas de alimentación comúnmente pueden alcanzar diámetros finos que rondan los 30-40 micrómetros y en el caso de técnicas como el sinterizado selectivo los diámetros de los láseres son también ajustables rondando el milímetro de diámetro [88]. Este tipo de equipos permiten la obtención de estructuras biomiméticas pero requieren de pasos adicionales y críticos como la

fabricación de un material de inyección adecuado o la programación de protocolos informáticos para una correcta operación [90].

2.6.2.4 Secado por liofilización

En la fabricación de bioandamios existe la posibilidad de secar mediante un proceso de sublimación, en esta se procede al congelamiento de suspensiones coloidales estables de precursores, dicha temperatura agrega propiedades a los materiales como dispersiones adecuadas para la fabricación de micro y nanopartículas, pero también puede ser aplicada en la fabricación de construcciones macroscópicas. El congelamiento de las suspensiones normalmente se efectúa en una dirección particular, lo que resulta en la formación de poros con una microestructura orientada. Debido a esta capacidad de otorgar dirección en la microestructura, las propiedades mecánicas como la fuerza de compresión se ven optimizadas, comparadas con aquellas de los materiales de dirección aleatoria en su microestructura, no obstante su limitación se encuentra en los diámetros de poro que se pueden lograr, encontrándose entre típicamente entre 10 y 40 micrómetros, lo cual se considera demasiado pequeño para la colonización de células dentro de éste [37,91].

2.6.2.5 Procesamiento sol-gel

Uno de los más estudiados procesos de elaboración de andamios es el proceso sol-gel, donde la solución de precursores es modificada mediante surfactantes. Posteriormente los procesos de condensación y gelación ocurren de forma normal, para en seguida ser sinterizados o tratados a altas temperaturas. Esto da lugar a morfologías porosas con diferentes diámetros donde los macroporos cuyos diámetros varían entre los 10 y 500 micrómetros se encuentran interconectados mientras que los mesoporos de entre 2 y 50 nanómetros se encuentran normalmente aislados. Esta estructura jerárquica da lugar a un buen proceso de hidrólisis-condensación para la formación de hidroxiapatita, pero limita las propiedades mecánicas, ocasionando comúnmente bajas fuerzas de compresión de entre 0.3 y 2.3 mega pascales [92].

2.6.2.6 Espumado por gas

En la mayoría de las técnicas de síntesis es un requisito el uso de solventes para la preparación de la solución precursora, sin embargo esto ocasiona problemas como la incorporación de residuos que pueden dañar el tejido y afectar negativamente las funciones celular, para evitar el uso de solventes se puede hacer uso de dióxido de carbono en estado gaseoso a presiones alrededor de los 800 psi para saturar la solución de precursores, a partir de esta saturación se desestabiliza el dióxido

de carbono [93], ocasionando que estas moléculas inicien el proceso de nucleación formando burbujas, ocasionando la formación de porosidad una vez que termina el proceso de síntesis, su principal desventaja al igual que en otros procesos es la formación de poros muy pequeños lo cual ocasiona que el biomaterial no permita la migración de células al interior del andamio [82].

2.7 Ensayos *in vitro*

El empleo de modelos estandarizados en el laboratorio permiten la discusión y comparabilidad de los diferentes experimentos alrededor del mundo, uno de los principales modelos *in vitro* es el fluido corporal simulado diseñado específicamente para ver la condensación de hidroxiapatita y los subproductos propios de este proceso, sin embargo, existen otros modelos que permiten el analizar otras variables como los sueros naturales extraídos de sangre, cuya composición proteínica permite analizar el efecto de dichas biomoléculas en procesos químicos. Además, otro tipo de ensayos *in vitro* como los cultivos celulares ya sea de bacterias o células mamíferas inmortalizadas, también permiten analizar e incluso obtener datos numéricos sobre el efecto de una sustancia sobre dichos organismos. Así, dichos modelos *in vitro* nos permiten realizar experimentos repetibles, comparables y cuantificables.

2.7.1 Fluido corporal simulado

Desde hace aproximadamente treinta años se desarrolló un modelo *in vitro* denominado fluido corporal simulado o SBF (Simulated Body Fluid) a partir de sus siglas en inglés, en una primera instancia se ha formulado la composición iónica a partir de la composición nominal de cada ión presente en la sangre, sin embargo, dicha composición se ha adaptado a partir de diferentes descubrimientos. Aunque se han generado diferentes modificaciones en la composición, dos han sido las principales variaciones empleadas, la primera fue la denominada composición convencional del fluido corporal simulado, donde se ha aumentado la fracción del ion Cl^- y se ha disminuido la de la fracción del ion HCO_3^- , dicha modificación se elaboró para alargar el tiempo de estabilidad de la solución y brindar tiempos de análisis de hasta un mes sin alteraciones debido a precipitación en los componentes del medio. Una segunda variación del fluido corporal simulado es la denominada composición revisada del fluido corporal simulado, donde a raíz de diferentes estudios se determinaron las cantidades del ion Mg^{2+} y del ion Ca^{2+} que, aunque se cuantifican como parte del plasma, se encuentran ligadas a proteínas limitando su disponibilidad para los procesos de condensación de hidroxiapatita, siendo ajustada la concentración de dichos iones en el

medio para brindar un resultado más representativo, dicha formulación es la empleada en el presente trabajo siendo actualmente la más aceptada en conjunto con que los tiempos de ensayo son menores a los 10 días [94].

Este modelo es empleado principalmente en el ensayo de biovidrios y debido al proceso de condensación de la fase de hidroxiapatita y óxido de silicio, existen cambios en la composición del fluido corporal simulado conforme avanza el tiempo de incubación de alícuotas en este. En una primer etapa comienza la liberación de iones de silicio además del resto de los iones aunque en menor proporción debido a la composición, ocasionando cambios en la solubilidad del microentorno inmediato generando un medio supersaturado, posteriormente una parte del silicio liberado vuelve a condensarse para formar una capa de óxido de silicio y enseguida comienza la condensación de hidroxiapatita, lo que conlleva a una disminución considerable en los iones de fósforo y calcio, siendo condensados una mayor cantidad de iones de los que se liberaron en la primer etapa a partir del biovidrio reduciendo considerablemente la fracción de estos en el fluido corporal simulado, evitando que dicho medio se precipite de forma espontánea debido a la alta carga de iones, este cambio en la composición conlleva un cambio en la alcalinidad del medio ocasionando un incremento en el pH, sin embargo, aunque este cambio es evidente en un modelo *in vitro*, en un organismo superior donde existe una dinámica de fluidos compleja, este cambio en la alcalinidad es apenas perceptible [95–97].

2.7.2 Suero sanguíneo de conejo

El uso de modelos *in vitro* como el fluido corporal simulado tiene la finalidad de representar de la forma más cercana el medio vivo al cual será sometido un biomaterial, sin embargo, estos sistemas son una representación y existen factores cuya reproducibilidad es más compleja. El uso de sueros purificados a partir de diferentes especies permite analizar el efecto que las diferentes biomoléculas solubles tienen sobre el organismo y la disposición de ciertos elementos como el carbono [98].

Aunque el uso de estos modelos ha sido considerablemente lento en comparación con sistemas sintéticos como la solución amortiguadora de fosfatos o el fluido corporal simulado debido a las implicaciones que su obtención conlleva, desde el número de individuos requeridos hasta los equipos de centrifugación, a diferencia de dichos modelos, el uso de sueros naturales permite la obtención de soluciones altamente estables con un contenido de proteínas que puede ser controlado, representando de un modo más cercano a organismos multicelulares y permitiendo

simultáneamente la reproducibilidad entre experimentos, la importancia de la presencia de proteínas durante los ensayos yace en el fenómeno de absorción proteínica en la fracción mineral que compone al tejido óseo, donde se favorece prioritariamente la absorción de colágeno cuya presencia da lugar a la posterior condensación y ordenamiento de la nueva capa mineral de hidroxiapatita, un proceso que se busca imitar en los implantes elaborados a partir de biomateriales como el biovidrio. Sin embargo, un proceso derivado de la implantación de un andamio biomimético no tiene el mismo desarrollo que el proceso de remodelamiento óseo natural, generando incertidumbre en cuanto al efecto que las proteínas solubles presentes en la sangre puedan tener en la bioactividad del andamio, ya que sin en el enlace inicial del implante con el hueso, el proceso de remodelación ósea natural no ocurrirá [99,100].

2.7.3 Actividad antimicrobiana

Una gran parte de la ciencia médica se ha desarrollado para el combate a procesos infecciosos, permitiendo evaluar nuevos fármacos o agentes antimicrobianos en una gran cantidad de microorganismos, sin embargo, esta área se encuentra en un constante desarrollo debido a la pérdida en la eficacia de dichas sustancias debido a la resistencia que los microorganismos adquieren. Hoy en día existe una gran variedad de metodologías para el análisis de actividad antimicrobiana cuya adecuación depende tanto del microorganismo como del agente antibiótico que se busca analizar [101].

El método de difusión de disco en agar es el más común, su metodología se centra en la inoculación del microorganismo de forma homogénea en una caja de Petri, en seguida un disco de papel filtro el cual contiene el compuesto de interés en diferentes concentraciones el cual se coloca en el centro del medio para ser incubados en conjunto. Por convención el agente antimicrobiano en estudio se difundirá en el agar e inhibirá la germinación y crecimiento del microorganismo, se analiza el diámetro de la zona de inhibición, es decir, el radio alrededor del disco que se encuentra libre de crecimiento permitiendo determinar la resistencia fenotípica del microorganismo. Sin embargo, esta técnica posee limitaciones como la dificultad para el cálculo en la cantidad de sustancia que se difunde en el medio, la imposibilidad de determinar de forma directa la concentración mínima inhibitoria o MIC (Minimal Inhibitory Concentration) por sus siglas en inglés, además de que el tipo de compuestos que se pueden analizar se limita normalmente a moléculas o nanopartículas. Debido a este tipo de limitantes se han desarrollado otro tipo de metodologías como el método de

dilución, el cual es empleado principalmente para determinar la concentración mínima de inhibición y permite el análisis de compuestos de naturaleza particulada como algunos biomateriales, esta metodología se puede adaptar al análisis tanto en medios sólidos como líquidos, permitiendo la interacción del compuesto en diferentes concentraciones con el microorganismo que puede ser bacteria, levadura u hongos filamentosos. La concentración mínima inhibitoria es calculada a partir de una curva de concentraciones y es determinada como la cantidad mínima en un volumen de medio que se requiere de una sustancia para inhibir el desarrollo de un microorganismo. En el caso específico del biovidrio 45s5 y su naturaleza particulada se requiere de una doble etapa de crecimiento, donde en la primer etapa se permite la interacción sustancia/microorganismo en un medio líquido con la consecuente liberación de iones al medio y en la segunda etapa se analiza la viabilidad del organismo en el estudio a través de un sembrado en medio de crecimiento sólido, donde mediante un conteo de unidades formadoras de colonia brinda una variable cuantificable del efecto de la sustancia en el microorganismo [101,102].

2.7.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es uno de los microorganismos gram positivos mejor estudiados dentro del grupo de las enterobacterias siendo el modelo de estudio en bacterias por excelencia, se encuentra ampliamente distribuida en el suelo y agua, siendo muy común en los ecosistemas casi todos los ecosistemas naturales y artificiales, al encontrarse en los tractos intestinales de animales y del hombre. Este microorganismo es el principal agente causal de infecciones urinarias, infecciones hepatobiliares y abscesos [103]. Debido a su naturaleza se ha detectado una disminución considerable en su sensibilidad a los agentes antimicrobianos más comunes, siendo esta resistencia el principal problema al momento de buscar un tratamiento adecuado en un caso de infección [104].

E coli es un bacilo gram negativo, que puede poseer factores especializados de virulencia como adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de iones, recubrimientos de polisacáridos e incluso invasinas, cuya presencia depende de cada filogruppo de dicho organismo. Dependiendo también de cada línea de *E coli* se pueden encontrar distintos efectos en el organismo como la generación de respuestas inflamatorias, diarrea o colitis ulcerativa, dichas respuestas dependen de los genes que estas poseen siendo determinantes los genes que codifican la hemolisina, factor 1 necrotizante citotóxico, policetida sintetasa, entre otros. De forma similar a otros microorganismos es capaz de asimilar múltiples fuentes de carbono simultáneamente, lo cual ocasiona altas tasas de crecimiento

y proliferación, siendo posible su cuantificación mediante técnicas de absorción o técnicas de sembrado en placa.

Dentro de las diferentes líneas se encuentra una de uso particular en la biotecnología denominada *E. coli* DH5 alpha, la cual es derivada de la línea K12 cuyo empleo en el laboratorio se centra en procesos de clonación, producción de plásmidos para terapias génicas y ensayos de actividad antibacterial [105,106]. Esta línea es deficiente en la expresión de RecA y endonucleasa I, lo cual mantiene la estabilidad genética y un nivel reducido de actividad nucleasa a nivel endógeno, además no posee resistencia a fármacos lo cual permite analizar el efecto de diferentes sustancias además de comparar con fármacos preexistentes sin algún tipo de restricción [106].

2.7.3.2 Medio LB

El medio Luria-Bertani o medio LB, es uno de los medios más usados a nivel internacional para el cultivo de *Escherichia coli* y otros microorganismos, este proporciona una gran cantidad de nutrientes a partir de la triptona extraída de la caseína de leche y el extracto de levadura extraído de *Sacharomyces cerevisiae*, además, este medio permite el adicionar o no adicionar agar para llevarlo a un estado sólido, permitiendo el desarrollo de metodologías de doble etapa, donde se requiere de una etapa de crecimiento en medio líquido para una posterior etapa de conteo en medio sólido. Este medio ha sido ampliamente establecido por bacteriólogos alrededor del mundo para brindar reproducibilidad a los cultivos, sin embargo es posible tener diferentes tasas de crecimiento y límites en la densidad celular dependientes tanto de las condiciones de incubación como de las condiciones ambientales en la localidad, encontrándose cultivos que exceden cinco veces la biomasa final a otros que emplean el mismo medio [107,108].

En el medio LB contiene amplias cantidades de nutrientes inorgánicos como magnesio y calcio permitiendo llevar a cabo el metabolismo celular sin presentar una limitante aparente, por otro lado, el contenido de azúcares asimilables como la glucosa sí afecta la tasa máxima de biomasa que se puede obtener de un lote cultivo, siendo posible la recuperación del crecimiento una vez adicionado solamente el contenido de carbohidratos necesario al medio. La disponibilidad de aminoácidos es proporcionada a través de la digestión de oligopéptidos propios de la triptona y el extracto de levadura, siendo catabolizados a partir de permeasas de oligopéptidos y peptidasas con diferentes rangos de especificidad que son producidas por el propio organismo, sin embargo, el uso de este

tipo de fuentes de aminoácidos da lugar a la excreción de amonio, lo cual alcaliniza el medio durante el crecimiento [107].

2.7.4 Citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad son requeridos para la evaluación del efecto y respuesta que ocasiona un compuesto o molécula a las células que conforman un organismo, este efecto puede ser monitoreado y cuantificado mediante el análisis del desarrollo, la reproducción, la morfología e incluso el metabolismo de líneas celulares específicas. La citotoxicidad se encuentra ampliamente relacionada con la biocompatibilidad debido a que es necesaria una evaluación cuantificable sobre el efecto que un implante o instrumento médico puede tener sobre el receptor al encontrarse en contacto directo, dicho de otra forma, la citotoxicidad se puede definir como el proceso dinámico de cambio en un ambiente determinado y la tolerancia a ese cambio en el receptor, evitando cualquier tipo de expulsión o encapsulación del agente que propició dicho cambio.

2.7.4.1 Tipos de ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Hoy en día existen tres tipos principales de ensayos *in vitro* las pruebas de extractos, las pruebas de contacto directo y de contacto indirecto, cada una se emplea dependiendo de la sustancia a estudiar, del tipo de cultivo y de la medición que se busca registrar, entre otras consideraciones.

2.7.4.1.1 Pruebas de extractos

El método más empleado actualmente es la denominada prueba de extractos, la cual consiste en la cuantificación de la actividad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa a partir de la degradación del compuesto metil tiazol tetrazolio (MTT). El principio de este método es la reacción de la enzima deshidrogenasa mitocondrial localizada en el citocromo b y c con el reactivo MTT, bajo la premisa de que dicha reacción solo sucederá en células cuya integridad metabólica no ha sido alterada por el tratamiento en cuestión, cambiando el color de la sustancia de amarillo a púrpura mediante el rompimiento del anillo tetrazolio de la estructura del MTT dando lugar a una molécula de formazan, los cristales generados mediante esta reacción son insolubles en agua y deben ser solubilizados empleando dimetil sulfóxido u otro solvente orgánico. La cantidad de cristales de formazan obtenidos brinda una correlación positiva respecto al número de células viables en el medio, siendo cuantificable mediante espectroscopía el cual puede ser cuantificado mediante colorimetría, generando una correlación entre la integridad del mecanismo energético de las células viables y la medición del color obtenido tras la producción de formazan [109,110].

2.7.4.1.2 Pruebas de contacto indirecto

Se basan en el cultivo de células que forman monocapas como los fibroblastos sobre un filtro de celulosa con medio líquido, para posteriormente ser removidas mediante la adición de un medio que contiene agar, este gel se separa del filtro retirando la monocapa de células al encontrarse adheridas al agar, posteriormente este cultivo es expuesto a la muestra cuya toxicidad se busca analizar en diferentes tiempos y concentraciones del agente. Para analizar el efecto sobre las células se emplean compuestos como la calceína AM y el homodímero de etidio, los cuales permiten diferenciar mediante microscopía de fluorescencia aquellas células sanas de las que han sufrido deterioro en su estructura, este tipo de técnica se denomina como semicuantitativa debido a que el resultado obtenido se representa en un formato de área a través de la diferenciación por color de células viables [109,111].

2.7.4.1.3 Pruebas de contacto directo

Este método consiste en la incubación directa de células en un medio óptimo que contiene lo necesario para su desarrollo y también la muestra de la cual se plantea el análisis de citotoxicidad, los ensayos citotóxicos de este tipo se elaboran mediante la observación directa de cambios morfológicos en las células en conjunto con tinciones con compuestos como el azul de tripano, cuyo empleo permite analizar la permeabilidad de las membranas, adicionalmente se emplean celdas de conteo para obtener una cuantificación real del número de células viables que se encuentran en el cultivo. La principal limitante en este método es el no poder discriminar células aparentemente viables cuyo metabolismo se ha comprometido, pero no su membrana. No obstante, este tipo de cultivo es de gran utilidad en análisis de citotoxicidad en cultivos mixtos, debido a que técnicas como la producción de formazan mediante enzimas deshidrogenasas no pueden diferenciar de un organismo a otro, dando una cuantificación general [109].

2.7.4.2 Células RPMI 8226

El empleo de líneas celulares mamíferas inmortalizadas en ensayos de citotoxicidad es una práctica estandarizada alrededor del mundo, a diferencia de las células extraídas directamente de tejido, las líneas inmortalizadas poseen la capacidad de reproducirse indefinidamente, esta capacidad las vuelve un excelente modelo para ensayos de citotoxicidad donde se busca determinar el efecto de una sustancia particular en la proliferación celular evitando factores como la inviabilidad generacional que las células silvestres poseen. En particular la línea RPMI 8226 es una línea celular

de mieloma múltiple la cual se obtuvo y desarrollo a partir de la sangre periférica de un hombre de 61 años diagnosticado con mieloma múltiple [112,113] hace cinco décadas [114]. La línea RPMI se ha posicionado como una de los más importantes modelos de estudio en células mamíferas debido a la gran cantidad de información que se ha documentado sobre ella, se ha mantenido genéticamente estable desde su purificación, es una línea celular EBV-negativa lo cual elimina el problema de la interpretación de resultados debido a su función como factor mitogénico, es capaz de producir factores de crecimiento auto estimulatorios, entre otras características [114,115].

2.8 Ensayos *in ovo*

En el ámbito científico se manejan diferentes modelos de estudio, cada uno con características que le vuelven un modelo adecuado para su implementación en el laboratorio, ya sea por su tamaño, su ciclo de vida, el conocimiento que se tiene sobre este, su similitud con el ser humano o incluso la economía que implica su manejo. Dentro de los modelos *in vivo* existe una gran variedad de modelos a elegir entre los que destacan los modelos mamíferos por su similitud fisiológica con el ser humano, sin embargo, su manejo requiere de instalaciones adecuadas destinadas única y exclusivamente a este propósito. Es así, que el modelo *in ovo*, el cual consiste en el uso de embriones de *Gallus gallus domesticus* (Gallina domestica) dentro del cascarón ha cobrado importancia como medio de crecimiento o modelo del desarrollo angiogénico. El desarrollo del embrión tarda 21 días antes de la eclosión, siendo clasificadas las etapas del crecimiento a partir de las características externas de diferentes partes del embrión, el primer día de incubación es denominado como el primer día del desarrollo embrionario o EDD (Embryonic Development Day) por sus siglas en el idioma inglés, en esta etapa se comienzan a formar tres membranas extra embrionarias que protegen al embrión durante todo el proceso de desarrollo. Posteriormente, entre el 4 y 5 EDD a partir de la fusión de las capas mesodérmicas, el alantoides y el corión, se da la formación de un mesodermo altamente vascularizado compuesto por arterias y venas. Esta red capilar prolifera a una alta velocidad hasta el 11 EDD donde decrece y alcanza su velocidad mínima, siendo a partir de este momento la etapa en la cual se puede analizar el desarrollo de las membranas con respecto a alguna sustancia, a partir del 18 EDD el desarrollo se vuelve constante y se mantiene así hasta la eclosión [116].

2.8.1 La membrana corialantoidea

La membrana corialantoidea posee características como amplia visibilidad, accesibilidad y rápido desarrollo las cuales hacen de esta un modelo altamente eficiente para el análisis de funciones vasculares, inicialmente este modelo de estudio fue empleado para el ensayo de crecimiento de tumores [117] y posteriormente exportado al cultivo de virus y bacterias [117] hasta que se consolidó como un modelo para el análisis de la respuesta vascular.

La membrana corialantoidea es un tejido similar al alantoides de los mamíferos, donde también se extiende extra embríonicamente desde el tubo digestivo, con la diferencia de que en aves también se une con el corion para formar la membrana corialantoidea. Esta comienza de forma avascular, pero hacia el tercer EDD se desarrolla hasta ganar un plexo vascular que rápidamente adquiere complejidad jerárquica con la aparición de arterias y venas, encontrándose completamente formada al décimo día de la gestación.

Histológicamente, la membrana corialantoidea consiste en 2 hojas epiteliales que limitan una capa fina de estroma, el epitelio superior es de origen ectodérmico mientras que el estroma y la hoja epitelial inferior son de origen mesodérmico y endodérmico respectivamente. Debido a esto cualquier tipo de tratamiento que afecte al desarrollo vascular debe poseer la característica de lograr atravesar las capas epiteliales, siendo importante que el embrión se encuentre en condiciones de humedad adecuadas debido a que en condiciones de poca humedad es común la queratinización de la capa epitelial superior.

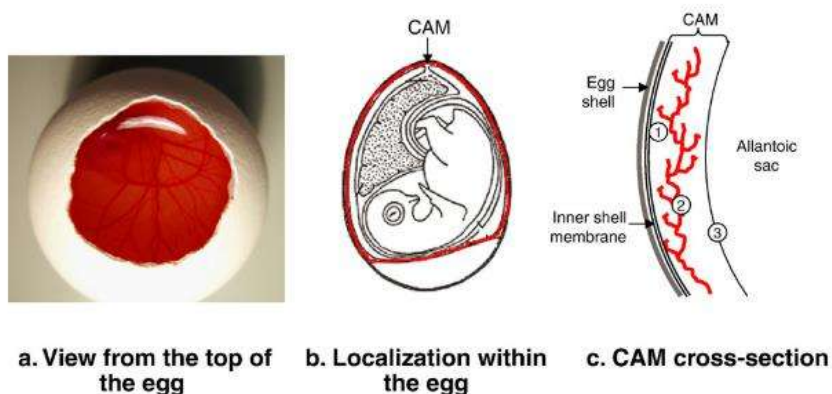


Figura 2.2 Membrana corialantoidea. a) Imagen tomada desde la parte superior de un embrión en el 10 EDD, b) localización de la membrana corialantoidea (rojo) en el 12 EDD, c) ilustración del corte transversal de la membrana corialantoidea que está en contacto con el cascarón [118].

2.8.2 Angiogénesis

La estimulación de la formación de tejido vascular es un factor de vital importancia en los biomateriales que se desarrollan actualmente, esta se vuelve necesaria debido al tráfico de nutrientes que el nuevo tejido requiere para un correcto desarrollo y para la manutención del tejido ya formado. Existen dos procesos similares que buscan cumplir esta función, la neoangiogénesis y la angiogénesis, la primera es un proceso de formación de vasos capilares completamente nuevos a diferencia de la angiogénesis en donde el proceso de formación de vasos capilares nuevos es a partir de vasos capilares preexistentes. La angiogénesis se encuentra regulada por diferentes biomoléculas como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés), proteínas de la matriz extracelular, algunos tipos de receptores de membrana y otras moléculas de señalización, sin embargo, el empleo de estos factores de forma directa en la estimulación de la formación de vasos capilares suele tener ciertas dificultades como el cálculo del tiempo de vida, la desnaturalización en los procesos de liberación controlada y la formación de construcciones vasculares sin la morfología natural [119]. Debido a estas limitantes, el uso de compuestos químicos ha cobrado importancia para promover la angiogénesis, así el biovidrio mediante la liberación de iones bioactivos como el silicio, el calcio, el fósforo y el sodio puede estimular diferentes factores que se encuentran involucrados con procesos metabólicos, sin embargo, dicha estimulación depende de la disponibilidad y de la forma en que dichos iones interactúan con el tejido vivo, encontrándose que la disponibilidad se encuentra relacionada de forma directa con la cristalinidad y la morfología del material llegando a ser nula si estos no se encuentran disponibles de forma adecuada como tiempos de liberación muy lentos o demasiado rápido al grado de ser resorbidos por otros tejidos [120]. A través de diferentes experimentos con diferentes líneas celulares como fibroblastos o células endoteliales en forma *in vitro* e *in vivo*, se ha encontrado una correlación directa entre la cantidad de biovidrio disponible en medio y la cantidad de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) o factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), dicha correlación se ha analizado mediante cuantificación directa de proteínas, cuantificación de ARN mensajero y bajo diferentes condiciones de crecimiento, ya sea de forma libre o fija sobre algún sustrato, e incluso embebida en andamios, siendo constante el incremento de los bioproductos relacionados con el desarrollo y la concentración del biomaterial [121].

En el caso particular del silicio, el cual es el principal componente del biovidrio 45s5, existen diferentes estudios que le confieren propiedades angiogénicas ya sea como un factor aislado [78]

o acompañado de otras moléculas como dimetil oxaloil glicina [122] donde se genera un tipo de sinergia en la estimulación de la formación de tejido nuevo, particularmente el silicio ha sido catalogado como un elemento bioactivo en el desarrollo angiogénico debido a que tiene un papel quimio-atrayente donde mediante un gradiente de estos iones se genera un señal de migración para células endoteliales, fomentando la formación de tejido vascular el cual mantiene la morfología natural, encontrándose la sobreexpresión de factores como los previamente mencionados (VEGF y FGF) además de una sintetasa específica del óxido nítrico. Esta estimulación ha sido propuesta mediante la simulación de hipoxia en el microentorno donde el silicio se libera, posiblemente mediante la inactivación del dominio 2 de la prolil hidroxilasa (PHD2) ya sea por la interacción directa o agotando indirectamente el ácido ascórbico (AA) (cofactor de la enzima) acelerando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales posiblemente contribuyen a la estabilización del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) el cual en conjunto con el factor inducible por hipoxia 1 beta (HIF-1 β) se dimerizan para formar el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) el cual se transloca al núcleo donde activa los elementos de respuesta a hipoxia (HREs) que regulan la producción de factores de crecimiento como VEGF el cual una vez secretado es reconocido por los receptores tirosina quinasas VEGF de las células endoteliales con lo cual se activa la cascada de señalización propia de la angiogénesis, donde otros factores como el receptor con dominio inserto/quinasa (KDR) activan la producción de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) y por lo tanto de óxido nítrico (NO), los cuales son responsables de la proliferación y migración de células endoteliales [78,123].

2.9 Biofuncionalización

Los biomateriales de tercer y cuarta generación son sistemas multifuncionales, dinámicos y con diferentes características que les hacen una plataforma adecuada para reacciones químicas y biológicas. Sin embargo, aún con toda la tecnología que existe en el diseño de estas estructuras es imposible mimetizar un entorno vivo sin el uso de biomoléculas, ante esta situación se emplean procesos de modificación en la superficie donde se adapta para favorecer el desarrollo del tejido vivo alrededor de este mediante biomoléculas como colágeno, proteínas integrinas, material genético, entre otros [124], no obstante esta funcionalización de superficies no se limita solo a dicha adaptación, también se puede emplear las superficies para el tratamiento de enfermedades mediante la liberación controlada de fármacos o de genes en el caso de las terapias génicas, cuya disposición y entrega dentro del cuerpo humano puede ser más específica al encontrarse unidas a

un material que se encuentra en la micro o nano escala siendo posible su aplicación oral o intramuscular además de ser fácilmente ubicable mediante propiedades como magnetismo [125], disminuyendo la cantidad de fármacos o biomoléculas mientras mantiene su disponibilidad y disminuye los efectos adversos que pueda tener [124].

2.9.1 Colágeno Tipo I

El colágeno es una biomolécula extremadamente versátil, ha sido empleada en la ciencia de los biomateriales en formas como andamios, esponjas, membranas, entre otras. Debido a esta versatilidad una gran cantidad de funciones se han atribuido a esta biomolécula como la fabricación de injertos para reemplazo de corneas o el tratamiento de infecciones al emplearse en conjunto con fármacos antiinflamatorios o antibacterianos. Además, el colágeno también puede ser empleado en conjunto con otras proteínas como las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), las cuales se emplean para estimular la osteoinducción y por lo tanto la osteointegración [125].

El término colágeno se emplea de forma genérica para proteínas que conforman hélices triples a partir de 3 cadenas polipeptídicas, estas a su vez se organizan en grupos basados en sus funciones y estructura supramolecular, dentro de las cuales destaca el grupo de las fibrilares por ser el más abundante en los macroorganismos, estas se han categorizado en 5 tipos diferentes (I, II, III, V y XI) dependiendo de su función inmediata. El colágeno tipo II y el colágeno tipo XI son principalmente encontrados como parte del cartílago, mientras que el colágeno tipo III se encuentra principalmente como parte estructural de órganos como el hígado, bazo y riñones, por otro lado, el colágeno tipo I y el colágeno tipo V son de gran aplicación por ser de los principales componentes del hueso al actuar como la parte orgánica y flexible de este compuesto natural, lo que les brinda una gran importancia en aplicaciones de la ingeniería de tejido óseo.

Como se ha mencionado, aún cuando las funciones son distintas, todos los diferentes tipos de colágeno tienen en común una estructura de triple hélice compuesto por tres cadenas alfa las cuales pueden ser idénticas (homotrímeros) o diferentes (heterotrímeros), la triple hélice es prioritariamente helicoidal dextrógira, como prerrequisito para el ensamblaje de la estructura helicoidal se requiere de residuos de glicina en cada tercera posición de la cadena polipeptídica lo cual resulta en una estructura de repeticiones $(\text{Gly-X-Y})_n$ la cual es definida como un dominio colagenoso o colagénico. Las cadenas alfa se posicionan alrededor del eje central de tal forma que todos los residuos de glicina se encuentran posicionados hacia el centro, mientras que el resto de

residuos en los aminoácidos se encuentran en la parte externa, permitiendo un efecto de superenrollamiento debido al pequeño tamaño de la glicina, la posición X y [125].

El colágeno tipo I se encuentra relacionado con la formación y remodelación de hueso en diferentes estratos, su función es principalmente atribuida a la adhesión de células propias de la osteogénesis, sin embargo, diferentes estudios relacionan a esta biomolécula con procesos de regulación de genes, tal es el caso de diferencias en los niveles de RNA mensajero que codifican a la hormona paratiroide y su receptor en la línea UMR 106-08 la cual posee el fenotipo de un osteoblasto maduro, también se ha encontrado relación del colágeno tipo I en la sobre expresión de RNA mensajero codificante para fosfatasa alcalina y osteopontina las cuales se encuentran relacionadas con la diferenciación de células de la medula ósea en osteoblastos lo cual sugiere una correlación directa entre esta biomolécula y los procesos de osteogénesis [126]. Por otro lado, es necesario encontrar un método adecuado para la funcionalización con colágeno, esto debido a que recubrimientos totales de la superficie requieren de procesos de entrecruzamiento químico entre ambos, con la subsecuente necesidad de químicos como el glutaraldehído que al liberarse en un medio lleno de biomoléculas puede ocasionar la desnaturalización de estas, en el otro extremo un recubrimiento total sin entrecruzamiento da lugar a un sustrato inestable en el cual las células se pueden desprender del andamio al estar unidas a un recubrimiento que en medios acuosos actúa como una fase gelatinosa [71,127].

2.9.2 Vitamina D3

La vitamina D3 también conocida como colecalciferol es una biomolécula de un grupo con la característica estructural de estar conformadas por 4 anillos (A, B, C y D), difiriendo en las sustituciones de las cadenas laterales. La conformación de estos cuatro anillos es derivada de un anillo estructural ciclopentanoperhidrofenantreno propio de los esteroides, siendo definidas las vitaminas D como seco-esteroides, debido a que estos poseen un anillo que ha sido roto, siendo el enlace 9,9 carbono-carbono del anillo B el que se encuentra roto [128].

De forma natural el colecalciferol es sintetizado en la piel mediante una vía que involucra radiación ultravioleta, lo que limita su disponibilidad a partir del tiempo de exposición a la luz, el clima, la región del planeta donde se reside además de la cantidad de pigmentos en la piel. Esta vitamina es sintetizada a partir de la irradiación del 7-dihidrocolesterol para posteriormente ser movilizada al hígado por proteínas de transporte de unión a vitaminas D, en este órgano se realiza una

hidroxilación generando una forma inactiva llamada 25-hidroxivitamina D3 o 25(OH)D3, para posteriormente ser hidroxilada en los riñones mediante una enzima 1 alfa-hidroxilasa dando lugar a la forma activa denominada 1,25-dihidroxivitamina D3 o 1,25(OH)D3. Aunque esta forma activa es principalmente generada en los riñones es posible también que ocurra en osteoclastos, colon, cerebro e incluso en macrófagos. El tiempo de vida medio de esta biomolécula es de 21 días, esta amplia estabilidad se encuentra relacionada con la forma de síntesis debido a la adaptabilidad de los humanos a lugares donde existe escases de luz solar en ciertos periodos del año [129,130].

El colecalciferol se encuentra relacionado en la formación de hueso mediante procesos de regulación de concentraciones de iones de calcio y fósforo en sangre, tomando un papel crítico en la homeostasis del hueso mediante su participación en el control del metabolismo óseo a través de la regulación de la diferenciación de osteoblastos, proliferación, apoptosis y expresión de proteínas específicas del hueso y factores de crecimiento. El papel que tiene el colecalciferol en la mineralización del hueso se debe a su factor como regulador positivo en la actividad de la fosfatasa alcalina y osteocalcina, donde se ha encontrado una correlación entre la cantidad de calcio intracelular, esta enzima y su proximidad al tejido óseo en formación, además se ha encontrado que el colecalciferol afecta a la producción de fosfatidilserina en los osteoblastos, la cual se ha demostrado que posee relación con la formación de apatita mediante su unión con calcio y fosfatos para la formación de complejos calcio-fosfatidilserina-fosfato. También se ha encontrado que esta biomolécula regula el transporte de calcio mediante la síntesis de calbindina-D9K. Por otro lado, el colecalciferol al igual que el colágeno se encuentra relacionado con la diferenciación celular a partir de células de médula ósea, aunque en una forma menos específica al dar lugar a células tanto osteogénicas como adipocíticas [131,132].

2.10 Estado del arte

Hoy en día diversos trabajos han sido publicados en el desarrollo de biomateriales, la mayoría de estos se enfocan en procesos de reconstrucción ósea, no obstante, el desarrollo de estos materiales ha alcanzado un límite en cuanto a la mejora en la capacidad bioactiva por medio de la composición química básica, debido a este límite aparente se han desarrollado estrategias alternativas como lo es la biofuncionalización, algunos de los centros de investigación más importantes han abordado este tipo de procesos mediante procesos químicos que involucran el uso de reactivos como el 3 aminopropil trietoxisilano y el glutaraldehído, en este modelo el 3 aminopropil trietoxisilano actúa

como un activador de superficie agregando grupos amino en el biomaterial para que posteriormente se forme un enlace con el grupo carboxilo de uno de los extremos del glutaraldehído y de forma simultánea se forme en el otro extremo un enlace igual pero entre el glutaraldehído y la proteína en cuestión, dicha metodología permite obtener recubrimientos de prácticamente un cien por ciento, sin embargo, involucra el uso de reactivos altamente peligrosos cuya estabilidad debe ser analizada para determinar que eventualmente no reaccione con proteínas propias del organismo, debido a esta problemática se ha buscado alternativas como el uso de soluciones amortiguadoras que permitan la adhesión a la superficie de los biomateriales sin el uso de agentes entrecruzantes, aunque se encuentre limitado el rango de recubrimiento [127]. El uso de agentes templantes en la elaboración de estructuras tridimensionales en materiales cerámicos es un área altamente desarrollada, al día de hoy existen trabajos especializados en andamios de biovidrio donde el empleo de agentes templantes de origen orgánico dan lugar a estructurar altamente ordenadas con áreas superficiales definidas, sin embargo, es necesario hacer hincapié a que dentro de la naturaleza es necesario alcanzar equilibrios, debido a que una construcción de extremadamente alta superficial no garantiza un proceso de condensación adecuado para la formación de hueso nuevo, no obstante esto da lugar al diseño de experimentos específicos para determinar tanto el diseño con el templete como la temperatura para la cristalización del andamio [120,133]. El biovidrio ha sido ampliamente estudiado en cuanto a sus propiedades en la regeneración de tejido óseo, sin embargo su aplicación puede ser enfocada también a otro tipo de bioprocesos, un ejemplo es el uso de biovidrio en base a boro, los cuales han sido ampliamente correlacionados con la reparación de úlceras crónicas en la piel que se han extendido hacia el interior del tejido vivo, así, el diseño de los procesos de síntesis desarrollados en el presente proyecto pueden ser acoplados no solo a un tipo de biomaterial con un enfoque específico, sino que este puede adquirir un enfoque transversal en el tratamiento de padecimientos que involucran a procesos como la osteogénesis y la angiogénesis como lo es la diabetes y sus efectos en el organismo [63,76].

Una vez analizados todos los antecedentes y el estado del arte, podemos determinar algunos parámetros y consideraciones para el desarrollo de una estrategia que de lugar a la obtención de un material bioactivo el cual pueda funcionar tanto como un sustituto óseo bioactivo y a su vez, bajo ciertas condiciones, también pueda propiciar la formación de tejido vascular endotelial, así, el biovidrio ofrece un modelo con amplios rangos para su adecuación, los cuales destacan desde los diferentes métodos de síntesis que pueden ser aplicables y adaptables, al mismo tiempo este

material permite la construcción de estructuras tridimensionales las cuales se pueden adecuar hasta alcanzar condiciones viables para su empleo, sin embargo, aunque existen diferentes estudios es necesario mantener puntos de control que permitan realizar ensayos comparables con otros grupos de trabajo.

CAPÍTULO 3. REACTIVOS Y METODOLOGÍAS

La síntesis del biovidrio puede ser adaptada a diferentes procesos o tratamientos, dichos procesos se estandarizaron a nivel laboratorio con la finalidad de brindar reproducibilidad a los diferentes experimentos, por lo cual se han determinado los mejores parámetros de síntesis incluyendo la estandarización de procesos de caracterización, en el presente trabajo se ha abordado un proceso de síntesis sol-gel el cual parte de precursores los cuales se hidrolizan y posteriormente se condensan, acoplado a este proceso se empleó un proceso de secado por aspersión, en ambos se analizaron las diferentes condiciones a fin de obtener los mejores procesos de síntesis, entre los que se encuentran la concentración de precursores, las temperaturas de secado, la relación entre precursores y fase acuosa, entre otros. La caracterización se llevó a cabo en diferentes equipos en los cuales se han manejado las mismas condiciones de análisis para que estos sean reproducibles y comparables. En el presente proyecto se han manejado algunas técnicas de biología como la cuantificación de viabilidad mediante la cuantificación de actividad enzimática o el conteo de unidades formadoras de colonia, los cuales se desarrollaron conforme a los desarrollado en los siguientes puntos.

3.1 Reactivos

Todos los reactivos para la síntesis de biovidrio, su funcionalización, ensayos *in vitro* y caracterización del espectro infrarrojo fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich: Tetraetil ortosilicato ($C_8H_{20}O_4Si$) 98.0% (TEOS), Trietil fosfato ($C_6H_{15}O_4P$) 98.0% (TEP), Nitrato de Sodio ($NaNO_3$) 99.0% (NaN), Nitrato tetra hidratado de Calcio ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) 98.0% (CaNT), Nitrato de Plata ($AgNO_3$) 99.0% (AgN), Nitrato de Cobre ($Cu(NO_3)_2$) 98.0% ($Cu(NO_3)_2$), Colecalciferon (Vitamina D3), Cloruro de Sodio (NaCl), Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$), Carbonato Sódico (Na_2CO_3), Cloruro de Potasio (KCl), Fosfato de Potasio Dibásico Trihidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), Cloruro de Magnesio Hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Cloruro de Calcio ($CaCl_2$), Sulfato de Sodio (Na_2SO_4), Tris(hidroximetil) aminometano ($(HOCH_2)_3CNH_2$) y Bromuro de Potasio (KBr). Solventes y fases acuosas fueron adquiridos de reactivos Meyer como la Acetona ($CH_3(CO)CH_3$), Ácido Nítrico (HNO_3), Ácido Clorhídrico (HCl), Alcohol Etilico Absoluto (C_2H_6O), Cloroformo ($CHCl_3$). Así mismo algunos compuestos fueron obtenidos mediante colaboración con otras instituciones como las Nanoesferas de poliestireno 100 y 500 μm en el IPN-ESIQIE y el Colágeno Tipo I Proveído por el IIAF. El resto de los reactivos complementarios fueron adquiridos en diferentes laboratorios como la Peptona de Caseína GE Dibico, Bacto Agar GE Díbico, Solución

Amortiguadora de Fosfatos (PBS) pH 7.0 JT Baker, Triton X-100 JT Baker, Extracto de Levadura Beckton Dickinson Bioxon y algunos consumibles como el Agua destilada y Agua desionizada fueron producidos en el propio laboratorio de Cerámicos Avanzados.

3.2 Metodologías

3.2.1 Síntesis de biovidrio por la técnica sol-gel

Las diferentes alícuotas de biovidrio se prepararon, a partir de la técnica sol-gel acoplada a una etapa de secado por pulverización. La síntesis se inició con la hidrólisis de tetraetilortosilicato mezclando en medio ácido (HNO_3 0.1 M) durante una hora para proporcionar tiempo suficiente para la hidrólisis del precursor; posteriormente se agregó el resto de los reactivos también con un tiempo de hidrólisis de una hora entre cada uno y en el siguiente orden: fosfato de trietilo, nitrato de calcio tetrahidratado, nitrato de sodio y nitrato de plata, siendo este último agregado solo en aquellas muestras donde es pertinente el uso de plata para conferir actividad biocida al biovidrio.

3.2.2 Secado por aspersión

Las soluciones preparadas se secaron en un equipo de secado por pulverización también llamado Spray Dryer marca Yamato Modelo ADL, dando como resultado microesferas aglomeradas de nanopartículas de biovidrio. La solución de alimentación se inyectó usando un sistema monofásico, a través del uso de una bomba peristáltica de flujo continuo a 2.45 ml/min, que inicia el proceso de atomización en gotas usando aire a 2 bar (2×10^5 Pa) de presión. Las gotas formadas son secadas por contacto con una corriente de aire caliente cuya temperatura se mantuvo a 180°C , los aglomerados de biovidrio se separaron de la corriente de aire caliente en un ciclón incorporado en el equipo de atomización, llevando a cabo un proceso de sedimentación. Los aglomerados obtenidos se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas en un desecador para producir un ambiente libre de humedad.

3.2.3 Tratamientos térmicos

Con la finalidad de analizar el efecto de la temperatura en la morfología y la estructura cristalina de los diferentes productos elaborados a partir del biovidrio, se diseñaron diferentes tratamientos térmicos (Figura A), previamente al tratamiento térmico las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 horas en un entorno libre de humedad. Para realizar el tratamiento térmico los diferentes productos se depositaron en contenedores de porcelana y se colocaron en una mufla

modelo F47925M de la marca Thermo Scientific. El tratamiento térmico consiste en dos etapas de calcinación, comenzando con una rampa de calentamiento con una velocidad de 3 °C por minuto, que se mantiene hasta alcanzar los 100 °C donde permanecerá constante ésta temperatura durante una hora, a continuación se establece una rampa nuevamente de 3 °C por minuto hasta alcanzar la temperatura de la segunda meseta de calentamiento, en esta etapa del tratamiento la temperatura puede ser variada entre los 600 y 1000 °C. Posteriormente se efectuó una rampa de enfriamiento, a una velocidad de aproximadamente entre 1 y 2 °C por minuto.

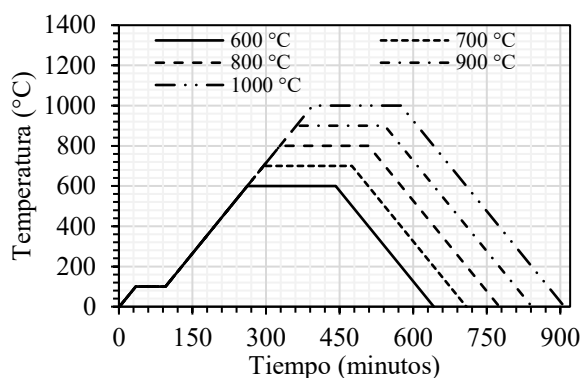


Figura 3.1 Tratamientos térmicos empleados en la fabricación de diferentes productos de biovidrio.

3.2.4 Biofuncionalización del biovidrio.

Las pruebas de adición de colecalciferol (vitamina D3) y colágeno tipo I en la superficie del biovidrio se realizaron empleando soluciones de vitamina D3 y colágeno en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con un pH de 7.0 en un rango de 0.005 a 0.03 mg/mL de Vitamina D3 y 0.3 a 3.0% (p/p) de Colágeno. Las alícuotas del bioandamio se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm con una temperatura controlada de 25 °C en tubos protegidos de la luz durante 25 minutos en el caso de la vitamina D3 y 15 minutos para el colágeno, posteriormente se lavaron con agua destilada para eliminar el excedente de biomoléculas agregadas o aquellas que no se adhirieron adecuadamente a la superficie, consecutivamente se secaron las alícuotas a 4 °C en ausencia de luz durante 15 días.

3.2.5 Caracterización cristalográfica por difracción de rayos X.

Se empleó un equipo D8 ADVANCE Bruker $\text{CuK}\alpha$, donde se analizó la interacción entre la estructura cristalina desarrollada en el biovidrio y una fuente de Rayos X, donde los planos

atómicos en ordenamiento cristalino difractan los rayos X permitiendo obtener reflexiones características de acuerdo con la ley Bragg, de las fases cristalinas presentes. Las diferentes fases presentes en el biovidrio se determinaron en un rango de 15° a 75° . Con un tamaño de paso de 0.3 mediante la técnica de caracterización de polvos.

3.2.6 Caracterización de grupos funcionales por espectroscopía de infrarrojo.

Para la identificación de grupos funcionales correspondientes al biovidrio, hidroxiapatita condensada y las diferentes biomoléculas empleadas en la biofuncionalización, se empleó un equipo de análisis IR TENSOR 27 BRUKER para realizar un análisis espectroscópico de infrarrojo, donde un haz de luz que se encuentra en el rango medio del espectro infrarrojo genera un barrido que abarca de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con un tamaño de paso de 0.1 cm^{-1} , el cual es dirigido a una muestra suspendida en bromuro de potasio en forma de tableta, siendo determinada la cantidad de radiación que es absorbida y transmitida debido a la interacción de esta vibración con los enlaces moleculares de la muestra, el espectro obtenido en modo de transmitancia atenuada fue analizado con el software específico del equipo a partir del cual se generó el correspondiente espectro de absorbancia para su consecuente análisis.

3.2.7 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido.

La caracterización estructural se realizó utilizando un microscopio de electrónico de barrido de emisión de campo JEOL JSM-7600F en condiciones de alto vacío, en determinados casos, para analizar la microestructura y morfología con mayor calidad de imagen, las muestras fueron metalizadas mediante bombardeo de átomos de cobre durante 5 minutos para mejorar la conductividad del material y evitar la carga de la muestra. Todas las muestras fueron colocadas en un soporte de cobre en conjunto con pintura de carbono para su fijación. Las condiciones de análisis se estandarizaron en 2000 y 20000 aumentos con la finalidad de brindar una mejor representatividad y comparabilidad entre las diferentes muestras analizadas generadas a partir de los diferentes tratamientos y procesos de síntesis.

3.2.8 Caracterización semicuantitativa por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X

Se realizaron análisis de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS) con una microsonda marca Bruker XFlash 6T, cuyo fundamento se basa en la exposición de la muestra a un haz de electrones que interaccionan con las capas electrónicas de valencia de los átomos de la muestra excitándolos para producir por fluorescencia rayos X característicos para cada uno de los

elementos que conformar la muestra. Ya que esta técnica es paralela al análisis de microscopía electrónica de barrido, no se requiere de un procesamiento especial de la muestra, este análisis se realizó en un rango de 0 a 15 keV, siendo solo reportado el rango de 0 a 5 keV, debido a que en el excedente del espectro no se obtuvieron señales a mayores energías, permitiendo una mejor interpretación y representación de los resultados.

3.2.9 Ensayos de bioactividad *in vitro*.

Las pruebas de bioactividad *in vitro* para la formación de hidroxiapatita en el bioandamio se elaboraron empleando tres soluciones de tratamiento: fluido corporal simulado y plasma de sangre de conejo parcialmente desproteinizado. El tamaño de las muestras del bioandamio se estandarizó en 5 x 5 mm y se cargó en recipientes de plástico previamente lavados con agua destilada para posteriormente ser secados a temperatura ambiente, se añadió 1 ml de solución de tratamiento y se mezclaron suavemente para eliminar las gotas de aire en el andamio, a 37 °C, en posición estática y en ausencia de luz. La solución se cambió cada 48 horas durante el período de inmersión y se recogieron alícuotas después de dos, cuatro, seis y ocho días. Las muestras obtenidas se lavaron cinco veces en agua desionizada para eliminar la solución de tratamiento, y luego se secaron a 37°C durante dos días y se almacenaron en un desecador hasta su análisis.

3.2.10 Preparación del fluido corporal simulado.

El fluido corporal simulado se preparó de acuerdo con el procedimiento de Kokubo [95,134], empleando agua destilada a 36.5 ± 1.5 °C bajo agitación en un recipiente de plástico de 1000 ml, empezando con sólo 700 ml de agua y disolviendo totalmente los reactivos uno a uno en el orden siguiente: cloruro de sodio (0.035 g), carbonato de sodio (0.355 g), cloruro de potasio (0.225 g), fosfato de hidrógeno fosfato di-potásico (0,231 g), hexahidrato de cloruro de magnesio (0.311 g) ácido clorhídrico 1 M (39 ml), cloruro de calcio (0.292 g), sulfato de sodio (0.072 g), Tris-hidroximetilaminometano (6.18 g) y ácido clorhídrico 1 M (desconocido); los reactivos higroscópicos fueron medidos inmediatamente antes de la adición. Posteriormente a la adición de sulfato sódico se ajustó el volumen a 900 ml y luego se agregó el tris(hidroximetil)aminometano (Tris) lentamente para evitar la precipitación controlando que el pH no aumente más de 7.45, adicionando HCl 1M para mantener el nivel en 7.42 ± 0.01 , el pH finalmente se ajustó a 7.4 con la temperatura aún en 36.5 °C y se colocó en un matraz aforado de 1000 ml, se enfrió a 20 °C en agua y finalmente se ajustó con el volumen con agua destilada. Las concentraciones de iones inorgánicos

de SBF fueron 142 mM de Na^+ , 5 mM de K^+ , 1 mM de Mg_2^+ , 1.3 mM de Ca_2^+ , 103 mM de Cl^- , 27 mM de HCO_3^- , 1 mM de HPO_4^{2-} y 0.5 mM de SO_4^{2-} , diferenciando únicamente las concentraciones de Cl^- y de HCO_3^- a las del plasma sanguíneo humano.

3.2.11 Obtención de plasma sanguíneo de conejo

Se obtuvo la sangre a partir del sangrado de conejos conforme a las normas oficiales mexicanas (NOM-033-ZOO-1995). Donde se indica realizar la insensibilización a partir del desnucamiento para separar el cráneo de la columna vertebral, posteriormente se realizó un corte en la vena yugular dentro de los 30 segundos posteriores a la insensibilización. La sangre obtenida fue almacenada durante una hora a cuatro grados centígrados para favorecer que los factores hemostáticos sean separados, posteriormente el coágulo fue dividido en viales para ser separado en fases en una centrífuga a 3000 revoluciones por minuto, se recuperó la fracción líquida y se colocó en viales nuevamente para ser centrifugados bajo los mismos parámetros y eliminar el resto del coágulo, obteniéndose así el suero sanguíneo.

3.2.12 Cuantificación de contenido de proteína por el método de Bradford

La fracción de proteína en el plasma de sangre de conejo se determinó para asegurar la reproducibilidad de los experimentos, el proceso de cuantificación se realizó empleando albúmina de suero bovino como estándar, el reactivo de Bradford como indicador y solución amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.0. Se elaboraron diferentes alícuotas a partir del estándar ajustándose la concentración en 25, 50, 74, 100 y 120 mM/mL, mientras la solución problema (plasma de sangre de conejo) se diluyó a 1:2, 1:5 y 1:10 para encontrarse dentro del rango lineal del análisis. De acuerdo al procedimiento se tomaron 80 mL de los estándares y muestras problemas y se colocaron en una placa de 96 pocillos donde se adicionaron 20 mL de reactivo de Bradford a estos, se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de todas las muestras a 595 nm con un analizador de placas iMark Microplate Absorbance Reader de la marca Bio Rad, a partir de los datos obtenidos se elaboró la ecuación característica mediante regresión lineal y se realizó el cálculo para las muestras problema [135].

3.2.13 Ensayos de bioactividad in ovo.

Se incubaron huevos de pollo criollo fertilizados con un periodo máximo de incubación de 15 días a 35 °C y 65% de humedad relativa. Se elaboró una perforación de 3 mm en el lado superior del huevo al día 4 de fertilización usando un taladro con una fresa de acero inoxidable de alta velocidad

desinfectada a 1000 rpm y se selló con una película elástica de parafina. A los ocho días de fertilización empleando una lámpara, los huevos inviables fueron retirados del grupo segregándose por la exposición de la vasculatura de la membrana corialantoidea, donde la presencia de la vasculatura indica huevos viables, en esta etapa también se marcaron los extremos del saco de aire. Las muestras del bioandamio se colocaron en la membrana corialantoidea a los 10 días de fertilización usando la marca anterior, elaborando un hueco de 2 cm empleando un disco de corte de alta velocidad de 15/16X1/64 pulgadas, de forma transversal a la cáscara del huevo para exponer la membrana corialantoidea y con el uso de pinzas para eliminar los fragmentos restantes del cascarón alrededor del hueco. Posteriormente se elaboró una incisión de 5 mm de largo con un bisturí estéril para poder insertar el bioandamio en la membrana, finalmente el óvulo se selló con una película elástica de parafina y las alícuotas del bioandamio se recuperaron después de 2, 3, 4 y 5 días después de la implantación y los embriones se mataron por decapitación.

3.2.14 Ensayos de citotoxicidad con células RPMI 8226

Se emplearon células RPMI 8226, caracterizadas por ser linfocitos B aislados por primera vez en 1968, en un paciente con mieloma múltiple, otorgando modificaciones que permiten su proliferación sin las limitaciones que las células normales tienen. Se empleó medio RPMI adicionado con 10% de suero fetal de ternera adicionado con antibióticos para la adaptación de las células, incubándose a 37 °C en condiciones atmosféricas de 5% de CO₂, se realizaron varias etapas de lavado de las células para eliminar la contaminación generada durante su almacenamiento en criogenia, consistentes en la remoción del medio de crecimiento empleando una centrífuga para separar las células, la remoción del medio con vacío y la adición nuevamente de medio de crecimiento con antibiótico.

La citotoxicidad fue medida a partir de la viabilidad celular empleando la tinción por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio), cuyo fundamento se basa en la reducción de este compuesto por enzimas deshidrogenasas presentes en células viables (principalmente en las mitocondrias) haciendo uso del NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido Fosfato Reducido) como donador de protones, produciendo el (4,5-Dimetiltiazol-2-il)1,3-difenilformazan) también llamado formazan (Figura 2), cuyo color característico es el púrpura. El ensayo consistió en el uso de una placa de 96 pocillos, donde se colocaron 10000 células RPMI 8226 por pozo dispersas en medio de cultivo RPMI 1640, posteriormente se colocaron los diferentes tratamientos en cada

pocillo ajustando el volumen a 200 microlitros con medio de cultivo, estos se incubaron durante 24 y 48 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, a 5 diferentes concentraciones: 1, 2, 4, 8, 16 y 32 miligramos de los diferentes tipos de biovidrio por mililitro de cultivo. Para calcular el índice de muerte celular se adicionaron 10 microlitros de reactivo MTT en cada pocillo, este fue incubado durante 4 horas para posteriormente ser centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos retirando el sobrenadante, se adicionaron 100 microlitros de DMSO 99.9% para suspender los cristales de formazan y lisar las membranas de las células en el ensayo, el precipitado púrpura fue incubado en ausencia de luz a 27 °C durante 10 minutos para completar la solubilización. Una vez listas las placas, se centrifugo a 2500 rpm durante 5 minutos nuevamente y se recuperaron 100 microlitros de la suspensión en placas de 96 pocillos y los cuales se midieron en un espectrómetro UV/Vis donde se determinó la banda correspondiente a absorbancia en una longitud de onda de 595 nanómetros, calculándose el porcentaje de células viables a partir de la ecuación:

$$\%Supervivencia = \frac{Muestra_{abs} - Blanco_{abs}}{Control_{abs} - Blanco_{abs}} \cdot 100$$

ec. 1

Donde la absorbancia del blanco (*Blanco_{abs}*) es el medio solamente y la absorbancia del control (*Control_{abs}*) corresponde al medio con células. Además, este control sin la adición de ningún tratamiento brinda una referencia para determinar un cien por ciento de supervivencia celular, mientras que la absorbancia de la muestra (*Muestra_{abs}*) se refiere a las muestras problema cuyo efecto citotóxico buscamos cuantificar.

3.2.15 Conteo celular y viabilidad de células linfocíticas.

El medio de cultivo con las células de la caja de Petri o los posos, son colocados en un viales de fondo cónico, para recuperar la mayor cantidad de células es necesario realizar un lavado enzimático empleando una solución de tripsina 0.25% con EDTA 0.53 mM para estabilizar los aminoácidos de carga positiva como la lisina que ocasionan una adhesión de las células RPMI 8226 a las paredes de la caja de Petri debido a su recubrimiento con poli-L-lisina, que permite la formación de enlaces de tipo iónico con otros aminoácidos que se encuentran en la matriz extracelular como el ácido aspártico o glutámico. En seguida se realiza una etapa de centrifugación a 2000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, se elimina el medio de cultivo empleando una línea de vacío dejando solamente el precipitado del fondo del tubo. Una vez realizada esta

separación se estandariza el volumen del cultivo a 5 mililitros adicionando medio RPMI-1640 y suspendiendo las células empleando un agitador de tipo vórtex. Cuando existe un número muy alto de células y el conteo no puede ser realizado de forma directa, se puede proceder a elaborar tres diluciones empleando una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH fisiológico, agregando 100 microlitros del medio con células y 200 microlitros de la solución amortiguadora, este se agita y homogeniza nuevamente y se procede a la etapa de tinción.

Consecutivamente se realiza el cálculo del factor de dilución el cual se obtiene a partir de la siguiente ecuación:

$$F = \frac{Vol_{PBS}}{Vol_{medio}} + 1$$

ec. 2

Donde el volumen de PBS (Vol_{PBS}) se refiere a la cantidad de solución amortiguadora que se adiciona para elaborar la dilución y el volumen de medio que contiene las células (Vol_{medio}) es la cantidad de la suspensión de células que se adicionó.

Durante la etapa de tinción se toman 90 microlitros de esta suspensión de células y se adicionan 10 microlitros del reactivo azul de tripano al 0.4% (esta etapa es opcional cuando se ha obtenido la capacidad para diferenciar células sanas y viables a partir de la morfología de las membranas). El colorante azul de tripano es un reactivo cuyas propiedades electroquímicas evitan que este se penetre la membrana celular, siendo así un ensayo de viabilidad indirecto, indicando la viabilidad a partir de la tinción del citoplasma en las células debido a la pérdida de la integridad de la membrana (Figura 3).

El conteo se realiza empleando una cámara de Neubauer, donde se colocan 10 microlitros de la suspensión de células tratadas con el azul de tripano, colocándolos de forma rápida para evitar cualquier tipo de gradiente que pueda suceder dentro de la cámara. En seguida se realiza el conteo de las células en cinco cuadrantes diferentes para en seguida realizar los cálculos pertinentes aplicando la siguiente fórmula.

$$Concentración \frac{cel}{mL} = \frac{\#células \cdot F}{\#cuadrantes} \cdot 10000$$

ec. 3

Donde el número de cuadrantes (#cuadrantes) es el número total de cuadrantes analizados siendo cinco en este experimento, mientras que el número de células (#células) es el número total de células en los cuadrantes cuantificados y el factor de dilución (F) se refiere al ajuste necesario para correlacionar la medición con el número de células por mililitro real siendo calculado a partir de la fórmula anterior.

3.2.16 Ensayos de actividad antimicrobiana.

Se tomó una alícuota de una línea de *Escherichia coli* resistente a antibióticos la cual fue cultivada en 100 mL de medio LB líquido (10 g de peptona de caseína, 10 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura, Agua Desionizada cbp_{1000mL}), se incubó durante 24 horas en agitación a 37 °C. Posteriormente se pesaron diferentes alícuotas del biovidrio dopado con diferentes porcentajes de plata en su estructura, además de los controles correspondientes. Fueron vaciados 5 mL de medio LB líquido en tubos de cultivo y se agregaron las diferentes cantidades de biovidrio. Se inocularon 200 µL del cultivo de *E. coli* por cada 5 mL de medio y se incubó a 37 °C, durante 24 horas en agitación. Posteriormente se elaboraron una serie de cultivos en medio LB sólido (10 g de peptona de caseína, 10 g de cloruro de sodio, 5 g de extracto de levadura, 7.5 g de bactoagar, Agua Desionizada cbp_{1000mL}) a partir de cada alícuota fueron sembrados 50 microlitros los cuales se diluyeron en 4.9 mL del medio, se mezclaron y se incubaron durante 48 horas a 37 grados centígrados. Posteriormente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonia por centímetro cuadrado y se elaboró una curva de correlación.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las metodologías previamente descritas se ha diseñado una serie de experimentos que permite la toma de decisiones dependiendo de los resultados obtenidos, estos se encuentran estructurados en diferentes puntos, partiendo de la síntesis de la materia prima que son los aglomerados esféricos de biovidrio, posterior a esto se han establecido diferentes condiciones para la obtención de andamios biomiméticos de biovidrio. Una vez determinados los parámetros más eficientes para la elaboración de estos andamios se ha procedido a estudiar los diferentes medios para la determinación de bioactividad, analizando las ventajas y desventajas de cada uno, en seguida se han hecho las pruebas pertinentes de citotoxicidad y actividad angiogénica de forma *in vitro* e *in ovo*, para determinar si el material obtenido hasta ahora es realmente adecuado para su uso como implante en un organismo vivo. Posteriormente se ha realizado la biofuncionalización del andamio con diferentes biomoléculas, determinando también las mejores condiciones para obtener un recubrimiento mayor, analizando el efecto que esta tiene sobre la bioactividad.

4.1 Síntesis de aglomerados esféricos de biovidrio por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión.

A partir de las metodologías descritas se prepararon 5 lotes diferentes de biovidrio con la composición característica del biovidrio 45s5, mediante la técnica sol-gel acoplada a secado por aspersión, estos 5 lotes difieren en la relación entre la fase acuosa y los precursores (Tabla 4.1), estos se pulverizaron y secaron a las mismas condiciones para ser posteriormente tratados a 3 diferentes temperaturas (500, 600 y 700 °C), con la finalidad de observar la morfología obtenida en los productos de dichas síntesis. En la tabla 4.1 se describe la nomenclatura y composición de las muestras obtenidas.

Tabla 4.1 Composición nominal de soluciones de alimentación

Sistema de alimentación	Relación nominal	Biovidrio (g)	H ₂ O (g)
BGs1:1	1/1	49.72	49.72
BGs1:3	1/3	49.72	99.44
BGs1:6	1/6	49.72	248.6
BGs1:9	1/9	49.72	397.76
BGs1:12	1/12	49.72	546.92

La Figura 4.1 se muestran las diferentes distribuciones de diámetro de agregado obtenidos del secado por aspersión y tratados térmicamente, se puede observar la forma en la cual se puede controlar este diámetro en base a la concentración, donde se obtienen mayores diámetros en aquellos sistemas cuya concentración de sales fue mayor y viceversa. El diámetro de estos agregados fue determinado a partir de un equipo de dispersión dinámica de la luz (90-PLUS/Bi-MAS).

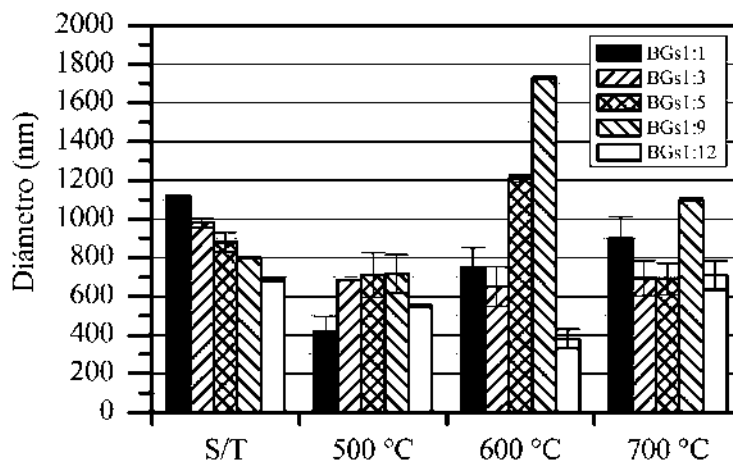


Figura 4.1 Distribución de diámetro de aglomerados de partículas en 5 lotes de biovidrio 45s5 con tratamiento térmico y sin tratamiento térmico.

Es posible observar como en aquellas muestras donde no se realizó un tratamiento térmico (Figura 4.1, grupo S/T), el diámetro de los agregados disminuye desde 1106.1 hasta los 702.1 nm, con una correspondencia prácticamente lineal, no obstante, esta relación se pierde una vez que se efectúan los tratamientos térmicos, dentro de los cuales destaca el sistema BGs1:9 por una gran variabilidad, mientras que el sistema BGs1:3 se mantiene más estable, con una disminución en el diámetro de agregado conforme la temperatura máxima del tratamiento va aumentando. Un sistema de muestras también interesante es el BGs1:12, donde se puede observar una disminución en el diámetro de los agregados al ser sometidos a tratamiento térmico, hasta que se alcanza el tratamiento de 700 °C donde el diámetro comienza a incrementarse, posiblemente debido a procesos de crecimiento de grano dentro de los aglomerados, lo que da lugar a la formación de construcciones de mayor tamaño.

4.1.1 Caracterización morfológica de las microesferas de biovidrio.

En la figura 4.2 se pueden observar las micrografías electrónicas de barrido de las microesferas producidas por secado por aspersión correspondientes al sistema BGs1:3 previo al tratamiento térmico, se puede observar la correcta formación de esferas, con una morfología homogénea aunque con diferentes diámetros, a diferencia de trabajos anteriores donde se obtienen agregados con formas oblicuas irregulares aun tratándose de una técnica de atomización similar [136], por otro lado, en trabajos donde se ha manejado la misma técnica pero con diferentes materiales, la formación de cuerpos esféricos se ha logrado solamente cuando se emplean tratamientos de sinterización, donde la compactación de la estructura acarrea esta morfología como consecuencia [137].

Posteriormente a los tratamientos térmicos se puede determinar una evolución en la superficie y morfología de las muestras de biovidrio sintetizadas, particularmente en la Figura 4.2 panel D se puede apreciar la formación de uniones entre las esferas tras el sinterizado, además de algunas esferas huecas, los cuales colapsaron tras el tratamiento. Similarmente, las muestras BGs1:3 de la Figura 4.2 (B), mostraron uniones entre ellas, aunque de un modo más robusto, generando una estructura muy similar a la denominada como coral con un cierto nivel de rugosidad en la superficie. Por otro lado, la muestra BGs1:3 cuyo tratamiento térmico se realizó hasta llegar a los 700 °C exhibió superficies lisas y un alto grado de dispersión de tamaños entre las esferas, a diferencia de las muestras anteriores. Esta serie de resultados corresponde con trabajos anteriores donde se analizó el comportamiento del biovidrio a través del sinterizado, donde se determinó que la fusión de partículas es algo común, además de la pérdida de rugosidad en la superficie, al menos por debajo de los 800 °C, ya que una vez que se supera esta temperatura comienza un proceso de craterización superficial, devolviendo la rugosidad a la muestra e incluso incrementándola [138,139].

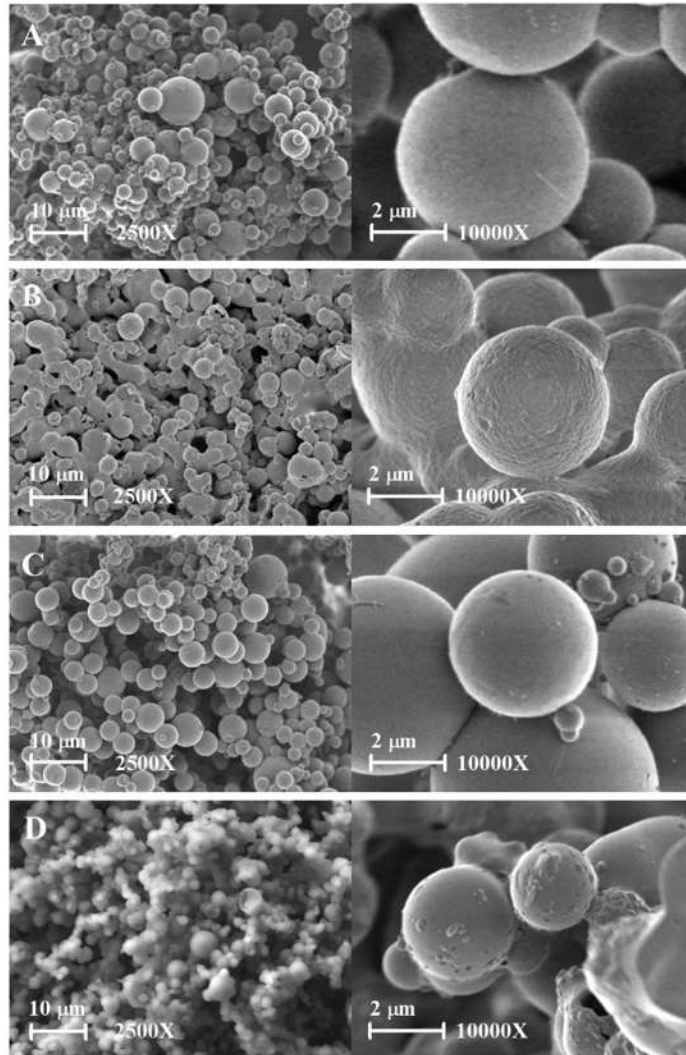
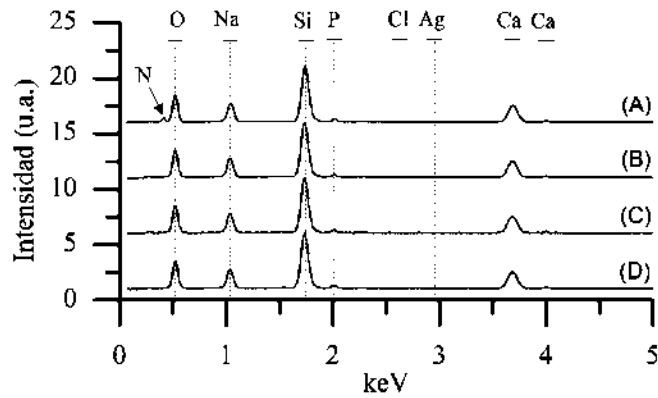


Figura 4.2 Micrografías (MEB) de diferentes muestras de biovidrio obtenidas por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión del lote BGs1:3 previo al tratamiento térmico (A), el lote BGs1:3 tratado a 500 °C (B), el lote BGs1:3 tratado a 700°C (C) y el lote BGs1:12 tratada a 700 °C (D).

Columna izquierda aumento de 2500X y columna derecha aumento de 10000X.

4.1.2 Caracterización semicuantitativa de las microesferas de biovidrio.

Durante las pruebas de microscopía electrónica de barrido se realizaron una serie de ensayos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (Figura 4.3), mediante los cuales se determinó la composición de la muestra analizada además de que permite un ensayo no solo cualitativo sino semicuantitativo.



Elemento	Muestra			
	BGs1:3	BGs1:3 500 °C	BGs1:3 700 °C	BGs1:12 700 °C
Si (%)	47.86	46.76	46.6	44.72
Na (%)	24.03	23.95	23.87	25.27
Ca (%)	20.64	24.73	24.49	24.57
P (%)	4.52	4.56	5.04	5.44
N (%)	2.94	0	0	0

Figura 4.3 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra BGs1:3 previa al tratamiento térmico (A), muestra BGs1:3 tratada a 500 °C (B), muestra BGs1:3 tratada a 700°C (C), muestra BGs1:12 tratada a 700 °C (D).

Los análisis EDS determinaron un espectro característico del biovidrio 45s5 [138], además de la presencia de un cierto grado de contaminación en el biovidrio por parte de los precursores, generando una señal de electrones con una energía de enlace de 0.392 keV característica de los átomos de nitrógeno, esta señal es encontrada en la muestra BGs1:3, por lo que se puede deducir que esta contaminación es eliminada o disminuida por el tratamiento térmico, como se puede observar en el resto de los análisis EDS donde la intensidad del pico nula o bastante baja. Esta contaminación se debe a la eliminación incompleta del ión nitrato de las sales precursoras que se encuentra presente en los sistemas de reacción sol-gel durante el proceso de gelificación; a través del análisis de difracción de rayos X (Figura 4.4) se determinó que esta contaminación es Nitratina (NaNO_3), cuya temperatura de descomposición es de 570 °C, siendo esta temperatura menor a la empleada durante el sinterizado es normal que su fracción en el biovidrio disminuya [140]. Por otro lado, todas las muestras han mostrado los picos correspondientes para el silicio, el calcio, el fósforo, el sodio y el oxígeno, como se ha mostrado en otros procesos de síntesis donde los picos

son correspondientes aún con la adición de agentes dopantes y tras procesos de incubación en medios orgánicos e inorgánicos [45,141].

4.1.3 Caracterización cristalográfica de las microesferas de biovidrio.

La caracterización estructural mediante difracción de rayos X muestra los patrones de difracción obtenidos de las nanoesferas de biovidrio de las muestras: BGs1:3 sin un tratamiento térmico (Figura 7A), y de las muestras BGs1:3 (Figura 7B) y Biovidrio 45s5 dopado con 3% de plata (Figura 7C) después del proceso de sinterizado a 700 °C. El espectro del biovidrio BGs1:3 sin tratamiento térmico muestra los picos característicos de la fase cristalina nitrata (NaNO₃) (COD 9009659), correspondiente a la contaminación que se genera a partir de los nitratos de las sales precursoras del sistema sol-gel, que se ve disminuida en el resto de las muestras por el tratamiento de sinterizado; además, el espectro permite determinar un grado de cristalinidad menor en aquellas especies que contienen sodio, calcio, potasio, silicio y oxígeno, en base a la intensidad de la señal de las crestas correspondientes a las fases cristalinas que en la Figura 7A son prácticamente irreconocibles, contrario a las Figura 7B y 7C.

En contraste, los espectros de las muestras BGs1:3 y del Biovidrio 45s5 dopado con 3% de plata muestran el patrón correspondiente al biovidrio 45s5 y un grado de cristalización adecuado con respecto a otros trabajos, mostrando las crestas características de la fase cristalina Na₆Ca₃Si₆O₁₈ (JCPS #77-2189), cuya presencia ha sido reportada por diferentes autores tras el análisis de diferentes probetas pero siempre manejando la composición propia del biovidrio 45s5 [142,143], siendo esta cristalización benéfica para la bioactividad del biovidrio al fomentar la formación de apatita, según reportes previos donde se compara la estructura amorfa del biovidrio y su contraparte cristalizada [142].

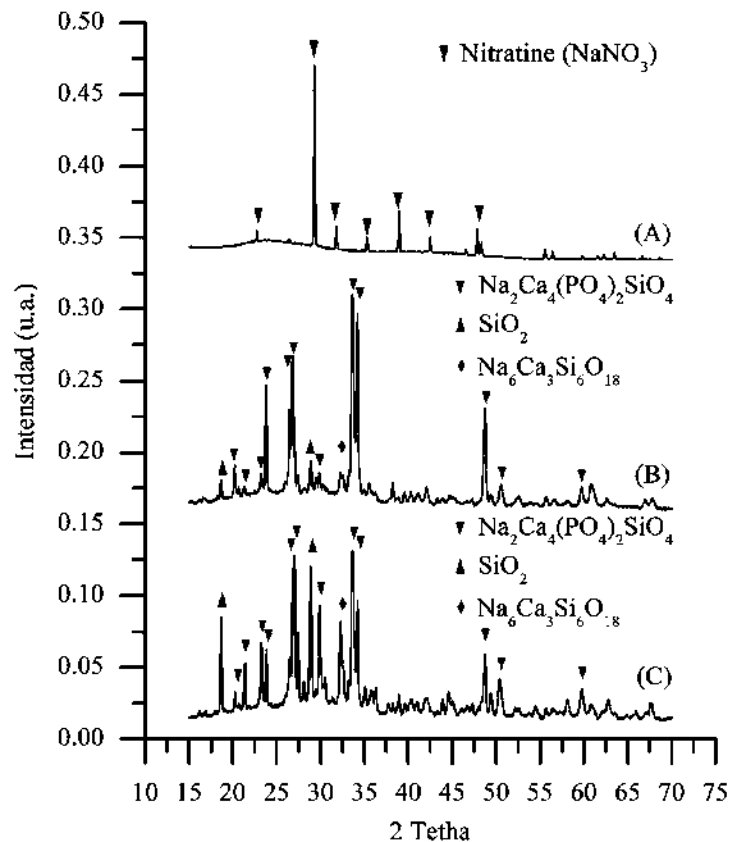


Figura 4.4 Patrón de difracción de rayos X: (A) de la muestra BGs1:3 previa al tratamiento térmico, (B) muestra BGs1:3 tratada a 700 °C, (C) muestra BGsP3 tratada a 700 °C.

4.2 Síntesis de biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre

Aplicando los resultados generados a partir de la síntesis de biovidrio, incluyendo la primera aproximación a la adición de plata en la estructura, se obtuvieron diferentes lotes de este material dopado con dos elementos diferentes, la plata y el cobre. Se analizó la distribución del tamaño de agregado que se obtuvo para ambos grupos de muestras y se encontró que el dopaje con cobre ocasiona un mayor tamaño de agregado y una mayor variabilidad en este (Tabla 4.2), alcanzando tamaños de agregado desde 10000 hasta 50000 nanómetros, según se incrementa la cantidad de cobre en el sistema de síntesis, el dopaje puede ser confirmado a partir de los ensayos de EDS, difracción de rayos X e incluso por el color azul que este ocasiona en el materia al tratarse de un óxido cúprico.

Tabla 4.2 Distribución de diámetro nominal de partícula en los microagregados de biovidrio dopado con plata y cobre.

Código de la muestra	Composición Nominal (mol. %)	Diámetro (μm)	Desviación Estándar
BGs	SiO ₂ (45%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%)	55.3	9.2
BGsAg1	SiO ₂ (44.5%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - AgO ₂ (0.5%)	63.5	8.5
BGsAg2	SiO ₂ (43.25%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - AgO ₂ (1.75%)	57.5	11
BGsAg3	SiO ₂ (42%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - AgO ₂ (3%)	60.9	8.3
BGsCu1	SiO ₂ (44.5%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - CuO (0.5%)	1026.2	134.5
BGsCu2	SiO ₂ (43.25%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - CuO (1.75%)	2456.6	189.3
BGsCu3	SiO ₂ (42%) - P ₂ O ₅ (6%) - Na ₂ O (24.5%) – CaO (24.5%) - CuO (3%)	5102.3	430.3

4.2.1 Caracterización morfológica de biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre

La morfología del biovidrio sintetizado puede verse en la Figura 4.5 obtenida mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, donde se observa la conservación parcial de la forma esférica en los lotes adicionados con plata (BGsAg1, BGsAg2 y BGsAg3) mientras que se puede observar una considerable aglomeración que se debe a la forma en que el cobre se comporta como agente dopante (BGsCu1, BGsCu2 y BGsCu3), al cambiar la carga en la superficie y favoreciendo la unión de las nanoesferas individuales que durante el proceso de gelificación lleva a la generación de un gran número de cuellos entre sí, este efecto ha sido reportado previamente en diferentes materiales incluyendo composites de biovidrio, donde se ha encontrado que el cobre favorece la formación de aglomerados de nanopartículas [144] y en otros materiales como nanopartículas de óxido de zinc donde se puede apreciar el mismo efecto aglomerante [145]. Este efecto se debe a que el cobre posee la capacidad acomplejante que favorece

la aglomeración cuando se encuentra en condiciones ácidas, siendo esta característica explotada para procesos de extracción y producción de sulfato de cobre, debido a esto se ha recomendado el uso de otro tipo de medios como el hipofosfito de sodio que, aunque incrementan considerablemente el costo de producción, también permiten obtener nanoestructuras más definidas aunque con un grado de aglomeración visible [144].

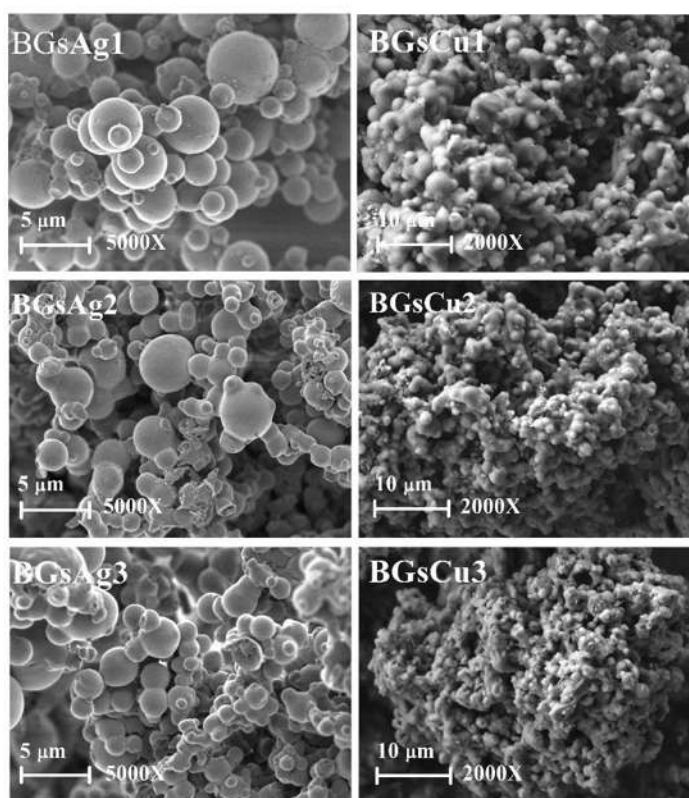


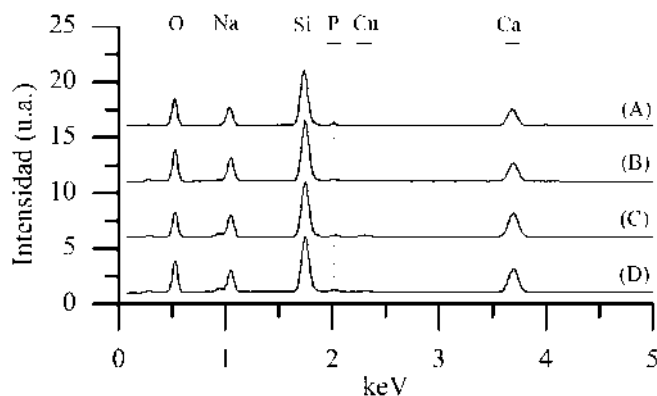
Figura 4.5 Micrografías (MEB) de muestras de biovidrio obtenidas por la vía sol-gel acoplada a secado por aspersión de los lotes BGsAg1, BGsAg2, BGsAg3, BGsCu1, BGsCu2 y BGsCu3.

4.2.2 Caracterización semicuantitativa del biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre

Mediante la observación microestructural por microscopía electrónica de barrido se realizaron una serie de ensayos de espectroscopía de energía dispersiva o EDS (Figura 4.6), con los cuales se determinó la composición de las muestras analizadas, además de que permite un ensayo no solo cualitativo sino semicuantitativo.

Los análisis EDS determinaron un espectro característico del biovidrio 45S5[138], además de la presencia de los agentes dopantes en el biovidrio, generando una señal de electrones con una

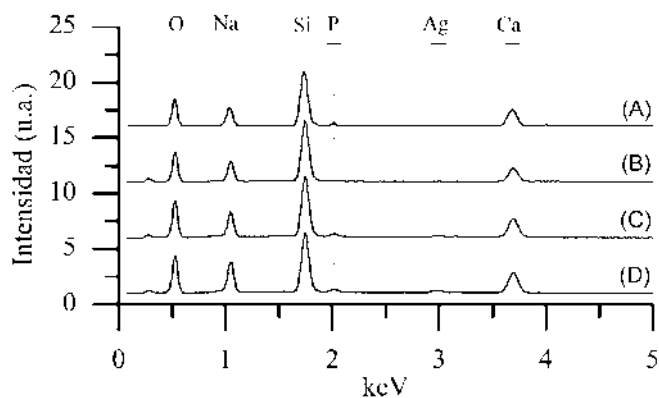
energía de enlace de 2.984 keV y 0.927 keV para la plata (Figura 4.6) y el cobre (Figura 4.7) respectivamente, descartándose un pequeño pico adicional en 8.04 que identifica también al cobre pero cuya intensidad es baja en comparación con el determinado a 0.927 keV. De forma similar a resultados previos, tras el tratamiento térmico desaparece la señal de electrones correspondiente al nitrógeno correspondiente a 0.392 keV, que se encuentra en el material debido a la eliminación incompleta del nitrato de las sales precursoras durante el proceso de gelificación.



Elemento	Muestra			
	Control	BGsCu1	BGsCu2	BGsCu3
Si (%)	47.35	45.54	43.83	43.3
Na (%)	23.91	26.4	25.16	23.38
Ca (%)	22.52	21.95	23.32	23.98
P (%)	6.22	5.48	5.8	6.58
N (%)	0	0.63	1.89	2.76

Figura 4.6 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra Control (A), BGsCu1 (B), BGsCu2 (C) y BGsCu3 (D) posteriores al tratamiento térmico.

Por otro lado, todas las muestras han mostrado los picos correspondientes para el silicio, el calcio, el fósforo, el sodio y el oxígeno, como se ha mostrado en otros procesos de síntesis donde los picos son correspondientes aún con la adición de agentes dopantes y tras procesos de incubación en medios orgánicos e inorgánicos [45,141].



Óxido	Muestra			
	Control	BGsAg1	BGsAg2	BGsAg3
Si (%)	46.55	45.19	44.19	42.67
Na (%)	24.54	25.78	24.25	24.23
Ca (%)	23.15	22.62	23.65	24.32
P (%)	5.76	5.88	6.12	5.91
Ag (%)	0	0.53	1.79	2.87

Figura 4.7 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de la muestra Control (A), BGsAg1 (B), BGsAg2 (C) y BGsAg3 (D) posteriores al tratamiento térmico.

4.2.3 Caracterización cristalográfica del biovidrio nanoestructurado dopado con plata y dopado con cobre

La caracterización estructural mediante difracción de rayos X muestra los patrones de difracción obtenidos de los microaglomerados de biovidrio de las muestras dopadas con plata y dopadas con cobre sin un tratamiento térmico (Figura 4.8 B y D respectivamente), y de las mismas muestras posterior al tratamiento térmico realizado a 700 °C (Figura 4.8 C y E), además de una muestra de biovidrio control que muestra las fases características del biovidrio 45s5 posteriores a un tratamiento térmico también a 700 °C. El espectro de los biovidrios sin tratamiento térmico muestran los picos característicos de la fase cristalina NaNO_3 , correspondiente a la contaminación que se genera a partir de los nitratos de las sales precursoras del sistema sol-gel, siendo este un efecto conservado del proceso de síntesis sol-gel independiente de si existe o no un elemento adicional para dopaje (Figura 4.4), dichas fases producidas a partir de los productos secundarios de los precursores es desplazada del resto de las muestras por el tratamiento a 700 °C (debido a que este compuesto solo es estable hasta aproximadamente 530 °C); además, el espectro permite

determinar un grado de cristalinidad adecuado en base a la intensidad de la señal de los picos correspondientes a las fases cristalinas y la deformación de la línea base del mismo espectro. Tanto en la muestra de biovidrio control como en las muestras BGsAg3 y BGsCu3 se muestra el patrón correspondiente al biovidrio 45s5, indicando a partir del biovidrio control que las condiciones de síntesis y de análisis son las adecuadas para su caracterización, además de demostrar un grado de cristalización adecuado con respecto a otros trabajos, mostrando las crestas características de la fase cristalina $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$, cuya presencia ha sido reportada por diferentes autores tras el análisis de diferentes probetas pero siempre manejando la composición propia del biovidrio 45s5 [142,143], siendo esta cristalización benéfica para la bioactividad del biovidrio al fomentar la formación de apatita, según reportes previos donde se compara la estructura amorfa del biovidrio y su contraparte cristalizada, encontrándose que al poseer el biovidrio una estructura amorfa, el material es hidrolizado a una velocidad mayor a la de bioasimilación, perdiéndose este material antes de la correcta formación de hidroxiapatita [142].

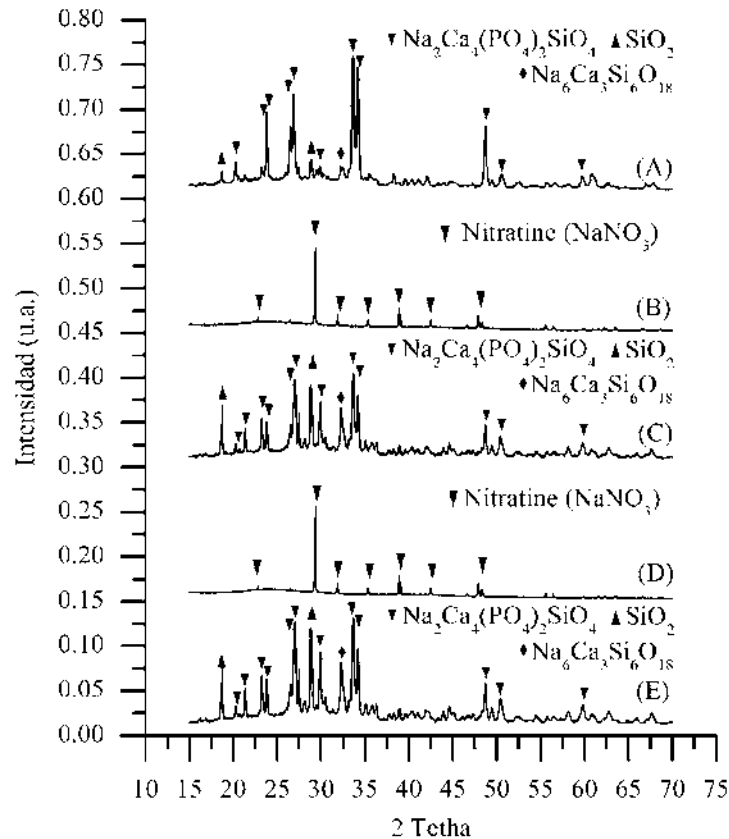


Figura 4.8 Patrón de difracción de rayos X de biovidrio 45s5 (A), biovidrio 45s5 dopado con plata (BGsAg3) antes (B) y después (C) del tratamiento térmico, biovidrio 45s5 dopado con cobre (BGsCu3) antes (D) y después (E) del tratamiento térmico.

4.3 Actividad antimicrobiana

Se investigaron los efectos bactericidas de las nanopartículas de biovidrio dopadas con plata y de las dopadas con cobre correspondientes a los sistemas enunciados en la Tabla 4.2. Para ello se realizó un análisis de actividad bactericida en líquido, donde se agregó una alícuota de medio conteniendo un número homogéneo de bacterias de *Escherichia coli* a diferentes probetas de medio conteniendo diferentes concentraciones de biovidrio dopado. Para poder realizar la medición de la actividad antimicrobiana se realizó un cultivo de placa, debido a que las nanopartículas de biovidrio interfieren con la densidad óptica del medio de cultivo y por lo tanto con el conteo en líquido del número de bacterias. Debido a esta situación se elaboró una curva de correlación entre el número de células en el medio y el número de Unidades Formadoras de Colonia por cada 50 μL que se pueden contabilizar a través de un sistema de sembrado por vertido en placa (Figura 4.9).

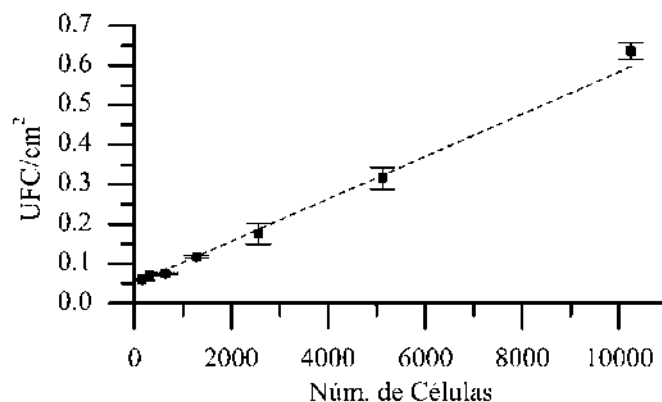


Figura 4.9 Curva de calibración entre unidades formadoras de colonia y número de células en suspensión de cultivo.

Para la elaboración de la gráfica, se utilizó el control positivo, correspondiente al medio líquido sin biovidrio dando lugar al que sería el número máximo de células que se podría obtener, este se diluyó y fue sembrado por vertido en placa para obtener el número de UFC/50 μ L para cada caso, de manera similar se planteó realizar también una serie de diluciones a las muestras que sí contenían biovidrio, aunque una vez que se realizó la práctica se pudo observar la falta de crecimiento de las bacterias evidenciando que no era necesario realizar las diluciones. En la Tabla 4.4 se aprecian las cuantificaciones del número de bacterias que se encontraron en cada alícuota de medio con y sin biovidrio dopado, tras su inoculación con 50 mL del medio líquido incubado con *E. coli*. Es fácilmente deducible que los lotes de biovidrio dopado con plata mostraron una alta actividad antimicrobiana, mientras que los lotes de biovidrio dopados con cobre desarrollaron una pobre actividad antimicrobiana al verse completamente turbios los tubos que se sembraron, e incluso el proceso de contabilización en las cajas se vio imposibilitado debido al gran número de unidades formadoras de colonias.

En investigaciones similares se elaboró y analizó la actividad antimicrobiana del biovidrio dopado con plata, sin embargo el porcentaje molar de plata mínimo que tuvo que ser adicionado es del 3%, debido sobre todo a la geometría irregular del material [146,147], no obstante aunque en el presente estudio se ha analizado un material de composición idéntica a dicho análisis, es su carácter nanoestructurado el cual incrementa sustancialmente el área superficial de contacto con respecto a cualquier otra configuración no porosa, resultando en un menor límite inferior respecto al porcentaje de adición de plata que se requiere, encontrándose en el 0.5% cuando este se encuentra

en una proporción de 15 mg/mL de biovidrio en el medio. Este efecto es debido a que la actividad que la plata presenta se debe en principio a la liberación de iones de este elemento, lo cual se ve potencializado cuando la superficie de contacto con el medio se incrementa. Respecto al biovidrio cuyo dopaje se realizó con cobre, se determinó que la concentración que se empleó no fue suficiente para conferir una actividad antimicrobiana representativa, en trabajos con una temática similar se desarrollaron nanopartículas con un contenido suficiente de cobre para inhibir la proliferación microbiana, manejándose porcentajes nominales de hasta 53% de cobre con respecto al resto de los componentes, lo cual para un bioandamio de la naturaleza del biovidrio es inviable, por otro lado, trabajos previos con biovidrio [148] donde se realiza la sustitución de una fracción de silicio permitiendo un dopaje de hasta 15% con cobre, han mostrado actividad antimicrobiana similar a la de la plata, sin embargo este gran porcentaje de cobre modifica negativamente la velocidad en la formación de hidroxiapatita encontrándose que solamente en concentraciones alrededor de 2.5% el dopaje con cobre no afecta la bioasimilación del biovidrio [149].

Tabla 4.3 Cuantificación de unidades formadoras de colonia de *Escherichia coli* en presencia de diferentes concentraciones de biovidrio dopado con plata (BGsP1, BGsP2 y BGsP3) y dopado con cobre (BGsC1, BGsC2 y BGsC3).

Muestra	mg/mL	UFC/cm ²	Bacterias/mL	Muestra	mg/mL	UFC/cm ²	Bacterias/mL
BGsP1	5	5	733.8	BGsC1	5	ND	ND
	10	3	299.02		10	ND	ND
	15	0	0		15	ND	ND
	20	0	0		20	ND	ND
	30	0	0		30	ND	ND
BGsP2	5	0	0	BGsC2	5	ND	ND
	10	0	0		10	ND	ND
	15	0	0		15	ND	ND
	20	0	0		20	ND	ND
	30	0	0		30	ND	ND
BGsP3	5	0	0	BGsC3	5	ND	ND
	10	0	0		10	36	5287
	15	0	0		15	26	3186
	20	0	0		20	47	6898
	30	0	0		30	45	6604
Control Positivo	N/A	48	10250				

Control	N/A	0	0
Negativo			

4.4 Síntesis de andamios miméticos de biovidrio nanoestructurado empleando microesferas de poliestireno como agente templante.

Para lograr el andamiaje de células como los osteocitos cuyo diámetro es de entre 7 y 20 micrómetros, se requiere de la síntesis de andamios de biovidrio capaces de contener diámetros de poro superiores a 100 micrómetros y al mismo tiempo lograr la formación de poros de menor diámetro que interconecten la estructura completa [150].

Dentro del proceso de síntesis por secado por aspersión se requiere analizar las condiciones en las cuales la adición de microesferas de poliestireno es más estable y además genera una mejor morfología, esto puede ser analizado desde el punto de vista de la estructura tridimensional final. Así, se sintetizaron 5 diferentes sistemas sol-gel dopados con plata (1.75%) y adicionados con microesferas de poliestireno para la producción de bioandamios con actividad antimicrobiana (Figura 4.10), manejando la composición de agua y sistema sol-gel, correspondiente al sistema BG1:3 estandarizado en resultados previos.

La Figura 4.10 muestra las micrografías MEB de bioandamios obtenidos mediante síntesis sol-gel del Biovidrio y alimentando al secador por aspersión junto con el agente poroso de esferas de poliestireno en forma concurrente, formación de los bioandamios por prensado y tratamiento térmico para eliminar el poliestireno dejando como resultado la estructura porosa hierárquica típica diseñada de acuerdo a los requerimientos de la aplicación, definiéndose en modelos dependientes de la fracción de agente: BGsHw1 (3.322 gramos de porógeno por cada 49.59 gramos de precursores), BGsHw2 (6.644 gramos de porógeno por cada 49.59 gramos de precursores), BGsHw3 (9.966 gramos de porógeno por cada 49.59 gramos de precursores), BGsHw4 (13.288 gramos de porógeno por cada 49.59 gramos de precursores) y BGsHw5 (16.61 gramos de porógeno por cada 49.59 gramos de precursores).

El primer resultado visible fue el límite de adición de agente porógeno, aunque estructuralmente se puede ver a las muestras BGsHw5 (Figura 4.10 Panel E) como un andamio altamente poroso, el equipo de secado se ve limitado en cuanto a la capacidad de inyectarlo en forma de gotas, la cantidad de microesferas de poliestireno es tan alta que se agregan en la boquilla de la columna de inyección e incluso variando el diámetro de la boquilla por uno mayor, el equipo no es capaz de

inyectar la corriente de alimentación por más de 5 minutos, mermando la cantidad de material que se puede obtener en cada corrida de secado.

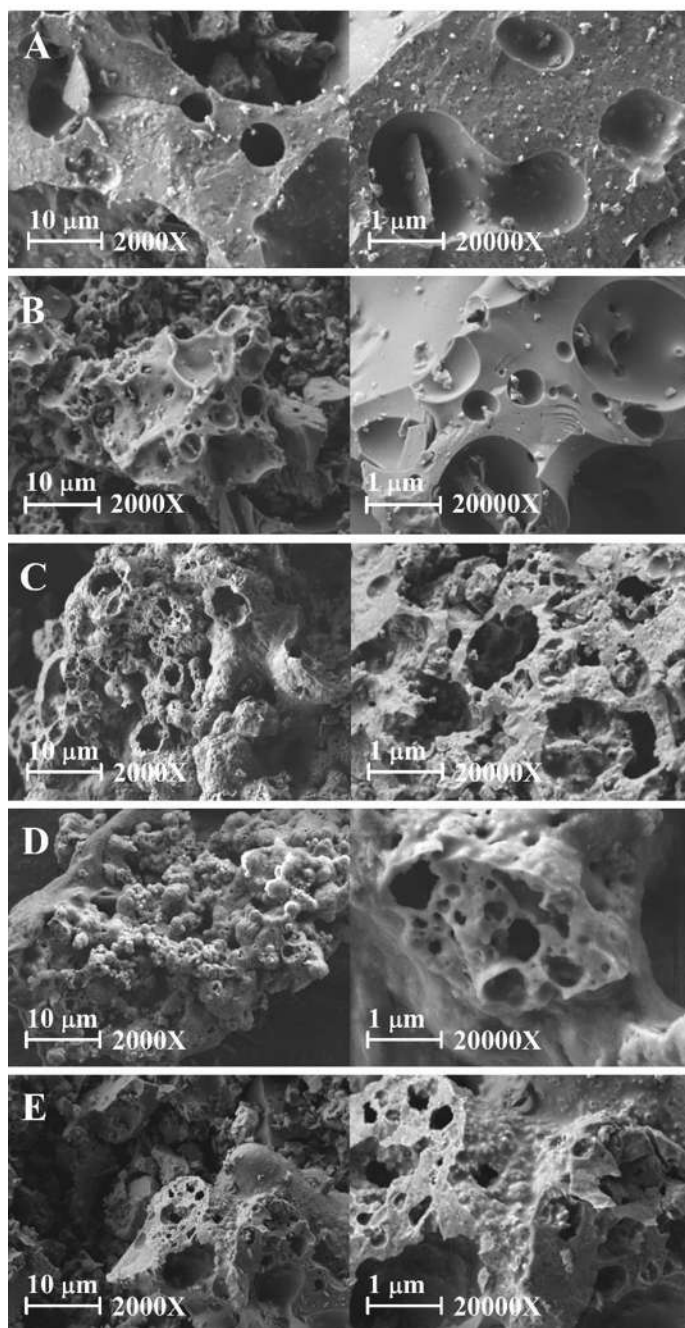


Figura 4.10 Micrografías (MEB) de los andamios de biovidrio: BGsHw1(A), BGsHw2(B), BGsHw3(C), BGsHw4 (D) y BGsHw5 (E) adicionados con microesferas de poliestireno en la solución precursora, secadas por aspersión, formados por prensado y tratados a 700 °C.

Las muestras de biovidrio analizadas muestran que la interconectividad efectivamente va vinculada a la cantidad de nanoesferas de poliestireno que han sido adicionadas durante el proceso de síntesis. Es así que las muestras con un contenido menor de este agente porógeno han mostrado una pobre interconectividad, tal es el caso de la muestra BGsHw1 donde se pueden visualizar cuellos con grosores que varían desde 1 hasta 7 micrómetros, mientras que en la muestra BGsHw2 (Figura 4.10 Panel B) se ve una disminución en el grosor de los cuellos determinándose desde los 200 nanómetros hasta 5 micrómetros, en las muestras BGsHw3 (Figura 4.10 Panel C) y BGsHw4 (Figura 4.10 Panel D) se puede encontrar que estos cuellos han disminuido su grosor alrededor de un micrómetro o menos, además de mostrar una gran interconectividad entre los macro y los mesoporos formados, lo cual favorece a la vascularización del nuevo tejido óseo que se busca generar. Estudios previos de otros autores refieren esta porosidad como un objetivo durante la síntesis de cualquier tipo de andamio, ya que no solamente se requiere el tráfico de células sino de iones, proteínas y otras biomoléculas para un correcto desarrollo de tejido nuevo [151–153].

Respecto a la microestructura se analizaron diferentes muestras de los lotes preparados con la adición de agentes porógenos, descartando al lote BGsHw5 debido a que su composición no es viable para la producción empleando un equipo de secado como lo es el SprayDryer. Haciendo uso de un equipo de corte se realizaron diferentes incisiones en el material para observar la porosidad sin problemas de iluminación. Así se elaboraron las estadísticas de la distribución de tamaño de microporo en los bioandamios sintetizados, los resultados se muestran en la Figura 4.11 donde se puede ver que existe una correspondencia prácticamente lineal entre el contenido de agente porógeno y los diámetros de poro promedio obtenidos (Figura 4.11).

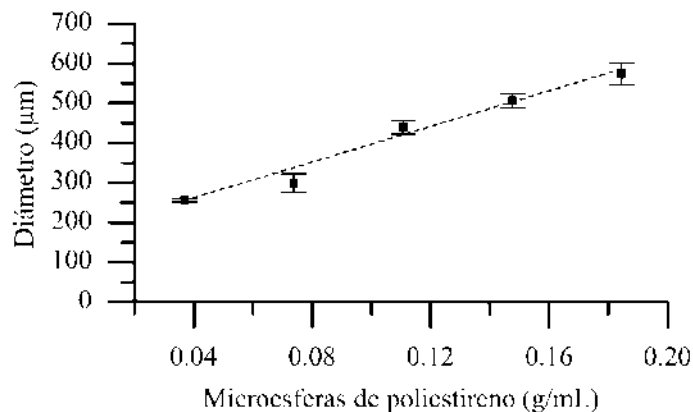


Figura 4.11 Curva de distribución de diámetro de poros en andamios biomiméticos de biovidrio 45s5.

Se puede observar como la porosidad de los bioandamios nuevamente está completamente relacionada con la adición de las nanoesferas de poliestireno, encontrándose una relación prácticamente lineal entre el tamaño final del poro y la concentración de agente porógeno, aunque se observó que también se aumentaba la variabilidad en el tamaño de poro con el incremento del agente porógeno. Estimándose que la muestra BGsHw3 la más adecuada para la preparación de estos bioandamios, al lograr una porosidad suficiente para la vascularización del tejido, la migración de biomoléculas y requiriendo de una cantidad de agente porógeno lo suficientemente baja para no complicar el proceso de secado.

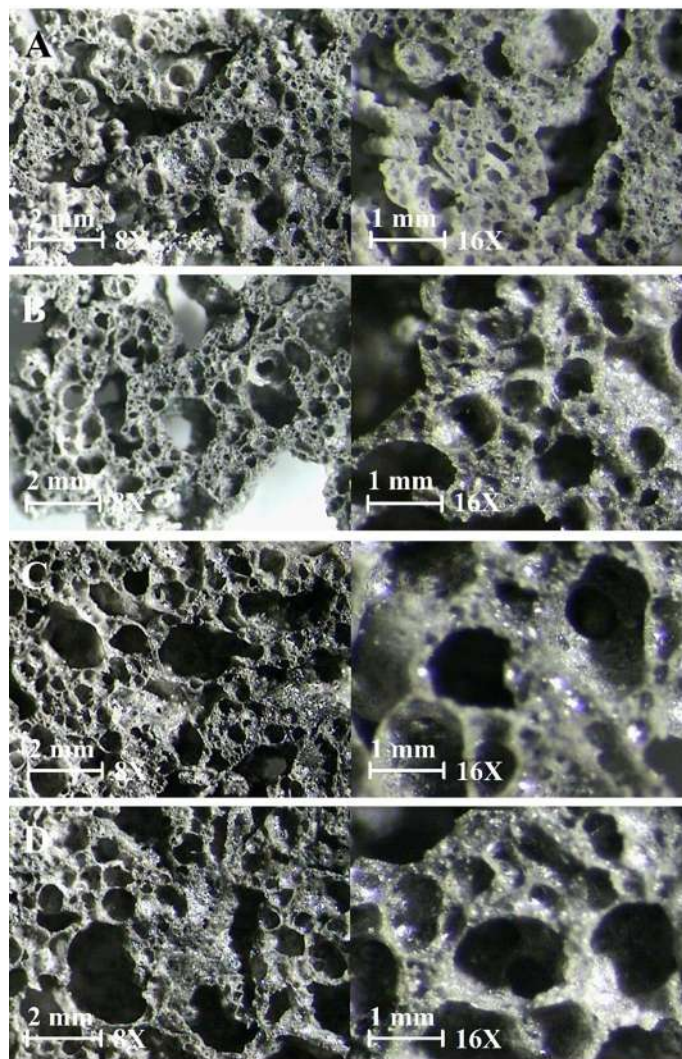


Figura 4.12 Fotografías de microscopio óptico de los bioandamios de biovidrio porosos: BGsHw1(A), BGsHw2(B), BGsHw3(C), y BGsHw4 (D) adicionados con microesferas de poliestireno en la solución precursora.

Además, de acuerdo con investigaciones previas, se deben elaborar bioandamios con la mayor cantidad de área específica debido a la gran cantidad de mesoporos que se requieren para optimizar la asimilación del biovidrio, resultando en un biomaterial con características lo suficientemente adecuadas para la implantación. Sin embargo, aunque algunos autores refieren a un material de esta naturaleza como extremadamente poroso, que puede ser asimilado de manera descontrolada mediante hidrólisis, ocasionando cambios significativos en el microambiente como la modificación del pH fisiológico, que es tan necesario para la correcta asimilación del biovidrio por parte del

organismo, esto puede ser equilibrado con un grado suficiente de cristalización del material [146,154].

4.5 Efecto de la temperatura en la síntesis de andamios miméticos de biovidrio nanoestructurado empleando microesferas de poliestireno como agente templante

A partir de los resultados de morfología previos se determinaron las proporciones adecuadas de agente porógeno para la formación de poros interconectados, dicha información se empleó para la elaboración de andamios y el análisis del efecto del tratamiento térmico sobre este y la bioactividad que se genera. En las muestras obtenidas de los diferentes tratamientos térmicos se evaluaron una serie de parámetros entre los que se encuentra la estructura, la composición, pero fundamentalmente la bioactividad. Para ello, se emplearon diferentes técnicas, siendo la microscopía electrónica de barrido la mejor para determinar la morfología y su evolución con respecto a los diferentes tratamientos, los ensayos de difracción de rayos X brindan la identidad de las fases que se encuentran en las muestras obtenidas y los ensayos de composición semicuantitativa por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X nos brindan un panorama general sobre la composición de cada una de las alícuotas.

4.5.1 Caracterización morfológica de los bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.

A partir de los ensayos previos donde se estandarizó la cantidad de agente templante, se elaboraron diferentes bioandamios que, aunque contenían la misma cantidad de microesferas de poliestireno ($0.66\text{mg}_{\text{microesferas}}/\text{mL}$), llegaron a mostrar diferencias estructurales con respecto a la temperatura a que fueron tratadas. Las muestras de los bioandamios analizados muestran que la interconectividad efectivamente se encuentra vinculada tanto a la temperatura (Figura 4.13) como a la cantidad de esferas de poliestireno que han sido adicionadas durante el proceso de síntesis (Figura 4.12). Sin embargo, a diferencia del efecto de la adición de las microesferas, el efecto de la temperatura se ve reflejado en una porosidad que va evolucionando, siendo el tratamiento a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ el que no mostró la generación de una porosidad definida (Figura 12A), mientras que a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ se mantiene una porosidad que en reportes previos se había descrito y comprobado como interconectada (Figura 4.13 Panel B), sin embargo, en las temperaturas más altas es posible ver un efecto negativo en la porosidad de la estructura siendo disminuida en aquellas muestras tratadas a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 4.13 C), formando un material con poros del orden de los 10 micrómetros, cuya interconectividad es

difícilmente apreciable, además, en los tratamientos que se realizaron a 900 y 1000 grados centígrados se puede definir la formación de poros de diámetros que varían entre los 20 y 100 micrómetros, que aunque en diámetro son similares a las muestras tratadas a 700 grados centígrados, estos se encuentran aislados unos de otros, generándose también un material compacto en el que la microporosidad de las paredes ha colapsado y es esta la porosidad que permite el flujo de biomoléculas de un extremo del bioandamio a otro (Figura 4.13 Panel D y E), particularmente en el desarrollo de bioandamios este efecto en la arquitectura del material es limitante, ya que, aunque el tráfico de células hacia el material requiere de poros en una escala mucho mayor también es necesaria la interconectividad para facilitar la dispersión de iones, proteínas y otras biomoléculas (hormonas, oxígeno, etcétera) a través del bioandamio.

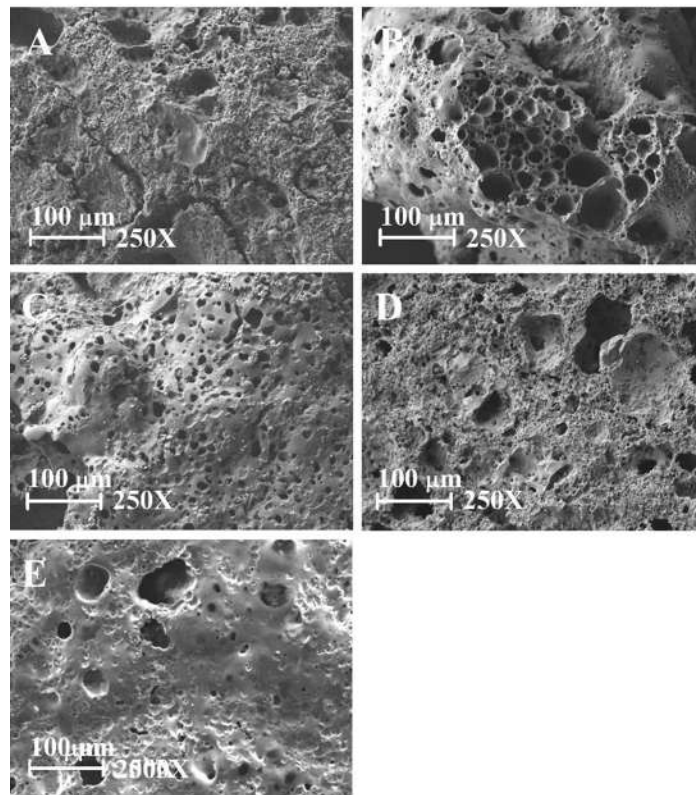
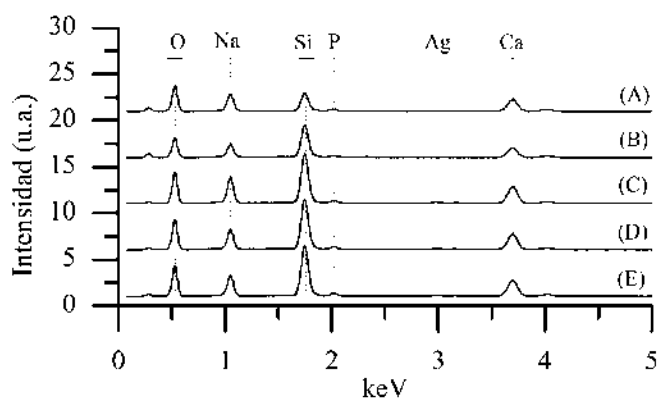


Figura 4.13 Micrografías (MEB) de los bioandamios obtenidos a partir de los diferentes tratamientos térmicos (A) 600, (B) 700, (C) 800, (D) 900 y (E) 1000 °C. Imágenes tomadas a 250X aumentos.

4.5.2 Caracterización semicuantitativa de bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.

Los ensayos de caracterización semicuantitativa elemental mediante EDS (Figura 13) muestran las diferencias composicionales en los bioandamios obtenidos a partir de los cinco tratamientos térmicos propuestos (Figura 1), ante esto es posible ver que no existe una diferencia significativa en la composición de las muestras cuyos tratamientos térmicos no superan los 800 °C (Figura 4.13 panel A, B y C); sin embargo, de forma similar a otros trabajos, a 1000 °C es posible observar modificaciones en la composición final, siendo los elementos más afectados el silicio y el sodio (Figura 13D y 13E), ya que la proporción de estos se ve disminuida por la difusión de estos dos elementos que suele suceder a temperaturas superiores a los 900 °C [155].



Óxido	Muestra				
	600 °C	700 °C	800 °C	900 °C	1000 °C
Si (%)	43.97	42.82	44.39	47.08	31.12
Na (%)	20.28	25.85	22.76	20.74	27.55
Ca (%)	15.7	25.09	21.12	15.002	19.4
P (%)	15.58	4.52	11.16	15.32	20.63
Ag (%)	1.45	1.72	1.56	1.61	1.27

Figura 4.14 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X de diferentes bioandamios tratados a (a) 600, (b) 700, (c) 800, (d) 900 y (e) 1000 grados centígrados.

4.5.3 Caracterización cristalográfica de bioandamios obtenidos a diferentes tratamientos térmicos.

La caracterización de las fases mediante difracción de rayos X mostró los patrones de difracción obtenidos de los diferentes bioandamios elaborados con los cinco diferentes tratamientos térmicos (Figura 4.15), así como en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido, en los

resultados obtenidos por difracción de rayos X también se muestran variaciones con respecto a las temperaturas empleadas, es posible encontrar diferentes fases en cada uno de los tratamientos las cuales corresponden con trabajos previos, donde se establece la formación de fases ricas a partir de tratamientos con 580 °C, apareciendo la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (PDF 00-023-0671) a partir de los 610 °C y la aparición de la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ (JCPDS #32-1053) a partir de los 700 °C en contraste con otros trabajos donde esta fase se presenta hasta temperaturas de 800 °C [138,143]. Así mismo, es posible determinar la formación de una gran cantidad de silicato de calcio en forma de $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ (CaSiO_3) (PDF 00-034-0558) a partir del tratamiento térmico que se realizó a 600 grados centígrados (Figura 4.15 Panel E), mientras que en el caso de las muestras tratadas a 700 grados centígrados (Figura 4.15 Panel D) esta fase no es tan representativa y aparece la fase $\text{Na}_6\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ además de una fracción de óxido de silicio que en otros trabajos ha demostrado afectar directamente la bioactividad del material acelerando la formación de hidroxiapatita en la superficie [1,156], además, se puede identificar parcialmente la fase NaAg_3O_2 (PDF 04-015-4528) indicando la presencia de plata en el material, sin embargo, no se puede concluir del todo ya que sólo un pico se encuentra de forma independiente (55.88°) y el resto se encuentran solapados con otros, desapareciendo en las muestras sometidas a tratamientos con temperaturas mayores, adicionalmente a esto, a partir de 800 °C no se aprecia una gran variación en su estructura, salvo por la aparición de más picos característicos de la fase $\text{Na}_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_2\text{SiO}_4$ el cual normalmente solo logra ser cristalizado a partir de este rango de temperaturas [138,143,157].

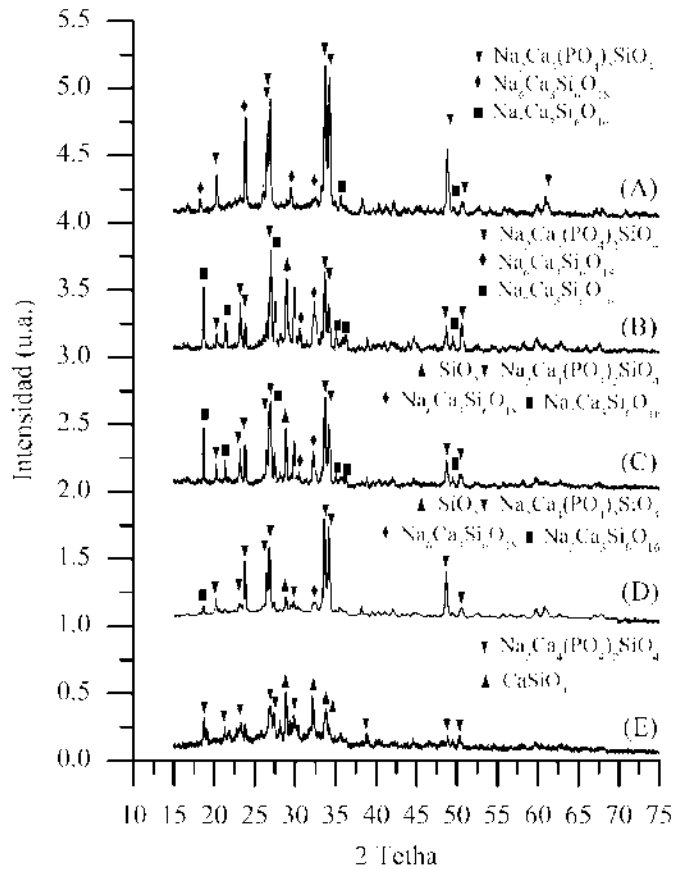


Figura 4.15. Difractogramas de rayos X de los diferentes bioandamios tratados a 600 °C(A), 700 °C (B), 800 °C (C), 900 °C (D) y 1000 °C (E).

En la Figura 4.16, se grafica el comportamiento de la relación de fracciones de la masa amorfa y la masa cristalizada, denominado como: índice de cristalización, con respecto a la temperatura de los tratamientos, se puede determinar un comportamiento parcialmente lineal, aunque es claro que el índice se incrementa conforme se incrementa la temperatura, mostrando un comportamiento similar al obtenido por otros autores donde se encuentra esta relación en muestras obtenidas de forma sintética con índices de carácter similar [158,159].

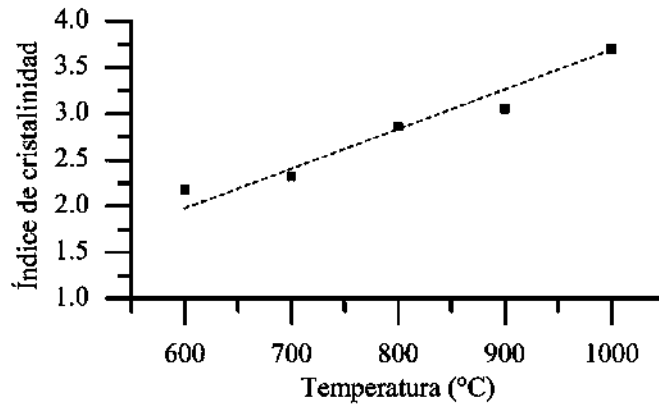


Figura 4.16 Índice de cristalinidad de los diferentes bioandamios tratados a (a) 600, (b) 700, (c) 800, (d) 900 y (e) 1000 grados centígrados.

4.6 Ensayos de bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.

La bioactividad es influenciada directamente por la disponibilidad de iones en la cercanía de los biomateriales, aunque algunos de estos son tomados del medio una gran parte se debe generar del material debido a lo cual la cristalinidad y la morfología juegan un papel crucial en esta característica. Este efecto en la bioactividad fue analizado en un medio sintético llamado fluido corporal simulado (SBF) el cual fue removido cada 24 horas durante 2, 4, 6 y 8 días, donde una vez cumplidos los lapsos de incubación de cada alícuota se realizaron una serie de tres lavados con agua desionizada para ser secados a temperatura ambiente y, posteriormente, ser sometidos por las diferentes técnicas de caracterización.

4.6.1 Caracterización morfológica de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.

A partir de las muestras previamente generadas por los diferentes tratamientos térmicos se elaboraron una serie de alícuotas que fueron incubadas en fluido corporal simulado para evaluar su capacidad en la formación de hidroxiapatita en su superficie. Así, en las muestras elaboradas a 600 °C (Figura 4.17) se encontró que efectivamente existía la depositación de hidroxiapatita, sin embargo, esta es muy escasa debido posiblemente a la inestabilidad de la superficie ya que una tercera parte es correspondiente a fase amorfa, la cual, aunque es más fácil de solubilizar también

ocasiona una deposición muy inestable de la hidroxiapatita en la superficie (Figura 4.17 Panel C) que se ve reflejada en aglomerados pequeños y discontinuos.

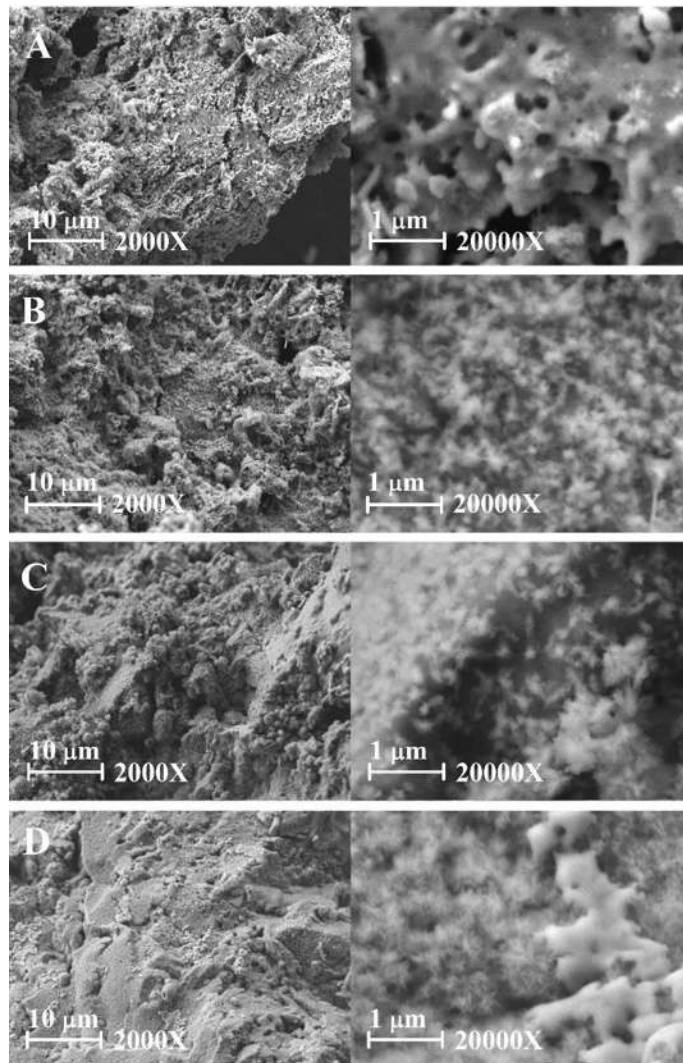


Figura 4.17 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 600 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

La situación es distinta en los andamios cuyo tratamiento térmico se realizó a 700 grados centígrados (Figura 4.18), como se había determinado en reportes propios previos, la formación de

hidroxiapatita comienza a depositarse desde los 4 días (Figura 4.18 Panel B), adquiriendo la morfología denominada de coliflor y manteniendo un tamaño constante donde solamente se incrementa el número de estas formaciones hasta saturar la superficie (Figura 4.18 Panel D).

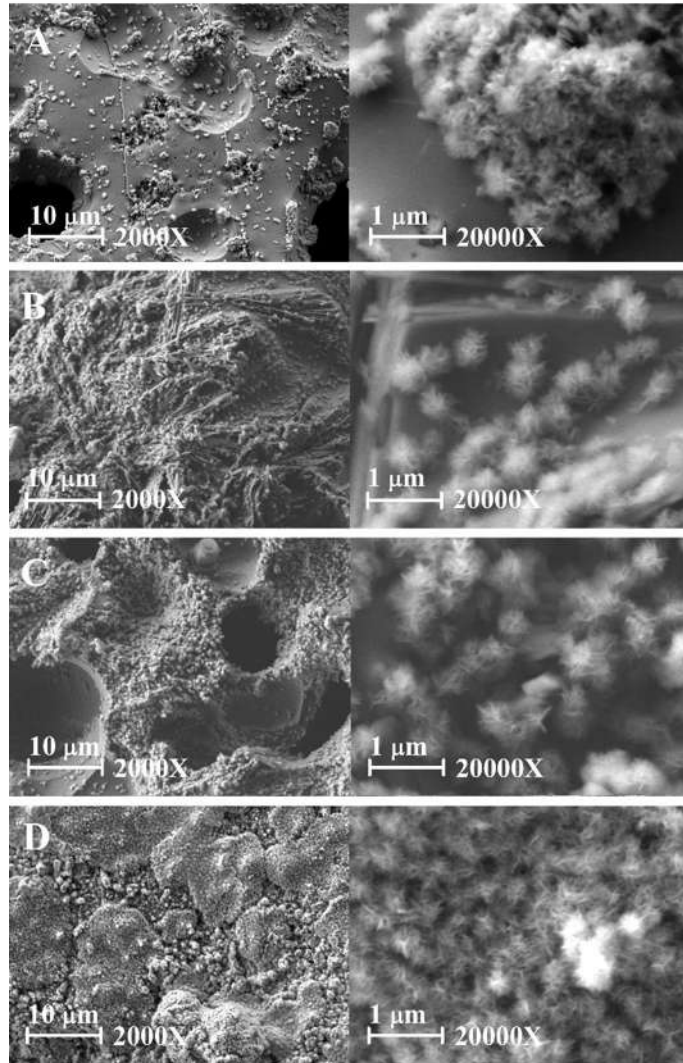


Figura 4.18 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Por otro lado en las muestras correspondientes a los andamios producidos a 800 °C (Figura 4.19) se puede determinar una correcta formación de la hidroxiapatita, que además, despliega diámetros de hasta 3 micrómetros en sus agregados, lo cual indica que la porosidad que se retiene es suficiente para permitir la liberación de iones suficientes para la formación de la hidroxiapatita, que en

conjunto con una distribución de poros menor, da lugar a la formación de agregados de mayor tamaño siendo poco limitado por las inmediaciones estructurales (Figura 4.19 Panel D).

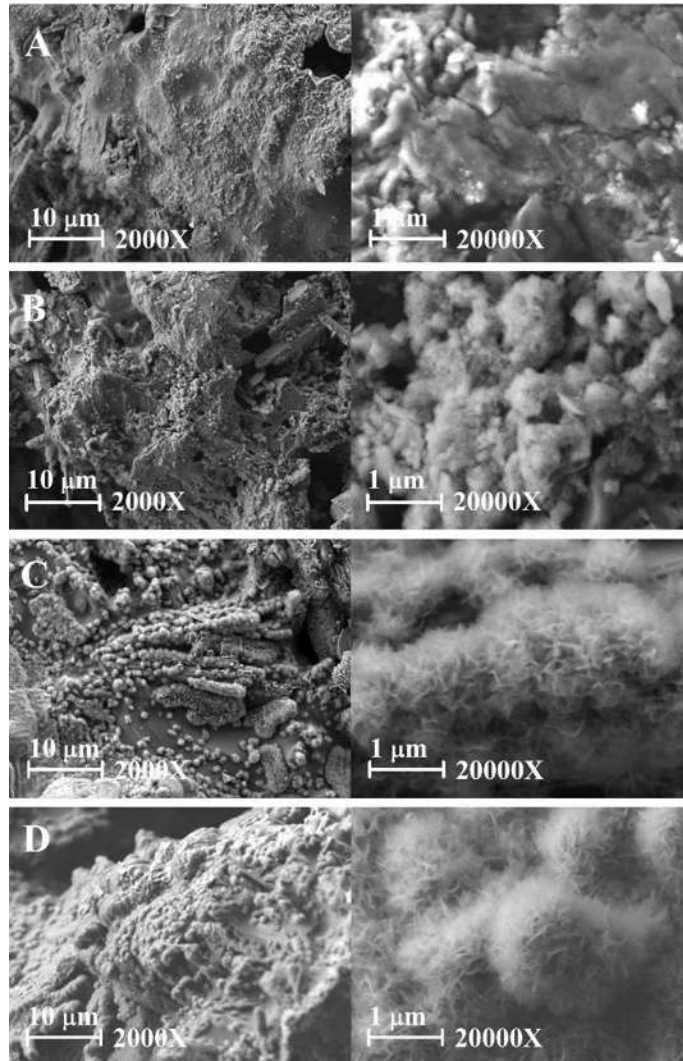


Figura 4.19 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 800 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

En estos tres ensayos, correspondientes a los tratamientos térmicos de 600, 700 y 800 °C, la formación de aglomerados de hidroxapatita sucede del mismo modo como ha sido reportado en diferentes trabajos realizados por otros investigadores, con una aglomeración de la hidroxapatita que no se realiza en forma de nódulos, sino en forma de aglomerados de pequeños micro-bigotes que conforme se incrementa su número llegan a formar cuerpos semiesféricos [84,160,161].

Una situación similar se presenta en las muestras que han sido tratadas a 900 °C (Figura 4.20), donde se puede observar la formación de hidroxiapatita, sin embargo, estas formaciones se ven de un diámetro menor pese a que tampoco encuentran limitaciones en cuanto a la superficie donde se depositan, sugiriendo que la formación de la hidroxiapatita fue limitada debido al tratamiento térmico que al formar un material más cristalino no permite la liberación de los iones tan necesarios para la bioactividad ocasionando que los aglomerados, aunque cubren prácticamente toda la superficie (Figura 4.20 Panel D) sean de menor tamaño a su homólogo tratado térmicamente a 800 °C (Figura 4.19 Panel D). Este resultado es similar al obtenido por Clupper y colaboradores [162] quienes encuentran una limitada formación de hidroxiapatita que se ve limitada por la cristalinidad del material, no obstante, aún cuando el resultado es similar, el biovidrio nanoestructurado que se empleó en esta serie de experimentos incrementa la formación de una capa homogénea de hidroxiapatita a 8 días contrario a Clupper y colaboradores que requirieron de un periodo de 14 días.

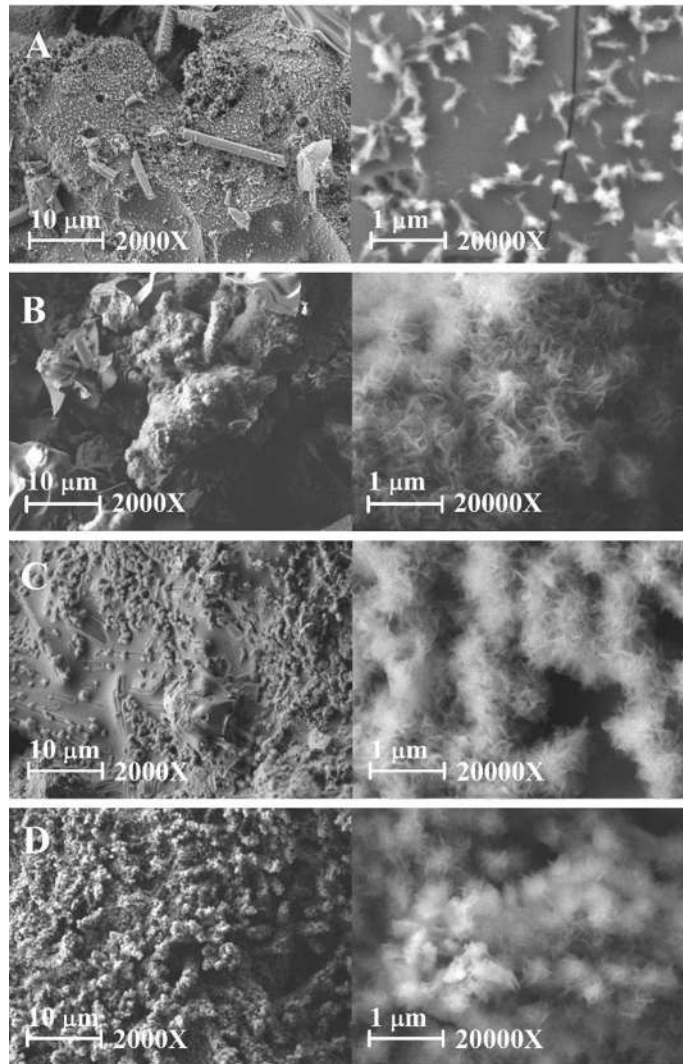


Figura 4.20 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 900 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Las muestras calcinadas a 1000 °C (Figura 4.21) tienen un comportamiento diferente al resto de las muestras, cabe resaltar que el índice de cristalinidad revela a que una quinta parte del injerto se encuentra en fase amorfa, dando lugar a una muy limitada fuente de iones de calcio, sodio, fósforo y silicio, lo que se ve reflejado en formaciones de hidroxapatita anquilosadas (Figura 21 Panel B y C) que no logran cubrir por completo la superficie del material aún después de 8 días en incubación con fluido corporal simulado (Figura 4.21 Panel D). Este resultado contrasta con los datos obtenidos por Vargas y colaboradores [120], donde reportan la pérdida de la estructura y

solamente obtienen un remanente del bioandamio tras 6 días de incubación, a diferencia de ellos el bioandamio que se ha desarrollado en este trabajo mantiene su estructura, y esto es debido a la porosidad tan limitada que se generó en el bioandamio ya que estos otros autores tenían una alta porosidad la cual no permitió el depósito de la fase de hidroxiapatita pero si la dilución del material [120].

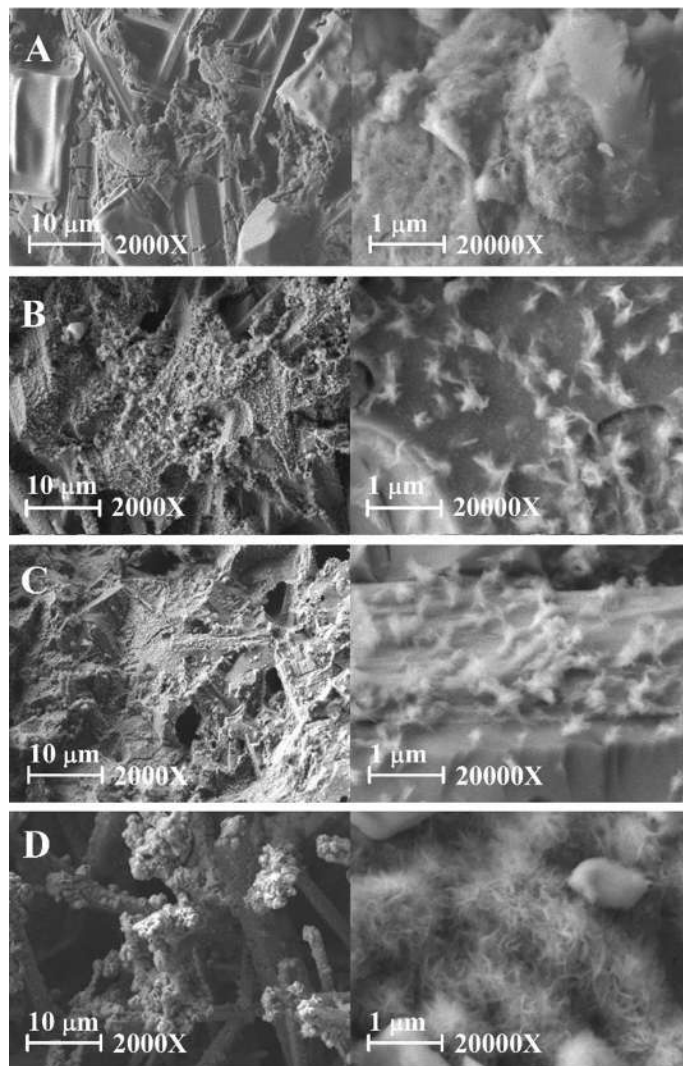
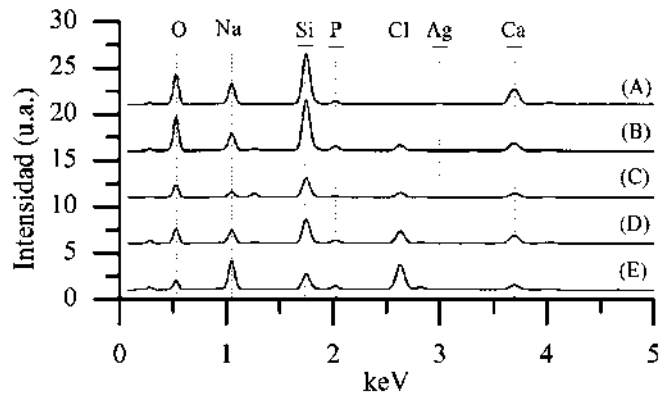


Figura 4.21 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 1000 °C después de (A) 2, (B) 4, (C) 6 y (D) 8 días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

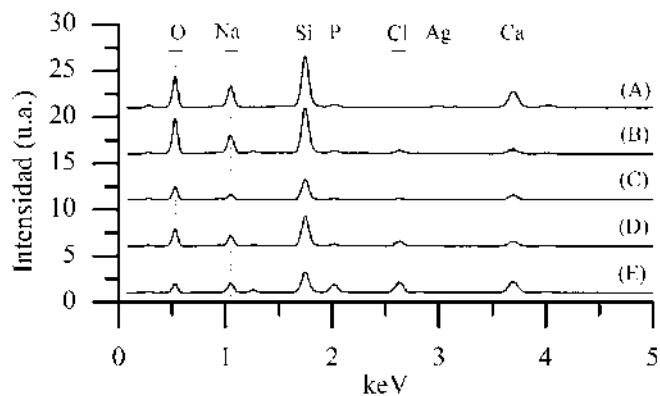
4.6.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.

En la Figura 4.21 se puede comparar la evolución de los diferentes andamios tratados a 600 (Figura 4.22), 700 (Figura 4.23), 800 (Figura 4.24), 900 (Figura 4.25) y 1000 °C (Figura 4.26), en los ensayos correspondientes al bioandamio tratado a 600 °C se puede observar una modificación muy rápida en los espectros EDS (Figura 4.22 Espectro A), donde aunque por medio de los ensayos estructurales es visible la formación de la hidroxiapatita (Figura 4.17) se puede determinar que existe una gran pérdida de la matriz de biovidrio, específicamente de la fracción conformada por silicio (1.739 keV), ya que el pico característico de este va disminuyendo conforme pasan los días del tratamiento, del mismo modo se ve una disminución en el pico principal correspondiente al calcio (3.69 keV), que puede ser interpretado como una incorrecta depositación de los iones sobre la superficie en forma de hidroxiapatita; al mismo tiempo se puede observar la aparición e incremento de un pico en la banda 2.62 keV que corresponde al cloro, es decir, este elemento se encuentra siendo absorbido en la superficie del andamio, ya que cuando se encuentra unido a la hidroxiapatita como clorhidroxiapatita, la cantidad que se puede detectar suele ser menor.



Elemento	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.82	49.6	47.34	35.41	21.04
Na (%)	25.85	15.98	13.01	17.1	28.91
Ca (%)	25.09	11.48	12.76	15.46	8.51
P (%)	4.52	14.24	12.78	15.32	7.7
Ag (%)	1.72	1.68	1.66	1.15	1.04
Cl (%)	0	7.02	12.51	15.56	32.9

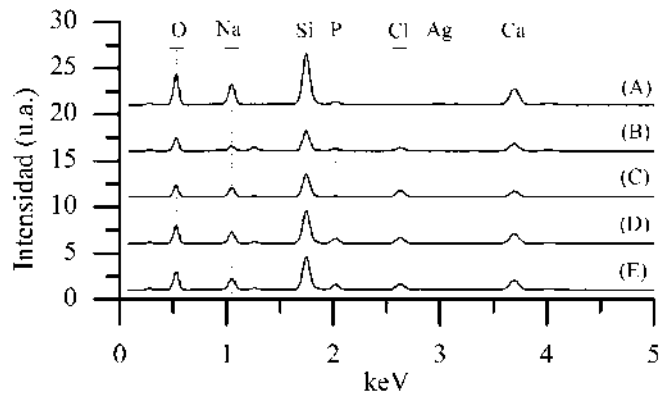
Figura 4.22 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 600 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.



Elemento	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.82	50.25	49.09	48.37	32.87
Na (%)	25.85	18.7	13.47	15.62	13.35
Ca (%)	25.09	8.46	16.49	12.17	20.76
P (%)	4.52	15.2	13.34	12.32	14.95
Ag (%)	1.72	1.58	1.23	1.01	0.63
Cl (%)	0	5.78	6.35	10.48	16.41

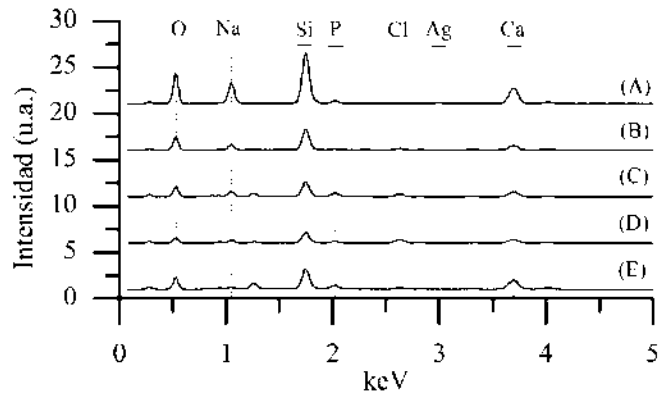
Figura 4.23 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 700 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.

El caso del biovidrio obtenido por el tratamiento térmico a 700 °C (Figura 4.23) confirma la información que se ha desarrollado a lo largo del proyecto, donde existe una pérdida de silicio no significativa debido a la depositación de este en forma de óxido de silicio en la superficie del bioandamio para así permitir el anclaje de la fase de hidroxiapatita, se puede ver un incremento en la fase de fósforo y también en el calcio, mientras que la cresta correspondiente al sodio se ve disminuida (1.041 keV), también existe la aparición de una cresta correspondiente al elemento cloro, lo cual se debe a que la forma en que se produce la hidroxiapatita es en forma de clorhidroxiapatita, siendo un caso muy similar los bioandamios tratados a 800 °C (Figura 4.24).



Elemento	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	43.1	42.45	43.61	43.79	40.21
Na (%)	25.64	11.57	16.25	14.57	13.22
Ca (%)	25.11	21.2	15.09	17.28	20.23
P (%)	4.44	13.73	8.95	13.38	15.9
Ag (%)	1.71	1.16	1.31	1.25	1.07
Cl (%)	0	9.86	14.76	9.7	9.37

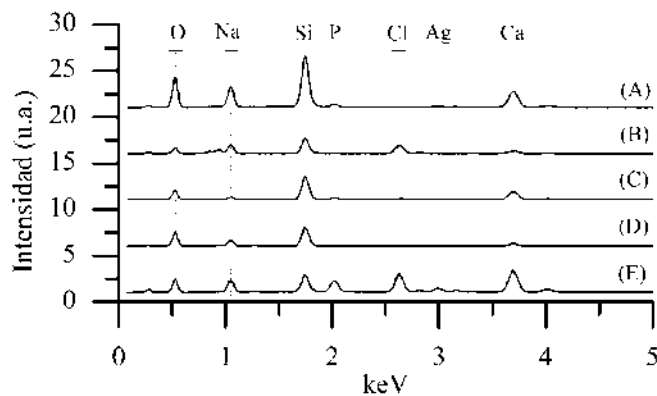
Figura 4.24 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 800 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.



Elemento	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	43.42	50.12	41.45	40.72	40.1
Na (%)	25.14	13.07	13.98	11.67	12.73
Ca (%)	25.23	16.09	17.15	18.14	25.72
P (%)	4.48	13.04	16.57	11.61	15.36
Ag (%)	1.73	1.54	1.46	1.16	0.93
Cl (%)	0	6.01	9.96	16.66	5.12

Figura 4.25 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 900 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.

Los tratamientos térmicos de 900 (Figura 4.25) y 1000 °C (Figura 4.26) se muestran particularmente invariables, es decir, aunque existe una formación visible en ambos, los espectros no cambian en gran medida, sin embargo, existe la aparición de una banda en 2.62 keV que nuevamente puede confirmar la formación de clorhidroxiapatita, sin embargo, este ensayo sólo funciona como prueba ortogonal de confirmación y no como una prueba definitiva ya que la aparición de esta banda puede estar relacionada con fenómenos de absorción y no de depositación de una fase específica en el andamio.



Elemento	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.98	37.96	50.96	51.56	21.94
Na (%)	25.65	20.46	7.65	16.82	12.35
Ca (%)	24.99	10.9	23.55	11.79	24.29
P (%)	4.66	6.31	11.77	13.93	14.83
Ag (%)	1.72	1.3	1.17	1.16	1.2
Cl (%)	0	23.04	4.87	4.63	24.39

Figura 4.26 Evolución de la composición elemental de alícuotas de andamios de biovidrio obtenidas a 1000 °C después de 0 (A), 2, (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de inmersión en fluido corporal simulado.

Estos espectros corresponden parcialmente con trabajos de otros autores, aunque existe una generalidad en cuanto a la forma en que se comportan los bioandamios elaborados y es la prácticamente nula pérdida de la estructura, que se puede determinar debido a la conservación del pico característico del silicio, ya que la pérdida de este pico en los andamios se encuentra relacionada con una disminución completa o parcial de la estructura de soporte del bioandamio, es decir, deja de ser osteoconductiva y se limita a ser solamente osteoinductiva debido a la liberación no regulada de iones [163,164]; así, podemos determinar que el método de síntesis empleado nos permite generar andamios estables y osteoconductivos sin la limitante de un tiempo muy estrecho en su aplicación y la obtención de un resultado favorable tras su implantación.

4.6.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado de los andamios obtenidos de los diferentes tratamientos térmicos.

En la figura 4.27 se pueden observar los difractogramas correspondientes a los bioandamios producidos a través de los 5 tratamientos térmicos propuestos tras haber sido incubados en fluido

corporal simulado, además de una alícuota de hidroxiapatita porcina como control (A). Así, es posible determinar la formación de la fase hidroxiapatita en el bioandamio y otras fases como la cristobalita que es característica de la formación reciente de hidroxiapatita.

Es posible observar una tendencia indicativa de que cuanto más se acercan los tratamientos térmicos a los 700 °C, es más fácil la determinación de las bandas características de la hidroxiapatita (Figura 4.27 Panel C), sin embargo, es posible ver que existe también una variación en cuanto a los picos característicos de la cristobalita, ello se debe posiblemente a que debido al alto grado de cristalización que existe esta es la única fase que puede ser formada ya que el resto de los elementos no están en una forma sencilla de hidrolizar y por lo tanto, de poder ser empleados en la formación de hidroxiapatita, así, es posible determinar las temperaturas óptimas a las cuales se puede recurrir para determinar las características específicas que se quieran atribuir a un injerto en específico.

En trabajos similares se ha determinado la temperatura óptima en 600 °C debido a que se busca facilitar el flujo de iones del material y economizar la energía que se invierte en la síntesis de los bioandamios, sin embargo, debido a que en el presente trabajo también buscamos una serie de características estructurales preestablecidas vemos esta temperatura como no óptima, debido a que con el tratamiento correspondiente a 700 °C no solo se obtuvo una adecuada cristalinidad sino que también se logró obtener una estructura tridimensional interconectada y estable [165,166].

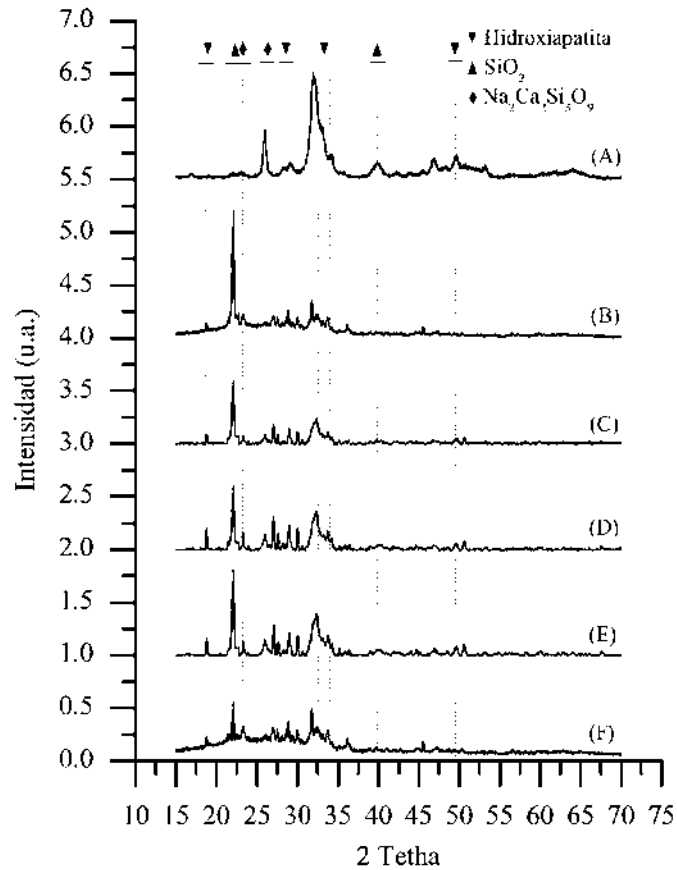


Figura 4.27 Difractogramas de Rayos X de hidroxiapatita porcina (A) y diferentes bioandamios tratados a 600 (B), 700 (C), 800 (D), 900 (E) y 1000 (F) grados centígrados, tras un tratamiento de 8 días en fluido corporal simulado.

4.7 Análisis de la interconectividad de poro

Analizando los resultados particulares de cada uno de los diferentes andamios obtenidos en diferentes temperaturas, se ha estandarizado el método de síntesis con la adición de 9.966 gramos por cada 49.59 gramos de precursores realizándose un tratamiento térmico a 700 °C, a partir de estos parámetros se elaboraron una serie de muestras que se emplearon para los consecuentes análisis, partiendo de un análisis de estructura para determinar que efectivamente los diferentes poros se encuentra interconectados.

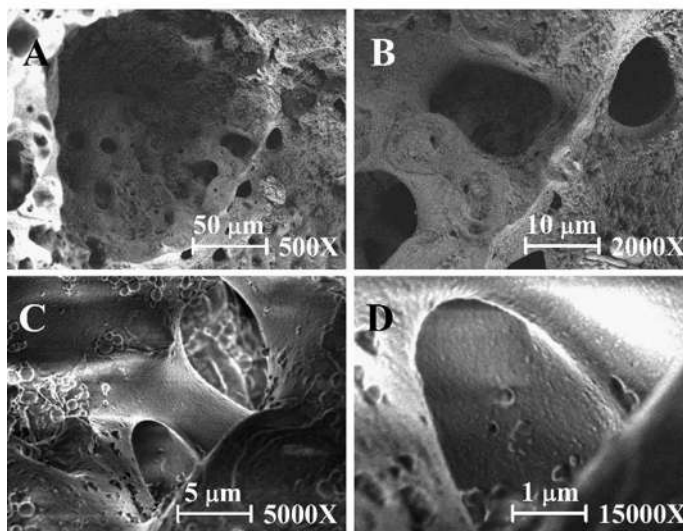


Figura 4.28 Micrografías electrónicas de barrido de andamio de biovidrio 45s5.

Mediante microscopía electrónica de barrido se elaboró un primer acercamiento a los poros generados en el andamio de biovidrio, el a figura 28 panel A se puede observar un poco cuyo diámetro supera los 100 micrómetros, dentro del cual se encuentran poros con un diámetro de entre 10 y 30 micrómetros (Figura 28 Panel B), que al mismo tiempo permiten encontrar poros internos con diámetros menores a los 10 micrómetros (Figura 28 Panel C) y simultáneamente se obtienen evidencias de poros más pequeños cuya caracterización adecuada debe ser determinada mediante otro tipo de técnicas.

Macro-estructuralmente se puede observar una similitud con el tejido óseo esponjoso, obteniéndose poros lo suficientemente amplios para contener la estructura orgánica que pueda poblar al injerto (Figura 29), dichos poros tienen un rango de diámetro de entre 300 y 500 micrómetros, mientras que existe una población de poros más pequeños con diámetros muy variables, dicha distribución de poros se encuentra relacionada con niveles más altos de fosfatasa alcalina, cuya actividad se puede tomar como un parámetro para la adhesión celular de líneas como los osteoblastos y osteoclastos.

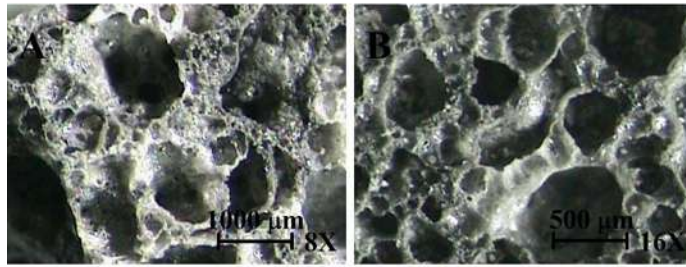


Figura 4.29 Microscopías ópticas del andamio de biovidrio 45s5.

Grupos de investigación del área reportan la formación de estructuras porosas; sin embargo, las estructuras tridimensionales que han generado suelen presentar cuellos más finos para lograr la interconectividad tan necesaria para un correcto acoplamiento del bioandamio en el cuerpo [152] lo cual se ve involucrado en una incorrecta mineralización de la superficie del material al momento de emplearse en un sistema biológico, siendo completamente hidrolizado y resorbido por el organismo impidiendo la formación de hidroxapatita [120]. Debido a esto, la generación de poros interconectados sin una excesiva porosidad debe ser uno de los factores principales dentro del diseño de bioandamios [167].

Para tener una idea de la estructura tridimensional del andamio se realizó una tomografía de una muestra, la cual se llevó a cabo con un microtomógrafo computarizado (MTC) de laboratorio marca Zeiss 510 Xradia Versa con una intensidad del haz de rayos X de 80 kV. Se tomaron 1600 proyecciones alrededor de 360° de la muestra con una cámara CCD de 1024X1024 píxeles con una resolución de voxel de alrededor de 12 micrómetros, lo que permite observar completamente la muestra y enfocarse en la macroporosidad. En la Figura 30 Panel A se presenta un corte virtual en dos dimensiones en el plano radial de la muestra después de la reconstrucción en tres dimensiones en donde se pueden observar grandes y pequeños poros. En la Figura 30 Panel B se muestra un corte virtual en dos dimensiones del plano perpendicular, el cual muestra más claramente la distribución de los poros. Por otro lado, la Figura 30 Panel C muestra una representación tridimensional con la ayuda de cortes virtuales en los tres planos lo que permite visualizar la continuidad de la porosidad en la muestra.

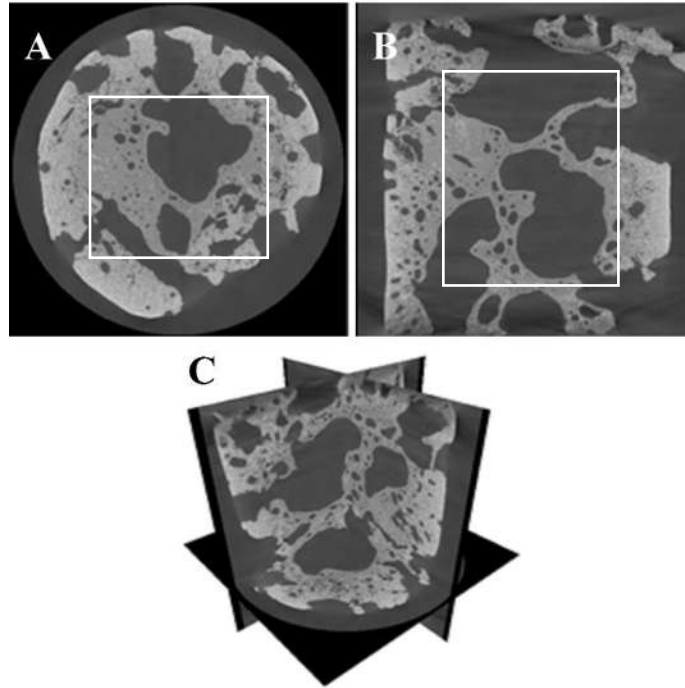


Figura 4.30 Cortes virtuales 2D de la muestra de biovidrio, a) corte radial, b) corte perpendicular y c) cortes en los tres planos principales.

Para obtener información cuantitativa de la porosidad se extrajo un volumen interior de la imagen completa por dos razones, la primera eliminar los defectos de borde y la segunda por la capacidad informática requerida para realizar el análisis de toda la muestra. Los recuadros en blanco mostrados en la Figura 30 Panel A y Panel B ilustran en donde se realizaron los cortes del volumen analizado. Para obtener datos cuantitativos de la muestra se realizó un tratamiento de imágenes que permite incluye algunos filtros y la segmentación de las fases presentes en la imagen con la ayuda del software ImageJ. La Figura 31 Panel A muestra un corte virtual en dos dimensiones del volumen analizado, mientras que la Figura 31 Panel B muestra la imagen binaria de la parte sólida de la muestra. Finalmente, la figura 31 Panel C presenta la imagen binaria de la porosidad contenida en la muestra.

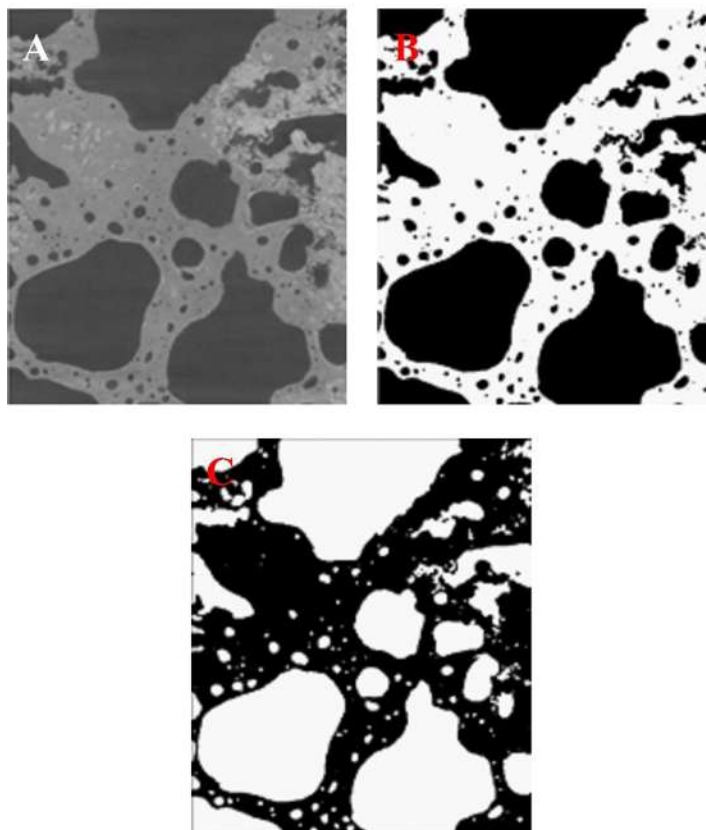


Figura 4.31 Cortes virtuales 2D del volumen analizado que ilustran el proceso de análisis de imágenes, a) imagen inicial, b) imagen binaria del sólido y c) imagen binaria de los poros.

En la Figura 32 se presentan las representaciones tridimensionales del volumen analizado y del cual se extrajeron los datos cuantitativos de la porosidad. La Figura 32 Panel A presenta una visualización 3D de la parte sólida del andamio de biovidrio fabricado en donde se aprecia la continuidad del sólido, ya que solo presenta un color en toda la muestra. Por otro lado, la Figura 32 Panel B, muestra la porosidad al interior del andamio en 3D y se pueden notar diferentes colores en la imagen lo que nos indica que existen poros que no se interconectan en 3D. También observamos que la mayoría de los poros se encuentran interconectados ya que se obtienen de color verde.

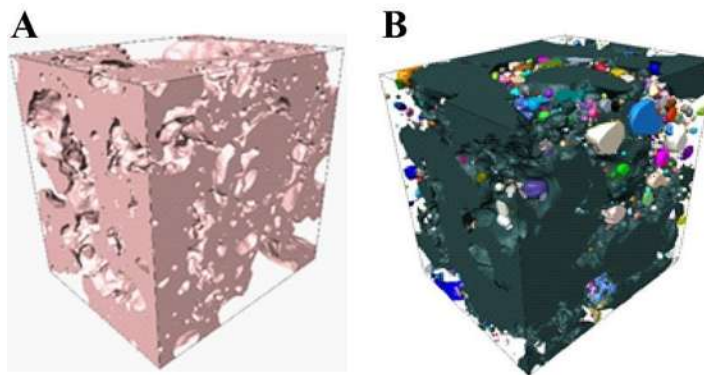


Figura 4.32 Representación tridimensional de la fase sólida (A) y la porosidad contenida (B) en el interior del andamio de biovidrio.

Las propiedades de flujo del medio poroso del andamio se evaluaron mediante simulaciones numéricas de permeabilidad realizadas mediante el uso del software Avizo® en las imágenes binarias 3D que contienen porosidad. Antes de ejecutar las simulaciones numéricas, el volumen mínimo representativo (MRV) se estimó recortando la imagen en pequeños cubos de volumen (20x20x20 voxels) en el centro de la imagen y luego se calculó la densidad relativa para ese volumen. Estas operaciones se repitieron aumentando el volumen del cubo en 20 voxeles por lado hasta alcanzar una densidad relativa casi constante. El volumen mínimo útil para obtener suficiente precisión en nuestros resultados tuvo que ser calculado ya que hay limitaciones computacionales y, para ahorrar tiempo para las simulaciones numéricas. Se encontró que el volumen al que la densidad relativa alcanzó casi un valor constante es de alrededor de 250^3 voxeles³. Se utilizó un volumen de $300 \times 300 \times 300$ voxeles, que representa 46 mm^3 , para ejecutar las simulaciones numéricas que se realizaron en el eje vertical de la muestra.

Las simulaciones de Avizo se basan en la ley de Darcy al resolver las ecuaciones de Navier Stokes con un método de volumen finito. La simulación consideró un fluido newtoniano incompresible de una fase con un flujo laminar de estado estable y una viscosidad de 0,045 Pascal-Segundo, que representa la viscosidad de la sangre. Las condiciones de los límites utilizados fueron la presión de entrada y salida, con valores de 130 y 100 kPa, respectivamente. La Figura 33 muestra las líneas de flujo que pasan a través del andamio. En la Figura 33 se presenta el volumen sólido completo al interior del cual se realizó la simulación de flujo, en donde se aprecian las líneas de flujo. En la Figura 33 Panel B se muestra un extracto tridimensional que permite observar que la trayectoria del

flujo a través del andamio, en donde se aprecia que el paso en la dirección vertical no es forma directa y presenta un cierto grado de tortuosidad. En la Figura 33 Panel C se presentan las líneas de flujo, el color de las líneas indica su velocidad, siendo el azul oscuro velocidad baja y el rojo una velocidad muy alta. Se aprecia que en su mayoría la velocidad del fluido es homogénea, excepto por dos pequeñas contracciones que presentan una coloración azul claro indicando una aceleración del fluido debido al cambio de sección por el que debe pasar el fluido.

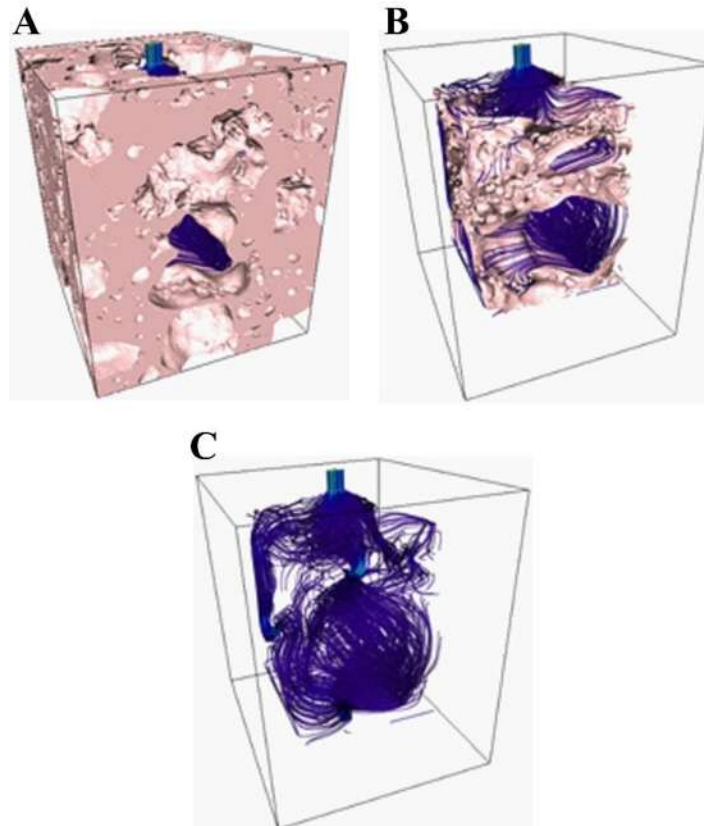


Figura 4.33 Representación tridimensional del volumen sólido y las líneas de flujo obtenidas de la simulación numérica: volumen y líneas de flujo al interior (A), recorte del volumen tridimensional que permite observar por donde pasa el fluido (B) y líneas de flujo que indican los cambios de velocidad del fluido (C).

Los resultados cuantitativos de diferentes propiedades del andamios se enlistan en la Tabla Y, se ha determinado una permeabilidad del $1.89 \times 10^{-10} \text{ m}^2$, dicho valor es correspondiente con trabajos como Abdalrahman y colaboradores, los cuales han estimado un rango de entre 0.1 y $8 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ [168] para el hueso poroso en remodelación, paralelamente este valor es considerablemente más

alto que los reportados por otros grupos de trabajo que se encuentran entre 5×10^{-23} y 9.5×10^{-18} m² [169], no obstante, es necesario hacer la diferenciación en que este rango es característico para estructuras óseas más compactas que normalmente se ven relacionadas con la diferenciación de osteoblastos a osteocitos [170]. Se ha determinado un porcentaje de interconectividad del 93.5% lo cual significa que una gran cantidad de los poros del andamio se encuentran unidos entre sí, aunque el valor óptimo para este parámetro en la remodelación del tejido óseo es de un 100% se han determinado rangos donde interconectividades superiores al 90% permiten el desarrollo e fomentar una correcta asimilación del andamio en los organismos vivos [171], dicha interconectividad es lograda gracias a una porosidad de 52.31%, este parámetro es particularmente complicado de analizar debido a que no existe una correlación lineal entre la porosidad y la bioactividad, donde porosidades altas pueden dar lugar a una pobre depositación de hidroxapatita [120] y porosidades muy bajas no permiten la hidrólisis adecuada del andamio para la liberación de iones, como se ha demostrado en el punto anterior.

Tabla 4.4 Valores de la porosidad

Fracción en volumen de poros (%)	Tamaño poro medio (μm)	Interconectividad (%)	Tortuosidad	Permeabilidad (m ²)
52.31	1560	93.5	1.34	1.89×10^{-10}

El tamaño de poro medio se ha determinado en un valor de 1560 micrómetros (Tabla Y), este es un valor nominal obtenido a partir de la población total de poros del andamio, como es posible observar existen diferentes diámetros que comienzan a cobrar notoriedad a partir de los 150 micrómetros en adelante (Figura 34), lo cual es una característica de los andamios obtenidos mediante agentes templantes [172]. Al día de hoy no se ha determinado con certeza cuales son los diámetros óptimos para la osteoregeneración, sin embargo se han determinado diferentes rango donde existen ventajas y desventajas, algunos trabajos han determinado que los poros entre 300 y 400 micrómetros son los más efectivos para la remodelación ectópica del hueso, es decir, la calcificación de los tejidos extraesqueléticos, por otro lado, andamios con poros con diámetros inferiores a los 200 micrómetros favorecen el depósito de sales en la matriz ósea y andamios con diámetros de poro superiores a los 1000 micrómetros han demostrado una mejor bioactividad en modelos *in vivo* [172], debido a este tipo de situaciones es que modelos con diferentes diámetros

de poro pueden dar funcionar de una manera integral para favorecer diferentes tipos de actividad osteogénica.

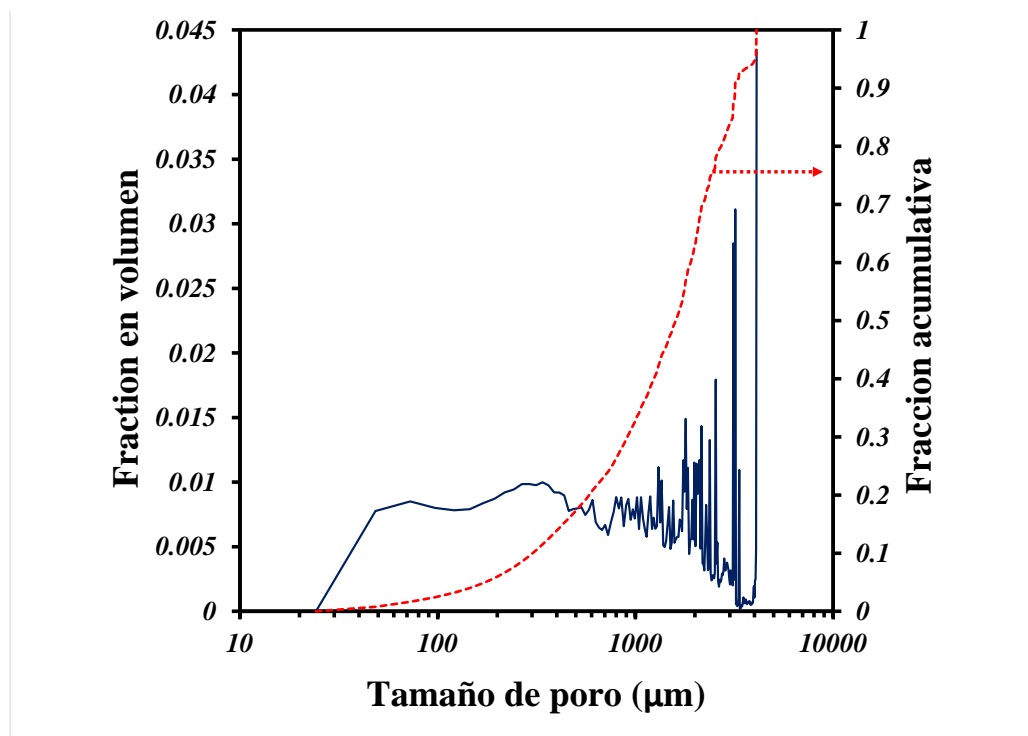


Figura 4.34 Distribución de tamaño de poros en el andamio.

Se analizó también la estructura del material para confirmar que este es un material nanoestructurado, para ello se tomaron una serie de micrografías electrónicas de barrido (Figura 35) de las paredes interiores del andamio de biovidrio 45s5, estas micrografías se determinaron diámetros de partícula menores a los 100 nanómetros, este tipo de materiales nanoestructurados presentan un fenómeno de aglomeración que a su vez ocasiona la pérdida de la homogeneidad en los diámetros de aglomerado, debido a que nanoesferas se fusionan con otras, generando partículas de diámetros mayores al original [172].

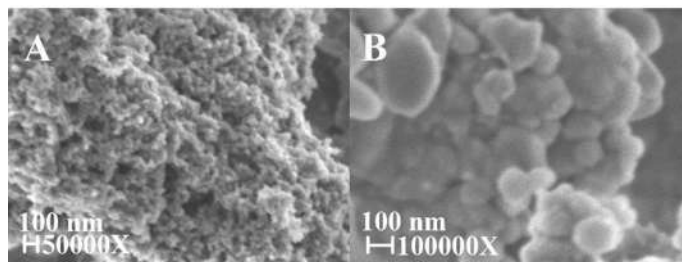


Figura 4.35 Micrografía electrónica de barrido de un andamio de biovidrio 45s5 a 50000X (A) y 100000X (B) aumentos.

Es posible concluir parcialmente que se han determinado las condiciones de síntesis para un andamio mimético de biovidrio 45s5, con una interconectividad adecuada con respecto a los diferentes grupos de trabajo, se ha logrado determinar y confirmar la naturaleza nanoestructurada del andamio y también se ha determinado que existen poros con diámetros adecuados para fomentar el crecimiento de tejido óseo, respecto a la permeabilidad se han logrado valores adecuados para su implantación.

4.8 Comparabilidad de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal

Una serie de alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio y otras de andamios de biovidrio obtenidas por síntesis tradicional, fueron incubadas por un periodo de 8 días en fluido corporal simulado, estas muestras fueron incubadas a 37 grados centígrados de forma estática, en total ausencia de luz. El fluido corporal simulado fue cambiado cada 24 horas para finalmente ser retirado de la muestra mediante tres ciclos de lavado con agua desionizada, agitando levemente y decantando el agua de lavado, posteriormente fueron secados a temperatura ambiente y caracterizadas a partir de microscopía electrónica de barrido, análisis EDS, determinación del espectro infrarrojo y Raman.

4.8.1 Caracterización morfológica de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.

En los ensayos correspondientes al bioandamio mimético de biovidrio en fluido corporal simulado, las micrografías MED se presentan en la Figura 4.36, donde la formación de aglomerados de hidroxiapatita ocurre como se reporta en diferentes trabajos realizados por otros investigadores, es decir, la aglomeración de la hidroxiapatita no se realiza en forma de nódulos, sino que se forman

aglomerados como los previamente demostrados en las figuras 4.16, 4.17 y 4.18 denominadas como micro-bigotes que forman estructuras esféricas al aglomerarse. En el día 4 (Figura 4.36 Panel B) la formación de hidroxiapatita no es tan representativa como en el sistema *in ovo* aunque es posible ver una gran cantidad de pequeñas aglomeraciones, pero no es sino a partir del día 6 (Figura 4.36 Panel C) cuando inicia la aglomeración de la hidroxiapatita en la superficie del biovidrio que comienza sin un orden aparente, pero que hacia el día 8 (Figura 4.36 Panel D) ya se ve definida en la configuración denominada tipo “coliflor”. Aunque esta morfología concuerda con los trabajos de otros autores, cabe resaltar que en el caso de este bioandamio mimético de biovidrio se reduce el tiempo de incubación en fluido corporal simulado en una tercera parte, dando lugar a la misma formación de hidroxiapatita de una forma más rápida y eficiente[161], atribuyendo esta aceleración del proceso a que el bioandamio es un biomaterial nanoestructurado, es decir, está conformado por pequeñas esferas aglomeradas con diámetros menores a 1 micrómetro que pueden funcionar como sitios de nucleación para la condensación de la hidroxiapatita.

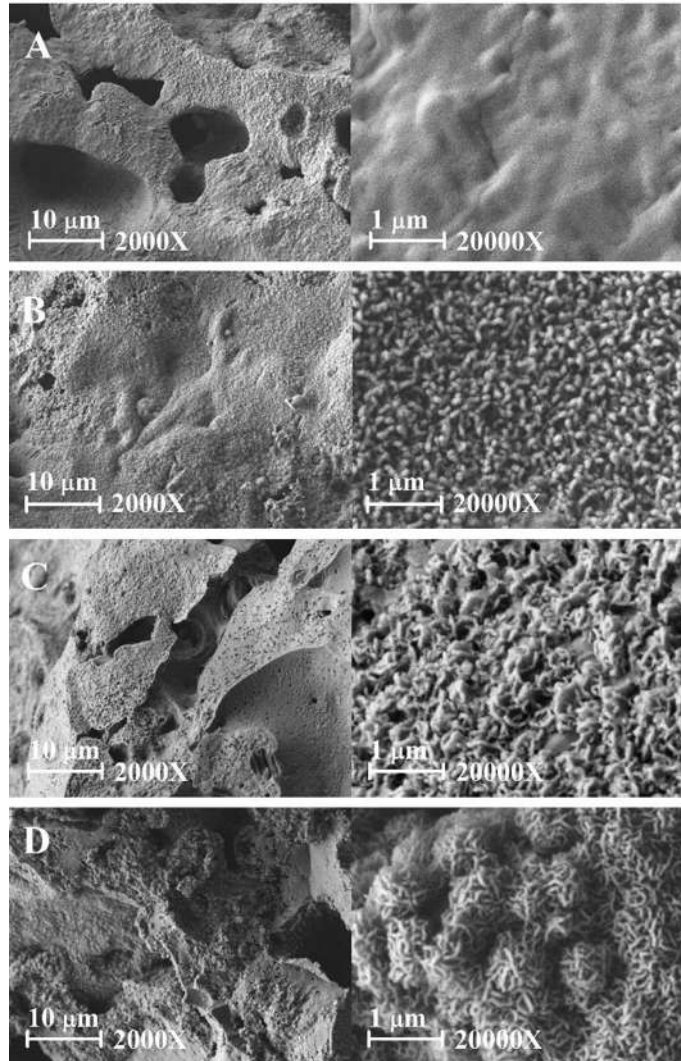


Figura 4.36 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de (A1-A2) 2 días, (B1-B2) 4 días, (C1-C2) 6 días y (D1-D2) 8 días de incubación en fluido corporal simulado (SBF). Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Como un control para determinar que efectivamente un biomaterial nanoestructurado es más eficiente que un material que no lo es, se realizó el mismo experimento, pero empleando el biovidrio no poroso y no nanoestructurado, del cual se determinó que el sistema *in vitro* es capaz de hidrolizar lo suficiente al biovidrio para generar poros en la superficie pero con una pobre formación de hidroxiapatita en la superficie que solo es visible hasta el día 6 (Figura 4.37 Panel C) y que aún en el día 8 (Figura 4.37 Panel D) no llega a presentar una formación de hidroxiapatita

tan eficiente como el bioandamio poroso mimético, esta eficiencia tan reducida se debe a que el área superficial del material es demasiado baja en comparación con el bioandamio mimético desarrollado por el método de síntesis propuesto en este proyecto, además de que no posee sitios de nucleación nanométricos preestablecidos que su contraparte proporciona para favorecer la nucleación de la hidroxiapatita [84,160,161].

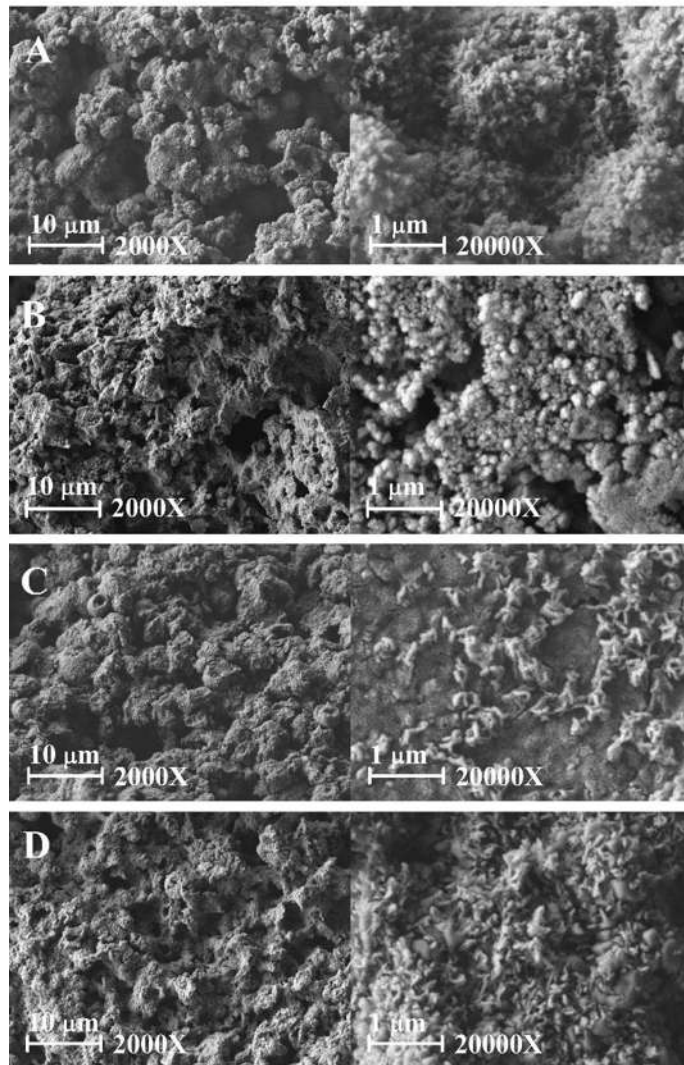


Figura 4.37 Micrografías (MEB) de las alícuotas de biovidrio no poroso después de (A1-A2) 2 días, (B1-B2) 4 días, (C1-C2) 6 días y (D1-D2) 8 días de incubación en fluido corporal simulado (SBF). Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

4.8.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X de la bioactividad entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.

En las figura 4.38 y 4.39 se puede comparar la composición elemental de diferentes muestras de biovidrio antes y después de ser incubados en fluido corporal, en la Figura 4.38, se muestran aquellas alicuotas de andamios de biovidrioporoso nanoestructurado, mientras que en la Figura 4.39 se puede ver el control correspondiente al biovidrio que ha sido sintetizado de forma tradicional mediante secado por evaporación y no mediante el equipo de secado por asperción, lo cual da una estructura poco porosa. En los ensayos *in vitro* correspondientes mediante los espectros EDS se puede observar una evolución relativamente lenta, donde para el caso del bioandamio nanoestructurado poroso (Figuras 4.38 y 4.36) se genera la hidroxiapatita a partir del cuarto día de tratamiento, mientras que en el caso del biovidrio no poroso (Figuras 4.39 y 4.37) la formación de hidroxiapatita tarda 8 días en suceder, demostrando nuevamente que la porosidad es uno de los principales factores que controlan la bioactividad del biovidrio. Un factor más a tener en cuenta es la presencia de la plata, la cuál prevalece, aunque siendo una fracción tan pequeña del biomaterial el pico es apenas distingible aunque prácticamente constante, lo cuál indica que el biomaterial puede mantener su actividad antibiótica aún después de 8 días injertado en un sistema *in vitro*, sin que este afecte en la bioactividad del material. Esta batería de resultados es contrastante con trabajos previos donde el espectro EDS muestra la pérdida de los elementos constituyentes de la hidroxiapatita, dando lugar a una fase prácticamente constante de oxido de silicio, debido a la pérdida del calcio y el sodio [116,120].

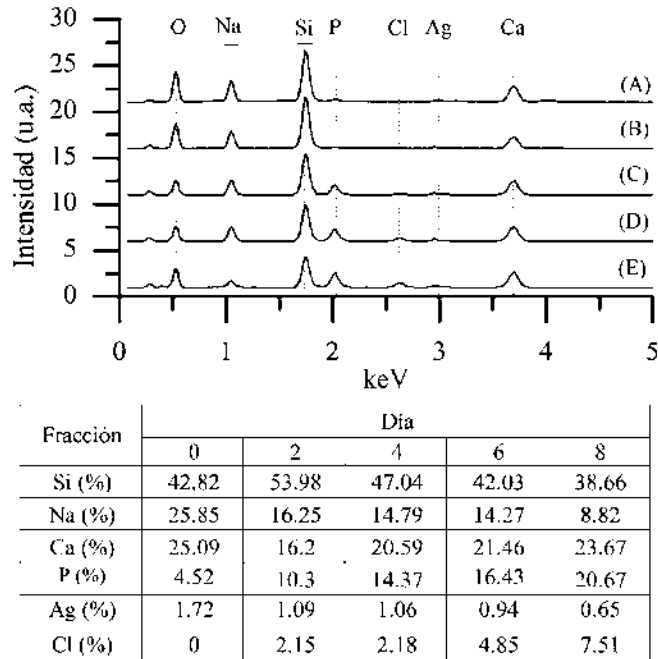
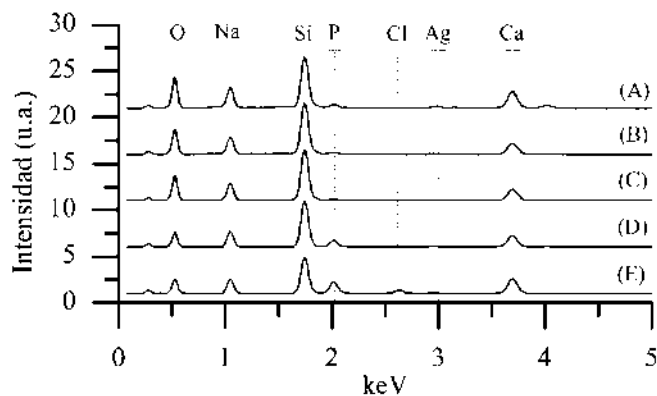


Figura 4.38 Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6(D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.

En ambos sistemas se puede observar que la proporción de silicio disminuye, aunque no simultáneamente, ya que en el biovidrio poroso la disminución del silicio es más rápida con el subsecuente incremento de la fase de fosforo, mientras que en el biovidrio no poroso esto tarda por lo menos 8 días. Comparando estos resultados con las imágenes previas y el espectro EDS del estándar de hidroxiapatita se puede deducir que la hidrólisis que el biovidrio no poroso sufre es igual para todos los elementos al no existir una modificación en las proporciones de la composición y no es sino hasta el octavo día cuando la hidroxiapatita forma una capa lo suficientemente representativa para modificar el espectro EDS. En el caso de las alícuotas del biovidrio poroso, se alcanza un equilibrio donde ya se ha generado hidroxiapatita en la superficie y eso mismo disminuye la cantidad de elementos del biovidrio que se liberan al sistema, aunque esto no es indicativo de que la formación de hidroxiapatita haya cesado, sino simplemente ha disminuido la tasa de hidrólisis del biovidrio por el medio, viéndose reflejado en la cresta correspondiente al silicio que permanece prácticamente constante entre el día 6 y 8 de tratamiento.



Fracción	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.82	54.07	53.02	52.45	42.1
Na (%)	25.85	16.28	17.42	15.66	14.29
Ca (%)	25.09	16.23	15.63	17.06	21.5
P (%)	4.52	10.31	11.23	11.56	16.46
Ag (%)	1.72	1.33	1.06	1.33	0.86
Cl (%)	0	1.75	1.64	1.94	4.79

Figura 4.39 Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del biovidrio no poroso después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6(D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.

4.8.3 Caracterización espectroscópica de infrarrojo de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado.

A partir de los espectros de absorbancia de infrarrojo se puede observar la evolución de los grupos funcionales que se encuentran en un material a partir de las crestas características que estos generan, siendo fácilmente identificable la fase de biovidrio debido a sus enlaces Si-O-Si (1067, 805 y 492 cm^{-1}) y Si-O (926 y 606 cm^{-1}), mientras que la configuración del espectro cambia cuando se encuentran grupos funcionales propios de la hidroxiapatita como el PO_4^{3-} (1050 cm^{-1}) o enlaces del tipo P-O-P (967 cm^{-1}). Así, a partir de una alícuota de hidroxiapatita se puede elaborar un control que ayude a determinar si la formación de hidroxiapatita se encuentra efectivamente ocurriendo y así descartar que sucedan modificaciones composicionales debido al medio en el cual se realiza el tratamiento de las probetas de biovidrio, es decir, se determinan las modificaciones que deben suceder en el espectro para que este asegure la identidad de los compuestos formados para evitar una malinterpretación de la información obtenida.

En las Figuras 4.40 y 4.41 se pueden observar diferentes patrones de control entre los que se encuentra el espectro de la hidroxiapatita (A) y el espectro del biovidrio ya sea en forma de bioandamio mimético (Figura 4.41 (A)) o de una alícuota de biovidrio sin porosidad pero de la misma composición (Figura 4.41 (B)), es posible observar la formación de la hidroxiapatita a partir de la modificación de las crestas y su posición con respecto al espectro; teniendo en cuenta que una parte importante de la técnica es la homogenización de la muestra se puede obtener lectura a partir tanto del biovidrio como de la hidroxiapatita simultáneamente, de forma similar a los ensayos EDS donde se cuantifica una fracción de silicio incluso cuando este no forma parte de la hidroxiapatita. Se puede observar una paulatina disminución de las crestas propias de los enlaces Si-O-Si, mientras que el pico mayor se desplaza hacia un valor de 1034 cm^{-1} , que corresponde a los grupos fosfato del fosfato de calcio que conforma la estructura de la hidroxiapatita de tal modo que, en ambos casos se puede observar el efecto que el fluido corporal simulado tiene sobre el material en la formación de la hidroxiapatita, este cambio estructural es más drástico en las muestras del andamio de biovidrio donde se puede observar desde el segundo día manteniéndose relativamente estable hasta el día 8 cuando el espectro prácticamente se vuelve idéntico al de la hidroxiapatita, exceptuando la posición de la banda correspondiente a los enlaces Si-O-Si en la posición 484 cm^{-1} indicando que aún en esa alícuota existe una fracción de silicio que se confirma por los ensayos de composición o EDS, que en la hidroxiapatita un pico cercano a esta posición indica un grupo funcional PO_4^{3-} [173]. Mientras tanto en la Figura 4.41, paralelamente a la figura anterior también se visualiza un control correspondiente al espectro infrarrojo de la hidroxiapatita de origen animal y el espectro del biovidrio antes de realizar el tratamiento, para así comparar los cambios en los espectros y determinar si existe o no un efecto significativo. Nuevamente, se puede observar como el tratamiento genera cambios en las bandas de los diferentes espectros de infrarrojo del biovidrio, sin embargo, en este no se observan cambios significativos en los espectros, lo que indica una muy pobre bioactividad. Sin embargo, recordando las micrografías correspondientes al mismo sistema, se puede discernir que el fluido corporal simulado si está realizando la etapa de hidrólisis en la superficie del biovidrio, pero no está ocurriendo una condensación adecuada para la formación de la hidroxiapatita, lo que se debe posiblemente a que estas alícuotas de biovidrio no poroso no poseen una estructura que le permita fomentar la nucleación de la formación de la hidroxiapatita en la superficie. Esto, en contraste con el andamio biomimético nanoestructurado (Figura 4.40), en

el cual se observa una adecuada formación de hidroxiapatita a partir de la aparición de las bandas correspondientes al grupo fosfato y un hombro junto a esta cresta que corresponde a enlaces P-O-P, lo que indica que el proceso de hidrólisis sí está ocurriendo de forma acoplada a un proceso de condensación de los iones que se generan dando lugar a los grupos funcionales como el fosfato de calcio que es parte primordial de la composición de la fase mineral del hueso. Muchos trabajos previos muestran la evolución del biovidrio y como las bandas que corresponden al silicio son modificadas, sin embargo, en el presente trabajo se demuestra como el espectro no solamente se modifica, sino que el patrón obtenido es prácticamente igual en los bioandamios miméticos de biovidrio en los diferentes ensayos, mientras que en el biovidrio de síntesis tradicional el patrón aunque se modifica no es igual al de la hidroxiapatita de origen animal, además de tardar más tiempo en modificar el patrón de bandas, para ambos sistemas [165,173].

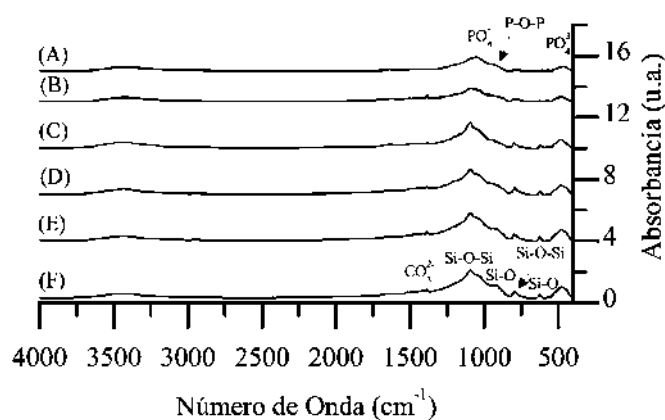


Figura 4.40 Espectro de absorción de infrarrojo del biovidrio en incubación en fluido corporal simulado (*in vitro*). (A) bioandamio mimético de biovidrio nanoestructurado y (B) biovidrio no poroso. (a) control de hidroxiapatita, (b) día 8 del tratamiento, (c) día 6 del tratamiento, (d) día 4 del tratamiento, (e) día 2 del tratamiento y (f) sin tratamiento.

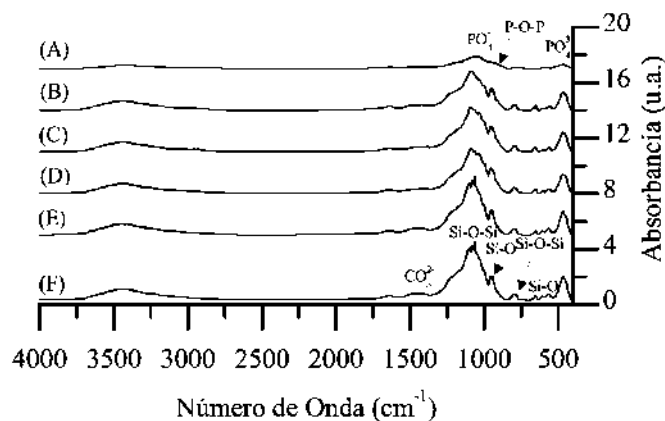


Figura 4.41 Espectro de absorción de infrarrojo del biovidrio en incubación en fluido corporal simulado (*in vitro*). (A) bioandamio mimético de biovidrio nanoestructurado y (B) biovidrio no poroso. (a) control de hidroxiapatita, (b) día 8 del tratamiento, (c) día 6 del tratamiento, (d) día 4 del tratamiento, (e) día 2 del tratamiento y (f) sin tratamiento.

4.8.4 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado y en la membrana corialantoidea.

Se emplearon como controles la hidroxiapatita (Figura 4.42 A) y el biovidrio dopado con 1.75% de plata calcinado a 700 °C (Figura 4.42 D), para determinar la formación de hidroxiapatita en conjunto con la base de datos disponible en el equipo mismo para el caso de la hidroxiapatita y para determinar los cambios en la estructura cristalográfica en el caso del control de biovidrio, siendo correspondientes con los patrones previamente determinados tanto en el presente proyecto como por otros grupos de trabajo [155,174]. Nuevamente se evaluó la bioactividad del biovidrio sin poros en un tratamiento con fluido corporal simulado (Figura 4.42 B) con una duración de 8 días bajo los lineamientos preestablecidos en las metodologías previas; paralelamente se analizó la bioactividad del bioandamio mimético de biovidrio también en fluido corporal simulado (Figura 4.42 C), de antemano se ha observado que en el biovidrio no poroso la formación de hidroxiapatita se realiza de forma muy lenta; sin embargo, se ha podido determinar que aunque este proceso en específico no es muy eficiente debido a la pobre área superficial, sí se origina la formación de óxido de silicio (cristobalita) la cual se encuentra presente en las fases producidas en ambos sistemas de biovidrio, sin embargo, se observó cómo, a pesar de la baja área superficial del biovidrio no poroso,

se obtuvieron los picos correspondientes a la fase de hidroxiapatita comparables con los obtenidos a partir del bioandamio mimético de biovidrio. En el caso del bioandamio nanoestructurado se encontró una buena formación de la fase de hidroxiapatita, cabe destacar que debido a que es un proceso que se realiza a temperatura ambiente el grado de cristalización es muy bajo por lo cual los picos se muestran achatados. Esto corresponde con otros grupos de trabajo, los cuales reportan que a través de un tratamiento térmico logran refinar los ocho picos característicos de la hidroxiapatita, sin embargo, en este caso el tratamiento térmico no es requerido debido a que se coincide en por lo menos 5 picos característicos y un tratamiento térmico puede alterar las características texturales de la muestra [175,176].

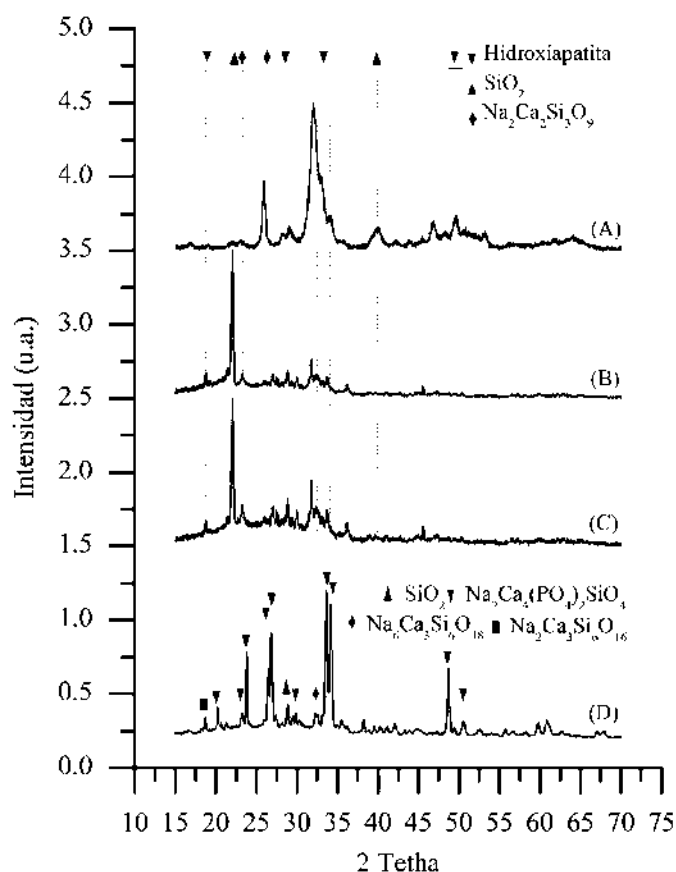


Figura 4.42 Espectros de difracción de rayos X de hidroxiapatita control (A), biovidrio no poroso obtenido por síntesis convencional tradicional tras 8 días de inmersión en fluido corporal simulado (B), andamio mimético de biovidrio tras 8 días de inmersión en fluido corporal simulado (C) y biovidrio control sin tratamiento de inmersión.

4.9 Comparabilidad de la evaluación de bioactividad en biovidrio 45s5 en la membrana corialantoidea, el plasma de sangre de conejo y el fluido corporal simulado.

4.9.1 Caracterización morfológica de la evaluación de bioactividad en biovidrio 45s5 en la membrana corialantoidea, el plasma de sangre de conejo y el fluido corporal simulado.

En la Figura 4.43 es posible ver la evolución del bioandamio mimético de biovidrio tras ser insertado en un sistema *in ovo*, donde se puede observar la formación de aglomerados de hidroxiapatita, que también pueden ser llamados nódulos. En el panel A1 de esta figura se puede observar como no existen estos nódulos en la superficie del material, cabe resaltar que el análisis de microscopía se realizó buscando las zonas más lisas donde este efecto pueda ser apreciado de mejor forma. A cuatro días tras su implantación se puede observar en la imagen a 20,000 aumentos (Figura 4.43 Panel B) que se comienzan a formar los primeros agregados de hidroxiapatita, pero no es hasta el día 6 que estos comienzan a tomar la forma de esferas (Figura 4.43 Panel C). Sin embargo, es hasta el día 8 cuando estos agregados han tomado un tamaño considerable siendo fácilmente identificados a 2000 aumentos (Figura 4.43 Panel D), no obstante a 20000 aumentos (Figura 4.43 Panel B D) se puede observar que estas esferas también se encuentran formadas por esferas más pequeñas, lo cual contrasta con trabajos previos de otros equipos de trabajo, donde el biovidrio al ser injertado en un sistema *in ovo*, es hidrolizado pero no se da el fenómeno de condensación de la hidroxiapatita, debido a que los iones de calcio y fósforo son monopolizados por la formación del sistema óseo del sistema, es decir, el proceso de hidrólisis funciona pero el organismo vivo no permite que estos iones lleven a cabo la formación de hidroxiapatita sobre el biomaterial. Este efecto se debe principalmente a que, en la búsqueda de un material eficiente, se han alcanzado porosidades de 90% o incluso más, lo cual en un sistema *in vitro* funciona para la formación óptima de la hidroxiapatita pero en un sistema *in vivo* o *in ovo*, esta bioactividad se ve mermada debido a que esta alta área superficial da lugar a una rápida hidrólisis pero limita el espacio en el cuál puede condensarse, que en conjunto con un sistema dinámico es capaz de secuestrar los iones tan necesarios para la formación de la hidroxiapatita, lo que hace que el biovidrio pierda la bioactividad [116,177].

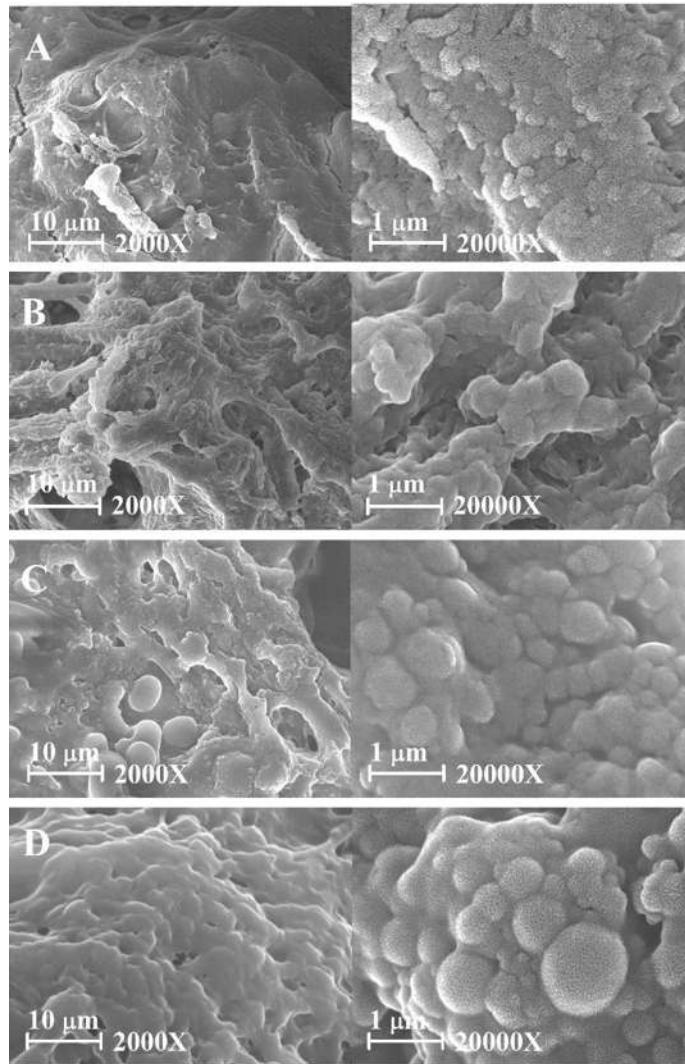


Figura 4.43 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio después de 2 días (A), 3 días (B), 4 días (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

En la Figura 4.44 se muestra la evolución a los 2, 4, 6 y 8 días de incubación en suero sanguíneo de conejo. Es posible observar la formación de una fase heterogénea a partir de los 4 días de incubación conformadas por estructuras alargadas tipo micro-bigote, que incrementan en número y longitud con el transcurso de los días, cubriendo por completo el material llegando a cubrir incluso los poros que conforman la estructura del material, alcanzándose construcciones de hasta 20 micrómetros con diámetros que van desde 0.5 hasta 2 micrómetros.

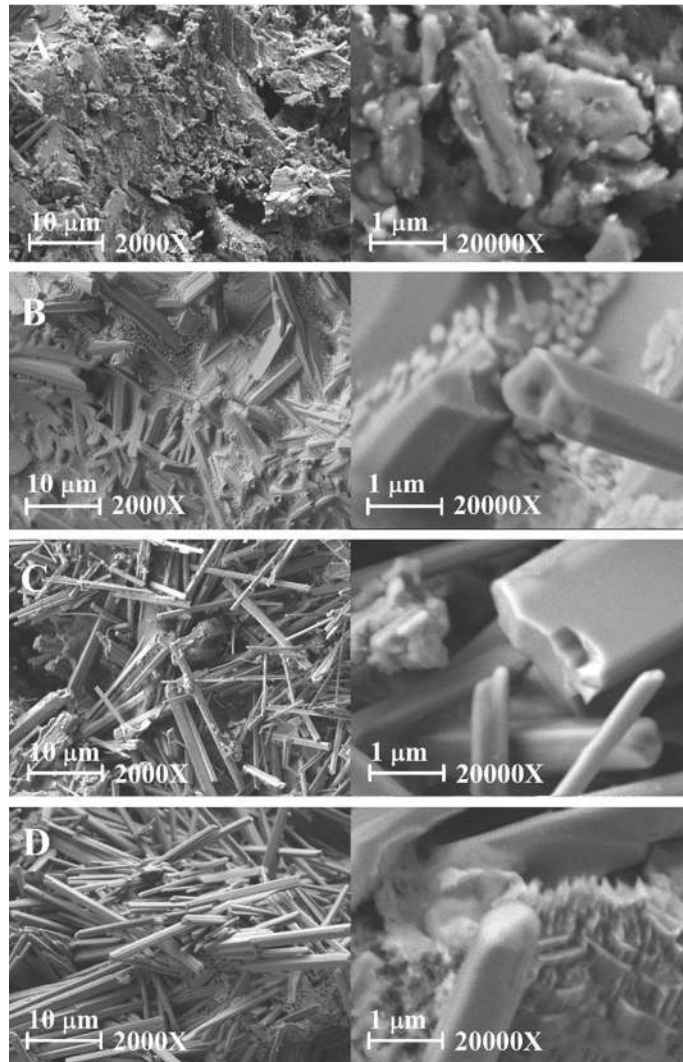


Figura 4.44 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 4(B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en suero sanguíneo de conejo.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Las muestras control fueron incubadas en fluido corporal simulado, siendo estas incubadas también durante 2, 4, 6 y 8 días, posteriores a los cuales se realizaron las pruebas de morfología, estructura y composición. Las pruebas de morfología (Figura 4.45) corresponden con lo reportado previamente, dando lugar a formación de hidroxiapatita en forma de micro-bigotes que se aglomeran en cuerpos semiesféricos de 10 micrómetros de diámetro, que a partir del día 8 recubren toda la superficie del material de forma homogénea sin obstruir los poros.

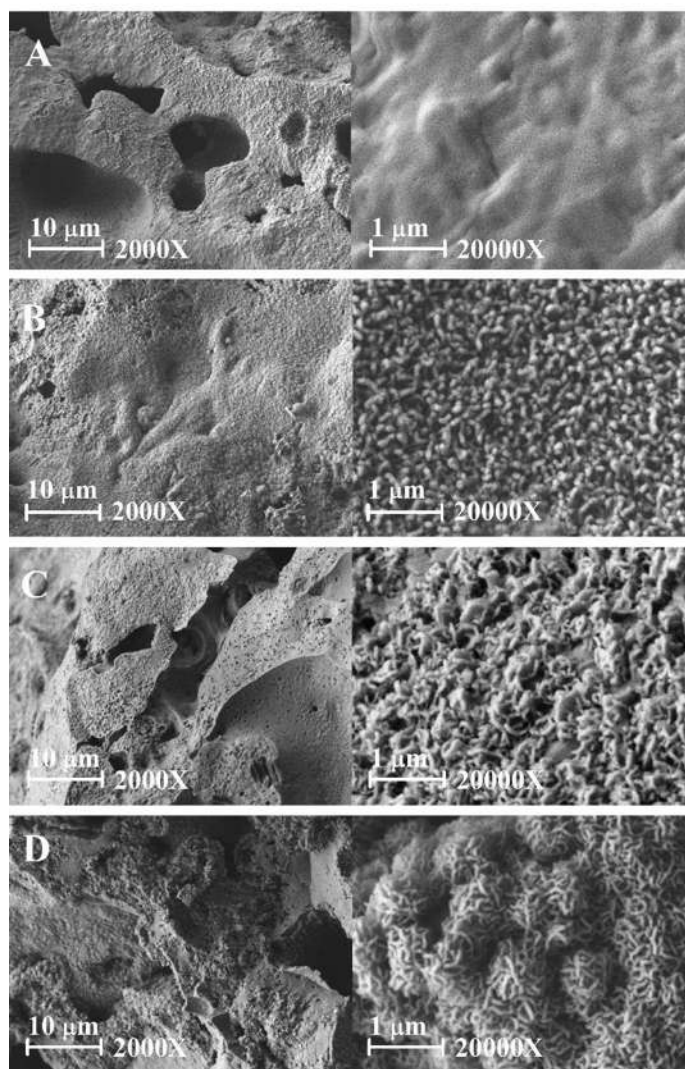


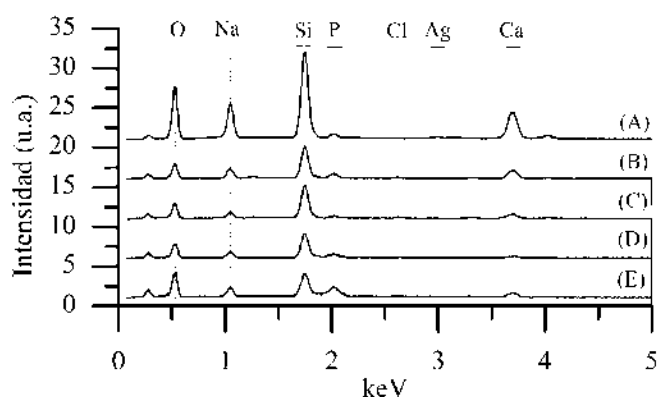
Figura 4.45 Micrografías (MEB) de las alicuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 4(B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en fluido corporal simulado.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

4.9.2 Caracterización semicuantitativa de energía dispersiva de rayos X.

En la Figura 4.46 se puede comparar la composición elemental del biovidrio antes y después de ser injertado en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo, en el panel A se muestran aquellas alicuotas de biovidrio poroso nanoestructurado, mientras que en el panel B se puede ver el control correspondiente al biovidrio no poroso. En ambos sistemas se puede observar que la proporción de silicio disminuye aunque no simultáneamente, ya que en el biovidrio poroso la disminución del silicio es más rápida con el subsecuente incremento de la fase de fósforo, mientras

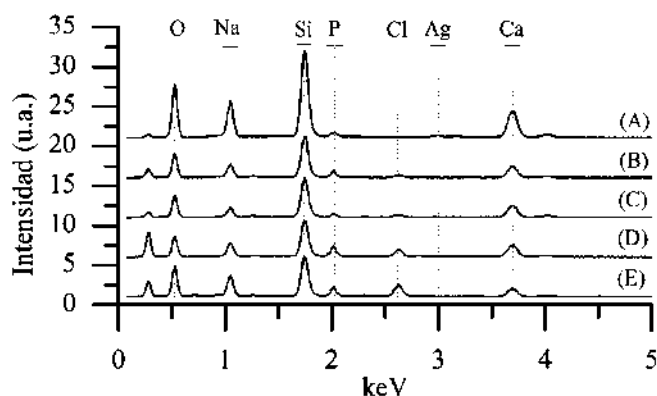
que en el biovidrio no poroso esto tarda por lo menos 8 días. Comparando estos resultados con las imágenes previas y el espectro EDS del estándar de hidroxiapatita se puede deducir que la hidrólisis que el biovidrio no poroso posee es igual para todos los elementos al no existir una modificación en las proporciones de la composición y no es sino hasta el octavo día cuando la hidroxiapatita forma una capa lo suficientemente representativa para modificar el espectro EDS.



Fracción	Día				
	0	2	3	4	5
Si (%)	42.82	47.87	52.31	48.74	41.8
Na (%)	25.85	14.85	16.81	13.51	15.13
Ca (%)	25.09	16.77	11.93	13.65	11.56
P (%)	4.52	13.88	12.91	17.99	23.6
Ag (%)	1.72	1.88	1.44	0.96	0.83
Cl (%)	0	4.72	4.6	4.11	7.04

Figura 4.46 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) y 5 (E) días de incubación en la membrana corialantoidea.

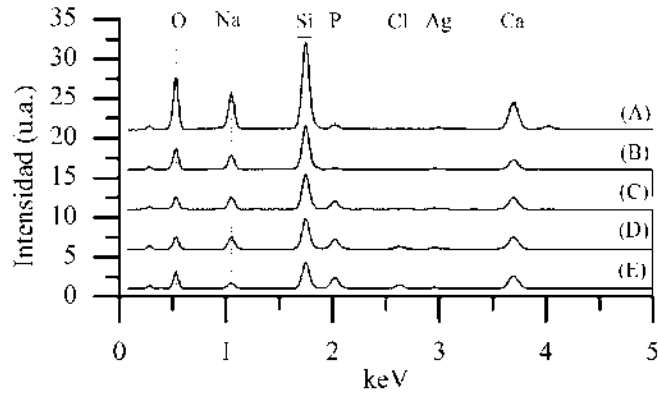
En aquellas muestras incubadas en suero sanguíneo de conejo el espectro de dispersión de electrones de rayos X muestra una evolución normal del material en la formación de hidroxiapatita, disminuyéndose la cantidad de silicio de la estructura e incrementándose la cantidad de fósforo y calcio, además de la aparición del pico de cloro correspondiente a la clorhidroxiapatita (Figura 4.47).



Fracción	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.82	48.09	49.97	41.96	40.78
Na (%)	25.85	14.58	12.2	14.74	18.31
Ca (%)	25.09	17.53	19.87	17.46	11.4
P (%)	4.52	13.76	14.32	15.3	15.35
Ag (%)	1.72	1.65	1.06	1.02	1.05
Cl (%)	0	4.39	3.58	9.52	13.08

Figura 4.47 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de incubación en suero sanguíneo de conejo.

Por otro lado, los espectros de dispersión de rayos X de las muestras control muestran la evolución de la composición del bioandamio con respecto al tiempo (Figura 4.48), siendo visible la disminución del pico correspondiente al silicio mientras que los picos característicos de la hidroxiapatita se incrementan y además aparece el pico correspondiente al cloro, que brinda indicios de la forma clorhidroxiapatita como la fase que se encuentra formándose en la superficie del bioandamio.



Fracción	Día				
	0	2	4	6	8
Si (%)	42.82	48.98	47.04	42.03	38.66
Na (%)	25.85	16.25	14.79	14.27	8.82
Ca (%)	25.09	16.2	20.59	21.46	23.67
P (%)	4.52	10.3	14.37	16.43	20.67
Ag (%)	1.72	1.59	1.5	1.04	0.95
Cl (%)	0	1.65	1.68	4.75	7.21

Figura 4.48 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 0 (A), 2 (B), 4 (C), 6 (D) y 8 (E) días de incubación en fluido corporal simulado.

4.9.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en fluido corporal simulado entre los andamios de biovidrio 45s5 nanoestructurado y el biovidrio 45s5 de síntesis tradicional en fluido corporal simulado y en la membrana corialantoidea.

En el caso de los bioandamios incubados en la membrana corialantoidea se encontró una buena formación de la fase de hidroxiapatita, cabe destacar que debido a que es un proceso que se realiza a temperatura ambiente el grado de cristalización es muy bajo debido a lo cual los picos se muestran achatados, lo cual corresponde con otros grupos de trabajo, los cuales reportan que a través de un tratamiento térmico logran refinar los ocho picos característicos de la hidroxiapatita, sin embargo, en este caso no es requerido debido a que se coincide en por lo menos 5 picos característicos y un tratamiento térmico puede alterar las características texturales de la muestra[175,176].

En la Figura 4.49 se puede observar la caracterización por difracción de rayos X de las muestras tras 8 días de incubación en suero de conejo (Figura 4.49 Panel C) y fluido corporal simulado (Figura 4.49 Panel D), debido al tiempo de incubación y a la composición de los medios de incubación el resultado es muy similar en ambas muestras permitiendo validar a ambos modelos

como adecuados para los ensayos de formación de hidroxiapatita, sin embargo, la morfología obtenida por medio del suero es muy distinta a la obtenida tanto por fluido corporal simulado como la que genera la membrana corialantoidea (Figura 4.49 Panel B), lo cual se debe a una concentración muy baja del ion carbonato en el medio [98,178,179].

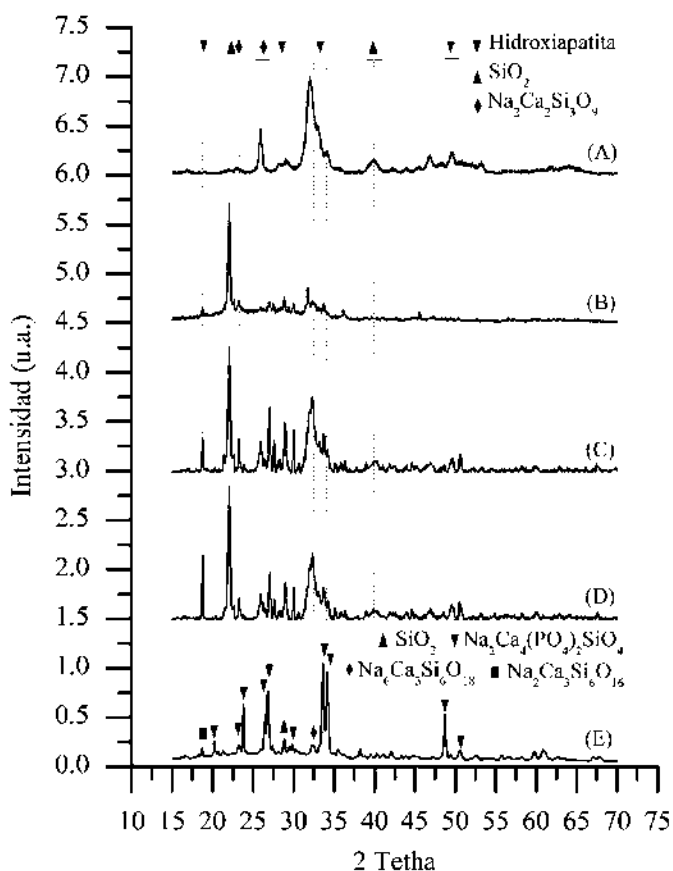


Figura 4.49 Difractogramas de rayos X de hidroxiapatita de origen porcino, andamios de biovidrio 45s5 elaborados a 700 °C y después de 8 días de incubación en la membrana corialantoidea (A), suero sanguíneo de conejo (B) y fluido corporal simulado (D), andamio de biovidrio sin tratamiento de incubación (E).

4.9.4 Modificaciones morfológicas en la fase de hidroxiapatita

Debido a las grandes diferencias en la estructura de la hidroxiapatita formada en la superficie del bioandamio se analizó el empleo de una atmósfera de CO₂ para corroborar si la morfología obtenida era en realidad debido a la falta de carbono en el medio, así se prepararon diferentes alícuotas que fueron incubadas durante 8 días (Figura 4.50), entre ellas se encuentra un control que corresponde

al uso del suero de conejo en atmósfera no controlada (Figura 4.50 Panel A), la incubación del medio simultáneamente con los bioandamios (Figura 4.50 Panel B) y la previa incubación del medio en atmósfera de CO₂ 5% durante dos días para posteriormente agregarse el bioandamio (Figura 4.50 Panel C).

En las micrografías es posible observar la formación de hidroxiapatita en todos los paneles, sin embargo, sí existen diferencias en la morfología ya que en aquellas muestras que fueron incubadas en atmósfera no controlada el crecimiento en forma de columnas se repitió como en la Figura 4.26, mientras que en las muestras que se trataron sin la previa incubación del suero en una atmósfera de CO₂ 5% (Figura 4.50 Panel B), se encontró que existe una tendencia a la formación de columnas que se ve frenada posiblemente debido a la absorción del dióxido de carbono en el suero de conejo, en aquellos sistemas donde se permitió al suero estar dos días incubándose en una atmósfera de CO₂ 5%, la morfología obtenida corresponde con la denominada coliflor, que a su vez se encuentra formada por micro-bigotes, con la diferencia de que se generan aglomerados de diámetros superiores al micrómetro.

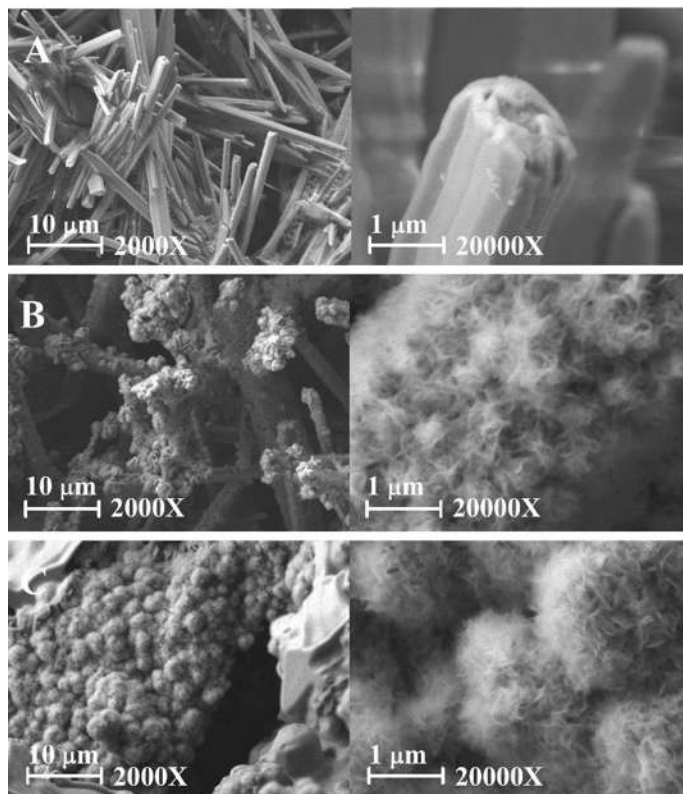


Figura 4.50 Micrografías (MEB) de bioandamios elaborados a 700 °C después de 8 días de incubación en suero sanguíneo de conejo (A), incubación en suero sanguíneo en atmósfera controlada con 5% de CO₂ (B) e incubación en suero sanguíneo previamente incubado 24 horas en atmósfera controlada con 5% de CO₂.

Las muestras incubadas en atmósfera no controlada son comparables con trabajos previos de otros autores, donde debido a la falta de carbonato en el medio es que se pierde la morfología común que adquiere la hidroxiapatita [98,178,179], sin embargo, se ha comprobado que es posible restaurar esta morfología agregando una atmósfera controlada, comprobando la utilidad del suero de conejo en la determinación *in vitro* de la bioactividad de materiales como el biovidrio.

Los análisis composicionales semicuantitativos indican leves variaciones en las proporciones de los elementos que conforman al bioandamio y a la nueva fase producida, en todas las alícuotas el pico correspondiente a la plata se ve reducido indicando que, efectivamente, se han liberado iones de esta al medio, el pico de silicio también se ve reducido lo que indica una hidrólisis parcial de la estructura, los picos de sodio y calcio no se ven incrementados, mientras que el pico de fósforo sí,

indicando que es posible que tanto el sodio como el calcio estén siendo secuestrados, sin embargo, el pico de fósforo indica una correcta condensación de la fase hidroxiapatita (Figura 4.51).

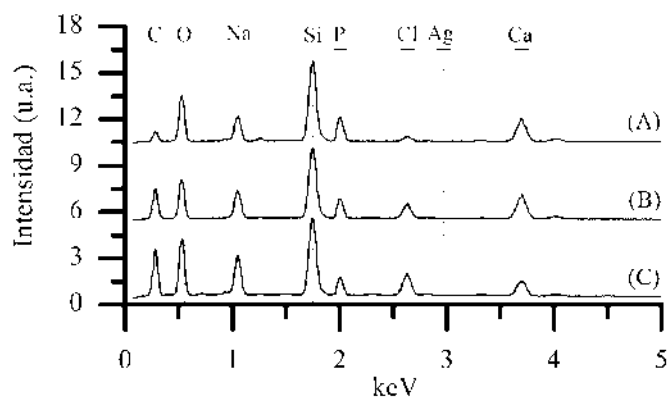


Figura 4.51 Ensayos semicuantitativos de composición EDS de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio inmersos en plasma de conejo por 8 días e incubadas en: atmósfera no controlada (A), atmósfera controlada con 5% de CO₂ (B) y atmósfera controlada con plasma de conejo previamente incubado durante 24 horas también en atmósfera controlada con 5% de CO₂ (C).

No obstante aunque se ha demostrado la formación de una fase que es congruente con la morfología de la clorhidroxiapatita, es necesario corroborar la presencia de esta fase empleando difracción de rayos X (Figura 4.52), donde se pueden observar al menos 4 picos de los 8 picos característicos que presenta la hidroxiapatita (Figura 4.52 Panel A), indicando que no existe una diferencia en la identidad de la fase que se está obteniendo, sino que el efecto es meramente morfológico y se sigue obteniendo hidroxiapatita como producto de las reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren en la superficie del bioandamio.

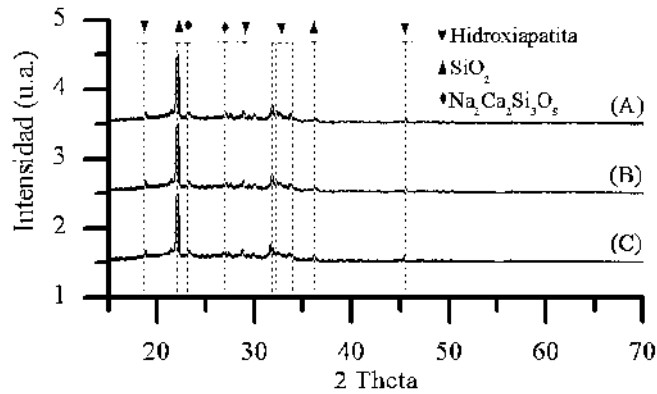


Figura 4.52 Difractogramas de rayos X de andamios las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio inmersos en plasma de conejo por 8 días e incubadas en: atmosfera no controlada (A), atmósfera controlada con 5% de CO₂ (B) y atmósfera controlada con plasma de conejo previamente incubado durante 24 horas también en atmósfera controlada con 5% de CO₂ (C).

4.10 Ensayos de citotoxicidad

Los ensayos de citotoxicidad se elaboraron mediante la cuantificación de la absorción generada del producto del metabolismo mediante el reactivo MTT, para ello se empleó una línea celular denominada como RPMI 8226, correspondiente a linfocitos B, responsables de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Debido a la naturaleza biocompatible del material se realizaron las pruebas por cuadruplicado en el rango de concentración máximo de suspensión del material, siendo de 32 mg/mL a fin de apreciar la actividad citotóxica del material sobre las células, manejándose como rango mínimo 1 mg/mL ya que a concentraciones más bajas no se ha observado este efecto citotóxico [180,181], estos fueron tratamientos fueron ajustados a un volumen de 200 microlitros en placas de 96 pocillos, donde cada pocillo a su vez contiene 10000 células RPMI 8226, siendo ajustada esta concentración a partir del uso del método de conteo con cámara de Neubauer y ajustes en los volúmenes para asegurar el número de células en cada alícuota. Los datos se analizaron mediante el software GraphPad PRISM donde se analizaron aplicando una prueba ANOVA de una vía y análisis de pares con la prueba de Tukey, para determinar la similitud estadística de los diferentes tratamientos en la viabilidad celular-

En la Figura 4.53 se puede observar los diferentes efectos citotóxicos del biovidrio en la viabilidad de las células alcanzándose en algunos casos (Figura 4.53 Panel A) la mitad de la muerte de las células en 24 horas en el tratamiento con la concentración más alta, siendo las concentraciones de

1 mg/mL a 18 mg/mL estadísticamente iguales, mientras que en el caso del biovidrio adicionado con plata (Figura 4.53 Panel C y D) es posible determinar estadísticamente que las concentraciones de 2 a 8 mg/mL no son estadísticamente diferentes, mientras que 1mg/mL no hay cambio con respecto al control y a partir de 16 mg/mL efectivamente se presentan diferencias; sin embargo, a pesar de la alta concentración no se alcanzó a matar al 50% de la población celular, esto debido a la naturaleza no tóxica del material. Posteriormente, a 72 horas de incubación de las células con el material, comienza una etapa de proliferación donde las células RPMI se reproducen una vez adaptadas al nuevo medio, en ambos casos se ve un incremento en la absorción indicando que incluso en las concentraciones más altas, las células pueden adaptarse y reproducirse, resultados similares fueron reportados en el 2011 siendo posible la recuperación de la densidad poblacional celular [181].

Los mismos ensayos se elaboraron para el biovidrio nanoestructurado (Figura 4.53 Panel E y F) y biovidrio nanoestructurado adicionado con 1.75% de plata (Figura 4.53 Panel G y H) obtenidos a través del secado por aspersión. En la figura 4.53 Panel E se puede observar de forma generalizada que el efecto citotóxico aumenta mientras se incrementa la cantidad de biovidrio nanoestructurado en el medio, pero a 72 horas de cultivo esta diferencia se vuelve mínima al no existir diferencias estadísticas en la mayoría de los tratamientos (exceptuando la concentración a 16 mg/mL), paralelamente en la figura 4.53 Gy H se encontró un efecto interesante en la respuesta citotóxica, siendo más tóxico en las concentraciones de biovidrio más bajas y más altas (1 y 32 mg/mL), demostrándose un efecto casi nulo que en el tratamiento a 2 mg/mL mientras que en las concentraciones del rango de 4 a 16 mg/mL (entre los cuales no existe una diferencia estadística significativa) se ve una leve disminución en la viabilidad, esto es debido en parte a un proceso de aglomeración que sucede en concentraciones más altas (disminuyendo el área superficial estadística) mientras que en la concentración más baja esto no sucede dando lugar a una citotoxicidad mayor, no obstante, aunque se manejan concentraciones que se encuentran cercanas al límite de la solubilidad, a penas en las más altas se puede alcanzar a mermar un 50% de las células depositadas en los pocillos. Del mismo modo que en el experimento previo y lo reportado por otros autores, es posible observar como existe una pronta recuperación en cuanto a la viabilidad celular y la capacidad metabólica que poseen para procesar el reactivo MTT, siendo viable el desarrollo de las células una vez que están se han acoplado al medio y las condiciones de crecimiento nuevas, determinándose a este material dentro del rango de levemente tóxico [182].

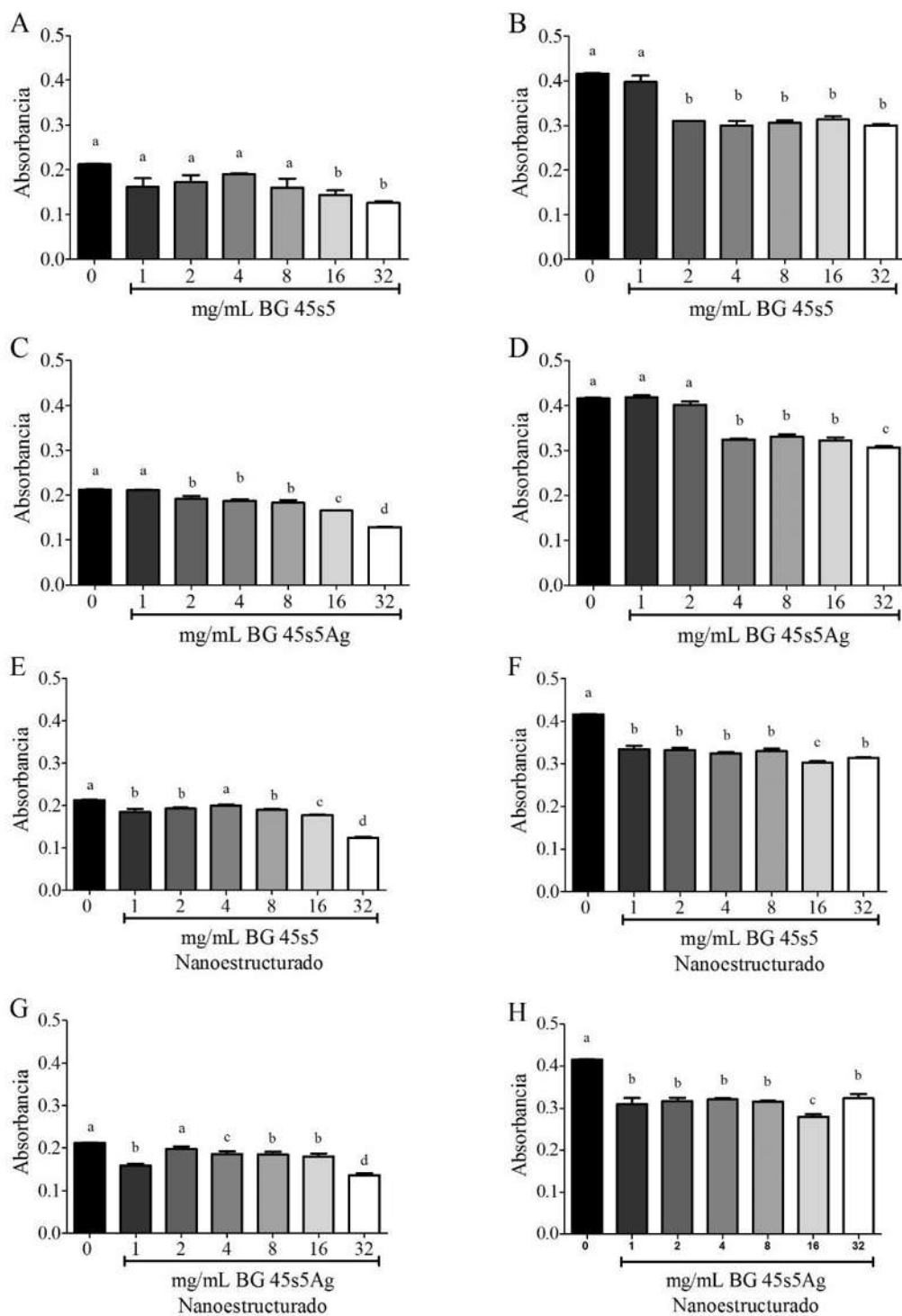


Figura 4.53 Viabilidad y proliferación de las células RPMI 8226 tratadas con diferentes biovidrio particulados. A y B) BG 45s5 a 24 y 72 h; C y D) BG 45s5Ag a 24 y 72 h; E y F) BG 45s5 Nanoestructurado a 24 y 72 h y G y H) BG 45s5Ag Nanoestructurado a 24 y 72 h.

4.11 Actividad angiogénica

Dentro de la ingeniería de tejido una de las principales limitantes es la inducción de un rápido desarrollo vascular que sea capaz de generar un entorno adecuado dentro de los injertos miméticos de hueso, ya que sólo de este modo es posible que los andamios sean poblados por células; debido principalmente a la necesidad del flujo de oxígeno y nutrientes, ya que tras la implantación en un ser vivo, cuando el andamio ha sido previamente poblado de forma *in vitro* con células compatibles, éstas no podrán sobrevivir si no se encuentran cercanas a vasos sanguíneos.

En la Figura 4.54 se puede observar el efecto del biovidrio en el desarrollo de la red capilar que conforma a la membrana corialantoidea, específicamente en la Figura 4.54 Panel E es posible observar la existencia de un mayor número de ramificaciones en la red capilar de los embriones con respecto al control (Figura 4.54 Panel A) donde no se colocó ninguna cantidad de biovidrio, siendo mayor el número de ramificaciones en la red conforme se incrementó la cantidad de biovidrio adicionada al embrión siendo el tratamiento con la mayor dosis (0.02 miligramos) de biovidrio el que dio lugar a la red capilar más ramificada, sin embargo debido a que el biovidrio fue suministrado en forma de suspensión, no es posible determinar si existe o no una respuesta inflamatoria por parte del embrión, ante lo cual un sistema *ex ovo* podría solucionar esta interrogante, en comparación con trabajos similares donde otros grupos de trabajo han intentado determinar el mecanismo mediante el cual el biovidrio logra estimular la angiogénesis, estos han brindado un panorama relativamente completo sobre que moléculas se encuentran relacionadas con la respuesta neoangiogénica estimulada por el biovidrio, entre las cuales destacan el factor de crecimiento vascular endotelial y el factor de crecimiento básico de fibroblastos, entre otros. Así, el efecto angiogénico y osteogénico se ve incrementado debido a los diferentes iones que se generan a partir de la hidrólisis del bioandamio, donde todos los iones incluido el silicio dan como resultado respuestas benéficas en el organismo en que se injertan [61,164,183,184].

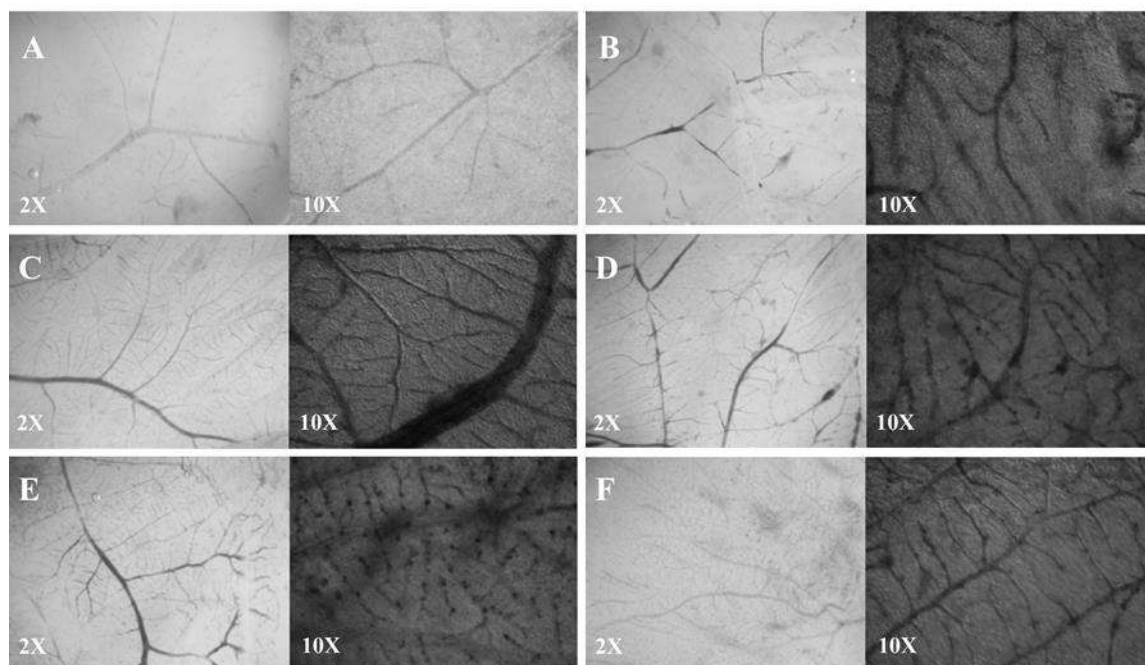


Figura 4.54 Imágenes de la membrana corialantoidea de embriones de pollo después de quince días de fertilización y 5 días de tratamiento. Sin adición de biovidrio (A) y con 0.008 mg (B), 0.011 mg (C), 0.014 mg (D), 0.017 mg (E) y 0.02 (F) mg de biovidrio 45s5Ag por cada 60 gramos de peso total. Izquierda 2X aumentos y derecha 10X aumentos.

Se elaboró un análisis de imagen donde se convirtieron las imágenes a 10X aumentos a un formato de 8 bits en escala de grises, dichas imágenes fueron tratadas mediante el software ImageJ para mostrar un sesgado en modo binario, donde se puede determinar con certeza el área superficial que ocupan los vasos capilares al contrastarse con un fondo blanco correspondiente a la zona libre de estos, se realizó la cuantificación por área empleando la escala correspondiente en un área delimitada por un círculo de un centímetro de diámetro (0.7854 cm^2), esta área se expresa en porcentaje dando lugar a una interpretación cuantitativa de la saturación de la membrana mediante vasos capilares (Figura 4.55). En el análisis se pueden observar diferencias estadísticamente significativas, elaboradas mediante un ANOVA de una vía y un análisis por pares mediante el método Tukey, en este se puede apreciar que las muestras control difieren de las muestras que se sometieron de forma indirecta al biovidrio 45s5, es decir, que aunque no se colocaron embebidas dentro del implante sí se encontraban en contacto al estar suspendido el material en las proximidades, se puede determinar también que existe una diferencia significativa en el efecto de

las diferentes concentraciones de biovidrio hasta que se alcanza un equilibrio a partir de 0.017 mg de biovidrio por cada 60 gramos de embrión, es decir, el efecto se torna constante y no existe variación, indicando que este ha alcanzado su máxima capacidad en la estimulación de vasos capilares. Dichos resultado muestran correspondencia con otros trabajos, donde se han encontrado valores para las muestras control alrededor del 15% [185], además, el porcentaje máximo alcanzado de densidad celular de 65.13% corresponde también con trabajos previamente reportados por otros investigadores, donde se han demostrado porcentajes de hasta 49% para materiales como el biovidrio 45s5 nano-particulado [186], este tipo de ensayos permite también determinar si existe un efecto adverso en el desarrollo de la red vascular, siendo posible determinarse no solo porcentajes de incremento en la densidad sino también el grado de inhibición de un tratamiento en específico [183], aunque debido a la naturaleza no citotóxica del biovidrio 45s5, esto no es observable.

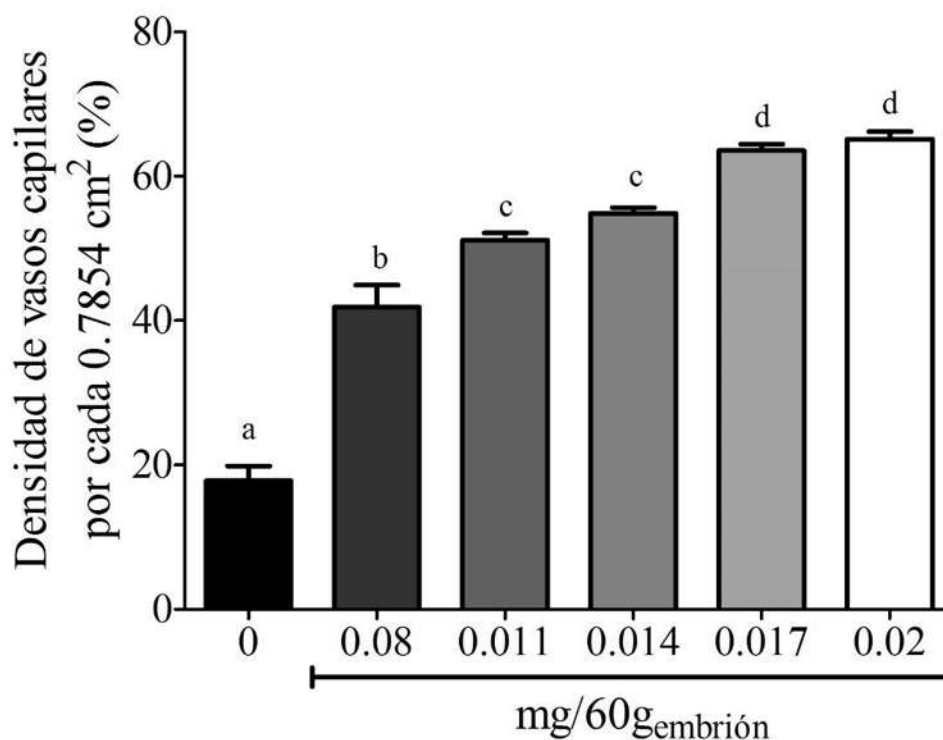


Figura 4.55 Análisis de la densidad de los vasos capilares en la membrana corialantoidea de embriones de pollo después de quince días de fertilización y 5 días de tratamiento con biovidrio 45s5Ag a diferentes concentraciones.

4.12 Biofuncionalización de la superficie de los andamios miméticos de biovidrio 45s5.

Una parte muy importante del diseño de bioandamios es la posibilidad de la biofuncionalización a través de biomoléculas que pueden ser adicionadas para así generar una acción específica en el microentorno del material. Siendo dos de las biomoléculas más importantes para el desarrollo del tejido óseo la vitamina D (colecalfiferol) y el colágeno tipo I.

La vitamina D3 en particular actúa como modulador en la absorción de calcio y fósforo, es también requerida por los osteoblastos y osteoclastos para el crecimiento y remodelación del tejido óseo, sin una cantidad adecuada de vitamina D3 los huesos se vuelven delgados y quebradizos. Además se atribuyen propiedades antiinflamatorias y de modulación del sistema inmune [187]. La bioactividad que la vitamina D3 posee se debe a su interacción con el receptor VDR (receptor de calcitriol), activando vías de señalización relacionadas con la diferenciación y crecimiento, algunas de las proteínas cuya expresión es inducida son la osteocalcina, fosfatasa alcalina, procolágeno tipo I, TGF β y IGF-I entre otras. Además, se ha demostrado el efecto de esta vitamina en el incremento de la actividad de las bombas de calcio de la membrana de los osteoblastos, induciendo la asimilación de calcio que es tan necesaria para la mineralización ósea. La vitamina D3 se encuentra ligada al mantenimiento de los niveles de calcio y fósforo a través de la resorción del hueso, generando esta resorción al estimular la diferenciación de células osteogénicas en osteoclastos y además estimular la actividad osteoclástica; esta función de resorción aún no ha sido dilucidada por completo por lo que se ha propuesto que su estimulación está ligada a factores específicos secretados por osteoblastos y la expresión de un receptor de calcitonina que es regulado por la presencia de vitamina D3, siendo la calcitonina producida en la glándula tiroidea para disminuir la actividad y número de osteoclastos [188,189]. A partir de un software especializado en cuantificación de áreas, se logró determinar el porcentaje del área superficial que se encuentra cubierta por vitamina D3 y colágeno tipo I. en los bioandamios sintetizados de biovidrio se puede observar un límite en cuanto a la cantidad de vitamina D3 que se puede fijar en la superficie, logrando cubrir solamente el 63% de la superficie total del bioandamio en el medio de incubación con una mayor concentración de la vitamina (Figura 4.56) aunque alcanzándose un nivel de cubrimiento similar desde la solución de vitamina D3 con una concentración de 0.1 gramos por mililitro. Estos ensayos se llevaron a cabo en un buffer de fosfatos con pH fisiológico, para simular las condiciones en que se encontrará en el cuerpo humano. En trabajos semejantes se ha realizado la incorporación de vitamina E en películas, donde han funcionado adecuadamente favoreciendo

la adhesión de proteínas y células, además de que favorece la teoría de que el andamio de biovidrio puede ser optimizado al agregar estos inductores directos de la osteogénesis, en contraste la síntesis de películas con vitamina E incrustada permite un limitado porcentaje de sustitución debido a que altera la estructura de la película formada, mientras que en la técnica que se empleó para la adición de la vitamina D3 en el biovidrio no altera la estructura tridimensional y permite su completa disposición en la superficie, permitiendo recubrir un gran porcentaje del área superficial total [190].

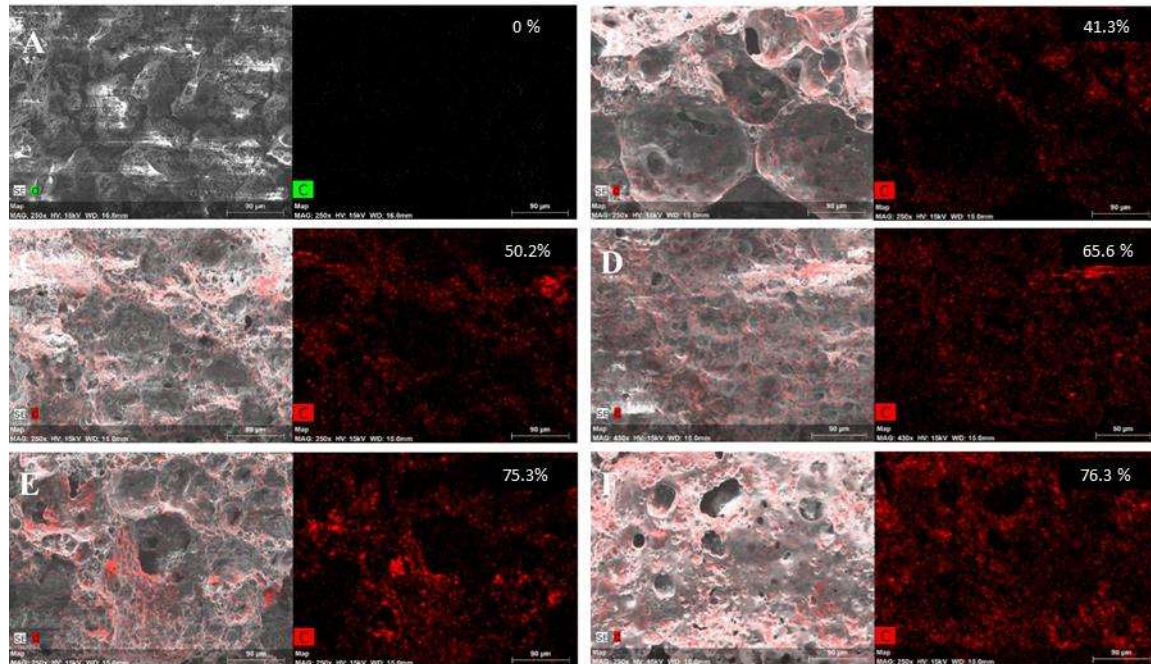


Figura 4.56 Mapeos EDS en el biovidrio biofuncionalizado con soluciones de vitamina D3 a 0.00 mg/mL, 0.005 mg/mL (B), 0.01 mg/mL (C), 0.015 mg/mL (D), 0.02 mg/mL (E) y 0.03 mg/mL (F).

La mineralización del calcio por parte de los osteoblastos también se encuentra modulada por receptores tipo integrina, los cuales se pueden activar a través de su interacción con diferentes sustratos, ya sean biopolímeros como el colágeno o incluso poliésteres, así, la adición de colágeno en la superficie del bioandamio puede acelerar el proceso de formación de hidroxiapatita, al no requerir de la preproducción de este biopolímero por parte de células adyacentes. Además, la adición de colágeno en la superficie del biomaterial (Figura 4.57) permite una mejor adhesión al generar un microentorno más amigable con las células, favoreciendo así que las células sembradas

en el andamio se retengan dentro de la estructura [191,192]. En trabajos previos, donde se emplea al colágeno como matriz y andamio, se obtienen buenos resultados en cuanto la formación del hueso nuevo, sin embargo, la producción del tejido óseo se ve limitada nuevamente por la disposición de iones de calcio y fósforo en sangre, por lo cual la disposición de bioandamios integrales puede ser viable para acelerar el proceso de reconstrucción ósea, no obstante, la adición del colágeno se ve afectada por la interacción entre las mismas cadenas de colágeno debido a lo cual se generan aglomerados de estas, limitando el área del andamio que pueden cubrir, limitándose a cubrir solamente el 76% del área total del andamio y observándose como estos se disponen en áreas específicas y no homogéneamente como lo es el caso de la vitamina D3, alcanzándose la máxima área cubierta en las muestras incubadas con colágeno en una concentración de 2.25% (Figura 57).

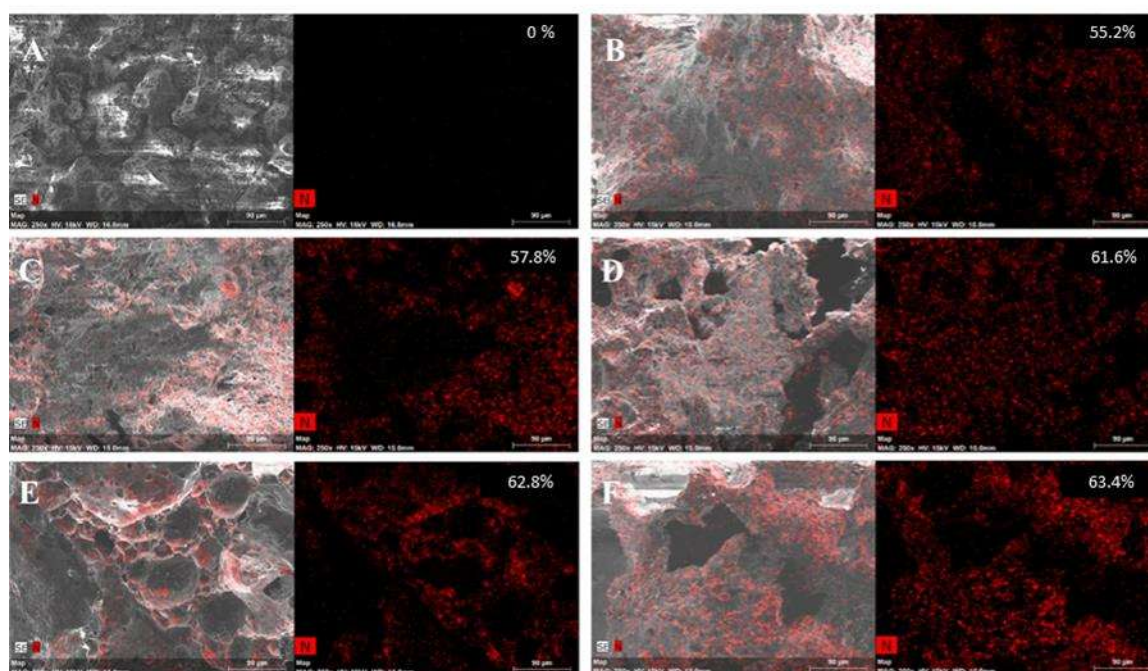


Figura 4.57 Mapeos EDS en el biovidrio biofuncionalizado con colágeno a =.0% (A), 0.3% (B), 0.75% (C), 1.5 % (D), 2.25 % (E) y 3 % (F).

En los análisis de espectro infrarrojo (Figura 4.50 A) se pueden observar las bandas principales del colágeno a 1650, 1560 y 1235 cm^{-1} , que corresponden a amidas propias de la estructura primaria del colágeno. La posición de absorción de la Amida Primaria en 1620 cm^{-1} se debe a las interacciones entre esta con un grupo C-O, correspondiente con el enlace peptídico que se encarga

de enlazar los aminoácidos que conforman al colágeno específicamente en el extremo amino terminal de cada cadena de colágeno, la absorción de la banda a 1560 cm^{-1} nuevamente corresponde a la proximidad de un grupo funcional C-N con un N-H, que correspondería a los enlaces peptídicos que se encuentran formando al resto de la cadena de colágeno, al igual que el pico en la banda a 1235 cm^{-1} , sin embargo este es más complicado de analizar debido a que se ve influenciado también por la proximidad con grupos CH_2 , los cuales se relacionan con la estructura de la prolina y glicina, que se encuentran en la secuencia del colágeno[192,193]. En el espectro infrarrojo del biovidrio biofuncionalizado con colecalciferol (Figura 4.58 B) se exhiben las crestas correspondientes a 1670 cm^{-1} , que indican la presencia de dobles enlaces entre carbonos, de los cuales el colecalciferol posee 4, mientras que la banda localizada a 813 cm^{-1} corresponde con la presencia de anillos aromáticos, específicamente a un ciclo alcano de seis carbonos con 3 sustituciones, del cual la molécula de vitamina D3 posee dos en su estructura, sin embargo el ruido en la cresta puede deberse a que la misma estructura de la molécula contiene otro anillo aromático de 5 carbonos; además, en 1021 y 1305 cm^{-1} se pueden encontrar las bandas correspondientes a enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno respectivamente los cuales se encuentran relacionados con las cadenas alifáticas y un grupo hidroxilo que se conforman la estructura molecular de la misma molécula [194,195]. Se debe recordar que al tratarse de un recubrimiento es posible ver indicios del material que se encuentra debajo, es decir, el biovidrio debido a lo cual se ve un comportamiento similar en las tres curvas que denota la presencia de grupos Si-O-Si.

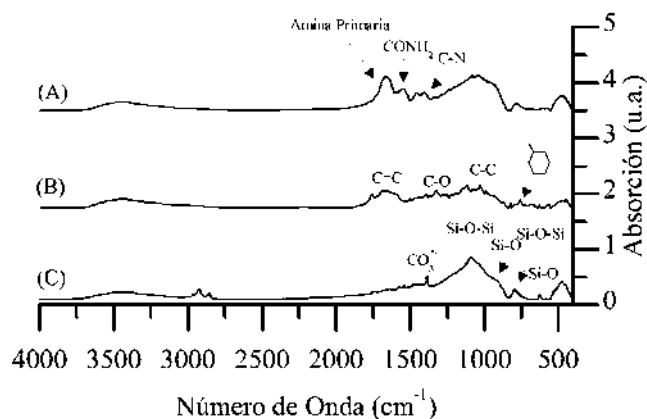


Figura 4.58 Espectros de infrarrojo de biovidrio 45s5 biofuncionalizado con colágeno (A), biovidrio biofuncionalizado con colecalciferol (B) y biovidrio sin biofuncionalizar (C).

4.13 Efecto de la biofuncionalización con vitamina D3 y colágeno tipo I en la bioactividad del biovidrio 45s5 nanoestructurado

Una serie de alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio biofuncionalizadas y un control sin biofuncionalizar fueron incubadas por un periodo de 8 días en fluido corporal simulado, estas muestras fueron incubadas a 37 grados centígrados de forma estática, en total ausencia de luz. El fluido corporal simulado fue cambiado cada 24 horas y para recuperar los injertos fueron realizados una serie de tres lavados con agua desionizada, agitando levemente y decantando el agua de lavado y posteriormente fueron secados a temperatura ambiente. Simultáneamente, un segundo grupo de alícuotas del mismo bioandamio y con las mismas características de biofuncionalización fueron injertadas en la membrana corialantoidea de embriones de pollo con 8 días de gestación, estos fueron mantenidos a una temperatura constante de 37 °C de forma estática y una humedad relativa de 50%. Una vez culminado el tiempo de incubación se recuperaron las alícuotas y se realizaron una serie de lavados consistentes de tres etapas con 10 mililitros de agua desionizada, dos etapas con 10 mililitros de etanol 20% v/v y nuevamente tres lavados con 10 mililitros de agua desionizada, agitando levemente y decantando el agua de lavado para ser secadas a temperatura ambiente. Ambos grupos de muestras se caracterizaron a partir de microscopía electrónica de barrido, análisis EDS, determinación del espectro infrarrojo y difracción de rayos X.

4.13.1 Caracterización morfológica de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y colágeno tipo I

En la Figura 4.59, es posible ver la evolución del bioandamio mimético de biovidrio sin biofuncionalizar tras ser insertado en un sistema *in ovo*, donde se puede observar la formación de aglomerados de hidroxapatita, que también pueden ser llamados nódulos. En el panel A de esta figura se puede observar como en el día dos de tratamiento ya existen nódulos en la superficie del material de aproximadamente 1 micrómetro de diámetro, cabe resaltar que el análisis de microscopía se realizó buscando las zonas internas de poros más homogéneas donde este efecto pueda ser apreciado de mejor forma. A tres días tras su implantación se puede observar en la imagen a 20,000 aumentos (Figura 4.59 Panel B) que se comienzan a formar los primeros agregados de hidroxapatita, pero no es hasta el día 4 que estos comienzan a aglomerarse en forma de esferas (Figura 4.59 Panel C). Sin embargo, es hasta el día 5 cuando estos agregados han formado una capa considerable siendo fácilmente identificada la fase de hidroxapatita desde 2000 aumentos (Figura

4.59 Panel D), no obstante, a 20000 aumentos se puede encontrar que esta capa se encuentra formada por esferas con diámetros de entre 2 y 30 micrómetros.

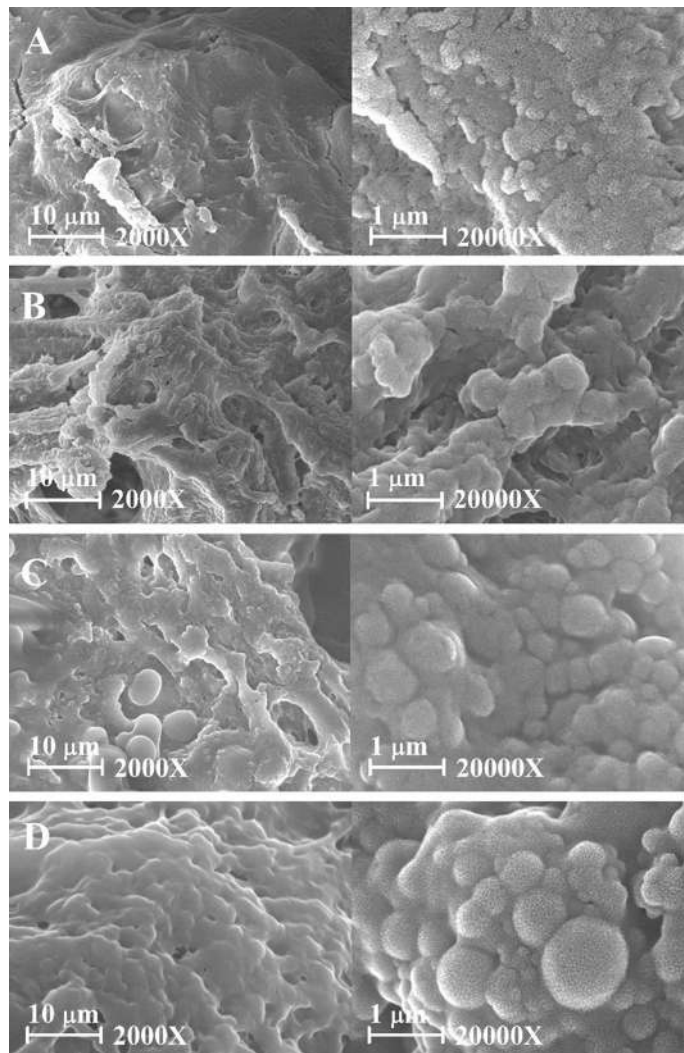


Figura 4.59 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea.

Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Aquellas muestras que han sido biofuncionalizadas muestran una formación muy similar de la fase de hidroxapatita, específicamente las muestras biofuncionalizadas con colágeno tipo I (Figura 4.60) desarrollaron una serie de pequeñas esferas de hidroxapatita en la superficie con un diámetro menor a 1 micrómetro en el día dos de implantación (Figura 4.60 Panel A), cuya evolución da lugar a la formación de aglomerados mayores hasta formar algo similar a un recubrimiento de superficie

parcialmente homogénea (Figura 4.60 Panel D), conformada de pequeñas esferas unidas por cuellos amplios, cuyo crecimiento se puede observar en los días 3 y 4 (Figura 4.60 Panel B y C) hasta prácticamente recubrir la superficie del interior del poro en el bioandamio.

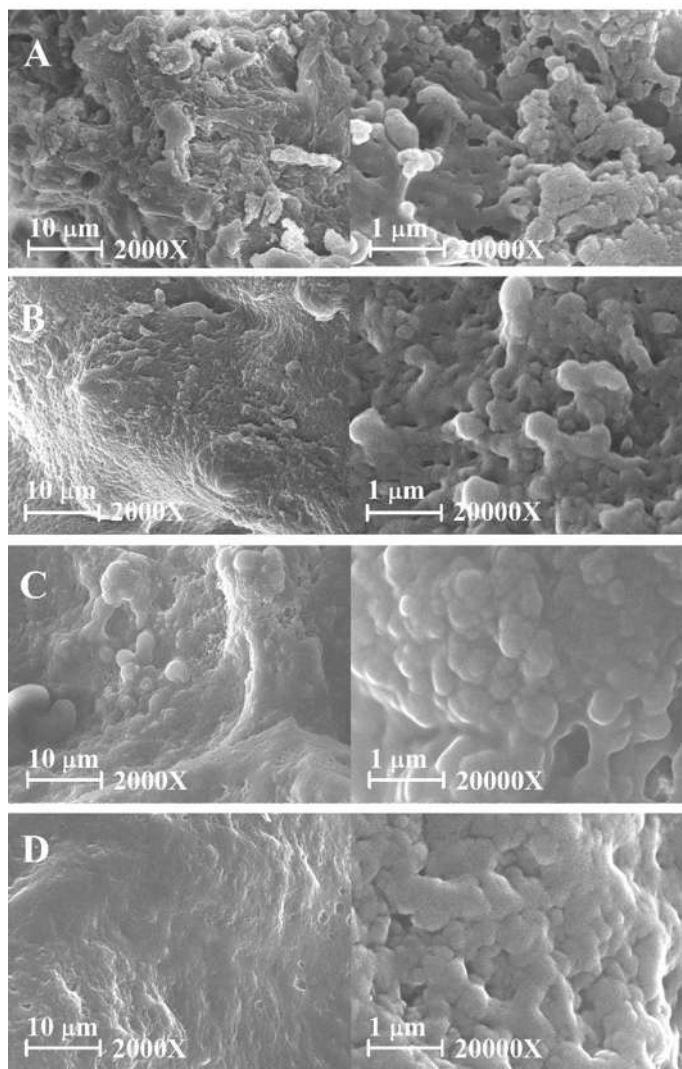


Figura 4.60. Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con colágeno tipo I después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Las muestras biofuncionalizadas con vitamina D3 (Figura 4.61) dan lugar a formaciones de hidroxiapatita heterogéneas, es decir, no forman un recubrimiento de hidroxiapatita medianamente liso sino que de forma similar al control, la hidroxiapatita se localiza en forma de agregados, donde

a partir del día 2 (Figura 4.61 Panel A) es posible observar la formación de nódulos, que a su vez dan lugar a la formación de microesferas de hidroxiapatita cada vez más cercanas entre sí (Figura 4.61 Panel B), cuyo crecimiento se ve reflejado en la aparición de microesferas aglomeradas entre sí en forma de cúmulos que se encuentran ubicados sobre la superficie de los poros (Figura 4.61 Panel D).

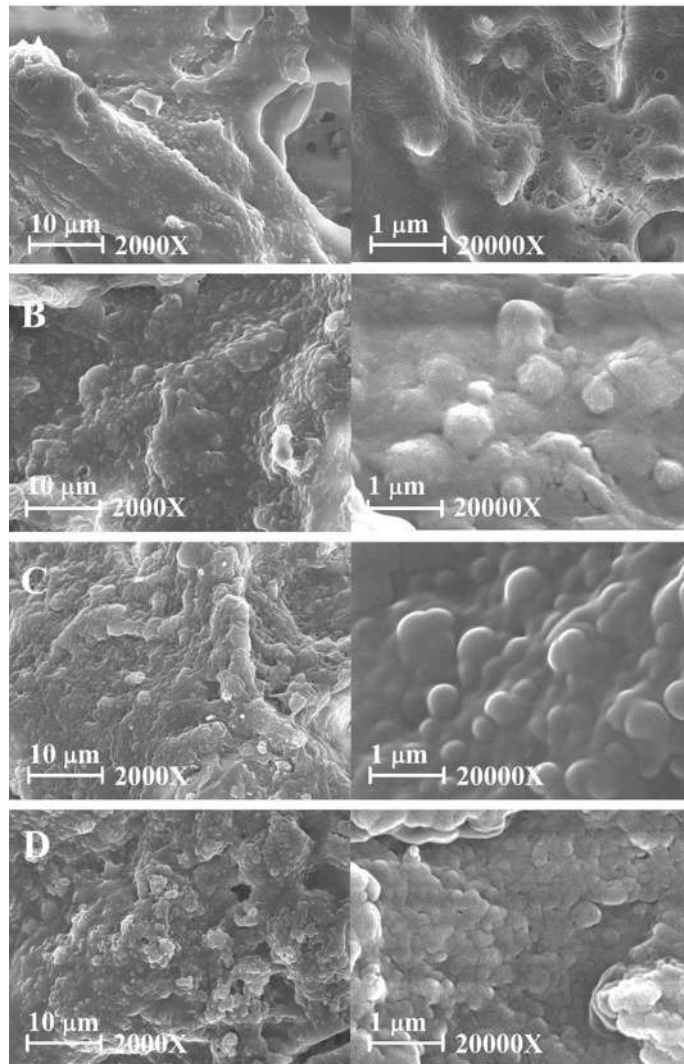


Figura 4.61 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con vitamina D3 después de 2 (A), 3 (B), 4 (C) y 5 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

Este tipo de resultados contrastan con trabajos previos de otros autores que reportan que el biovidrio al ser injertado en un sistema *in ovo*, es hidrolizado pero no se da el fenómeno de condensación de la hidroxiapatita y por lo tanto, no hay formación de nódulos, debido a que los iones de calcio y fosforo son monopolizados por la formación del sistema óseo del embrión, es decir, el proceso de hidrolisis funciona pero el organismo vivo no permite que estos iones lleven a cabo la formación/deposición de hidroxiapatita sobre el biomaterial. Este efecto se debe principalmente a que, en la búsqueda de un material eficiente, se han alcanzado porosidades de 90% o incluso mayores, lo cual en un sistema *in vitro* funciona eficientemente para la formación óptima de la hidroxiapatita pero en un sistema *in vivo* o *in ovo*, esta bioactividad se ve mermada debido a que esta alta área superficial da lugar a una rápida hidrolisis pero limita el espacio en el cuál puede condensarse, que en conjunto con un sistema dinámico capaz de secuestrar los iones tan necesarios para la formación de la hidroxiapatita, hace que el biovidrio pierda la bioactividad [120,177].

En los ensayos control correspondientes al bioandamio mimético de biovidrio sin funcionalizar en fluido corporal simulado (Figura 4.62), la formación de aglomerados de hidroxiapatita ocurre como se reporta en diferentes trabajos realizados por otros investigadores, con una aglomeración de la hidroxiapatita que mantiene la forma de aglomerados pequeños conformados por microbigotes que en conjunto dan lugar a construcciones esféricas. En el biovidrio sin biofuncionalizar tras dos días de incubación en el fluido corporal simulado (Figura 4.62 Panel A) la formación de hidroxiapatita no es tan representativa como en el sistema *in ovo* aunque en el día 4 (Figura 4.62 Panel B) es posible ver una gran cantidad de pequeñas aglomeraciones, pero no es sino a partir del día 6 (Figura 4.62 Panel C) cuando inicia la aglomeración de la hidroxiapatita en la superficie del biovidrio que comienza sin un orden aparente, pero que hacia el día 8 (Figura 4.62 Panel D) ya se ve definida en la configuración denominada “coliflor”.

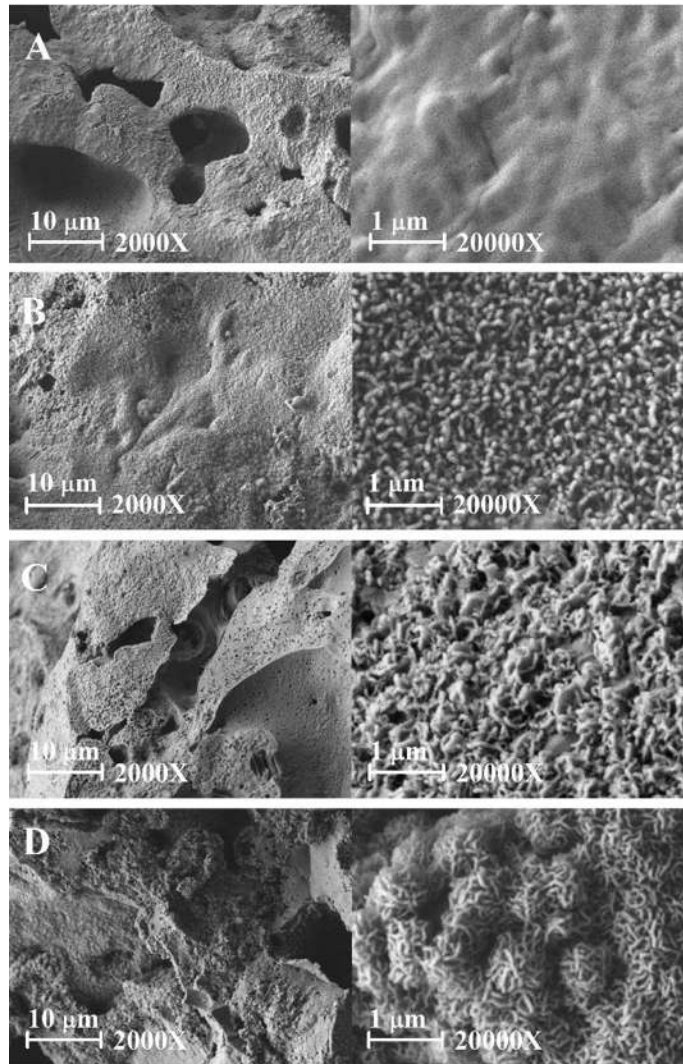


Figura 4.62 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio control (sin funcionalizar) tratado a 700 °C después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en fluido corporal simulado. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

A diferencia de aquellas alícuotas biofuncionalizadas que al ser injertadas en la membrana corialantoidea no muestran una diferencia significativa en cuanto a la morfología de la hidroxiapatita obtenida con respecto a las muestras no biofuncionalizadas, el sistema *in vitro* sí da lugar a diferencias en cuanto a la estructura tridimensional de la hidroxiapatita producida. En aquellas muestras biofuncionalizadas con colágeno (Figura 4.63) existe ya la presencia de hidroxiapatita tras solamente dos días de incubación en el fluido corporal simulado, que aunque se

encuentra en esferas aisladas, estas tienen diámetros muy amplios de hasta 30 micrómetros, contrario al mismo andamio sin biofuncionalizar que en dos días tan solo da lugar a la formación de nódulos no muy bien definidos, tras cuatro días de incubación estas microesferas ya se han desarrollado sobre la superficie del material cubriéndolo parcialmente pero formando cuellos amplios entre las esferas dando lugar a un recubrimiento similar al generado en el sistema *in ovo*, sin embargo, a diferencia del sistema *in ovo* cuyo desarrollo de la hidroxiapatita se da de forma homogénea sobre la superficie en el fluido corporal simulado existe un crecimiento vertical de la hidroxiapatita dando como resultado la generación de pequeñas columnas conformadas de esferas de hidroxiapatita que a su vez están conformadas por micro-bigotes, como se ha reportado en trabajos propios previos [196].

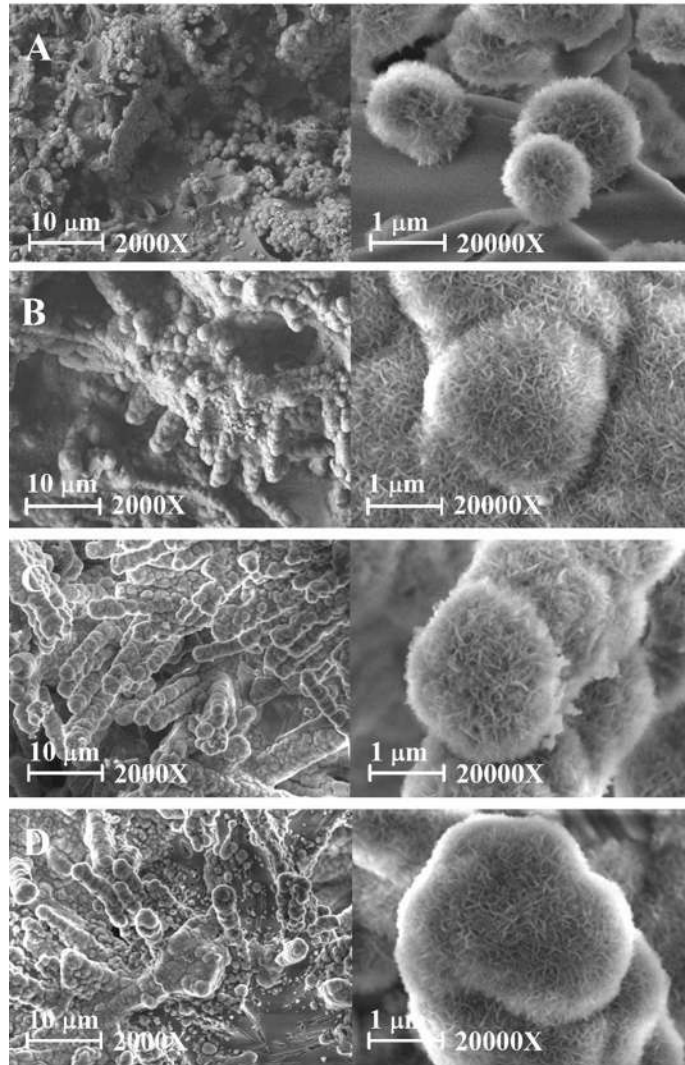


Figura 4.63 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con colágeno tipo I después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

En las muestras que han sido biofuncionalizadas con vitamina D3 (Figura 4.64), la formación de hidroxiapatita nuevamente se ve más relacionada con el bioandamio que no ha sido biofuncionalizado, dando lugar al crecimiento de aglomerados esféricos de hidroxiapatita que nuevamente se encuentran formados por micro-bigotes, con tan sólo la diferencia de una gran heterogeneidad en cuanto al diámetro de los aglomerados finales ya que existen esferas de

hidroxiapatita con diámetros desde 2 hasta 25 micrómetros, mientras que en los lotes anteriores la hidroxiapatita forma aglomerados de diámetros homogéneos.

Aunque la morfología de los aglomerados congenia con trabajos de otros autores, cabe resaltar que en el caso de este bioandamio mimético de biovidrio se reduce el tiempo de incubación en fluido corporal simulado en una tercera parte, dando lugar a la misma formación de hidroxiapatita de una forma más rápida y eficiente [161], proceso el cual cuando el material es sometido a una biofuncionalización previa, permite una mayor eficiencia en la formación de los aglomerados de hidroxiapatita a partir configuraciones como las columnas, además, esta aceleración del proceso puede ser también atribuida a que el bioandamio es un biomaterial nanoestructurado, es decir, está conformado por pequeñas esferas aglomeradas con diámetros menores a 1 micrómetro que pueden funcionar como sitios de nucleación para la condensación de la hidroxiapatita, además la adición del colágeno tipo I da también lugar a la depositación de la hidroxiapatita, proceso que se desarrolla de forma natural en organismos vivos, siendo la producción del colágeno una de las primeras etapas con la finalidad de dar lugar a un microentorno adecuado para la depositación de la hidroxiapatita [84,160,161].

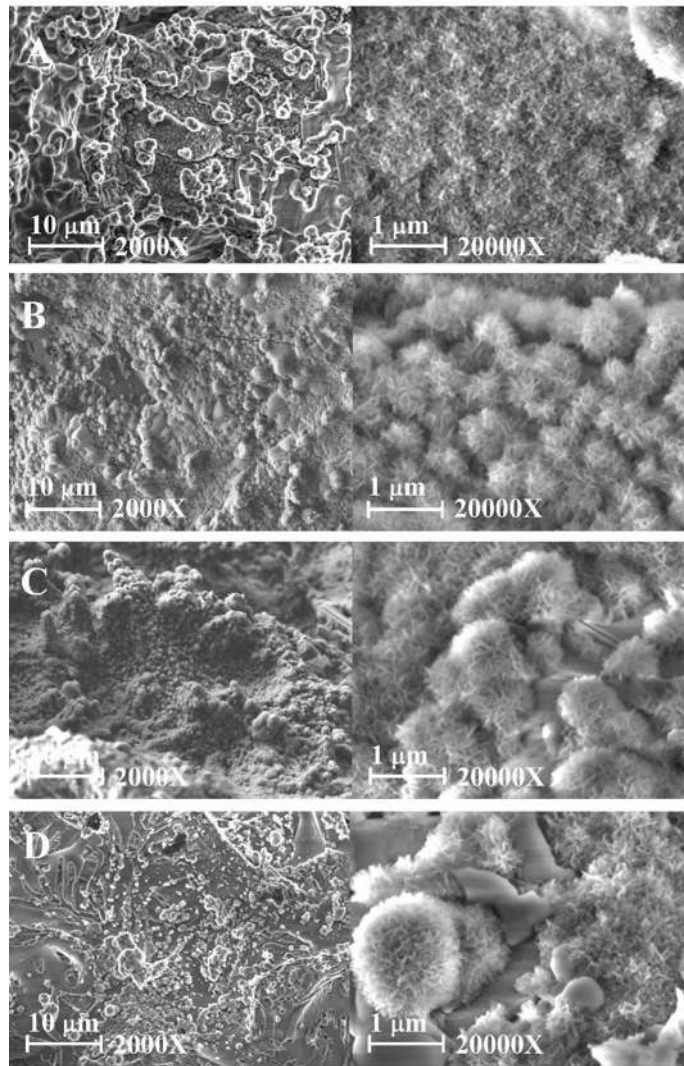


Figura 4.64 Micrografías (MEB) de las alícuotas del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C y biofuncionalizado con vitamina D3 después de 2 (A), 4 (B), 6 (C) y 8 (D) días de incubación en la membrana corialantoidea. Columna izquierda aumento de 2000X y columna derecha aumento de 20000X.

4.13.2 Caracterización semicuantitativa de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y colágeno tipo I

En la Figura 4.65 se puede comparar la composición elemental de los andamios de biovidrio antes y después de ser injertado en la membrana corialantoidea de embriones de pollo, en el panel A se muestran aquellas alícuotas de biovidrio que no fueron biofuncionalizadas, mientras que en el panel B y C se pueden ver los espectros correspondientes a los bioandamios biofuncionalizados con

colágeno tipo I y vitamina D3 correspondientemente. En los tres sistemas se puede observar que la proporción de silicio disminuye, aunque no simultáneamente, ya que en los bioandamios sin biofuncionalizar y biofuncionalizados con vitamina D3 la disminución del silicio es más rápida con el subsecuente incremento de la proporción de fósforo, mientras que en los biovidrios biofuncionalizados con colágeno no se ve una disminución en la proporción del silicio hasta el quinto día de incubación en la membrana corialantoidea. Comparando estos resultados con las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido y el espectro EDS del estándar de hidroxiapatita se puede deducir que la hidrólisis del bioandamio biofuncionalizado con colágeno es más lenta, pero permite la correcta depositación de los aglomerados de hidroxiapatita en la superficie, aunque no es sino hasta el quinto día que estos depósitos son lo suficientemente profundos para alterar el espectro obtenido por EDS. En el caso de las alícuotas del bioandamio sin biofuncionalizar y biofuncionalizado con vitamina D3, se alcanza un equilibrio donde ya se ha generado hidroxiapatita en la superficie y eso mismo disminuye la cantidad de elementos del biovidrio que se liberan al sistema, aunque esto no es indicativo de que la formación de hidroxiapatita haya cesado, sino simplemente ha disminuido la tasa de hidrólisis del biovidrio por el medio, viéndose reflejado en la cresta correspondiente al silicio que permanece prácticamente constante entre el día 4 y 5 de tratamiento.

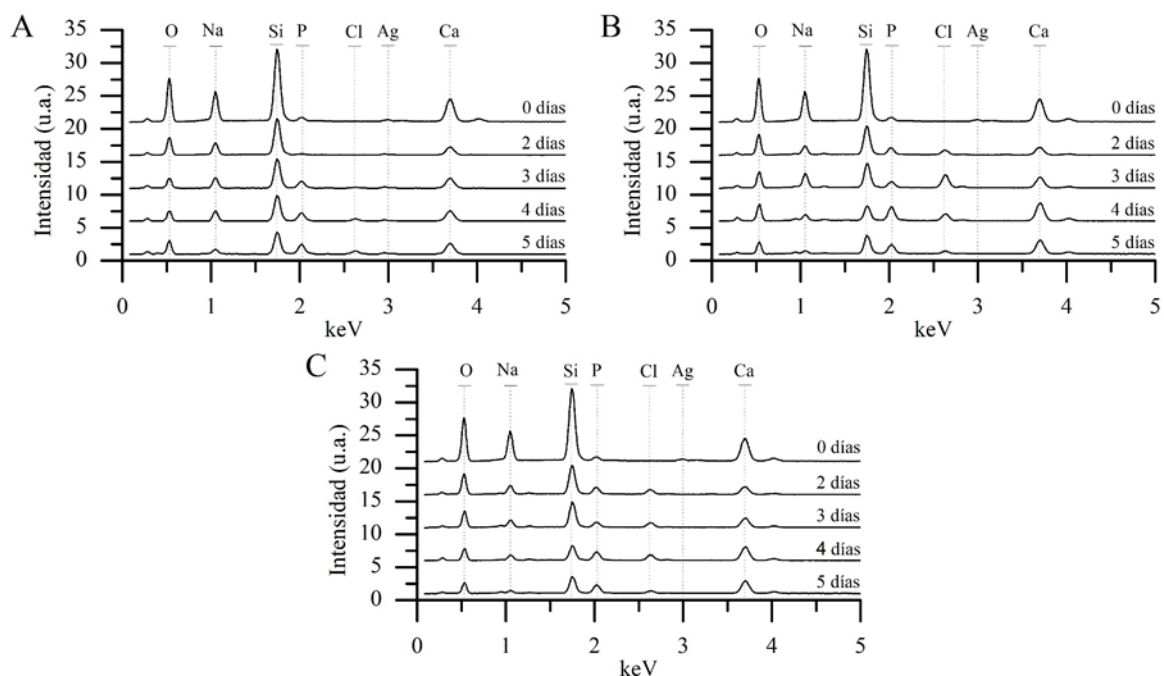


Figura 4.65 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C incubado en la membrana corialantoidea, sin biofuncionalizar (A) y biofuncionalizado con colágeno tipo I (B) y con vitamina D3 (C).

En los ensayos *in vitro* correspondientes a la Figura 4.66, se puede observar una modificación más lenta en los espectros EDS del bioandamio no biofuncionalizado (Figura 4.66 Panel A), donde aunque es visible la formación de la hidroxiapatita y en el espectro EDS se ve un incremento en la fase del fósforo, no hay un cambio significativo en la proporción del silicio, debido a que la capa de hidroxiapatita que se ha generado sobre el bioandamio es muy angosta con respecto al resto de muestras que sí han sido biofuncionalizadas. En el caso de los bioandamios biofuncionalizados con colágeno y vitamina D3, es posible observar un cambio en los espectros muy similar, dando lugar al incremento en la proporción del fósforo y el calcio, sin embargo es más drástico este cambio en las muestras biofuncionalizadas con colágeno posiblemente por la morfología que adoptaron los depósitos de hidroxiapatita, ya que son mucho más amplios que en el resto de los tratamientos.

Un factor más a tener en cuenta es la presencia de la plata, la cuál prevalece, aunque siendo una fracción tan pequeña del biomaterial (1.75%) el pico es apenas distingible aunque constante, lo cuál indica que el biomaterial puede mantener su actividad antibiótica aún después de 5 días injertado en un sistema *in vivo* (*in ovo*) o *in vitro*, sin que este afecte en la bioactividad del material. Estos resultados contrastan con trabajos previos de otros autores donde el espectro EDS muestra la

pérdida de los elementos constituyentes de la hidroxiapatita, dando lugar a una fase prácticamente constante de óxido de silicio, debido a la pérdida del calcio, fósforo y el sodio [116,120].

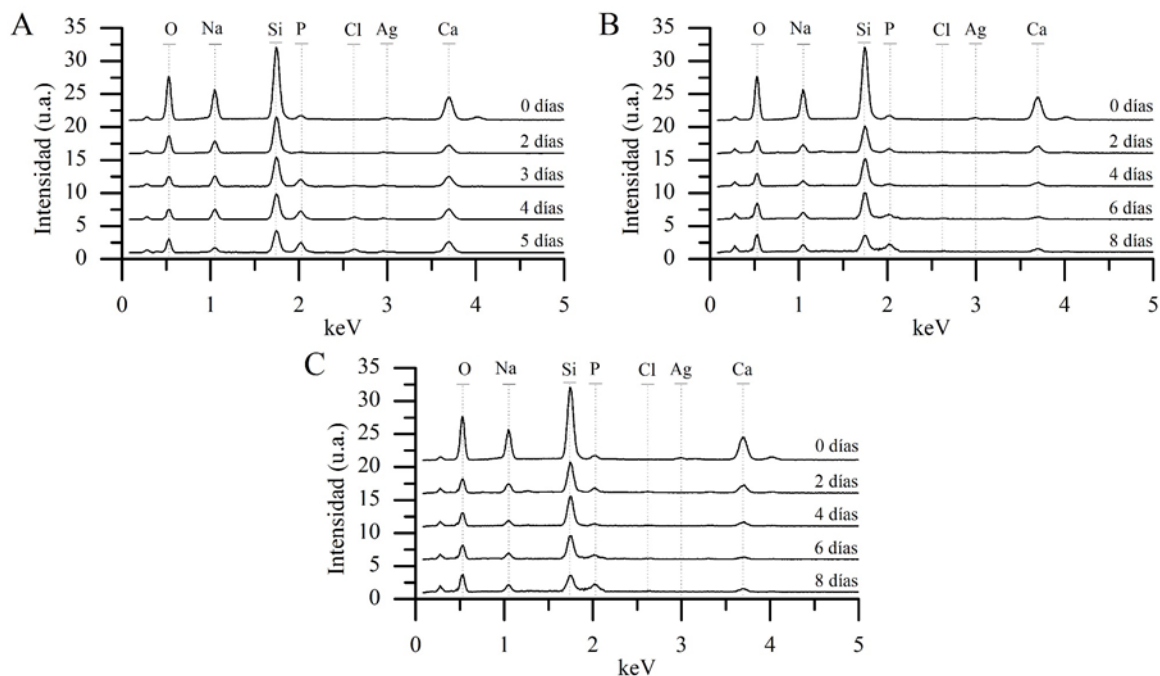


Figura 4.66 Ensayos semicuantitativos de espectroscopía de energía dispersiva de rayos X del bioandamio mimético de biovidrio tratado a 700 °C incubado en fluido corporal simulado, sin biofuncionalizar (A) y biofuncionalizado con colágeno tipo I (B) y con vitamina D3 (C).

4.13.3 Caracterización cristalográfica de la bioactividad en los andamios de biovidrio 45s5 biofuncionalizados con vitamina D3 y con colágeno tipo I

Los espectros de difracción de rayos X (Figura 4.67 y 4.68) denotan la formación de fases nuevas en el día 5 y 8 de los tratamientos *in ovo* e *in vitro*, respectivamente. Se empleó como control el bioandamio de biovidrio dopado con 1.75% de plata, para determinar la formación de hidroxiapatita en conjunto con la base de datos disponible en el equipo mismo, correspondientes al patrón A de las figuras 4.67 y 4.68. Nuevamente, se evaluó la bioactividad del bioandamio sin biofuncionalizar y biofuncionalizado con colágeno tipo I y vitamina D3, además de su uso conjunto en los sistemas *in ovo* e *in vitro* para determinar el efecto que estos tienen sobre la formación de hidroxiapatita y así poder ser contrastados.

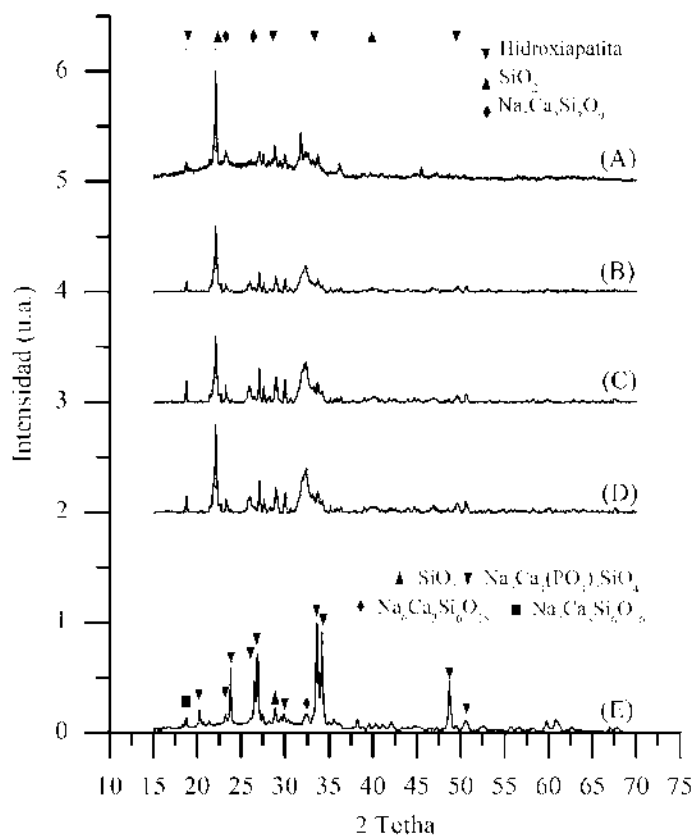


Figura 4.67 Espectros de difracción de rayos X de bioandamios de biovidrio injertado en la membrana corialantoidea durante 5 días sin biofuncionalizar (A), biofuncionalizado con colágeno tipo I (B), biofuncionalizado con colágeno tipo I y vitamina D3 y biofuncionalizado con vitamina D3 (E), biovidrio control sin proceso de incubación.

En el sistema *in ovo* (Figura 4.67) es posible observar una mayor definición en los picos correspondientes a las diferentes fases del bioandamio sin biofuncionalizar (Figura 4.67 Panel A) tras el tratamiento en la membrana corialantoidea, donde se pueden identificar cinco picos característicos de la fase de hidroxapatita además de tres picos representativos de la fase cristobalita y otros tres de la combeita, siendo la primera, la fase que se busca producir, la segunda una fase secundaria propia del proceso de hidrólisis/condensación de los iones del biovidrio para la formación de hidroxapatita, donde la cristobalita es la primer fase en condensarse y la tercer fase corresponde a la fase principal del biovidrio, cuya presencia indica aún parte del bioandamio que no ha sido hidrolizado y por lo tanto se mantiene aún en el injerto. En los siguientes sistemas donde se realizó la biofuncionalización, los picos característicos de la hidroxapatita se muestran

no tan definidos pero presentes, indicando que existen las fases, aunque existe un cierto grado de ruido por parte de las biomoléculas que posee el sistema y su falta de cristalinidad. Así, es posible determinar la correcta formación de hidroxiapatita debido a su patrón de difracción y no solamente de forma morfológica o composicional, además se encuentran también los picos característicos de la fase de cristobalita cuya presencia indica la hidrólisis y condensación de iones por parte del biovidrio durante el tratamiento.

De forma similar en el sistema *in vitro* (Figura 4.68) se observa nuevamente el mismo comportamiento, donde existe una mayor definición en los picos que corresponden al bioandamio sin biofuncionalizar (Figura 4.68 Panel E), mientras que en las muestras biofuncionalizadas se encuentran aunque no muestran tanta definición, sin embargo, a diferencia de las muestras con el tratamiento *in ovo* estas muestras presentan un comportamiento aún más parecido al no haber diferencias significativas en las alturas de las crestas, variando solamente en la altura del pico principal de la fase cristobalita, esto posiblemente ya que el fluido corporal simulado brinda un ambiente más homogéneo para el bioandamio, lo que da lugar a resultados más homogéneos entre sí, aun cuando poseen tratamientos de biofuncionalización diferentes.

Cabe destacar que debido a que es un proceso que se realiza a temperatura ambiente, el grado de cristalización es muy bajo debido a lo cual los picos se muestran achatados, lo cual corresponde con otros grupos de trabajo, los cuales reportan que a través de un tratamiento térmico logran refinar los ocho picos característicos de la hidroxiapatita, sin embargo, en este caso no es requerido debido a que se coincide en por lo menos 5 picos característicos y un tratamiento térmico puede alterar las características texturales de la muestra [175,176].

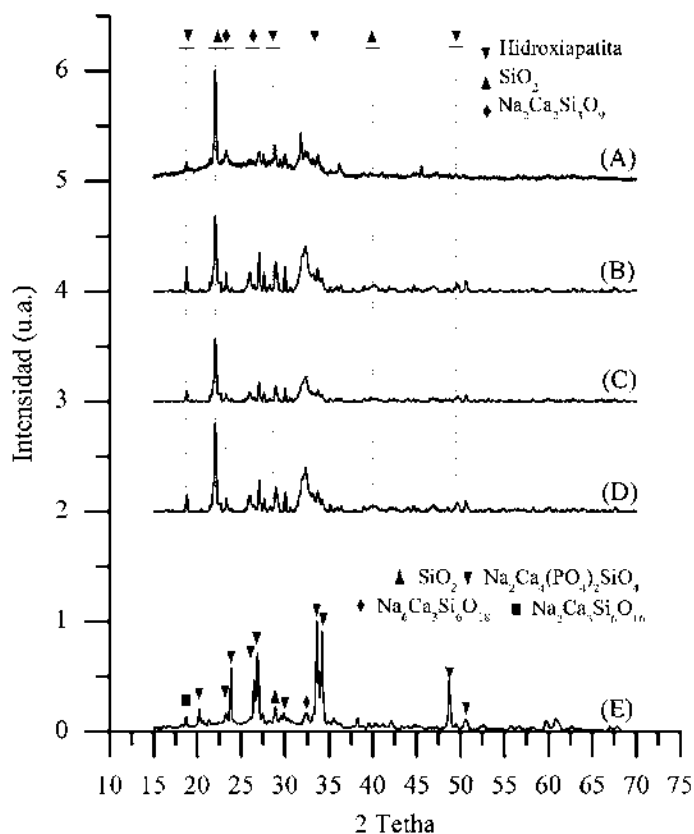


Figura 4.68 Espectros de difracción de rayos X de bioandamios de biovidrio incubado en fluido corporal simulado durante 8 días sin biofuncionalizar (A), biofuncionalizado con colágeno tipo I (B), biofuncionalizado con colágeno tipo I y vitamina D3 (C) y biofuncionalizado con vitamina D3 (D), biovidrio control sin proceso de incubación (E).

4.14 Alcances generales del proyecto

A través de las diferentes etapas de la investigación se logró producir diferentes lotes de biovidrio 45s5 con diferentes fracciones de elementos con capacidad antimicrobiana, no obstante, dicha fracción es muy limitada y las identidades cristalográficas no se ven alteradas, el empleo de una etapa de secado por aspersión ha permitido obtener aglomerados particulados con altas áreas superficiales lo cual permite la liberación adecuada de iones al medio, disminuyendo radicalmente la cantidad de elementos antimicrobianos requeridos para obtener un efecto observable y al mismo tiempo permite obtener grados de cristalinidad lo suficientemente altos para retener la estructura porosa y alcanzar una formación adecuada de hidroxiapatita simultáneamente.

La respuesta citotóxica a este material es mínima debido a la naturaleza no tóxica de los elementos que componen al material, además, se ha descartado la tendencia general de los materiales nanoestructurados a ser altamente tóxicos provocada por su alta reactividad, dichos ensayos se han elaborado en condiciones de biovidrio particulado donde la reactividad es superior a los andamios debido a una mayor disposición de superficie donde se lleve a cabo el proceso de hidrólisis, lo que puede ser extrapolado de tal forma que un andamio presentaría una toxicidad aún menor. Paralelamente se han analizado diferentes alícuotas con este mismo material adicionado con agentes antimicrobianos, donde de manera similar a otros ensayos, no se ha encontrado una diferencia significativa con respecto a sus análogos no adicionados, esto debido a la cantidad tan pequeña que es agregada a la composición del biovidrio 45s5.

A partir de los diferentes experimentos se han logrado estandarizar los procesos de elaboración de andamios a partir del biovidrio 45s5 obtenido previamente, estos andamios pueden ser diseñados con porosidades controladas a partir de la adición de agentes templantes y su relación precursores/agente, dicho proceso de síntesis es considerablemente más sencillo que otras técnicas de síntesis de andamios, sin embargo, requiere de la obtención de agentes templantes de diámetro controlado lo cual representa un costo adicional al proceso de síntesis.

Los procesos de biofuncionalización han permitido recubrir altos porcentajes de la superficie, aunque estos no son del 100 por ciento como en publicaciones de otros autores [127], estos se han logrado en pH fisiológico y sin la necesidad de agentes entrecruzantes, los materiales biofuncionalizados han demostrado formación de hidroxiapatita de forma similar a los que no han sido biofuncionalizados, a diferencia de dichos autores cuya tasa de formación de hidroxiapatita sí se ve alterada de forma negativa, además, se ha observado que en el caso del colágeno se ha replicado la forma de este al formarse estructuras de tipo columna a partir de hidroxiapatita, mientras que en las muestras biofuncionalizadas con vitamina D3 la morfología no varía significativamente.

Los modelos propuestos para evaluar la bioactividad han demostrado que son viables para el análisis de los biomateriales, otorgando así, modelos que permiten analizar de forma controlada los diferentes efectos que un organismo puede tener sobre los implantes, cada uno de estos posee ventajas y desventajas, como el fluido corporal simulado y la gran capacidad de reproducibilidad que tiene a lo largo del mundo, o el efecto de las proteínas de sangre en el caso del suero de conejo

y también, en un modelo más complejo, el efecto que un organismo completo en desarrollo tiene sobre los diferentes iones que conforman al andamio y la capacidad de estos para realizar el proceso de condensación al encontrarse en un entorno dinámico [120,197].

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

El método de síntesis sol-gel acoplado a secado por aspersión es una opción viable en el desarrollo de materiales bioactivos nanoestructurados, mediante esta técnica se han logrado adaptar las concentraciones de precursores durante el proceso de síntesis y adecuar la composición química final del material para conferir propiedades específicas como la actividad antimicrobiana mediante la incorporación de ciertos elementos como la plata en su estructura, generándose microesferas con diámetros de 4 micrómetros que están conformadas por nanopartículas con diámetros menores a los 100 nm y que al mismo tiempo se encuentran en construcciones de diámetros 650 hasta 1100 micrómetros aproximadamente.

Los diferentes biovidrios obtenidos poseen una gran versatilidad en cuanto a funciones dentro de un organismo, permitiendo desde la formación de fases minerales como la hidroxiapatita y la cristobalita para la regeneración del tejido óseo, hasta la estimulación de vías de señalización que dan lugar a la diferenciación celular de líneas específicas para la formación de tejidos como los vasos capilares, en los diferentes experimentos determinamos que este mismo material permite la depositación de los iones liberados por hidrólisis en forma de hidroxiapatita y también puede ser empleado como un agente angiogénico, dichas propiedades son críticas en el momento de diseñar un biomaterial para sustitución de tejido óseo y es de gran importancia el hecho de haber logrado material que estimule ambos procesos sin cambios en la composición.

Es posible controlar y adecuar la bioactividad de un material cerámico mediante el tratamiento térmico, se ha corroborado de forma experimental que un alto grado de cristalinidad da lugar a materiales parcialmente inertes, mientras que un menor grado de cristalinidad ocasiona la pérdida de la bioactividad debido a la disminución acelerada de la superficie, limitando los sitios donde se pueda realizar el depósito de las nuevas fases que se busca producir, siendo necesario un equilibrio entre dichas fases el cual puede ser expresado a partir de coeficientes como el factor de cristalinidad, funcionando este trabajo como un parámetro al momento de diseñar otros materiales.

La producción de andamios biomiméticos de biovidrio 45s5 a partir de aglomerados esféricos es posible mediante el uso de microesferas de poliestireno, las cuales son capaces de otorgar la estructura macro y mesoporosa necesaria para un correcto flujo iones dentro de este, además, es posible controlar dicha porosidad también mediante tratamientos térmicos donde, mayores temperaturas dan lugar a estructuras pobres en macroporos y temperaturas muy bajas no dan lugar

a la formación de una estructura tridimensional estable, siendo determinada la temperatura óptima para dicho proceso desde 700 hasta 800 °C, lo cual concuerda con las mejores temperaturas de tratamiento térmico para la cristalización y por lo tanto con una mejor eficiencia en la tasa de hidrólisis/condensación.

La superficie del biovidrio 45s5 en forma de andamio permite la biofuncionalización a partir de biomoléculas como el colágeno y la vitamina D3 sin la necesidad de agentes entrecruzantes y las consecuencias ambientales y de salud que estos pueden tener, como la formación de estructuras terciarias apócrifas o la desnaturalización de proteínas, alcanzándose un porcentaje de recubrimiento de la superficie superior al 70%. Además, la biofuncionalización en la superficie no impide la formación de la nueva capa de hidroxiapatita que se requiere para la formación del enlace entre el biomaterial y el tejido nativo, aunque sí tiene un efecto en la morfología de la fase obtenida, ya sea ocasionando la formación de columnas de microesferas en el caso del colágeno o aglomerados de hidroxiapatita de un mayor diámetro, comparados con los que se encuentran en los andamios sin biofuncionalizar, aunque en menor cantidad.

El biovidrio 45s5 de forma particulada es capaz de estimular la formación de vasos capilares a partir de preexistentes, generando el proceso denominado como angiogénesis, dicho proceso se diferencia del fomentado por otros métodos, como la adición de factores de crecimiento en la morfología de los vasos capilares, donde se suelen obtener estructuras aberrantes y disfuncionales, el biovidrio por otro lado, debido al gradiente de iones de silicio que se genera desde su superficie da lugar a la orientación de dichos vasos capilares.

Los estudios de viabilidad *in vitro* demostraron que el material posee una baja toxicidad, en ninguno de los casos se pudo determinar la dosis letal 50 pese a que el biovidrio se encontraba en concentraciones cercanas al límite de solubilidad, además se demostró que la naturaleza nanoestructurada de los bioandamios producidos no altera la citotoxicidad al encontrarse resultados muy similares con los controles, demostrando su seguridad aun siendo un material particulado.

Se determinó que tanto el fluido corporal simulado, la membrana corialantoidea y el suero extraído de sangre de conejo son medios viables para la determinación de la bioactividad en materiales, sin embargo, cada uno conlleva ventajas y desventajas. Entre estos destaca la membrana corialantoidea, debido a que el ensayo de bioactividad es más severo que en el fluido corporal simulado al existir un organismo vivo que también hace uso de los iones libres, dando lugar ensayos

más acercados a la realidad sobre cómo se comportaría dicho material injertado en un mamífero, de forma análoga permite determinar el grado de citotoxicidad de dicho material y el efecto que tiene este en el desarrollo de tejidos suaves.

Se encontró que, en estos tres modelos, el andamio biomimético producido al ser nanoestructurado y con porosidad hierárquica presenta diversas ventajas respecto a los resultados reportados por otros autores como son:

- 1.- Acelera los procesos de hidrólisis y condensación superficial de la hidroxiapatita.
- 2.- Forma hidroxiapatita como un recubrimiento uniforme en toda la superficie en solo 2 días de prueba en los diferentes medios.
- 3.- La reactividad superior de la nanoestructura permite desarrollar un recubrimiento homogéneo de hidroxiapatita en todo el bioandamio en tiempos mucho más cortos de exposición con una estructura de micro-bigotes.
- 4.- La nanoestructura del biovidrio estimula la angiogénesis lo cual es un resultado muy notable respecto a lo reportado por otros autores.
- 5.- La biofuncionalización de los bioandamios miméticos con colágeno tipo I no afecta la velocidad de la formación de hidroxiapatita, aunque sí modifica la forma en que esta se aglomera dando lugar a la formación de construcciones de tipo columna, mientras que con el colecalciferol o vitamina D3 se mantiene la forma esférica cambiando solo el tamaño de los condensados.

De manera general se formularon los cimientos para un proyecto integral de medicina regenerativa con un material que presenta ventajas en cuanto bioactividad, respuesta citotóxica y estabilidad, además, estos resultados han demostrado su valía mediante la obtención de una distinción nacional, superando las expectativas iniciales del proyecto.

CAPÍTULO 6. RECOMENDACIONES Y TRABAJO FUTURO

Queda disponible una gran cantidad de información para la publicación de artículos científicos, así mismo es posible fraguar una línea de investigación en base al efecto que el biovidrio biofuncionalizado puede tener en la angiogénesis, debido a que el biovidrio funciona no sólo como material bioactivo sino también como sistema de liberación continua de fármacos, que en conjunto con la capacidad de guía tridimensional del tejido vascular es posible que en conjunto con las biomoléculas den lugar a un mecanismo de sinergia para la formación de tejido nuevo y organizado. Se abre también una línea de investigación en el área biológica, determinando específicamente que tipo de vías de señalización que se encuentran involucrados en la respuesta del organismo a este tipo de materiales nanoestructurados. Partiendo de esta capacidad de la superficie del material para ser cargada con diferentes biomoléculas, se puede proponer una línea adicional de investigación que puede partir de este trabajo mediante la biofuncionalización con diferentes tipos de moléculas y la tasa de liberación controlada de estos hacia el medio, adicionando capacidades antiinflamatorias, antitumorales u otras.

Se recomienda el uso de metodologías como el secado por liofilización para la obtención de biovidrio 45s5 altamente poroso, durante el presente proyecto se han elaborado diferentes metodologías entre las que se encuentra un acercamiento a este procedimiento, sin embargo, es un proceso amplio el determinar las mejores condiciones de síntesis para la obtención de microesferas porosas, dicho proyecto puede ser abordado en un futuro con la ventaja adicional de los métodos de liofilización en condiciones de adecuadas permite definir estructuras porosas sin la necesidad de agentes porógenos o plantillas, disminuyendo tanto costos como la posibilidad de contaminación de las muestras por los residuos de estos agentes.

CAPÍTULO 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M.N. Rahaman, D.E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S.B. Jung, L.F. Bonewald, A.P. Tomsia, Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2355–2373.
doi:10.1016/j.actbio.2011.03.016.
- [2] R. Langer, J. Vacanti, Tissue engineering, *Science* (80-.). 260 (1993) 920–926.
- [3] E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, K. Roy, Biomaterials for stem cell differentiation, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60 (2008) 215–228.
doi:10.1016/j.addr.2007.08.037.
- [4] A.C. Jones, C.H. Arns, D.W. Hutmacher, B.K. Milthorpe, A.P. Sheppard, M.A. Knackstedt, The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth, *Biomaterials.* 30 (2009) 1440–1451.
doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.056.
- [5] J. Mitra, G. Tripathi, A. Sharma, B. Basu, Scaffolds for bone tissue engineering: role of surface patterning on osteoblast response, *RSC Adv.* 3 (2013) 11073.
doi:10.1039/c3ra23315d.
- [6] S.K. Bhullar, N.L. Lala, S. Ramkrishna, Smart biomaterials - A review, *Rev. Adv. Mater. Sci.* 40 (2015) 303–314.
- [7] L. Hench, Biomaterials, *Science* (80-.). 208 (1980) 826–831.
doi:10.1126/science.6246576.
- [8] L.L. Hench, J.M. Polak, Third-generation biomedical materials., *Science.* 295 (2002) 1014–1017. doi:10.1126/science.1067404.
- [9] C. Ning, L. Zhou, G. Tan, Fourth-generation biomedical materials, *Mater. Today.* 19 (2016) 2–3. doi:10.1016/j.mattod.2015.11.005.
- [10] N. Sachot, M.A. Mateos-Timoneda, J.A. Planell, A.H. Velders, M. Lewandowska, E. Engel, O. Castaño, Towards 4th generation biomaterials: A covalent hybrid polymer-ormoglass architecture, *Nanoscale.* 7 (2015) 15349–15361. doi:10.1039/c5nr04275e.

- [11] L.L. Hench, Chronology of Bioactive Glass Development and Clinical Applications, *New J. Glas. Ceram.* 03 (2013) 67–73. doi:10.4236/njgc.2013.32011.
- [12] P. Parida, A. Behera, S.C. Mishra, Classification of Biomaterials used in Medicine, *Int. J. Adv. Appl. Sci.* 1 (2012) 125–129. doi:10.11591/ijaas.v1i3.882.
- [13] K. Prasad, O. Bazaka, M. Chua, M. Rochford, L. Fedrick, J. Spoor, R. Symes, M. Tieppo, C. Collins, A. Cao, D. Markwell, K. Ostrikov, K. Bazaka, Metallic biomaterials: Current challenges and opportunities, *Materials (Basel)*. 10 (2017). doi:10.3390/ma10080884.
- [14] M. Mir, M.N. Ali, A. Barakullah, A. Gulzar, M. Arshad, S. Fatima, M. Asad, Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review, *Prog. Biomater.* 7 (2018) 1–21. doi:10.1007/s40204-018-0083-4.
- [15] M.I. Sabir, X. Xu, L. Li, A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications, *J. Mater. Sci.* 44 (2009) 5713–5724. doi:10.1007/s10853-009-3770-7.
- [16] G.M. Raghavendra, K. Varaprasad, T. Jayaramudu, *Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications*, Elsevier Inc., 2015. doi:10.1016/B978-0-323-32889-0.00002-9.
- [17] F. Mussano, T. Genova, L. Munaron, M.G. Faga, S. Carossa, Ceramic Biomaterials for Dental Implants: Current Use and Future Perspectives, in: *Dent. Implantol. Biomater.*, InTech, 2016. doi:10.5772/62701.
- [18] W. Höland, M. Schweiger, R. Watzke, A. Peschke, H. Kappert, Ceramics as biomaterials for dental restoration, *Expert Rev. Med. Devices.* 5 (2008) 729–745. doi:10.1586/17434440.5.6.729.
- [19] E. Salernitano, C. Migliaresi, Composite materials for biomedical applications: a review., *J. Appl. Biomater. Biomech.* 1 (2003) 3–18. doi:10.1177/228080000300100102.
- [20] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today.* 14 (2011) 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.

- [21] R. Agarwal, A.J. García, Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94 (2015) 53–62. doi:10.1016/j.addr.2015.03.013.
- [22] D. Foschi, F. Corsi, P. Cellerino, A. Rizzi, E. Morandi, E. Trabucchi, Angiogenic Effects of Suture Biomaterials, *Eur. Surg. Res.* 33 (2001) 16–20. doi:10.1159/000049687.
- [23] M. Chehade, M.J. Elder, Intraocular lens materials and styles: A review, *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 25 (1997) 255–263. doi:10.1111/j.1442-9071.1997.tb01512.x.
- [24] S.D. Bruck, E.P. Mueller, Materials aspects of implantable cardiac pacemaker leads., *Med. Prog. Technol.* 13 (1988) 149–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3285160>.
- [25] G.C. Timmis, S. Gordon, D. Westveer, R.O. Martin, K. Stokes, Polyurethane as a Pacemaker Lead Insulator, in: *Card. Pacing*, Steinkopff, Heidelberg, 1983: pp. 303–310. doi:10.1007/978-3-642-72367-4_45.
- [26] D.A. Banyard, J.M. Bourgeois, A.D. Widgerow, G.R.D. Evans, Regenerative Biomaterials: A Review, *Plast. Reconstr. Surg.* 135 (2015) 1740–1748. doi:10.1097/PRS.0000000000001272.
- [27] D.J.T. Kyle, A. Oikonomou, E. Hill, A. Bayat, Development and functional evaluation of biomimetic silicone surfaces with hierarchical micro/nano-topographical features demonstrates favourable invitro foreign body response of breast-derived fibroblasts, *Biomaterials.* 52 (2015) 88–102. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.003.
- [28] A. Korfage, G.M. Raghoebar, W.D. Noorda, B.E. Plaat, A. Vissink, A. Visser, Recommendations for implant-retained nasal prostheses after ablative tumor surgery: Minimal surgical aftercare, high implant survival, and satisfied patients, *Head Neck.* 38 (2016) E619–E624. doi:10.1002/hed.24053.
- [29] B. Tian, J. Liu, T. Dvir, L. Jin, J.H. Tsui, Q. Qing, Z. Suo, R. Langer, D.S. Kohane, C.M. Lieber, Macroporous nanowire nanoelectronic scaffolds for synthetic tissues, *Nat. Mater.* 11 (2012) 986–994. doi:10.1038/nmat3404.

- [30] J.R. Jones, Reprint of: Review of bioactive glass : From Hench to hybrids, *Acta Biomater.* 23 (2015) S53–S82. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.019.
- [31] L.L. Hench, *An Introduction to Bioceramics*, IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2013. doi:10.1142/p884.
- [32] J. Blac, Systemic effects of biomaterials, *Biomaterials.* 5 (1984) 11–18. doi:10.1016/0142-9612(84)90061-9.
- [33] M. Bohner, Resorbable biomaterials as bone graft substitutes, *Mater. Today.* 13 (2010) 24–30. doi:10.1016/S1369-7021(10)70014-6.
- [34] L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *J. Biomed. Mater. Res.* 5 (1971) 117–141. doi:10.1002/jbm.820050611.
- [35] A.E. Clark, C.G. Pantano, L.L. Hench, Auger Spectroscopic Analysis of Bioglass Corrosion Films, *J. Am. Ceram. Soc.* 59 (1976) 37–39. doi:10.1111/j.1151-2916.1976.tb09382.x.
- [36] L.L. Hench, *Bioceramics: From Concept to Clinic*, *J. Am. Ceram. Soc.* 74 (1991) 1487–1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [37] Q. Fu, E. Saiz, M.N. Rahaman, A.P. Tomsia, Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and future perspectives, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 1245–1256. doi:10.1016/j.msec.2011.04.022.
- [38] W. Lai, J. Garino, P. Ducheyne, Silicon excretion from bioactive glass implanted in rabbit bone, *Biomaterials.* 23 (2002) 213–217. doi:10.1016/S0142-9612(01)00097-7.
- [39] X. Zhang, W.T. Jia, Y.F. Gu, W. Xiao, X. Liu, D.P. Wang, C.Q. Zhang, W.H. Huang, M.N. Rahaman, D.E. Day, N. Zhou, Teicoplanin-loaded borate bioactive glass implants for treating chronic bone infection in a rabbit tibia osteomyelitis model, *Biomaterials.* 31 (2010) 5865–5874. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.04.005.

- [40] K. Franks, I. Abrahams, J.C. Knowles, Development of soluble glasses for biomedical use part I: In vitro solubility measurement, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 11 (2000) 609–614. doi:10.1023/A:1008949527695.
- [41] I. Ahmed, M. Lewis, I. Olsen, J.C. Knowles, Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P₂O₅-CaO-Na₂O glass system, *Biomaterials*. 25 (2004) 491–499. doi:10.1016/S0142-9612(03)00546-5.
- [42] H. Oonishi, S. Kushitani, E. Yasukawa, H. Iwaki, L. Hench, J. Wilson, E. Tsuji, T. Sugihara, Particulate Bioglass Compared With Hydroxyapatite as a Bone Graft Substitute, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 334 (1997) 316–325. doi:10.1097/00003086-199701000-00041.
- [43] C.J. Brinker, G.W. Scherer, *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, 1st ed., Academic Press, 1990.
- [44] K. Zheng, A.R. Boccaccini, Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 363–373. doi:10.1016/j.cis.2017.03.008.
- [45] A.M. El-Kady, A.F. Ali, R.A. Rizk, M.M. Ahmed, Synthesis, characterization and microbiological response of silver doped bioactive glass nanoparticles, *Ceram. Int.* 38 (2012) 177–188. doi:10.1016/j.ceramint.2011.05.158.
- [46] K. Zheng, M. Lu, B. Rutkowski, X. Dai, Y. Yang, N. Taccardi, U. Stachewicz, A. Czyska-Filemonowicz, N. Hüser, A.R. Boccaccini, ZnO quantum dots modified bioactive glass nanoparticles with pH-sensitive release of Zn ions, fluorescence, antibacterial and osteogenic properties, *Mater. Chem. B.* 1 (2016) 1–32. doi:10.1039/C6TB02053D.
- [47] Y. Lu, H. Fan, A. Stump, T.L. Ward, T. Rieker, C.J. Brinker, Aerosol-assisted self-assembly of mesostructured spherical nanoparticles, *Nature*. 398 (1999) 223–226. doi:10.1038/18410.
- [48] M. Seidenstuecker, L. Kerr, A. Bernstein, H.O. Mayr, N.P. Suedkamp, R. Gadow, P. Krieg, S.H. Latorre, R. Thomann, F. Syrowatka, S. Esslinger, 3D powder printed bioglass and β -tricalcium phosphate bone scaffolds, *Materials (Basel)*. 11 (2017). doi:10.3390/ma11010013.

- [49] I. Chopra, The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents : a useful development or a cause for concern ?, (2007) 587–590. doi:10.1093/jac/dkm006.
- [50] J.L. Clement, P.S. Jarrett, Antibacterial silver, *Met. Based Drugs*. 1 (1994) 467–482.
- [51] J.J. Castellano, S.M. Shafii, F. Ko, G. Donate, T.E. Wright, R.J. Mannari, W.G. Payne, D.J. Smith, C. Jj, S. Sm, F. Ko, G. Donate, W. Te, M. Rj, P. Wg, S. Dj, R.M.C. Comparative, Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, 4 (2007).
- [52] R. Edmondson, J.J. Broglie, A.F. Adcock, L. Yang, Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors, *Assay Drug Dev. Technol.* 12 (2014) 207–218. doi:10.1089/adt.2014.573.
- [53] J.P. Ruparelia, A.K. Chatterjee, S.P. Duttgupta, S. Mukherji, Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomater.* 4 (2008) 707–716. doi:10.1016/j.actbio.2007.11.006.
- [54] G. Borkow, J. Gabbay, Copper as a Biocidal Tool, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2163–2175. doi:10.2174/0929867054637617.
- [55] V. Stanić, S. Dimitrijević, J. Antić-Stanković, M. Mitrić, B. Jokić, I.B. Plećaš, S. Raičević, Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6083–6089. doi:10.1016/j.apsusc.2010.03.124.
- [56] M. Rai, A. Yadav, A. Gade, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials, *Biotechnol. Adv.* 27 (2009) 76–83. doi:10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.
- [57] M. Leotau, H. Villamizar, Osteomielitis: Una Revision De La Literatura, *Rev. Cent. Estud. En Salud.* 1 (2010) 135–145. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072010000100015.
- [58] J.A. Rubio, S. Jiménez, M.Á. Martínez-Izquierdo, G. Guadalix, Infección necrotizante en el pie diabético: Una urgencia que amenaza la pérdida de la extremidad, *Endocrinol. y*

Nutr. 59 (2012) 466–468. doi:10.1016/j.endonu.2011.10.008.

- [59] V. Arana-Conejo, J.D. Méndez-F, Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético, *Gac. Med. Mex.* 139 (2003) 255–264.
- [60] F.J. Serrano Hernando, A. Martín Conejero, Enfermedad arterial periférica: aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos, *Rev. Española Cardiol.* 60 (2007) 969–982. doi:10.1157/13109651.
- [61] A.A. Gorustovich, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences, *Tissue Eng. Part B. Rev.* 16 (2010) 199–207. doi:10.1089/ten.teb.2009.0416.
- [62] J. Geurts, J.J. Chris Arts, G.H.I.M. Walenkamp, Bone graft substitutes in active or suspected infection. Contra-indicated or not?, *Injury.* 42 (2011) S82–S86. doi:10.1016/j.injury.2011.06.189.
- [63] T.A.A. van Vugt, J.A.P.A.P. Geurts, J.J.J. Arts, N.C.C. Lindfors, Biomaterials in treatment of orthopedic infections, in: *Manag. Periprosthetic Jt. Infect.*, Elsevier, 2017: pp. 41–68. doi:10.1016/B978-0-08-100205-6.00003-3.
- [64] B. Clarke, Normal bone anatomy and physiology., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 3 Suppl 3 (2008) S131-9. doi:10.2215/CJN.04151206.
- [65] R.S. Taichman, Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche, *Blood.* 105 (2005) 2631–2639. doi:10.1182/blood-2004-06-2480.
- [66] L. Barone, C. Rodríguez, M. Ghiglioni, A. Cuenca, M. Stradella, *Anatomía y Fisiología del Cuerpo Humano*, Primer Edi, Cultural Librería Americana S.A., Buenos Aires, 2007.
- [67] F.P. Ross, S.L. Teitelbaum, $\alpha\beta 3$ and macrophage colony-stimulating factor: Partners in osteoclast biology, *Immunol. Rev.* 208 (2005) 88–105. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00331.x.

- [68] N. Rosenberg, O. Rosenberg, M. Soudry, Osteoblasts in Bone Physiology – Mini Review, *Rambam Maimonides Med. J.* 3 (2012) 1–7. doi:10.5041/RMMJ.10080.
- [69] E.M. Aarden, P.J. Nijweide, E.H. Burger, Function of osteocytes in bone, *J. Cell. Biochem.* 55 (1994) 287–299. doi:10.1002/jcb.240550304.
- [70] J.T. Compton, F.Y. Lee, A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin, (2014) 1659–1668. doi:10.2106/JBJS.M.01096.
- [71] K. Gelse, E. Pöschl, T. Aigner, Collagens - Structure, function, and biosynthesis, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 1531–1546. doi:10.1016/j.addr.2003.08.002.
- [72] J.P. Stegemann, S.N. Kaszuba, S.L. Rowe, Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-Based Biomaterials, *Tissue Eng.* 13 (2007) 2601–2613. doi:10.1038/jid.2014.371.
- [73] A. Kumar, S.S. D'Souza, O. V. Moskvin, H. Toh, B. Wang, J. Zhang, S. Swanson, L.W. Guo, J.A. Thomson, I.I. Slukvin, Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymoangioblasts, *Cell Rep.* 19 (2017) 1902–1916. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.019.
- [74] J.D. Pearson, Normal endothelial cell function, *Lupus.* 9 (2000) 183–188. doi:10.1191/096120300678828299.
- [75] F. Paneni, M. Volpe, T.F. Luscher, F. Cosentino, SIRT1, p66Shc, and Set7/9 in Vascular Hyperglycemic Memory: Bringing All the Strands Together, *Diabetes.* 62 (2013) 1800–1807. doi:10.2337/db12-1648.
- [76] G. Eelen, P. de Zeeuw, L. Treps, U. Harjes, B.W. Wong, P. Carmeliet, Endothelial Cell Metabolism, *Physiol. Rev.* 98 (2018) 3–58. doi:10.1152/physrev.00001.2017.
- [77] J.J. Kim, S.J. Kim, Y.S. Kim, S.Y. Kim, S.H. Park, E.C. Kim, The role of SIRT1 on angiogenic and odontogenic potential in human dental pulp cells, *J. Endod.* 38 (2012) 899–906. doi:10.1016/j.joen.2012.04.006.

- [78] K. Dashnyam, A. El-fiqi, J.O. Buitrago, R.A. Perez, J.C. Knowles, H. Kim, A mini review focused on the proangiogenic role of silicate ions released from silicon-containing biomaterials, (2017). doi:10.1177/2041731417707339.
- [79] B.K. Jong, Three-dimensional tissue culture models in cancer biology, *Semin. Cancer Biol.* 15 (2005) 365–377. doi:10.1016/j.semcan.2005.05.002.
- [80] D.H. Everett, Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry, *Pure Appl. Chem.* 31 (1972) 577–638. doi:10.1351/pac197231040577.
- [81] V. Karageorgiou, D. Kaplan, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials.* 26 (2005) 5474–5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [82] P. Deb, A.B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, S. Das Lala, Scaffold Development Using Biomaterials: A Review, *Mater. Today Proc.* 5 (2018) 12909–12919. doi:10.1016/j.matpr.2018.02.276.
- [83] B.P. Chan, K.W. Leong, Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations, *Eur. Spine J.* 17 (2008). doi:10.1007/s00586-008-0745-3.
- [84] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 546–554. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
- [85] J. Heino, Cellular Signaling by Collagen-Binding Integrins, in: *J. Phys. A Math. Theor.*, 2014: pp. 143–155. doi:10.1007/978-94-017-9153-3_10.
- [86] R. Bhatnagar, S. Li, Biomimetic scaffolds for tissue engineering., *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 7 (2004) 5021–5023. doi:10.1109/IEMBS.2004.1404387.
- [87] K. Zheng, A. Solodovnyk, W. Li, O.M. Goudouri, C. Stähli, S.N. Nazhat, A.R. Boccaccini, Aging time and temperature effects on the structure and bioactivity of gel-derived 45S5 glass-ceramics, *J. Am. Ceram. Soc.* 98 (2015) 30–38. doi:10.1111/jace.13258.

- [88] C. Vichery, J.-M. Nedelec, *Bioactive Glass Nanoparticles: From Synthesis to Materials Design for Biomedical Applications*, *Materials (Basel)*. 9 (2016) 288. doi:10.3390/ma9040288.
- [89] M. Alshaaer, M.H. Kailani, N. Ababneh, S.A. Abu Mallouh, B. Sweileh, A. Awidi, Fabrication of porous bioceramics for bone tissue applications using luffa cylindrical fibres (LCF) as template, *Process. Appl. Ceram.* 11 (2017) 13–20. doi:10.2298/PAC1701013A.
- [90] D. Barata, C. Van Blitterswijk, P. Habibovic, *Acta Biomaterialia* High-throughput screening approaches and combinatorial development of biomaterials using microfluidics q, *Acta Biomater.* 34 (2016) 1–20. doi:10.1016/j.actbio.2015.09.009.
- [91] K.K. Mallick, Freeze casting of porous bioactive glass and bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.* 92 (2009) 85–94. doi:10.1111/j.1551-2916.2008.02784.x.
- [92] J.R. Jones, L.M. Ehrenfried, L.L. Hench, Optimising bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 964–973. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.07.017.
- [93] E. Sachlos, J. Czernuszka, Making Tissue Engineering Scaffolds Work. Review: The application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *Eur. Cells Mater.* 5 (2003) 29–40. doi:10.22203/eCM.v005a03.
- [94] A. Oyane, H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, Preparation and assessment of revised simulated body fluids, *J Biomed Mater Res.* 65 (2003) 188–195. doi:10.1002/jbm.a.10482.
- [95] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, T. Yamamuro, Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 3 (1992) 79–83. doi:10.1007/BF00705272.
- [96] M. Bohner, J. Lemaître, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution?, *Biomaterials*. 30 (2009) 2175–2179. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.01.008.
- [97] S. Begum, W.E. Johnson, T. Worthington, R.A. Martin, The influence of pH and fluid

dynamics on the antibacterial efficacy of 45S5 Bioglass, *Biomed. Mater.* 11 (2016). doi:10.1088/1748-6041/11/1/015006.

- [98] N.C. Blumenthal, F. Betts, A.S. Posner, Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Res.* 18 (1975) 81–90. doi:10.1007/BF02546228.
- [99] H.H. Lu, S.R. Pollack, P. Ducheyne, 45S5 Bioactive glass surface charge variations and the formation of a surface calcium phosphate layer in a solution containing fibronectin, *Bioact. Glas. Surf. Charg. Solut.* 1 (2000) 454–461. doi:10.1.1.621.1481.
- [100] A. Chandrasekaran, G. Novajra, I. Carmagnola, P. Gentile, S. Fiorilli, M. Miola, M. Boregowda, A. Dakshanamoorthy, G. Ciardelli, C. Vitale-Brovarone, Physico-chemical and biological studies on three-dimensional porous silk/spray-dried mesoporous bioactive glass scaffolds, *Ceram. Int.* 42 (2016) 13761–13772. doi:10.1016/j.ceramint.2016.05.176.
- [101] M. Balouiri, M. Sadiki, S.K. Ibnsouda, Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *J. Pharm. Anal.* 6 (2016) 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- [102] L.A. Buchanan, A. El-Ghannam, Effect of bioactive glass crystallization on the conformation and bioactivity of adsorbed proteins, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 93 (2010) 537–546. doi:10.1002/jbm.a.32561.
- [103] J.F. Desforges, W.E. Stamm, T.M. Hooton, Management of Urinary Tract Infections in Adults, *N. Engl. J. Med.* 329 (1993) 1328–1334. doi:10.1056/NEJM199310283291808.
- [104] J.A. Karlowsky, L.J. Kelly, C. Thornsberry, M.E. Jones, D.F. Sahm, Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States., *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2540–5. doi:10.1128/AAC.46.8.2540-2545.2002.
- [105] J. Vila, E. Sáez-López, J.R. Johnson, U. Römling, U. Dobrindt, R. Cantón, C.G. Giske, T. Naas, A. Carattoli, M. Martínez-Medina, J. Bosch, P. Retamar, J. Rodríguez-Baño, F. Baquero, S.M. Soto, *Escherichia coli* : an old friend with new tidings, *FEMS Microbiol. Rev.* 40 (2016) 437–463. doi:10.1093/femsre/fuw005.

- [106] S. Selvarasu, D.S.W. Ow, S.Y. Lee, M.M. Lee, S.K.W. Oh, I.A. Karimi, D.Y. Lee, Characterizing escherichia coli DH5 α growth and metabolism in a complex medium using genome-scale flux analysis, *Biotechnol. Bioeng.* 102 (2009) 923–934. doi:10.1002/bit.22119.
- [107] G. Sezonov, D. Joseleau-Petit, R. D’Ari, Escherichia coli physiology in Luria-Bertani broth, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8746–8749. doi:10.1128/JB.01368-07.
- [108] S. Pedersen, P. Bloch, S. Reeh, F. Neidhardt, M. Schaechter, O. MaalOe, N.O. Kjeldgaard, Dependency on Medium and Temperature of Cell Size and Chemical Composition during Balanced Growth of Salmonella typhimurium, *Cell.* 14 (1978) 179–190. doi:10.1099/00221287-19-3-592.
- [109] W. Li, J. Zhou, Y. Xu, Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices, *Biomed. Reports.* (2015) 617–620. doi:10.3892/br.2015.481.
- [110] G. Fotakis, J.A. Timbrell, In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicol. Lett.* 160 (2006) 171–177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- [111] C.M. Sayes, F. Liang, J.L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J.M. Beach, V.C. Moore, C.D. Doyle, J.L. West, W.E. Billups, K.D. Ausman, V.L. Colvin, Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro, *Toxicol. Lett.* 161 (2006) 135–142. doi:10.1016/j.toxlet.2005.08.011.
- [112] W.T. Bellamy, A. Odeleye, P. Finley, B. Huizenga, W.S. Dalton, R.S. Weinstein, E.M. Hersh, T.M. Grogan, An in vivo model of human multidrug-resistant multiple myeloma in SCID mice., *Am. J. Pathol.* 142 (1993) 691–697. doi:amjpathol00075-0035.
- [113] M. Taya, T. Mano, T. Kobayashi, Kinetic expression for human cell growth in a suspension culture system, *J. Ferment. Technol.* 64 (1986) 347–350. doi:10.1016/0385-6380(86)90130-5.
- [114] G.E. Moore, H. Kitamura, Cell line derived from patient with myeloma., *N. Y. State J. Med.* 68 (1968) 2054–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5243066>.

- [115] N. Shimizu, A. Tanabe-Tochikura, Y. Kuroiwa, K. Takada, Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV., *J. Virol.* 68 (1994) 6069–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057484>.
- [116] A. Vargas, M. Zeisser-Labouèbe, N. Lange, R. Gurny, F. Delie, The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1162–1176. doi:10.1016/j.addr.2007.04.019.
- [117] P. Rous, J. Murphy, Tumor implantations in the developing embryo, *J. Am. Med. Assoc.* VI (1911) 741. doi:10.1001/jama.1911.02560100033015.
- [118] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials.* 21 (2000) 2529–2543. doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
- [119] C.J. Drake, C.D. Little, Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7657–7661. doi:10.1115/1.2087548.
- [120] G.E. Vargas, R.V. Mesones, O. Bretcanu, J.M.P. López, A.R. Boccaccini, A. Gorustovich, Biocompatibility and bone mineralization potential of 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds in chick embryos, *Acta Biomater.* 5 (2009) 374–380. doi:10.1016/j.actbio.2008.07.016.
- [121] V. Miguez-Pacheco, L.L. Hench, A.R. Boccaccini, Bioactive glasses beyond bone and teeth: Emerging applications in contact with soft tissues, *Acta Biomater.* 13 (2015) 1–15. doi:10.1016/j.actbio.2014.11.004.
- [122] M. Shi, Y. Zhou, J. Shao, Z. Chen, B. Song, J. Chang, C. Wu, Y. Xiao, Stimulation of osteogenesis and angiogenesis of hBMSCs by delivering Si ions and functional drug from mesoporous silica nanospheres, *Acta Biomater.* (2015). doi:10.1016/j.actbio.2015.04.019.
- [123] N. Maulik, D.K. Das, Redox signaling in vascular angiogenesis, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1047–1060.

- [124] J. Zweit, Engineering and functionalization of biomaterials via surface modification, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 1–69. doi:10.1039/c2tb00404f.
- [125] M. Arruebo, R. Fernández-pacheco, M.R. Ibarra, J. Santamaría, Magnetic nanoparticles Controlled release of drugs from nanostructured functional materials, *Rev. Lit. Arts Am.* 2 (2007) 22–32. doi:10.1016/S1748-0132(07)70084-1.
- [126] S. Celic, Y. Katayama, P.J. Chilco, T.J. Martin, D.M. Findlay, Type I collagen influence on gene expression in UMR106-06 osteoblast-like cells is inhibited by genistein., *J. Endocrinol.* 158 (1998) 377–388. doi:10.1677/joe.0.1580377.
- [127] J. Hum, A.R. Boccaccini, Collagen as coating material for 45S5 bioactive glass-based scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018). doi:10.3390/ijms19061807.
- [128] A.W. Norman, CHOLECALCIFEROL | Physiology, in: *Encycl. Food Sci. Nutr.*, Elsevier, 2003: pp. 1213–1220. doi:10.1016/B0-12-227055-X/00223-6.
- [129] L. Tripkovic, H. Lambert, K. Hart, C.P. Smith, G. Bucca, S. Penson, G. Chope, J. Berry, R. Vieth, S. Lanham-new, Comparison of vitamin D 2 and vitamin D 3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status : a systematic review, *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2012) 1357–1364. doi:10.3945/ajcn.111.031070.1.
- [130] T. Kulie, A. Groff, J. Redmer, J. Hounshell, S. Schrage, Vitamin D: An Evidence-Based Review, *J. Am. Board Fam. Med.* 22 (2009) 698–706. doi:10.3122/jabfm.2009.06.090037.
- [131] F. Posa, A. Di Benedetto, G. Colaianni, E.A. Cavalcanti-Adam, G. Brunetti, C. Porro, T. Trotta, M. Grano, G. Mori, Vitamin D effects on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells from dental tissues, *Stem Cells Int.* 2016 (2016). doi:10.1155/2016/9150819.
- [132] M. Driel van, H. Pols, J.P. van Leeuwen, Osteoblast Differentiation and Control by Vitamin D and Vitamin D Metabolites, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 2535–2555. doi:10.2174/1381612043383818.

- [133] L. Ji, W. Qiao, K. Huang, Y. Zhang, H. Wu, S. Miao, H. Liu, Y. Dong, A. Zhu, D. Qiu, Synthesis of nanosized 58S bioactive glass particles by a three-dimensional ordered macroporous carbon template, *Mater. Sci. Eng. C*. 75 (2017) 590–595. doi:10.1016/j.msec.2017.02.107.
- [134] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*. 27 (2006) 2907–2915. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [135] N.J. Kruger, The Bradford Method for Protein Quantitation, in: J.M. Walker (Ed.), *Protein Protoc. Handb.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2002: pp. 15–21. doi:10.1385/1-59259-169-8:15.
- [136] M. Mačković, A. Hoppe, R. Detsch, D. Mohn, W.J. Stark, E. Spiecker, A.R. Boccaccini, Bioactive glass (type 45S5) nanoparticles: In vitro reactivity on nanoscale and biocompatibility, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012). doi:10.1007/s11051-012-0966-6.
- [137] J. Kim, O. Wilhelm, S.E. Pratsinis, Packaging of Sol-Gel-Made Porous Nanostructured Titania Particles by Spray Drying, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001) 2802–2808. doi:10.1111/j.1151-2916.2001.tb01097.x.
- [138] L. Lefebvre, L. Gremillard, J. Chevalier, R. Zenati, D. Bernache-Assolant, Sintering behaviour of 45S5 bioactive glass, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1894–1903. doi:10.1016/j.actbio.2008.05.019.
- [139] 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 Mater.* 55 (2007) 3305–3313. doi:10.1016/j.actamat.2007.01.029.
- [140] B.D. Bond, P.W.M. Jacobs, The thermal decomposition of sodium nitrate, *J. Chem. Soc. A Inorganic, Phys. Theor.* (1966) 1265. doi:10.1039/j19660001265.
- [141] G. Theodorou, O.M. Goudouri, E. Kontonasaki, X. Chatzistavrou, L. Papadopoulou, N. Kantiranis, K.M. Paraskevopoulos, Comparative Bioactivity Study of 45S5 and 58S Bioglasses in Organic and Inorganic Environment, *Bioceram. Dev. Appl.* 1 (2011) 1–4. doi:10.4303/bda/D110154.

- [142] 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, *Dent. Mater.* 29 (2013) 1256–1264. doi:10.1016/j.dental.2013.09.016.
- [143] O. Bretcanu, X. Chatzistavrou, K. Paraskevopoulos, R. Conradt, I. Thompson, A.R. Boccaccini, Sintering and crystallisation of 45S5 Bioglass? powder, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 3299–3306. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2009.06.035.
- [144] J. Wen, J. Li, S. Liu, Q. yuan Chen, Preparation of copper nanoparticles in a water/oleic acid mixed solvent via two-step reduction method, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 373 (2011) 29–35. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.10.009.
- [145] A. Iribarren, E. Hernández-rodríguez, L. Maqueira, Structural , chemical and optical evaluation of Cu-doped ZnO nanoparticles synthesized by an aqueous solution method, *Mater. Res. Bull.* 60 (2014) 376–381. doi:10.1016/j.materresbull.2014.08.059.
- [146] M. Alcaide, P. Portolés, A. López-Noriega, D. Arcos, M. Vallet-Regí, M.T. Portolés, Interaction of an ordered mesoporous bioactive glass with osteoblasts, fibroblasts and lymphocytes, demonstrating its biocompatibility as a potential bone graft material., *Acta Biomater.* 6 (2010) 892–9. doi:10.1016/j.actbio.2009.09.008.
- [147] M. Bellantone, H.D. Williams, L.L. Hench, Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂O-Doped Bioactive Glass, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 1940–1945. doi:10.1128/AAC.46.6.1940-1945.2002.
- [148] L. Argueta-Figueroa, R.A. Morales-Luckie, R.J. Scougall-Vilchis, O.F. Olea-Mejía, Synthesis, characterization and antibacterial activity of copper, nickel and bimetallic Cu-Ni nanoparticles for potential use in dental materials, *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 24 (2014) 321–328. doi:10.1016/j.pnsc.2014.07.002.
- [149] 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 Biomater.* 19 (2015) 15–22. doi:10.1016/j.actbio.2015.03.009.
- [150] L. Marsich, L. Moimas, V. Sergio, C. Schmid, Raman spectroscopic study of bioactive

silica-based glasses: The role of the alkali/alkali earth ratio on the Non-Bridging Oxygen/Bridging Oxygen (NBO/BO) ratio, *Spectroscopy*. 23 (2009) 227–232.
doi:10.3233/SPE-2009-0380.

- [151] D. Bellucci, V. Cannillo, A. Sola, F. Chiellini, M. Gazzarri, C. Migone, Macroporous Bioglass®-derived scaffolds for bone tissue regeneration, *Ceram. Int.* 37 (2011) 1575–1585. doi:10.1016/j.ceramint.2011.01.023.
- [152] Q.Z. Chen, I.D. Thompson, A.R. Boccaccini, 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 2414–2425.
doi:10.1016/j.biomaterials.2005.11.025.
- [153] E.A. Aguilar-Reyes, C.A. León-Patiño, B. Jacinto-Díaz, L.-P. Lefebvre, Structural Characterization and Mechanical Evaluation of Bioactive Glass 45S5 Foams Obtained by a Powder Technology Approach, *J. Am. Ceram. Soc.* 95 (2012) 3776–3780.
doi:10.1111/j.1551-2916.2012.05465.x.
- [154] H. Yun, J. Park, S. Kim, Y. Kim, J. Jang, *Acta Biomaterialia* Effect of the pore structure of bioactive glass balls on biocompatibility in vitro and in vivo, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2651–2660. doi:10.1016/j.actbio.2011.02.014.
- [155] M.M.M. López, J. Fauré, M.I.E. Cabrera, M.E.C. García, Structural characterization and electrochemical behavior of 45S5 bioglass coating on Ti6Al4V alloy for dental applications, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 206 (2016) 30–38.
doi:10.1016/j.mseb.2015.09.003.
- [156] K. Fujikura, N. Karpukhina, T. Kasuga, D.S. Brauer, R.G. Hill, R. V. Law, Influence of strontium substitution on structure and crystallisation of Bioglass® 45S5, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 7395. doi:10.1039/c2jm14674f.
- [157] S. Fagerlund, L. Hupa, Crystallization of 45S5 during Isothermal Heat Treatment, *Ceram. Mater.* 62 (2010) 349–354.
- [158] J. Reyes-Gasga, E. Martínez-Piñeiro, G. Rodríguez-Álvarez, G. Tiznado-Orozco, R. García-García, E. Brés, XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel

and synthetic hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C*. 33 (2013) 4568–4574.
doi:10.1016/j.msec.2013.07.014.

- [159] A. Posner, F. Betts, Synthetic amorphous calcium-phosphate and its relation to bone-mineral structure, *Acc. Chem. Res.* 8 (1975) 273–281. doi:10.1021/ar50092a003.
- [160] L.-C. Gerhardt, A.R. Boccaccini, Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Materials (Basel)*. 3 (2010) 3867–3910. doi:10.3390/ma3073867.
- [161] K. Rezwani, Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*. 27 (2006) 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- [162] D.C. Clupper, J.J. Mecholsky, G.P. LaTorre, D.C. Greenspan, Bioactivity of tape cast and sintered bioactive glass-ceramic in simulated body fluid, *Biomaterials*. 23 (2002) 2599–2606. doi:10.1016/S0142-9612(01)00398-2.
- [163] A. Oliveira, M. Gabriela, M. Helena, V. Fernandes, N. Gomes, In Vitro Studies of Bioactive Glass / polyhydroxybutyrate Composites, *Mater. Res.* 9 (2006) 417–423.
- [164] L.A. Haro Durand, G.E. Vargas, N.M. Romero, R. Vera-Mesones, J.M. Porto-López, A.R. Boccaccini, M.P. Zago, A. Baldi, A. Gorustovich, Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass, *J. Mater. Chem. B*. 3 (2015) 1142–1148. doi:10.1039/C4TB01840K.
- [165] S. Adibnia, A. Nemati, M. Fathi, S. Baghshahi, Synthesis and Characterization of Sol-Gel Derived Hydroxyapatite-Bioglass Composite Nanopowders for Biomedical Applications, *J. Biomim. Biomater. Tissue Eng.* 12 (2012) 51–57.
doi:10.4028/www.scientific.net/JBBTE.12.51.
- [166] P. Feng, M. Niu, C. Gao, S. Peng, C. Shuai, A novel two-step sintering for nano-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Sci. Rep.* 4 (2015) 1–10.
doi:10.1038/srep05599.
- [167] S. Eqtesadi, A. Motealleh, P. Miranda, A. Pajares, A. Lemos, J.M.F. Ferreira, Robocasting

of 45S5 bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering, *J. Eur. Ceram. Soc.* 34 (2014) 107–118. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2013.08.003.

- [168] T. Abdalrahman, S. Scheiner, C. Hellmich, Is trabecular bone permeability governed by molecular ordering-induced fluid viscosity gain? Arguments from re-evaluation of experimental data in the framework of homogenization theory, *J. Theor. Biol.* 365 (2015) 433–444. doi:10.1016/j.jtbi.2014.10.011.
- [169] T. Beno, Y. Yoon, S.C. Cowin, S.P. Fritton, Estimation of bone permeability using accurate microstructural measurements, 39 (2006) 2378–2387. doi:10.1016/j.jbiomech.2005.08.005.
- [170] C.B. Bozal, Los osteocitos como mecanosensores del hueso, 9 (2013) 176–193.
- [171] E. Boccardi, F.E. Ciraldo, A.R. Boccaccini, Bioactive glass-ceramic scaffolds: Processing and properties, *MRS Bull.* 42 (2017) 226–232. doi:10.1557/mrs.2017.28.
- [172] E. Boccardi, A. Philippart, J.A. Juhasz-Bortuzzo, G. Novajra, C. Vitale-Brovarone, A.R. Boccaccini, Characterisation of Bioglass based foams developed via replication of natural marine sponges, *Adv. Appl. Ceram.* 114 (2015) S56–S62. doi:10.1179/1743676115Y.0000000036.
- [173] G. Stanciu, I. Sandulescu, B. Savu, Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface, *J. Biomed. & 1* (2007) 34–39. [http://www3.ntu.edu.sg/bmerc/contents/JBPE/J001/JBPE 1\(1\); 34-39.pdf](http://www3.ntu.edu.sg/bmerc/contents/JBPE/J001/JBPE 1(1); 34-39.pdf).
- [174] V. V Kostov-kytin, E. Dyulgerova, R. Ilieva, V. Petkova, Powder X-ray diffraction studies of hydroxyapatite and β -TCP mixtures processed by high energy dry milling, *Ceram. Int.* 44 (2018) 8664–8671. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.094.
- [175] D.N. Ungureanu, N. Angelescu, R.M. Ion, E. V. Stoian, C.Z. Rizescu, Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite Nanopowders by Chemical Precipitation, *Recent Res. Commun. Autom. Signal Process. Nanotechnology, Astron. Nucl. Phys.* . (2011) 296–301. doi:10.1007/s40097-014-0099-9.

- [176] R.K. Brundavanam, G. Eddy, J. Poinern, D. Fawcett, Modelling the Crystal Structure of a 30 nm Sized Particle based Hydroxyapatite Powder Synthesised under the Influence of Ultrasound Irradiation from X-ray powder Diffraction Data, *Am. J. M Aterials Sci.* 3 (2013) 84–90. doi:10.5923/j.materials.20130304.04.
- [177] M. Handel, T.R. Hammer, P. Nooeaid, A.R. Boccaccini, D. Hoefler, 45S5-Bioglass[®] - Based 3D-Scaffolds Seeded with Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Induce *In Vivo* Vascularization in the CAM Angiogenesis Assay, *Tissue Eng. Part A.* 19 (2013) 2703–2712. doi:10.1089/ten.tea.2012.0707.
- [178] H. Pan, B.W. Darvell, Effect of carbonate on hydroxyapatite Solubility, *Cryst. Growth Des.* 10 (2010) 845–850. doi:10.1021/cg901199h.
- [179] R.Z. Legeros, O.R. Trautz, J.P. Legeros, E. Klein, W.P. Shirra, Apatite crystallites: effects of carbonate on morphology., *Science.* 155 (1967) 1409–1411. doi:10.1126/science.155.3768.1409.
- [180] M. Rismanchian, N. Khodaeian, L. Bahramian, M. Fathi, H. Sadeghi-Aliabadi, In-vitro comparison of cytotoxicity of two bioactive glasses in micropowder and nanopowder forms, *Iran. J. Pharm. Res.* 12 (2013) 437–443. doi:17350328.
- [181] A. Doostmohammadi, A. Monshi, R. Salehi, M. Fathi, E. Seyedjafari, A. Shafiee, M. Soleimani, Cytotoxicity evaluation of 63s bioactive glass and bone-derived hydroxyapatite particles using human bone-marrow stem cells., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palack??, Olomouc, Czechoslov.* 155 (2011) 323–326. doi:10.5507/bp.2011.028.
- [182] J. Uggeri, S. Guizzardi, R. Scandroglio, R. Gatti, Adhesion of human osteoblasts to titanium: A morpho-functional analysis with confocal microscopy, *Micron.* 41 (2010) 210–219. doi:10.1016/j.micron.2009.10.013.
- [183] G.E. Vargas, L.A.H. Durand, V. Cadena, M. Romero, R.V. Mesones, M. Mačković, S. Spallek, E. Spiecker, A.R. Boccaccini, A.A. Gorustovich, Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 24 (2013) 1261–1269. doi:10.1007/s10856-013-4892-7.

- [184] R.M. Day, Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis *in Vitro*, *Tissue Eng.* 11 (2005) 768–777. doi:10.1089/ten.2005.11.768.
- [185] L. Zhang, L. Lü, W.M. Chan, Y. Huang, M.S.M. Wai, D.T. Yew, Effects of DL-3-n-Butylphthalide on Vascular Dementia and Angiogenesis, *Neurochem. Res.* 37 (2012) 911–919. doi:10.1007/s11064-011-0663-3.
- [186] M.G. Marks, J. Shi, M.O. Fry, Z. Xiao, M. Trzyna, V. Pokala, M.A. Ihnat, P.-K. Li, Effects of Putative Hydroxylated Thalidomide Metabolites on Blood Vessel Density in the Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay and on Tumor and Endothelial Cell Proliferation, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 597–604. doi:10.1248/bpb.25.597.
- [187] A. Cranney, T. Horsley, S. O'Donnell, H. Weiler, L. Puil, D. Ooi, S. Atkinson, L. Ward, D. Moher, D. Hanley, M. Fang, F. Yazdi, C. Garritty, M. Sampson, N. Barrowman, A. Tsertsvadze, V. Mamaladze, Effectiveness and safety of vitamin D in relation to bone health., *Evid. Rep. Technol. Assess. (Full. Rep.)*. (2007) 1–235.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088161>.
- [188] C. Minkin, X.H. Yu, Calcitonin receptor expression and its regulation by 1 alpha-25-dihydroxyvitamin D3 during de novo osteoclast formation in organ cultures of fetal mouse metatarsals., *Bone Miner.* 13 (1991) 191–200.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1650619>.
- [189] A.P. Mee, J.A. Hoyland, I.P. Braidman, A.J. Freemont, M. Davies, E.B. Mawer, Demonstration of vitamin D receptor transcripts in actively resorbing osteoclasts in bone sections., *Bone.* 18 (1996) 295–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8726384>.
- [190] S.K. Misra, S.E. Philip, W. Chrzanowski, S.N. Nazhat, I. Roy, J.C. Knowles, V. Salih, A.R. Boccaccini, Incorporation of vitamin E in poly(3hydroxybutyrate)/Bioglass composite films: effect on surface properties and cell attachment, *J. R. Soc. Interface.* 6 (2009) 401–409. doi:10.1098/rsif.2008.0278.
- [191] V. V. Artym, K. Matsumoto, Imaging Cells in Three-Dimensional Collagen Matrix, *Curr. Protoc. Cell Biol.* 48 (2010) 10.18.1-10.18.20. doi:10.1002/0471143030.cb1018s48.

- [192] J. Heino, The collagen family members as cell adhesion proteins, *BioEssays*. 29 (2007) 1001–1010. doi:10.1002/bies.20636.
- [193] B.D.C. Vidal, M.L.S. Mello, Collagen type I amide I band infrared spectroscopy, *Micron*. 42 (2011) 283–289. doi:10.1016/j.micron.2010.09.010.
- [194] J.H. Muyonga, C.G.B. Cole, D.K. G, Food Chemistry Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chem*. 86 (2004) 325–332. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.038.
- [195] X. Li, L. Lin, Y. Zhu, W. Liu, T. Yu, M. Ge, Preparation of ultrafine fast-dissolving cholecalciferol-loaded poly(vinyl pyrrolidone) fiber mats via electrospinning, *Polym. Compos*. 34 (2013) 282–287. doi:10.1002/pc.22402.
- [196] M.E. Abad-Javier, R.E. Nuñez-Anita, M. Cajero-Juárez, M.E. Contreras-García, Comparability in bioactivity assays of 45s5 bioglass scaffolds using simulated body fluid and rabbit blood plasma, *IOSR J. Pharm. Biol. Sci*. 13 (2018) 13–23. doi:10.9790/3008-1304061323.
- [197] A.A. Gorustovich, G.E. Vargas, O. Bretcanu, R. Vera Mesones, J.M. Porto López, A.R. Boccaccini, Novel bioassay to evaluate biocompatibility of bioactive glass scaffolds for tissue engineering, *Adv. Appl. Ceram*. 107 (2008) 274–276. doi:10.1179/174367508X306541.

CAPÍTULO 8. ANEXOS

Premio CANIFARMA 2017



PRIMER LUGAR EN LA CATEGORÍA DE INVESTIGACIÓN BÁSICA :

M. en C. Mario Eduardo Abad Javier

como Autor por el Trabajo Titulado:

"SÍNTESIS Y BIOFUNCIONALIZACIÓN DE BIOVIDRIO NANOESTRUCTURADO CON ENFOQUE BIOMÉDICO EN LA RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDO EPIDÉRMICO Y ÓSEO PARA EL TRATAMIENTO CORRECTIVO Y PROFILÁCTICO DEL PIE DIABÉTICO"

Ciudad de México a 26 de Octubre de 2017

Ing. Guillermo Funes Rodríguez
Presidente del Consejo Directivo de la Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica

M.E. Abad-Javier, M. Cajero-Juárez, M.E. Contreras García, 45S5 Bioglass porous scaffolds: structure, composition and bioactivity characterization, Epa. - J. Silic. Based Compos. Mater. 68 (2016) 124–128. doi:10.14382/epitoanyag-jsbcm.2016.22.

45S5 Bioglass porous scaffolds: structure, composition and bioactivity characterization

ME ABAD-JAVIER • IMM UMSNH • ibq.mario.abad@outlook.com

M CAJERO-JUÁREZ • IIAF UMSNH • cajeromarco@hotmail.com

ME CONTRERAS GARCÍA • IMM UMSNH • eucontre@gmail.com

Érkezett: 2016. 11. 02. • Received: 02. 11. 2016. • <http://dx.doi.org/10.14382/epitoanyag-jsbcm.2016.22>

Abstract

Advanced ceramics development is a promising area in regenerative medicine; although there are different biomaterials with features that make them viable enough, their improvement and optimization is required to produce biomaterials easier to bio assimilate and promote a faster tissue recovery. At this work a nanostructured bioglass based biomimetic scaffold is developed, beginning with the sol-gel synthesis parameters establishment coupled with a spray drying stage. Through X-ray diffraction the crystal $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{18}$ phase was characterized, this phase is common to find in almost every 45S5 bioglass different synthesis processes, also a standard of mammalian hydroxyapatite was prepared to be used as a comparative control in determining the bioglass scaffold bioactivity. Three-dimensional structure was characterized by optical and scanning electron microscopy, coupled to a semi-quantitative technique (EDS) to determine the composition of the synthesized biomaterial. Subsequently, simulated body fluid (SBF) was used as an in vitro system, whose composition emulates the ionic blood concentration to evaluate the scaffold bioactivity.

Keywords: Bioglass, bioscaffold, bioactivity, characterization

1. Introduction

Tissue engineering has emerged as a promising option for organ regeneration after partially or totally lost as an accident result, diseases, aging, among others. Tissue engineering has the potential to solve problems such as short feasibility time of donated tissues and even the donor's shortage [1,2]. A biomaterial is defined as a bioactive compound, able to bind chemically and form links with living tissue or be assimilated into the new tissue formation [3, 4], and a bioscaffold is a three-dimensional structure made from a biomaterial, to support and guide cell proliferation. At the same time, in the bioscaffold structure can be incorporated other components able to promote tissue regeneration, such as growth factors or other structure molecules as collagen [1].

The biological activity of bioglass scaffolds is ion release dependent, where calcium, phosphorus and silicon ions can modify osteogenic cells gene expression and vascularization, promoting a higher bone formation rate [3]. Particularly, bioglass bioactivity has been improved by the interconnected porous structure generation, allowing high surface area configurations, favoring their use for bone regeneration and making them candidates for controlled drug release in specific body areas [5-7].

Bone structure consists of several organic and inorganic layers, at the organic fraction can be found collagen, granular proteoglycans, cells and non collagenic proteins [8], while the main inorganic fraction is calcium and hydroxyapatite mineral carbonated, that develops along collagen fibers, forming nanocrystals of 40 nm long with 10 nanometers wide, generating an inorganic nanocomposite; while a 20-30% hydroxyapatite fraction, is in amorphous phase for release ions to the blood [7].

ME Abad-Javier

Master of sciences since 2014, post-graduate student in Ceramic Biomaterials, Department of Advanced Ceramics, Metallurgy and Materials Research Institute on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. He is specialist in sciences of biofunctionalization and synthesis of ceramic materials, and physico-chemical analysis of materials and biomolecules based on structure, chemical properties and quantification. His teaching experience include: introduction to bioassays, technical capacitation and analytical methods design.

M Cajero-Juárez

Doctor in Genetic and Molecular Biology, Titular C Professor and Researcher at the Animal Biotechnology Laboratory of the IIAF on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo and National Researcher. Specialized on animal genome Manipulation, gene expression on cells and synthetic biology for gene and protein design.

ME CONTRERAS GARCÍA

Doctor of Sciences since 2000, Titular C Professor and Researcher at the Ceramic Materials Department of the Metallurgy and Materials Research Institute on the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo since 1988 and Level 2 National Researcher since 2001. Specialized on Ceramic Synthesis and Processing Techniques such as ceramic powder processing via sol-gel and chemical techniques, focused on nanostructured ceramics processing and functional ceramics including: structural ceramics, bioceramics, magnetic ceramics, optoelectronic ceramics, catalytic and photocatalytic ceramics, macro-mesoporous ceramics all of them in bulk and in thin films. She is author and co-author of more than 100 international indexed papers, two book chapters and editor in one. She is member of several scientific societies and regional director of the Mexican Academy of Crystallography.

The bioglass scaffold design in conjunction with cell therapy have offered a broad overview regarding the tissue replacement, although there are some problems to overcome as the production and support of cells in the biological area and the development of interconnected networks in the advanced ceramics area, due to the compatibility donor-recipient and the microenvironment necessary for generating functional tissue, respectively [9, 10].

Sol-gel synthesis systems coupled with spray drying techniques make it possible to produce bioglass whose composition and mechanical properties comply with the parameters established by different institutions such as the FDA in the United States. Furthermore, the use of these methodologies allows to design nanoparticles aggregates with controlled porosities, standardized diameters and chemical modifiers as silver or polymers, facilitating the experimental design, analysis and helping to overcome the interconnected scaffold structure [11-14]. Nanostructured materials doping has been useful for improve the structural and functional characteristics [14]. Specifically, antimicrobial activity can be conferred upon a biomaterial after doping with silver or copper through the release of these ions in the organism, antimicrobial mechanisms triggers membrane depolarization or generate SOS stress type in bacteria [15-17], however doping in implants is regulated by the ion lethal dose, plus the generated additional costs.

M.E. Abad-Javier, R.E. Nuñez-Anita, M. Cajero-Juárez, M.E. Contreras-García,
Comparability in bioactivity assays of 45s5 bioglass scaffolds using simulated body fluid
and rabbit blood plasma, IOSR J. Pharm. Biol. Sci. 13 (2018) 13–23. doi:10.9790/3008-
1304061323.

IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)
e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN: 2319-7676. Volume 13, Issue 4 Ver. VI (Jul – Aug 2018), PP 13-23
www.iosrjournals.org

**Comparability in bioactivity assays of 45s5 bioglass scaffolds
using simulated body fluid and rabbit blood plasma**

Abad-Javier, M.E.¹; Nuñez-Anita, R.E.²; Cajero-Juárez, M.²;
Contreras-García, M.E.¹

¹(Advanced Ceramics Department, Instituto de Investigaciones en Metalurgia y Ciencias de los
Materiales/Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México)

²(Proteomic and Cellular Bioengineering Unit, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia/ Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México)

³(Animal Biotechnology Laboratory, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales/ Universidad
Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México)³

Abstract :Currently the development of viable biomaterials for replacement of damaged or lost tissue has become a humanitarian need due to the large number of degenerative syndromes and traumas, compromising the tissue and surrounding organs. 45s5 bioactive glass has been exhaustively studied around the world for bone replacement, but it does exist several factors involved in the bioactivity which need to be analyzed, such as local protein presence or differences in carbonate disposition in the surrounding medium. Bioactive scaffolds made of bioglass 45s5 were prepared by the sol-gel via coupled to spray drying, employing polystyrene microspheres as template agents and heat treatment at 700 °C. The bioactivity was examined in vitro with simulated body fluid (SBF) and rabbit blood plasma (RBP), examined by the ability of hydroxyapatite layer to condensate on the material surface. Bioglass scaffolds and hydroxyapatite formation were characterized by X-ray diffraction (XRD), surface electron microscopy (SEM) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Hydroxyapatite conformation in bioscaffolds incubated in RBP determine the dependence of CO₂ disposition in order to obtain microspheres conformed by micro whisker, the typically obtained morphology in bioscaffolds incubated in SBF.

Keywords –Bioglass, SBF, rabbit-blood-plasma, bioactivity, hydroxyapatite-morphology

Date of Submission: 14-03-2018

Date of acceptance: 30-08-2018

I. Introduction

Bone reconstitution is a complex process that involves cell process like migration of osteoprogenitor cells engaged to chemical processes like the mineral bone phase degradation and reconstitution, stages responsible of remodeling of the bone. The bone tissue engineering use chemical processes in order to develop active materials to allow the bone formation by their own hydrolysis. these materials also can be structured to contain interconnected pores and higher specifically surface areas bringing on the bioscaffolds production to produce a bone mimetically structure. This bioscaffolds can be used like prosthetic materials and drugs/biomolecules carriers such as growth factors, structural proteins or anti-inflammatory compounds[1].

A fundamental stage in bioscaffolds development for bone regeneration is the formation of a hydroxyapatite layer that serves as a chemical bond between the implant and the organism, this bone-like apatite formation has been studied by in vitro solutions such as SBF and TRIS buffer[2], [3]. Silicate bioactive materials like 45s5 Bioglass release and exchange soluble Si, Ca, P and Na ions, which lead to hydroxyapatite condensation or stimulation at intracellular or extracellular levels[4], although the bonding mechanism bone-scaffold is not well determinate, it is generally believed that hydroxyapatite layer formation is a critical factor for cell adhesion and protein absorption. Simulated body fluid (SBF) has been the most important used test media in the bioactivity analysis, however, although the SBF employs ion concentrations approximately equal to those found on human blood plasma[5], it is difficult to determine what effect the presence of plasma proteins may have on hydroxyapatite condensation, ion absorption on scaffold surface.

Hydroxyapatite, is a calcium phosphate ceramic and act as osteoconductive matrix, allowing bone cells to grow attached, the hydroxyapatite formation rate depends of the Si, Ca and P ions disposition and start with the repolymerization of a SiO₂-rich layer on the surface followed by the migration of Ca²⁺ and PO₄³⁻ groups to the surface forming a hydroxylated CaO-P₂O₅ layer and the consequent crystallization, incorporation of OH⁻, CO₃²⁻ or F⁻ anions from the media form a mixed hydroxyl, carbonate, fluorapatite layer[6]. Additionally, several works employing animal serum or plasma have demonstrated the hydroxyapatite layer condensation inhibition