

# Capítulo 8

## Vitrocerámicas porosas para ingeniería de tejidos: Desarrollo, degradación y biocompatibilidad *in vitro*

### 8.1. INTRODUCCIÓN

Ya en capítulos anteriores se mencionó la utilización de auto, alo y xenoinjertos como una posible solución a los problemas relacionados con la sustitución de tejido óseo. A pesar de que el uso de este tipo de injertos ha tenido resultados satisfactorios en algunos casos, éstos presentan ciertas limitaciones como la disponibilidad de material (hueso), problemas de tipo anatómico y el riesgo de transmisión de enfermedades entre otras.

Debido a las numerosas restricciones que este tipo de injertos biológicos presenta, el desarrollo de materiales sintéticos y su utilización en ingeniería de tejidos se ha convertido en una de las opciones con más futuro. Este tipo de substitutos sintéticos deben ser creados especialmente para estimular la regeneración ósea y servir de soporte al tejido neoformado. Existen dos estrategias generales en el área de ingeniería de tejidos: la primera consiste en la elaboración de andamios tridimensionales donde las células son colocadas *in vitro* para así promover la secreción de matriz extra-celular y la formación de tejido *in vitro*, antes de ser implantado. La segunda estrategia, consiste en el desarrollo de materiales con una porosidad interconectada capaces de alojar en su interior células óseas y guiar la regeneración del hueso *in vivo*. Dentro de este contexto, varios materiales, la mayoría de ellos polímeros y algunas cerámicas han

sido propuestas para el desarrollo de estos andamios (1-7). Los vidrios solubles, basados en fosfato de calcio, representan una opción interesante como material biodegradable para la elaboración de estructuras para ingeniería de tejidos.

Una de las características que un andamio 3D debe cumplir es una reabsorción controlada. La degradación del andamio debe estar sincronizada con la regeneración del tejido. En general, la hidroxiapatita cristalina posee una velocidad de reabsorción muy baja para esta aplicación ya que ésta es casi insoluble al pH fisiológico normal (8). Como ya sabemos, los vidrios en el sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$  presentan una solubilidad controlada (9;10) y ya vimos en el capítulo 4, que tanto el vidrio G0 como el G5 no son citotóxicos.

Otra característica de gran importancia en los andamios tridimensionales, es la porosidad. Lo ideal sería obtener estructuras formadas por una red de poros interconectados con una amplia variedad de tamaños de poro. Poros grandes del orden de 100-200  $\mu m$ , que permitan el crecimiento y vascularización del nuevo tejido dentro de ellos, y poros en el rango de los microporos y/o nanoporos, para promover la adsorción de proteínas y consecuentemente la adhesión y proliferación celular.

Existen diferentes estrategias para la elaboración de estas estructuras 3D en vidrio y cerámica. Algunas de las técnicas utilizadas son: la incorporación de diversos tipos de agentes porogénicos, de agentes espumantes y emulsificantes, la impregnación de un esqueleto poroso de poliuretano o algún otro polímero, en una emulsión cerámica, y la técnica de fabricación libre de sólido (*solid free form fabrication technique*) que consiste en la colocación del material capa sobre capa sin la necesidad de un molde (4;11-15).

Uno de los agentes espumantes utilizados para generar porosidad es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La descomposición de este compuesto tiene lugar a 60°C y conlleva la liberación de  $O_2$ . El oxígeno liberado induce la formación de burbujas en el interior del material dando paso a la estructura porosa. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para la elaboración de diversas cerámicas y vitrocerámicas porosas a partir de hidroxiapatita, TCP (*tricalcium phosphate*), y *Bioglass*®(14;16;17). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos son estudios *in vivo* donde el enfoque principal está centrado en la interacción entre el tejido óseo y el material, y se dice poco respecto al porcentaje de porosidad alcanzado o al tamaño y morfología de los poros obtenidos con esta técnica.

## **Objetivo**

Este capítulo describe un método para la obtención de estructuras 3D porosas de vidrio y vitrocerámica en el sistema  $P_2O_5$ -CaO- $Na_2O$ - $TiO_2$ . El método consiste en el espumado de una dispersión de partículas de vidrio con peróxido de hidrógeno, seguido de un proceso de sinterización a una temperatura menor a la temperatura de cristalización

del vidrio. Este método ha sido utilizado tanto en el caso de las cerámicas como en el caso de los vidrios bioactivos de base Si (14;18). Sin embargo, ninguno de estos materiales es completamente bioabsorbible. La aplicación de este método a los vidrios de fosfato podría permitir la elaboración de estructuras macroporosas solubles con una degradación controlada.

En este capítulo, se analizan varios parámetros que afectan tanto la arquitectura/microestructura de los andamios porosos, como las cantidades relativas de fases amorfas/cristalinas presentes, que a su vez condicionan notablemente la resorbabilidad del andamio. Asimismo, se presenta un estudio de degradación y un estudio de biocompatibilidad con el fin de analizar el comportamiento del material *in vitro*, y la respuesta de la interacción material-célula con el nuevo material poroso.

## 8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.2.1. Materiales

Los materiales utilizados fueron partículas del vidrio G5 < 30 μm y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de Panreac (cod.141077).

### 8.2.2. Preparación de los andamios porosos

Con la finalidad de evaluar la influencia de tres diferentes parámetros: porcentaje de agente espumante ( solución de peróxido de hidrógeno al 10% en volumen de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) presente en la mezcla, temperatura de sinterización y tiempo de sinterización, se llevó a cabo un diseño experimental factorial de tipo 2<sup>3</sup>. Las variables usadas y el diseño experimental se encuentran resumidos en la Tabla 8.1. Brevemente, se utilizaron dos porcentajes diferentes de agente espumante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 40 y 60 % en peso), dos temperaturas de sinterización (540 y 570°C) y dos tiempos de sinterización ( 2 y 3 horas). Las diferentes muestras estudiadas y los códigos asignados se encuentran en la Tabla 8.2.

**Tabla 8.1**  
**Factores y niveles utilizados en el diseño experimental**

Factor	Niveles	
	+	-
Agente espumante (peso/peso)	60	40
Temperatura de Sinterización (°C)	570	540
Tiempo de Sinterización (h)	3	2

Para la elaboración de los andamios, se utilizaron partículas de vidrio G5, que fueron obtenidas después de moler el vidrio en un molino planetario de ágata y tamizadas hasta obtener partículas menores a 30  $\mu\text{m}$ .

Antes de elaborar los andamios, se realizó un análisis térmico diferencial (ATD) de las partículas de vidrio para así obtener los valores de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y de la temperatura de cristalización ( $T_c$ ) y poder determinar el rango de temperaturas adecuado para el tratamiento térmico del material. Este paso fue necesario ya que uno de los objetivos era obtener andamios porosos con estructura amorfa similar a la del vidrio de partida. Por lo tanto, era indispensable conocer la temperatura de cristalización para así seleccionar la temperatura de sinterización y evitar la formación de fases cristalinas durante el procesado. El ATD fue llevado a cabo siguiendo las mismas condiciones descritas en la sección 2.2.2.1 del capítulo 2. Una vez conocidas las  $T_g$  (522°C) y  $T_c$  (618.1°C) de las partículas de G5, se procedió a la elaboración de las estructuras porosas.

Para obtener los vidrios o vitrocerámicas macroporosas, se mezclaron las partículas de vidrio con los dos porcentajes (40 y 60% en peso) de la solución de agente espumante. Una vez hecha la mezcla, se vertió en pequeños moldes cilíndricos de Teflón (10 mm de diámetro y 5 mm de altura) y se llevó al horno a 60°C durante 2,5 horas para su espumado. Los cuerpos verdes fueron sinterizados aplicando diferentes tratamientos térmicos con una temperatura ligeramente mayor a la  $T_g$  para evitar así la devitrificación del vidrio. Las muestras fueron sinterizadas a 540° y 570°C durante 2 o 3 horas.

---

**Tabla 8.2**  
**Códigos de las diferentes muestras elaboradas en el estudio, según el contenido en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el procesamiento térmico.**

<b>Código del Material</b>	<b>Agente espumante (peso/peso)</b>	<b>Temperatura de Sinterización(°C)</b>	<b>Tiempo de Sinterización (h)</b>
<b>G40a2</b>	40	540	2
<b>G40a3</b>	40	540	3
<b>G40b2</b>	40	570	2
<b>G40b3</b>	40	570	3
<b>G60a2</b>	60	540	2
<b>G60a3</b>	60	540	3
<b>G60b2</b>	60	570	2
<b>G60b3</b>	60	570	3

---

a=540°C y b=570°C

### **8.2.3. Caracterización de los andamios**

#### **8.2.3.1. Microscopía electrónica de barrido**

La porosidad, morfología y microestructura de las muestras fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, se fracturaron las diferentes muestras y la superficie de fractura de las mismas fue cubierta con oro.

El tamaño y la morfología de los poros fue estudiado a partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica utilizando un analizador de imágenes a través del programa Omnimet 5.1. Los parámetros estudiados fueron el largo, el ancho y el diámetro circular equivalente.

#### **8.2.3.2. Porosidad**

La porosidad de los andamios fue cuantificada utilizando picnometría de mercurio. Para esto, se sumergieron con la ayuda de un dispositivo metálico, uno a uno los andamios en un recipiente con mercurio colocado sobre una balanza. Conociendo la densidad del mercurio ( $\rho_{Hg}=13.57 \text{ g/cm}^3$ ) y la masa indicada por la balanza, se calculó el volumen de mercurio ( $Vol_{Hg}$ ). El volumen desplazado por el mercurio es equivalente al volumen de la muestra en cuestión. Por lo que, conociendo el  $Vol_{Hg}$  y la masa inicial de la misma ( $M_{muestra}$ ), se puede calcular la densidad aparente ( $\rho_a$ ) a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho_a = \frac{M_{muestra}}{Vol_{Hg}} \quad [8.1]$$

Usando tanto la densidad aparente como la densidad de la vitrocerámica ( $\rho_{GC}=2.957 \text{ g/cm}^3$ , medida por picnometría con el material pulverizado siguiendo el método descrito en el capítulo 5), se calculó el porcentaje de porosidad según la siguiente ecuación (19):

$$\%P = \left( 1 - \frac{\rho_a}{\rho_{GC}} \right) * 100 \quad [8.2]$$

donde P es el porcentaje de porosidad,  $\rho_a$  es la densidad aparente y  $\rho$  es la densidad del material no poroso. Se realizaron dos mediciones por cada tipo de material.

#### **8.2.3.3. Determinación de fases presentes**

La devitrificación del vidrio o formación de nuevas fases cristalinas fue evaluada por medio de difracción de rayos X (DRX). Las muestras fueron pulverizadas para su análisis por DRX. También se llevó a cabo el análisis de las diferentes muestras por

espectroscopia Raman con el fin de determinar los cambios estructurales en la red vítrea, originados durante el proceso de sinterización. Tanto el estudio por DRX como la espectroscopia Raman se llevaron a cabo siguiendo las condiciones descritas en capítulos anteriores (capítulos 6 y 2 respectivamente). Los difractogramas obtenidos a partir del análisis por DRX, fueron indexados mediante los patrones estándares del “*Joint Comitee on Power Diffraction Standards*” (JCPDS) para así identificar las diferentes fases formadas.

#### **8.2.4. Degradación *in vitro* de los andamios porosos**

El ensayo de degradación se llevó a cabo por un período de 9 semanas y se realizó según el procedimiento descrito en la sección 3.2.2.1 del capítulo 3, correspondiente a la degradación de los vidrios de fosfato. Se utilizó como medio de inmersión fluido fisiológico simulado (SBF) a 37°C y una relación superficie/volumen de 1 g / 50 ml de fluido.

##### **8.2.4.1. Determinación de la pérdida de peso**

La degradación del material fue evaluada mediante mediciones semanales de pérdida de peso, usando la ecuación [2.6]. Para esto, se utilizaron muestras del G60a3 en forma de polvo. El ensayo se hizo por triplicado. Las estructuras porosas fueron pulverizadas con un mortero de ágata y tamizadas hasta alcanzar un tamaño de partícula < 30  $\mu\text{m}$ , por lo que se colocaron 2 g aproximadamente de material en envases de polietileno junto con el fluido. Como material control se utilizó el vidrio G5, el cual fue pulverizado al igual que las muestras de G60a3 para así poder comparar el efecto de la cristalización en la solubilidad del vidrio. Cada semana el líquido fue extraído del envase cuidadosamente y posteriormente los envases fueron colocados en una estufa a 90°C para eliminar el agua restante. Las muestras fueron secadas hasta la estabilización de su peso.

##### **8.2.4.2. Microscopia electrónica de barrido**

Para la observación por microscopia electrónica, se utilizaron muestras cilíndricas de 10 mm de diámetro x 5 mm de altura aproximadamente. Las muestras fueron introducidas en SBF a 37°C siguiendo la relación superficie/volumen antes descrita y después de 3, 6 y 9 semanas de degradación en el SBF, las muestras fueron extraídas del fluido, lavadas con agua destilada y secadas en una estufa a 37°C durante 24 horas aproximadamente. Una vez secas, las muestras fueron cubiertas con oro para su observación en el microscopio *Jeol JSM-6400*.

### **8.2.4.3. Cambios estructurales en la superficie del material**

La evolución de la estructura del vidrio G60a3 en su superficie durante el período de degradación fue estudiada mediante espectroscopia Raman. Al igual que en el caso de la microscopia electrónica, se utilizaron muestras cilíndricas. Después de 3, 6 y 9 semanas de inmersión en SBF, se llevó a cabo el análisis microraman de la superficie del material. Para ello se siguió el protocolo descrito en el apartado 2.2.2.5 (capítulo 2).

### **8.2.4.4. Análisis estadístico**

La significación estadística de las diferencias de los valores medios obtenidos en los diferentes ensayos fueron evaluadas mediante el método One-way-ANOVA con el software Origin 6.1. Se han considerado que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **8.2.5. Cultivos Celulares**

Para ensayar la citotoxicidad del nuevo material, se siguieron dos métodos diferentes. El primer método consistió en colocar las células en contacto directo con el material, y el segundo método consistió en realizar el cultivo con los extractos de los materiales tal como se ha descrito en capítulos anteriores.

Dado que la reabsorción del material es un factor de gran importancia en el desarrollo de este tipo de materiales para regeneración ósea, se eligió el material con mayor porcentaje de fase vítrea y el más poroso, para la realización de este estudio de biocompatibilidad.

Para realizar los diferentes ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular SAOS-2, que está constituida por células de osteosarcoma humano de tipo osteoblástico, ampliamente utilizadas en los estudios biológicos. Para el cultivo, inicialmente se colocaron las células en placas de cultivo junto con 15 ml de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) sin fenol rojo, para evitar interferencias con otros reactivos en las lecturas de absorbancia, que fue suplementado previamente con 10% de suero bovino fetal (FCS, Gibco), 1% de penicilina/estreptomicina y 2mM de L-glutamina de Sigma. Las células se mantuvieron a 37°C en un incubador bajo una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>. El medio fue cambiado cada dos días.

Para el subcultivo, las monocapas celulares fueron lavadas con solución salina (PBS) y desadheridas de la placa de cultivo con Tripsina-EDTA (*ethylene-dinitrilo tetraacetic acid*, Sigma) al 0.25%, durante 5 minutos a 37°C. Las células fueron recultivadas según los requerimientos de los ensayos de citotoxicidad y proliferación.

### **8.2.6. Preparación de los extractos**

Los extractos para el ensayo indirecto de citotoxicidad fueron preparados según las condiciones estandarizadas indicadas en la norma ISO 10993-5 (20). Para esto, se introdujeron bajo condiciones estériles, 5 discos (20 mm de diámetro x 3 mm de altura) de G60a3 previamente esterilizados con óxido de etileno, en tubos plásticos con medio de cultivo completo según la relación 1:50 (g/ml). El medio completo junto con los discos de material fue incubado a 37°C y agitado ocasionalmente. Después de 24 horas, 4, 8, 12 y 22 días de incubación, el fluido fue recuperado y congelado a -20°C, sin filtrarlo, diluirlo o modificarle el pH, hasta su utilización.

### **8.2.7. Ensayo de citotoxicidad**

La evaluación de la citotoxicidad sobre el andamio vitrocerámico se realizó mediante el ensayo MTT (Sigma), descrito en el capítulo 7, sección 7.2.2.3. Antes de realizar el cultivo celular, los andamios de 20 mm de diámetro y 3 mm de altura fueron pulidos por ambas caras para abrir la porosidad superficial y permitir la penetración del medio de cultivo y de las células en el interior de la estructura. Luego de ser pulidos fueron lavados con etanol en ultrasonidos para eliminar las partículas de material que quedan libres después del pulido. Posteriormente, fueron esterilizados con óxido de etileno y sumergidos en medio de cultivo durante 12 horas aproximadamente, a 37°C para acondicionar los andamios y permitir la adhesión de las proteínas provenientes del FCS en la superficie de estos, facilitando así la adhesión celular. Los diferentes discos G60a3 fueron colocados en placas de 24 pozos. En primer lugar se depositaron 100µl de medio con  $7.10^4$  células en suspensión sobre cada uno de los discos a ensayar, se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente se añadieron 500µl de medio de cultivo en cada pocillo. Los pozos de la placa de cultivo de poliestireno fueron utilizados como controles bidimensionales. En cuanto a los cultivos realizados con los extractos obtenidos a partir del G60a3, se colocó la misma concentración de células ( $7.10^4$  células) por pocillo que para el ensayo de contacto directo con 500µl del DMEM suplementado y después de 4 horas de incubación se cambió el medio por el extracto del material. En este caso se utilizó como control el medio de cultivo.

Después de 24 horas, 3 y 6 días de cultivo, 1ml de solución de MTT (10% en medio de cultivo sin rojo fenol) fue añadido a cada pocillo con el fin de medir la actividad mitocondrial de las células. Después de 3 horas de contacto con el MTT, se añadieron 500 µl de solubilizante (0.1 N HCl en isopropanol) para disolver los cristales de formazán. Seguidamente, la absorbancia fue medida en un espectofotómetro modelo HP8453 a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados como el promedio de los valores de absorbancia de tres réplicas. La determinación de la significación estadística ( $p < 0,05$ ) de las diferencias en los valores de absorbancia, se realizó mediante el método de comparación múltiple de Tukey.

### **8.2.8 Análisis de la concentración iónica en el medio de cultivo**

Las concentraciones de calcio, fósforo, sodio y titanio en los extractos obtenidos a partir de la vitrocerámica porosa, fueron determinados mediante la técnica de espectroscopía de masa de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para el análisis por ICP se tomaron los diferentes extractos y se prepararon disoluciones 1:10 con una solución al 0.5% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  y Tritón X-100 0.05g/100ml, llamada solución B. El análisis se hizo por triplicado.

## **8.3. RESULTADOS**

En general se observó que los dos porcentajes de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  espumaron las muestras satisfactoriamente. Después del proceso de espumado a  $60^\circ\text{C}$  las muestras sufrieron una pequeña contracción y después del proceso de sinterización la contracción de las muestras fue muy poca. Los poros se formaron en el interior de las muestras y se observaron pocos poros en la parte exterior de los cilindros obtenidos.

Las temperaturas de transición vítrea ( $T_g$ ) y de cristalización ( $T_c$ ) obtenidas a partir del análisis térmico diferencial (ATD) se encuentran en la Tabla 8.3 . En dicha tabla se muestran las transiciones térmicas obtenidas para partículas de 200 y 30  $\mu\text{m}$ . Se observa que tanto la  $T_g$  como la  $T_c$  varían según el tamaño de partícula ensayado. Tanto en el caso de la  $T_g$  como en el caso de la  $T_c$  los valores fueron significativamente mayores para las partículas de mayor tamaño. Esto corrobora la necesidad de verificar los valores de las diferentes temperaturas de transición para el tamaño de partícula específico de cada aplicación. Sobretudo en los casos donde es necesario trabajar dentro de rangos de temperatura muy precisos para evitar la cristalización del material.

---

**Tabla 8.3**  
**Temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y temperatura de cristalización ( $T_c$ ) según el tamaño de partícula de vidrio G5**

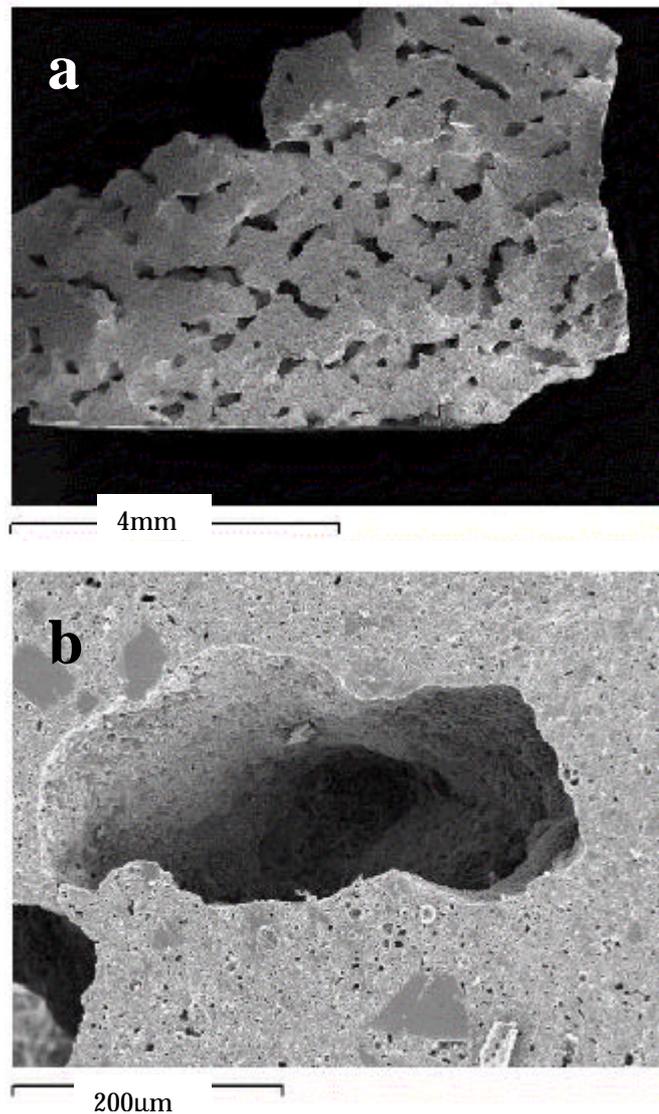
---

<b>Tamaño de partícula (mm)</b>	<b><math>T_g</math> (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>	<b><math>T_c</math> (<math>^\circ\text{C}</math>)</b>
30	522	618.1
200	533	704.5

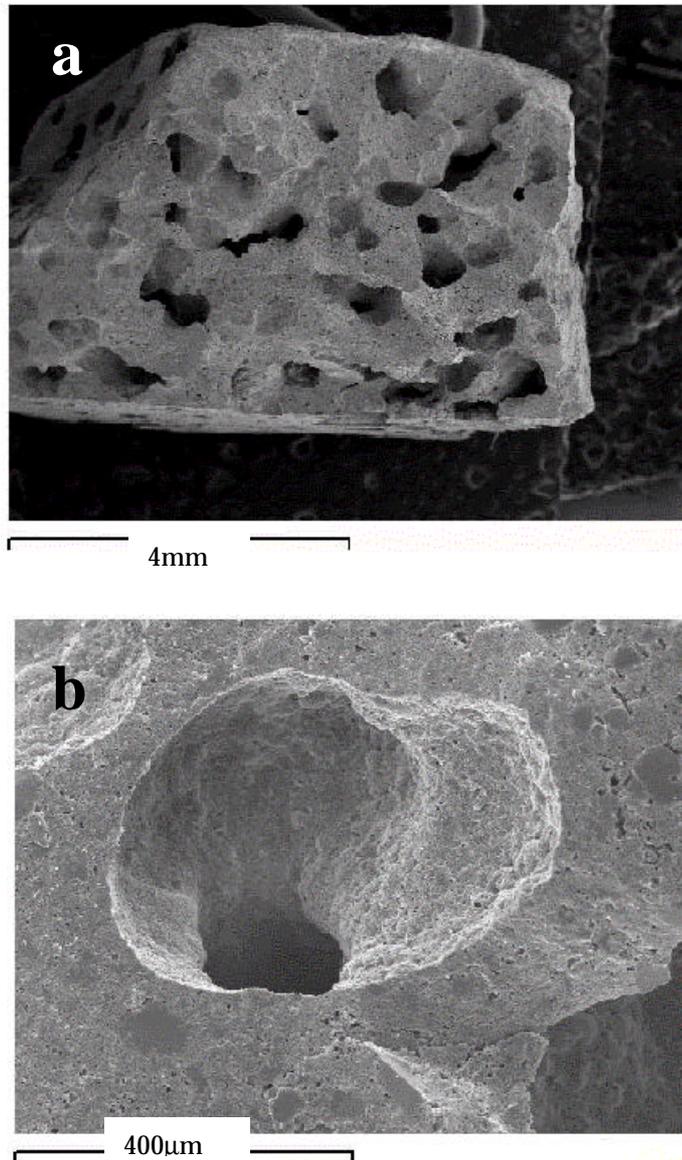
---

### 8.3.1. Morfología, macro y microestructura de los andamios

Las Figuras 8.1 y 8.2 muestran la superficie de fractura de las muestras con los diferentes porcentajes de  $H_2O_2$  sinterizadas a  $540^\circ C$  durante 3 horas. Se puede ver que las muestras con 40% en peso de  $H_2O_2$  mostraron una estructura formada principalmente por poros alargados, los cuales pueden ser debidos a la unión de pequeños poros. En el caso de la estructura de la muestra con 60%  $H_2O_2$  (Figuras 8.2a y 8.2b), se observaron poros ligeramente más redondeados y de mayor tamaño que en el caso de las muestras con 40% de  $H_2O_2$ .

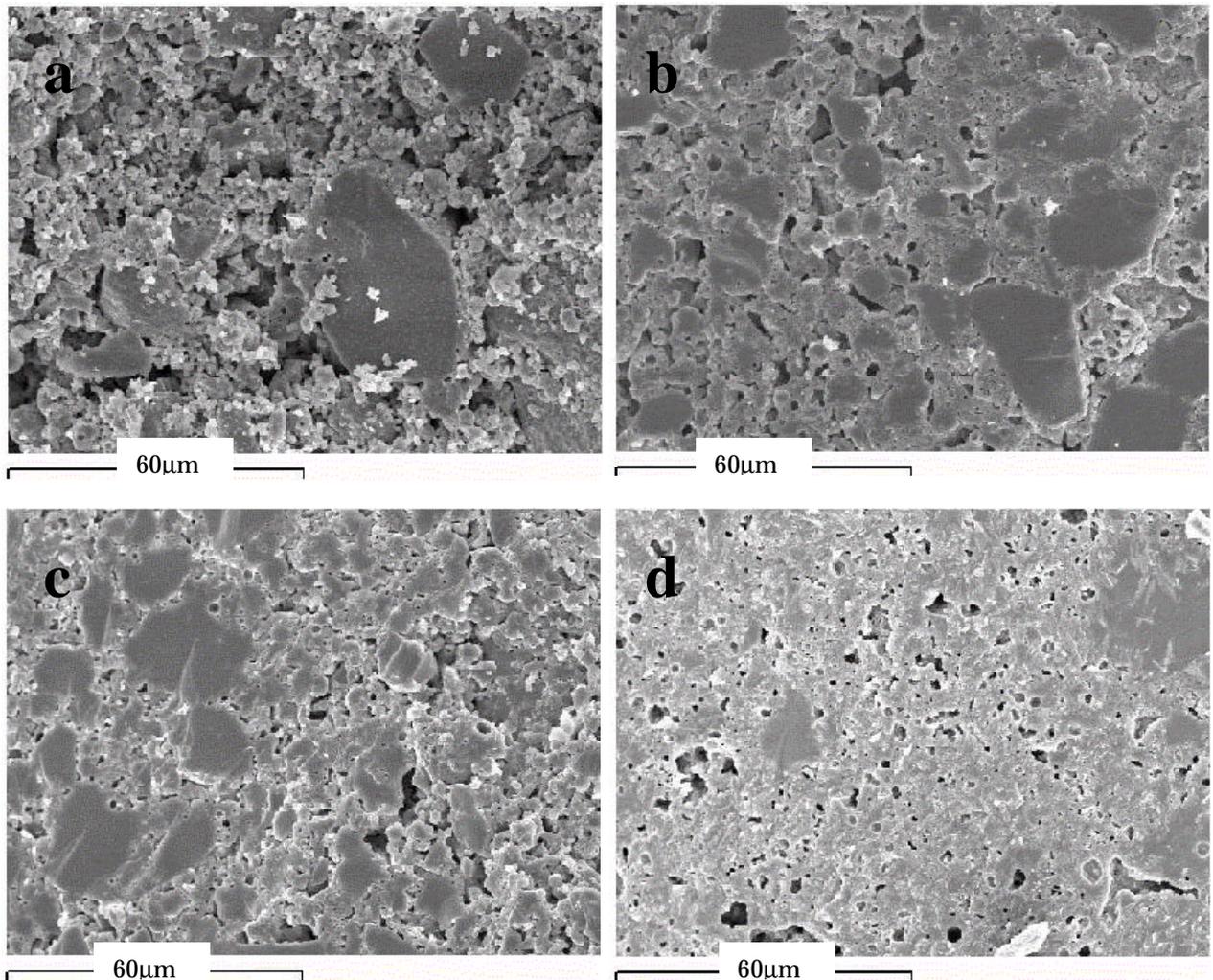


**Figura 8.1.** (a) Macroestructura de la muestra G40a3; (b) ampliación de un poro de la misma muestra.



**Figura 8.2.** (a) Macroestructura de la muestra G60a3; (b) ampliación de un poro de la muestra.

Con respecto a la microporosidad, la Figura 8.3 muestra la morfología de la superficie de fractura para los especímenes con 40% en peso de  $H_2O_2$ . En esta figura se observa la morfología de las diferentes estructuras obtenidas después de la sinterización a 540 y 570°C durante 2 y 3 horas. Las muestras con 60% de  $H_2O_2$  presentaron morfologías similares.

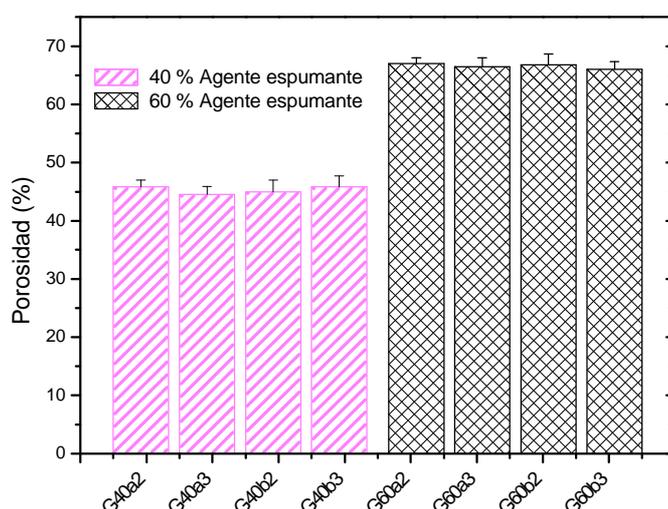


**Figura 8.3.** Microestructura de las muestras con 40% de  $H_2O_2$  después del sinterizado bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo: (a)  $540^{\circ}C$ -2 h; (b)  $540^{\circ}C$ -3 h; (c)  $570^{\circ}C$ -2 h y (d)  $570^{\circ}C$ -3 h.

Se observó una diferencia significativa entre las muestras sinterizadas durante 2 y 3 horas a  $540^{\circ}C$ . En las Figuras 8.3a y 8.3b, se puede ver que en las muestras sinterizadas durante 2 horas, las partículas de vidrio están poco sinterizadas, mientras que las muestras procesadas durante 3 horas mostraron la formación de múltiples cuellos entre las diferentes partículas vítreas. Esta unión entre partículas, debida al proceso de sinterización, introdujo un cierto nivel de microporosidad.

Las muestras sinterizadas a 570°C mostraron en general, un nivel de sinterización comparable con el de las muestras tratadas a 540°C durante 3 horas.

En la Figura 8.4 se muestran los resultados de porosidad medidas mediante picnometría de mercurio.



**Figura 8.4.** Porcentajes de porosidad total para las diferentes series estudiadas.

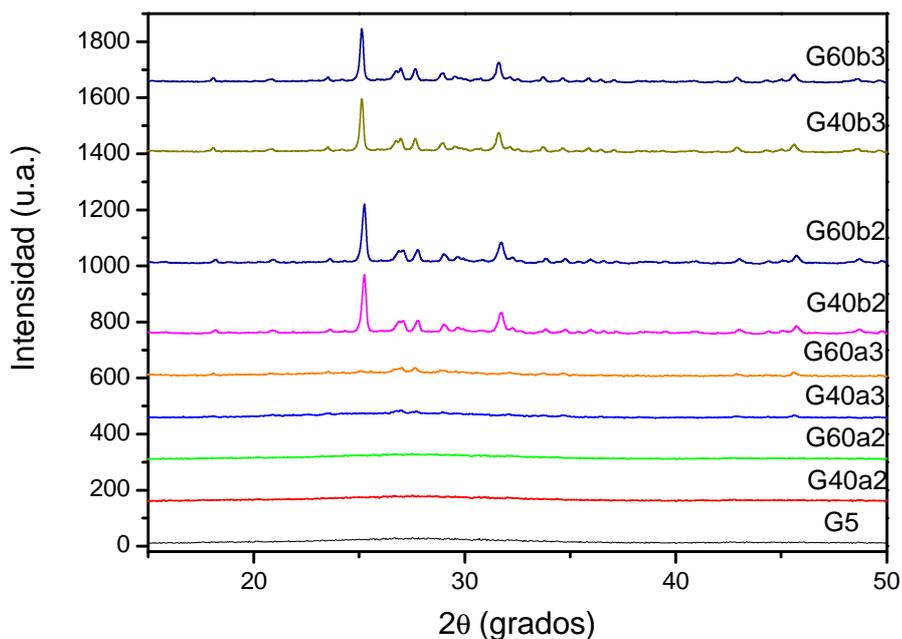
Según los resultados del diseño experimental factorial  $2^3$  realizado con el fin de determinar los factores que influyen en el porcentaje de porosidad total, el factor determinante en la porosidad de las estructuras 3D fue la cantidad de agente espumante incorporada en la mezcla inicial, mientras que el tratamiento térmico aplicado no afectó la porosidad total de las muestras con el mismo contenido de  $H_2O_2$ . No se observaron interacciones entre los diferentes factores. Por lo tanto, los porcentajes de macroporosidad debidos a la incorporación de las diferentes proporciones de  $H_2O_2$  fueron calculados como el promedio obtenido a partir de todas las series con el mismo porcentaje de agente espumante ( $H_2O_2$ ). Los resultados indicaron que los porcentajes de macroporosidad aumentaron con la incorporación de peróxido de hidrógeno dentro de la muestra. De hecho, la porosidad aumentó de  $45.2 \pm 0.6$  a  $66.6 \pm 0.4$  % en las muestras con 40 y 60% de agente espumante respectivamente.

Además, se observó la evolución del tamaño de los poros mediante el análisis de imágenes. El tamaño de los poros varió según el porcentaje de agente espumante incorporado. El hecho de que las muestras hayan presentado poros irregulares y sobretodo alargados hace imposible el cálculo de la distribución del tamaño de los poros a partir de los estudios de análisis de imagen. No obstante, se observó que las muestras con 40% de agente espumante presentaron una cantidad mayor de poros

entre las 100 y 200  $\mu\text{m}$ , mientras que los especímenes con 60% de agente espumante presentaron poros mayores a 500  $\mu\text{m}$ .

### 8.3.2. Efecto del tratamiento térmico en la estructura vítrea

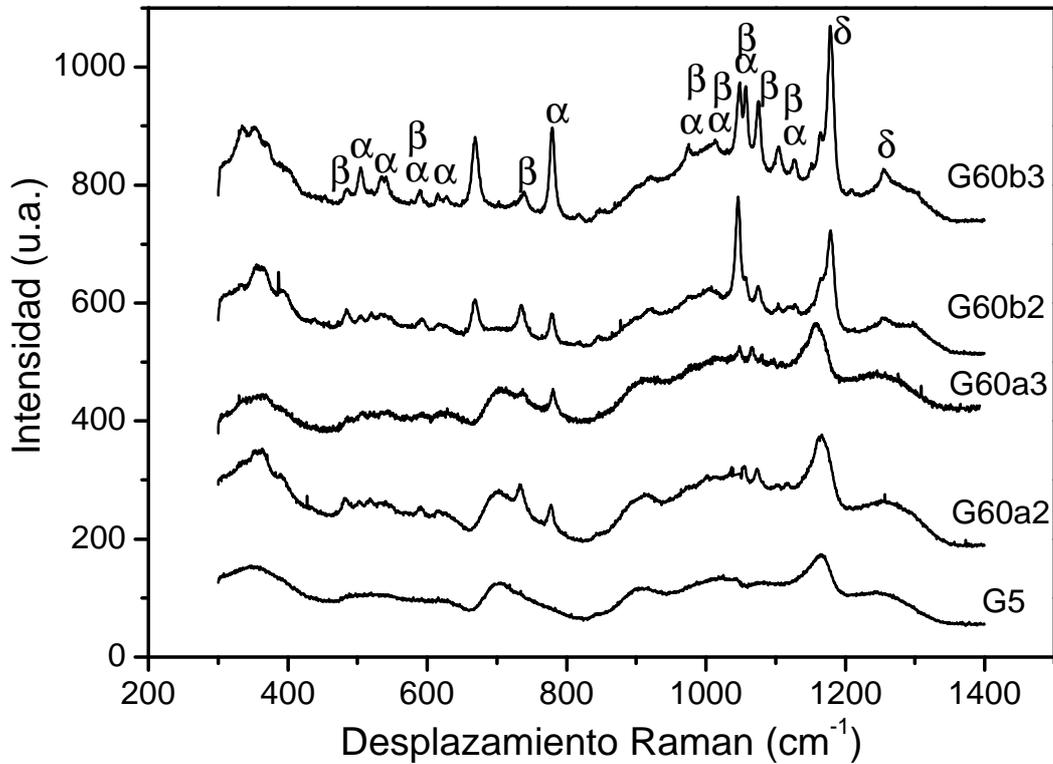
Con el fin de evaluar cualitativamente el nivel de devitrificación o de formación de fases cristalinas en el material, se llevó a cabo un análisis por DRX de cada serie. En la Figura 8.5 se observa la influencia de la temperatura de sinterización en la devitrificación del vidrio G5. Se observa que las muestras tratadas a 540°C (series a) presentaron un difractograma con un elevado porcentaje de fase amorfa. Sin embargo, a 3 horas de tratamiento se detectó la formación incipiente de algunas fases cristalinas (series G40a3 y G60a3).



**Figura 8.5.** Difractogramas de las muestras con 40 y 60% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , procesadas a 540 (series a) y 570°C (series b) después de 2 y 3 h, y el vidrio G5.

Las muestras procesadas a 570°C (series b), presentaron un elevado grado de cristalinidad independientemente del porcentaje de  $\text{H}_2\text{O}_2$  incorporado en la muestra y del tiempo de tratamiento como puede observarse en la Figura 8.5. Las muestras sinterizadas a 570°C durante 2 horas (G40b2 y G60b2) y las sinterizadas durante 3 horas (G40b3 y G60b3) mostraron difractogramas similares.





**Figura 8.7.** Espectros Raman del vidrio G5 y de las vitrocerámicas porosas con 60% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  procesadas a  $540^\circ\text{C}$  y a  $570^\circ\text{C}$  durante 2 y 3 horas. Las principales bandas han sido señaladas: ( $\alpha$ )  $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ; ( $\delta$ )  $\delta\text{-Ca}(\text{PO}_3)_2$  y ( $\beta$ )  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

La espectroscopia Raman también fue utilizada para evaluar los cambios sufridos por el vidrio durante los ciclos térmicos utilizados para su sinterización. Los resultados obtenidos a partir de los espectros Raman que se muestran en la Figura 8.7 ilustraron los cambios estructurales experimentados por los especímenes con 60% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  tratados a  $540^\circ\text{C}$  y  $570^\circ\text{C}$  durante 2 y 3 horas. En la Figura 8.7 se observa que después del tratamiento a  $540^\circ\text{C}$  (series a) durante 2 y 3 horas (G60a2 y G60a3) el material presentó las bandas típicas correspondientes a un vidrio de metafosfato como lo es el G5 (ver capítulo 2) y además la banda situada alrededor de  $1175\text{ cm}^{-1}$  debida a grupos metafosfato  $(\text{PO}_2)_{\text{sym}}$  aumentó en intensidad. También se observó la aparición de algunas bandas pequeñas e incipientes entre  $1000$  y  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,  $721$  y  $789\text{ cm}^{-1}$  y entre  $482$  y  $640\text{ cm}^{-1}$  debido a la formación del pequeño porcentaje de fases cristalina correspondiente a los siguientes meta y pirofosfatos de calcio:  $\delta\text{-Ca}(\text{PO}_3)_2$ ,  $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  y  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

En el caso del tratamiento a 570° C (series b), los cambios estructurales fueron más evidentes. Esto puede observarse claramente en la Figura 8.7, donde se muestran los espectros Raman de las muestras con 60% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tratadas a 570°C por 2 horas (G60b2) y 3 horas (G60b3). Una vez más, se pueden observar las bandas características del vidrio G5, las cuales se preservan a pesar de los tratamientos térmicos, y el aumento en intensidad de la banda situada a 1175 cm<sup>-1</sup> la cual representa a los grupos (PO<sub>2</sub>)<sub>sym</sub>. Además se pudo observar la presencia de una gran cantidad de bandas nuevas situadas a 1106, 1075, 1055, 1012, 973, 776, 745, 615, 590, 539 y 502 cm<sup>-1</sup>. Estas nuevas bandas pueden ser atribuidas a la formación de las fases cristalinas ya mencionadas, es decir δ-Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, α-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, β-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (ver Tabla 8.4). Según Cornilsen y Condrate (21), las bandas Raman más intensas en la fase β-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, tienen lugar a 745 y 1051 cm<sup>-1</sup> y las bandas más intensas del α-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> se encuentran alrededor de 775 y 1055 y 1074 cm<sup>-1</sup>(22;23).

**Tabla 8.4**  
**Modos de vibración Raman correspondientes al d-Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, α-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> y β-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (21-23).**

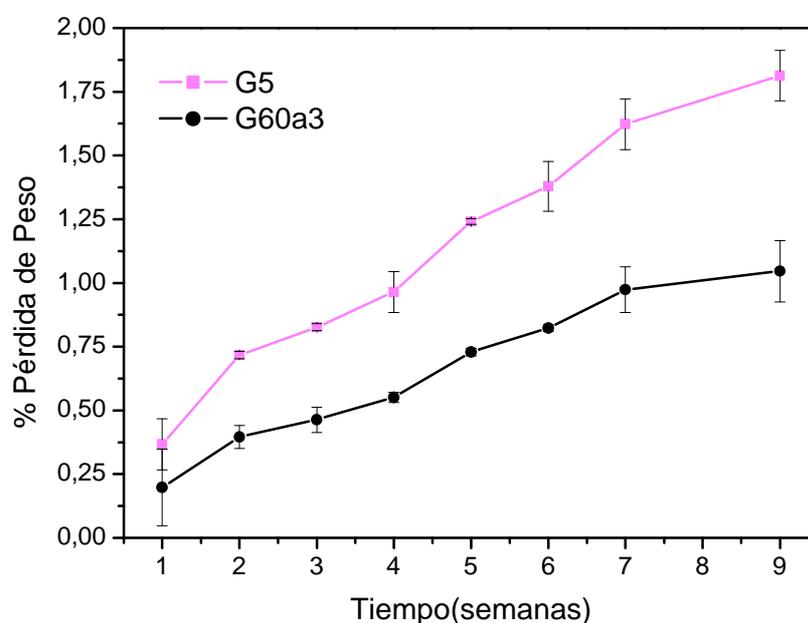
<b>Modo de vibración</b>	<b>d-Ca(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>α-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	<b>β-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>
ν (PO <sub>3</sub> ) <sub>asim</sub>		1210	1212
			1184
			1163
			1152
			1143
			1105
			1074
			1015
			995
ν (PO <sub>3</sub> ) <sub>sim</sub>			1067
		1074	1051
		1055	972
ν (POP) <sub>asim</sub>		974	955
		953	926
			745
ν (POP) <sub>sim</sub>	690	775	627
	700	629	590
		616	572
		591	566
		579	548
		558	517
		542	488
ν (PO <sub>2</sub> ) <sub>sim</sub>	1130-1220	537	455
		504	
		455	
ν (PO <sub>2</sub> ) <sub>sim</sub>	1160-1180		
ν (PO <sub>2</sub> ) <sub>asim</sub>	1240-1278		

De acuerdo con los resultados obtenidos, el tratamiento llevado a cabo a 540° C durante 3 horas fue el mejor para evitar la devitrificación del vidrio G5 y conseguir un grado de sinterización adecuado, y las muestras con 60% de peróxido de hidrógeno, resultaron tener el más alto porcentaje de porosidad e interconectividad. Por lo tanto las muestras de tipo G60a3 fueron las seleccionadas para continuar la caracterización del material mediante los ensayos de degradación del mismo.

### 8.3.3. Evolución de la pérdida de peso

En la Figura 8.8 se muestran las curvas correspondientes a los porcentajes de pérdida de peso para el vidrio G5 y para la vitrocerámica G60a3, ambos en forma de partículas. Se observa que ambos materiales experimentan una pérdida de peso creciente durante las 9 semanas de degradación. Además, en ambos casos se puede ver la existencia de una tendencia casi lineal, lo cual permitió el cálculo de la velocidad de degradación de cada uno de los materiales.

Asimismo, se pudo ver que la solubilidad del vidrio G5 disminuyó al convertirse en vitrocerámica, es decir, que el pequeño porcentaje de fase cristalina afectó considerablemente en la estabilidad química del material. De hecho, después de las 9 semanas del estudio, el vidrio G5 mostró un porcentaje de pérdida de peso cercano al 1.75% mientras que la vitrocerámica mostró un porcentaje de pérdida de peso alrededor de 1.02%.



**Figura 8. 8.** Evolución del porcentaje de pérdida de peso del G5 y del G60a3 en función del tiempo. Cuando las barras de error no aparecen es porque son más pequeñas que los símbolos.

La Tabla 8.5 muestra las velocidades de degradación del vidrio G5 y de la vitrocerámica G60a3.

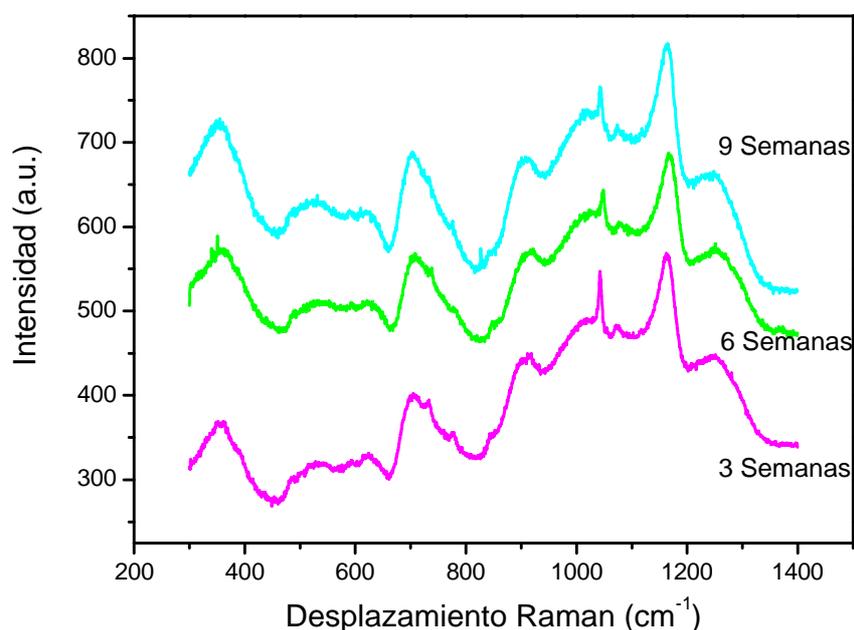
**Tabla 8.5**

**Velocidad de disolución de los diferentes vidrios en SBF a 37°C. (Media ± Desviación Estándar, n=3).**

Material	Velocidad de disolución (g/h)
G5	$3.125 \times 10^{-04} \pm 0.56 \times 10^{-04}$
G60a3	$5.04 \times 10^{-04} \pm 0.18 \times 10^{-04}$

### 8.3.4. Evolución de la superficie del material, cambios morfológicos y estructurales

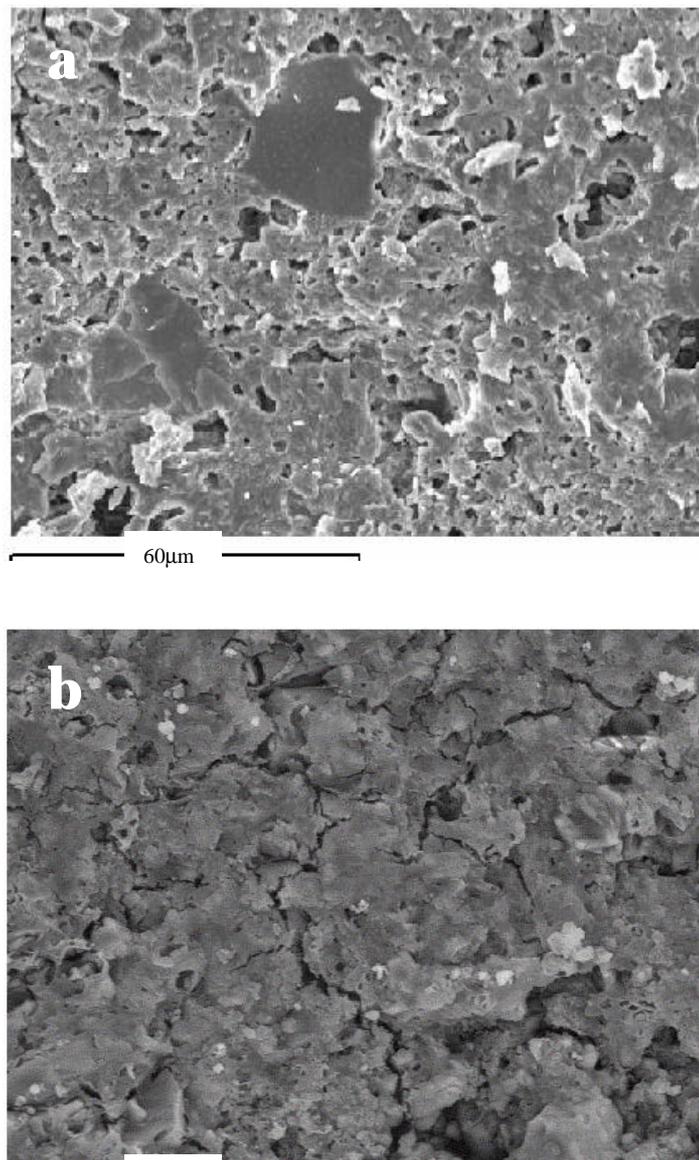
Los espectros resultantes del análisis superficial llevado a cabo con la espectroscopia Raman se muestran en la Figura 8.9. En primer lugar, se observa que no hay cambios representativos entre los 3 espectros adquiridos, a los 3 diferentes intervalos de degradación. En segundo lugar, se observan las bandas características del vidrio G5 (ver capítulo 2) y además están presentes las bandas correspondientes a las fases alfa y beta-pirofosfatos y delta-metafosfato mencionadas anteriormente, las cuales son debidas al tratamiento térmico utilizado en la etapa de sinterización del material.



**Figura 8.9.** Espectros Raman de la superficie del G60a3 después de 3, 6 y 9 semanas de degradación *in vitro* en SBF a 37°C.

Las Figuras 8.10-8.12 muestran la evolución de la superficie de la vitrocerámica porosa a lo largo del período de degradación. En esta figura puede observarse la degradación progresiva del material. Después de 3 semanas en el fluido, aún no se observan

cambios significativos en la superficie del material. Después de 6 semanas de degradación, los cambios son más evidentes ya que como se puede observar en la Figura 8.10b, se forma una capa hidratada en la superficie de la vitrocerámica, la cual además presenta algunas grietas. Después de 9 semanas de inmersión en el fluido (Figura 8.11), parece que la capa hidratada se va levantando por trozos y se observa una superficie bastante degradada, con numerosos agujeros. Estos signos de degradación son aún más obvios después de 12 semanas de degradación (ver Figura 8.12), donde se observa una superficie vítrea bastante erosionada.



**Figura 8.10.** Superficie de la vitrocerámica G60a3 después de (a) 3 semanas y (b) 6 semanas de degradación en SBF a 37°C

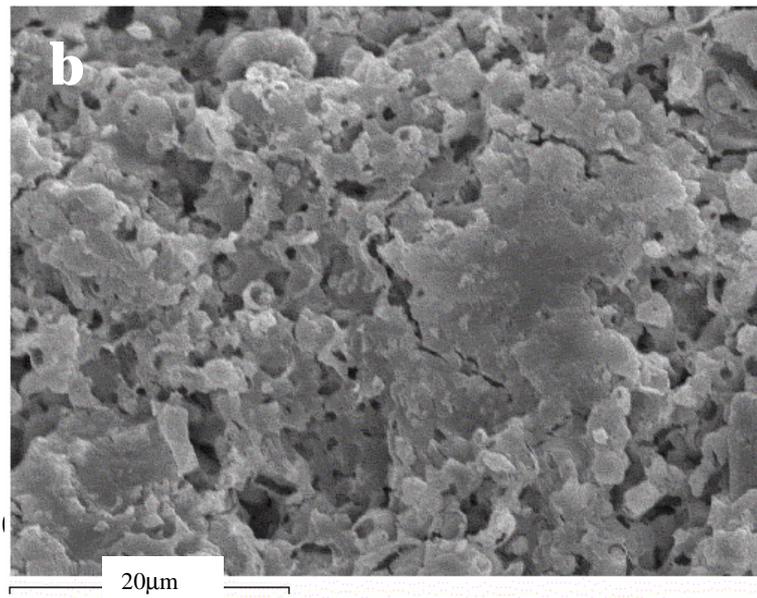
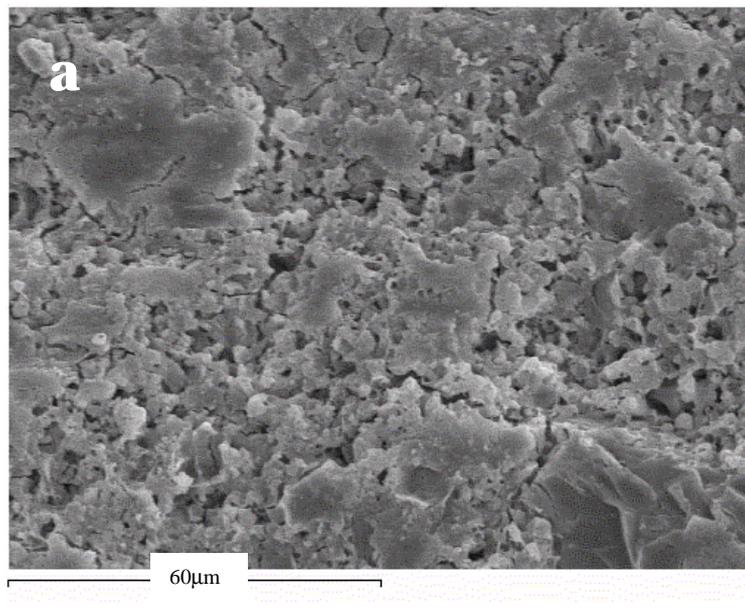
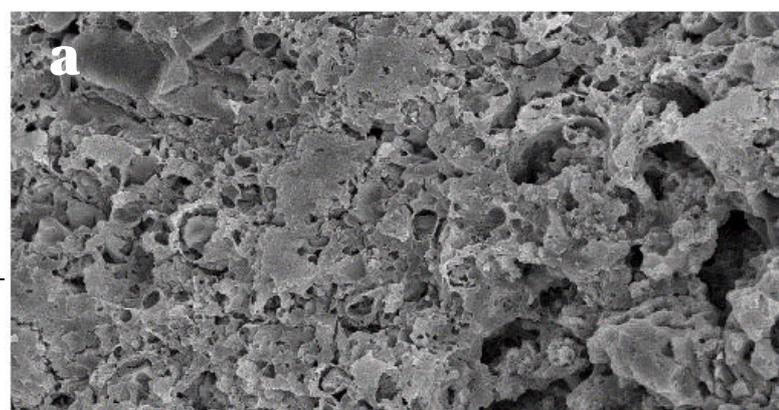


Figura 8.11. (a) and (b) SEM images of the surface of the samples.



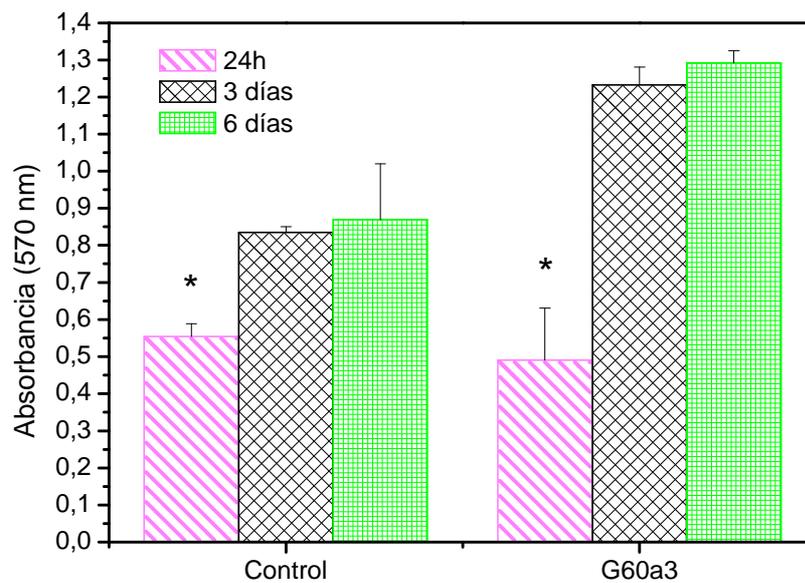
**Figura 8.12.** (a) Superficie de la vitrocerámica porosa G60a3 después de 12 semanas de degradación *in vitro*; (b) Ampliación de la zona degradada.

### **8.3.5. Evaluación de la citotoxicidad**

Las Figuras 8.13 y 8.14 muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad realizados tanto en contacto directo como con los extractos del G60a3. De acuerdo a estos resultados, ambos métodos mostraron una respuesta no citotóxica por parte de las células.

#### ***a) Ensayos en contacto directo con las estructuras vitrocerámicas***

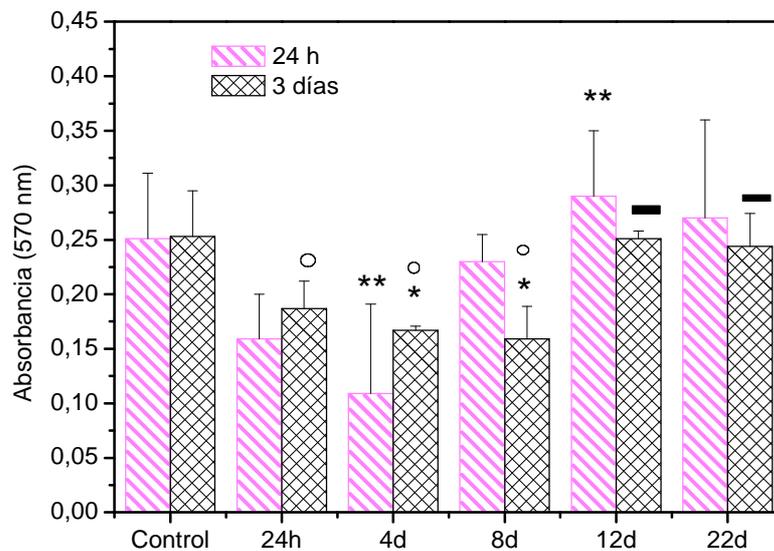
En el caso del método de contacto directo con el material, los valores de absorbancia mostrados en la Figura 8.13 sugirieron un incremento en el número de células viables con el tiempo, tanto para el G60a3 como para el control, especialmente después de 3 días de cultivo. Cabe destacar que a pesar de que a 24 horas de cultivo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y el andamio tridimensional, después de 3 y 6 días de cultivo, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) y los valores de absorbancia presentados por la vitrocerámica, resultaron mayores que los presentados por el control.



**Figura 8.13.** Resultados del ensayo MTT en contacto directo con el andamio tridimensional después de 24h, 3 y 6 días. Los asteriscos (\*) muestran los resultados sin diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para cada tiempo de cultivo, ( $n=3$ ).

**b) Ensayo con los extractos de la vitrocerámica**

En el caso de los extractos, en general después de 24 horas de cultivo no se observaron diferencias significativas entre los valores de absorbancia de los diferentes extractos y el medio control. Solo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de los extractos de 4 días y los de 12 días. Después de 3 días de cultivo, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes extractos y entre los extractos y el control, como se puede verificar en la Figura 8.14. Los niveles de absorbancia de los extractos obtenidos después de 12 y 22 días fueron similares entre sí, a su vez fueron estadísticamente mayores ( $p < 0.05$ ) que los extractos de 24 h, 4 y 8 días. Además, los valores de absorbancia de los extractos obtenidos a 4 y 8 días resultaron ser menores que el medio control.



**Figura 8.14.** Resultados del ensayo MTT llevado a cabo con las células en contacto con los diferentes extractos después de 24 horas y 3 días de cultivo. Los asteriscos (\*\*) muestran las diferencias estadísticamente significativas entre los extractos después de 24 h de cultivo. Los asteriscos (\*) indican los resultados estadísticamente diferentes al control ( $p < 0.05$ ) después de 3 días de cultivo. El resto de los símbolos indican los extractos sin diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) después de 3 días de cultivo, ( $n=3$ ).

### 8.3.6 Liberación de iones al medio

La Tabla 8.5 muestra los valores correspondientes a las concentraciones de Ca, P y Na, después de los diferentes tiempos de extracción utilizados, es decir, 24 horas, 4, 8, 12 y 22 días. Los valores de la concentración del ión Ti no aparecen, ya que las cantidades del mismo fueron indetectables. Además se presentan los valores de la concentración de estos iones en el medio de cultivo completo como valores de referencia. Se observa un aumento progresivo de las concentraciones iónicas con el tiempo de extracción como era de esperar.

Después de 24 horas, los valores de las concentraciones de Ca y P ya son ligeramente superiores a las concentraciones del medio control, mientras que el Na presenta niveles bastante inferiores. El sodio alcanza valores similares a los del medio de cultivo después de 12 días de extracción.

**Tabla 8.5**  
**Concentraciones iónicas del medio de cultivo y de los diferentes extractos obtenidos a partir del G60a3 a diferentes tiempos. (Media  $\pm$  Desviación Estándar, n=3)**

<b>Tiempo</b>	<b>Ca (mmol/L)</b>	<b>P (mmol/L)</b>	<b>Na (mmol/L)</b>
DMEM + 10%FCS	0.042 $\pm$ 0.009	0.022 $\pm$ 0.034	3.142 $\pm$ 0.41
24 horas	0.043 $\pm$ 0.006	0.030 $\pm$ 0.221	3.052 $\pm$ 0.29
4 días	0.044 $\pm$ 0.006	0.034 $\pm$ 0.033	3.086 $\pm$ 0.28
8 días	0.051 $\pm$ 0.001	0.049 $\pm$ 0.003	3.098 $\pm$ 0.42
12 días	0.050 $\pm$ 0.003	0.052 $\pm$ 0.032	3.144 $\pm$ 0.19
22 días	0.103 $\pm$ 0.009	0.176 $\pm$ 0.004	3.926 $\pm$ 0.08

#### **8.4. DISCUSIÓN**

En este capítulo, se han desarrollado substratos vitrocerámicos porosos basados en el vidrio G5, que ya ha sido estudiado en capítulos anteriores, utilizando el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como agente espumante para la elaboración de las estructuras tridimensionales para ingeniería de tejidos. En esta técnica, la porosidad es producida como consecuencia del proceso de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que se lleva a cabo a una temperatura de 60°C. A esta temperatura, el O<sub>2</sub> liberado tiende a formar burbujas en el interior de la mezcla (vidrio-solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), originando así la estructura porosa.

Uno de los objetivos de este trabajo era analizar el efecto de algunas variables tales como el contenido de peróxido de hidrógeno, la temperatura y el tiempo de sinterización en la porosidad, tamaño de poro y grado de devitrificación del material final.

A partir de los diferentes resultados obtenidos, se observó que en forma general, el factor que afecta predominantemente en la macroporosidad de las muestras es el porcentaje de  $H_2O_2$  incluido en la mezcla inicial, como era de esperar. Se pudo observar un aumento en la porosidad, en el tamaño de los poros y del grado de interconectividad con la incorporación de  $H_2O_2$  en la mezcla inicial. Los resultados obtenidos a partir de la picnometría de mercurio indicaron un incremento de la macroporosidad del 45.2% a 66.6% con la incorporación de 40 o 60% en peso de la solución con  $H_2O_2$  respectivamente. Otro punto relevante es el incremento en el tamaño del poro dependiendo del porcentaje de  $H_2O_2$  utilizado, ya que los materiales más porosos (60%  $H_2O_2$ ) presentaron los poros de mayor tamaño ( $> 500 \mu m$ ) y parecieron tener un mayor grado de interconectividad.

Hay que mencionar que la técnica de la picnometría de mercurio fue utilizada para determinar la porosidad total del material teniendo en cuenta que las muestras presentaban muy escasa porosidad en la superficie. En efecto, en el caso de que las muestras hubieran presentado macroporos de gran tamaño, el mercurio podría haber penetrado en el interior de la muestra al ser sumergida, y por lo tanto, el volumen aparente habría sido subestimado. Sin embargo, en las muestras analizadas no se encontró este inconveniente.

Como se ha mencionado anteriormente, la técnica de espumado con  $H_2O_2$  ha sido utilizada por varios autores (14-16). Almirall *et al* (16) reportaron una porosidad del 66% al incorporar un 20% en volumen de agente porogénico en un cemento de fosfato de calcio basado en  $\alpha$ -TCP, en este estudio se observó la formación de poros alargados orientados de forma horizontal, además se observó que al aumentar el porcentaje de agente porogénico, los poros presentaban una morfología más redondeada. Yuan *et al* (14), reportaron estudios de la biocompatibilidad *in vivo* de andamios 3D elaborados a partir de *Bioglass*®. En este estudio no se reportan datos sobre la porosidad del material. Sin embargo, las imágenes de los andamios muestran poros muy similares a los encontrados en la presente Tesis Doctoral.

Ya que los materiales desarrollados en este capítulo también presentaron poros con morfología alargada y orientados de forma horizontal, y presentaron una forma más redondeada al aumentar el porcentaje de agente espumante, se podría decir que en general, el peróxido de hidrógeno conlleva la formación de poros con esta morfología particular, que es alargada a bajas concentraciones y a concentraciones mayores parece redondearse un poco.

Algunos autores han reportado diferentes datos con respecto al porcentaje ideal de macroporosidad /microporosidad y al tamaño ideal de poro. Debido a la diversidad de los estudios, los rangos sugeridos por los diferentes autores son muy variables. Sin embargo, una gran parte de ellos coinciden en que poros con un diámetro mayor a los  $150 \mu m$  son los óptimos para facilitar el crecimiento del tejido óseo. Teniendo en cuenta

que el tamaño de una osteona es aproximadamente de 223  $\mu\text{m}$ , Holmes (24) ha sugerido que el tamaño ideal de poro sería entre 200 y 400  $\mu\text{m}$ . A pesar de eso, el tamaño ideal de poro depende enormemente del tipo de material utilizado como sustrato. Gauthier *et al* (25) por ejemplo, encontraron que para algunas cerámicas de fosfato de calcio, los macroporos de 565  $\mu\text{m}$  resultaron ser más efectivos que los poros de 300  $\mu\text{m}$  para alcanzar un buen crecimiento del tejido hacia el interior de la estructura. Por otro lado, Bobyn *et al* (26) encontraron que en el caso de implantes metálicos, los poros en un rango entre 50-400  $\mu\text{m}$  presentaron mejores resultados que los poros en el rango 400-800  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, la variedad de tamaños de poros que se ha encontrado en este estudio, parece estar dentro del rango de los tamaños propuestos por los diferentes autores.

Aunque las temperaturas de sinterización fueron elegidas en el rango comprendido entre la temperatura de transición vítrea y la de cristalización para así evitar la cristalización de las muestras, ambas temperaturas (540 y 570°C) afectaron de alguna manera la estructura del material e introdujeron diferentes niveles de devitrificación del vidrio de fosfato de calcio (G5) como pudo confirmarse a través del análisis por DRX y espectroscopia Raman. De hecho, los materiales sinterizados a 540°C sólo mostraron la formación de algunos máximos y bandas incipientes, mientras que las muestras sinterizadas a 570°C presentaron de forma clara, la formación de numerosos máximos y bandas correspondientes a varias fases cristalinas, las cuales fueron identificadas como metafosfato de calcio y pirofosfatos de calcio. Aunque el porcentaje de fase cristalina de las muestras no fue cuantificado, se observó que en el caso de las muestras sinterizadas a 540°C, el material se mantuvo mayoritariamente amorfo, siendo las cantidades de los metafosfatos y de pirofosfato de calcio formadas, muy pequeñas.

Los pirofosfatos representan los polifosfatos de cadena más corta. Pueden encontrarse en el medio acuoso combinados con algún ión metálico, principalmente en estado amorfo, o de forma anhidro en estado cristalino. En particular, el pirofosfato de calcio anhidro puede ser obtenido sometiendo el fosfato dicálcico  $\text{CaHPO}_4$  a un tratamiento térmico (27). En el sistema  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  el  $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  se forma en la región comprendida entre 240 y 500°C, el  $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  se forma a partir de los 750°C y el  $\alpha\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  se forma en la región comprendida entre los 1140 y 1350°C. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que las temperaturas a las que las distintas fases son estables pueden variar dependiendo del sistema, es decir, en el caso del vidrio G5 donde están presentes cuatro tipos de óxidos diferentes ( $\text{CaO}$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{TiO}_2$ ) las temperaturas de formación de cada fase serán diferentes. En nuestro caso, hemos visto que la fase alfa estaba presente a 540°C y que la fase beta apareció al calentar a 570°C.

En cuanto al efecto del tiempo de tratamiento se observó que el tiempo de procesado influyó principalmente en el grado de sinterización de las muestras, es decir, en el nivel de unión entre las diferentes partículas de vidrio que conforman los andamios, y consecuentemente, afectó también al porcentaje y tamaño final de la microporosidad.

Por otro lado, a pesar de que los difractogramas no mostraron diferencias entre los dos tiempos de sinterización utilizados para cada una de las temperaturas del tratamiento térmico, la espectroscopia Raman reveló algunos cambios relacionados con el tiempo de sinterización, específicamente de la serie b, es decir, los materiales sinterizados a 570°C. Estos cambios se vieron reflejados en la formación de bandas más estrechas e intensas después de 3 horas de tratamiento térmico lo que indica un aumento en la cristalinidad del material. Estos cambios en la intensidad de las bandas junto con la detección de la fase  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> a 540°C indican que en este estudio la espectroscopia Raman fue más sensible que la DRX.

Es un hecho conocido, que un proceso de degradación controlado es una de las características más importantes que un andamio 3D debe cumplir. El vidrio a partir del cual estos andamios han sido elaborados, el vidrio G5, tiene una velocidad de degradación conocida (ver capítulo 3). Tomando en cuenta que la cristalización de las partículas de vidrio pueden conllevar cambios en la biodegradación del material, el material más adecuado para el desarrollo de estas estructuras tridimensionales, sería aquel que preserve mejor el estado vítreo (amorfo) después del proceso de sinterización.

En este estudio, el G60a3 fue el material que presentó un porcentaje de porosidad más cercano al requerido, un tamaño de poros apropiado, y además las imágenes de microscopia electrónica mostraron un buen nivel de sinterización. Por lo tanto, el G60a3 fue el material seleccionado para continuar con los estudios de degradación y de biocompatibilidad.

En cuanto a los resultados obtenidos a partir del estudio de degradación *in vitro* del G60a3, se observó en forma general, que el pequeño porcentaje de fase cristalina inducida por el proceso de sinterización, afectó en la velocidad de degradación del material. Se sabe que en general y para una composición dada, las estructuras cristalinas, poseen una velocidad de degradación menor que las de las estructuras amorfas, ya que en las estructuras cristalinas, el grado de organización y compacidad de las mismas, dificulta la penetración del medio acuoso. Por lo tanto, al introducir un cierto grado de cristalinidad dentro del sistema vítreo, la velocidad de disolución se vio afectada de forma tal, que la nueva vitrocerámica (G60a3) presentó una velocidad de degradación 1.6 veces menor que el G5. Por lo que, a pesar de que el porcentaje de fases cristalinas formadas fue bastante pequeño, el efecto sobre la solubilidad del material fue evidente.

Las imágenes obtenidas a partir de la microscopia electrónica indicaron que el material experimentó un mecanismo de degradación superficial similar al del vidrio G5 (ver capítulo 3). Inicialmente la superficie del material sufre un proceso de hidratación donde se origina una capa hidratada. Esta capa se despega de la superficie del material eventualmente debido a la hidrólisis de las cadenas, dejando al descubierto una

superficie con numerosos huecos y visualmente muy erosionada (ver Figuras 8.10-8.12).

Por otro lado, los espectros Raman indicaron que la estructura del vidrio en la superficie se mantuvo prácticamente intacta durante el período de degradación. Estos resultados también son similares a los obtenidos para la degradación del G5, mostrados en el capítulo 3, donde se observó que el vidrio G5 no mostró cambios estructurales en la superficie durante el período de degradación, e indican que el material se degrada de una forma homogénea.

En este estudio, no se realizó un seguimiento a largo plazo de la degradación *in vitro* del material. Sin embargo, dada la similitud a tiempos cortos, con el mecanismo de degradación superficial experimentado por el vidrio G5, se podría sugerir, que esta nueva vitrocerámica, al igual que el G5, se degrada mediante un proceso cíclico, donde las cadenas de fosfato más externas, situadas en la superficie del material, están expuestas continuamente a los procesos de hidratación e hidrólisis mediados por el medio acuoso circundante.

Como ya se ha dicho, al igual que en el estudio de degradación *in vitro* con el fluido fisiológico, el G60a3, fue el material seleccionado para los cultivos celulares. Uno de los primeros acercamientos para el estudio de la biocompatibilidad de un biomaterial es el ensayo de citotoxicidad. En este capítulo se ha utilizado el ensayo MTT siguiendo dos métodos diferentes, uno en contacto directo con los materiales o método directo y el otro en contacto con los extractos del material o método indirecto. En ambos casos, se obtuvieron respuestas positivas por parte de las células, es decir, que tanto el material como los extractos resultaron ser no-citotóxicos.

Hay que mencionar que en los estudios en contacto directo con los andamios porosos, fue imposible encontrar un material con las especificaciones necesarias que sirviera de control 3D en los estudios realizados. El material control debe cumplir algunas condiciones como tener las mismas dimensiones, la misma porosidad, el mismo tamaño de poros y la misma distribución de poros que el andamio a ensayar. Por lo tanto, a pesar de que en el mercado existen algunos andamios 3D que podrían ser utilizados como control, ninguno poseía las características adecuadas para este estudio. Debido a esto, se decidió utilizar como control, el control 2D estándar, es decir, la placa de cultivo.

En el método de contacto directo, el número de células pareció incrementarse con el tiempo de cultivo de una forma bastante marcada, sugiriendo un buen comportamiento celular en los andamios 3D. Estos resultados no se pueden comparar con los resultados obtenidos anteriormente (capítulos 4 y 7) para el vidrio G5, ya que dichos resultados provienen de estudios realizados con otras líneas celulares, que reaccionan de forma diferente ante un mismo sustrato. Sin embargo, podría decirse de

manera general, que la diferencia en la proliferación de las células con respecto al control, es mucho más marcado aquí que en los otros estudios. Este hecho podría atribuirse a los cambios de solubilidad debidos a la cristalización del material o quizás la estructura tridimensional induce un mayor crecimiento celular.

En relación a los extractos, en general, no se observó un efecto citotóxico por parte de los diferentes extractos. Los resultados obtenidos indicaron que los productos de degradación liberados por el material durante los diferentes períodos de incubación con el fluido (ver Tabla 8.5), no ejercieron un efecto importante sobre las células SAOS-2 después de 24 horas de contacto. No obstante, en el caso del cultivo de tres días, los extractos con una concentración iónica mayor, es decir, los extractos de 12 y 22 días, parecieron presentar una mejor respuesta por parte de las células. Estos resultados parecen concordar con los resultados obtenidos para los extractos del vidrio G0 mostrados en el capítulo 4 donde se observó que los extractos del vidrio G0, que tenían una mayor concentración iónica que el vidrio G5, presentaron mayores valores de absorbancia después de 3 y 4 días de cultivo. Sin embargo, en el capítulo 7, donde se estudió la citocompatibilidad del material compuesto PLA50 junto con la del vidrio G5 y la del PLA, no se observó el efecto de los productos de degradación del vidrio G5 a pesar de que este vidrio es más soluble que la vitrocerámica porosa G60a3. Esto puede ser atribuido al hecho de que los extractos de vitrocerámica porosa fueron sumergidos en el medio durante un período más prolongado y por lo tanto dio tiempo a que se liberara una mayor concentración de iones.

Ya hemos visto que la devitrificación del G5 conllevó la formación de pequeños porcentajes de fases compuestas por meta y pirofosfatos. Es posible que estos grupos o pequeñas partículas de material, también hayan sido liberados en el medio de cultivo afectando la respuesta celular. En el caso específico de los pirofosfatos y particularmente el  $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , existen trabajos en los cuales se ha mostrado que este pirofosfato dicálcico, ha resultado ser más biocompatible que la hidroxiapatita en condiciones *in vitro* y en forma de partículas (28). Además se ha demostrado que concentraciones determinadas de este fosfato de calcio, tienen la capacidad de afectar positivamente el metabolismo celular mediante la activación de algunos genes presentes en los osteoblastos (29). Sin embargo, aún no se han podido definir los mecanismos moleculares que controlan estos procesos, así como tampoco ha sido definido si la estimulación de los osteoblastos por el pirofosfato ocurre a través del contacto directo con el material o con los iones liberados al medio.

En un estudio realizado por Sun *et al* (29), se analizó el efecto de los productos de degradación del pirofosfato dicálcico en el comportamiento de células osteoblásticas procedentes de un cultivo primario a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados revelaron que existe una concentración o un rango de concentraciones específico, que ejerce el efecto estimulador a partir de los 3 días de contacto con las células. Por debajo o por encima de este rango de concentraciones, los iones liberados afectan

negativamente conllevando a una disminución significativa de la proliferación celular. Por lo tanto, dentro del contexto del estudio presentado en este capítulo, es posible, que las concentraciones iónicas obtenidas en los extractos de 12 y 22 días, correspondan en nuestro caso particular, al rango de concentraciones que conllevan a la estimulación celular.

Por todo lo expuesto, aunque el rango de concentraciones estudiado no afectó negativamente la respuesta celular, sería necesario realizar estudios adicionales para una mejor comprensión de la influencia de los diferentes iones en el comportamiento celular, así como el efecto del tiempo de contacto entre las células y estos iones.

A pesar de que la evaluación de la citotoxicidad y proliferación hasta 6 días no es suficiente para predecir el comportamiento *in vitro* de estos andamios tridimensionales, los resultados obtenidos en este estudio representan un primer acercamiento al estudio biológico de la interacción célula-material en estas estructuras porosas, el cual debe ser profundizado en estudios futuros.

En este capítulo se han desarrollado andamios 3D a partir del vidrio G5 que es un vidrio de fosfato de calcio soluble. La técnica del espumado con  $H_2O_2$  ha permitido la obtención de un 66.6% de porosidad y con un tamaño de poros adecuado para el crecimiento celular, con la incorporación de un 60% en peso de agente espumante. Después de utilizar diferentes tratamientos térmicos se observó que la sinterización a 540°C durante 3 horas (G60a3), eran las mejores condiciones para la elaboración del andamio ya que se mantenía un gran porcentaje de fase amorfa. Sin embargo, los estudios de degradación *in vitro* mostraron que aunque la proporción de fases cristalinas fue muy baja, sí afectó en la velocidad de degradación del material disminuyéndola. Por otra parte se observó que la vitrocerámica G60a3 mostró un mecanismo de degradación similar al del vidrio G5.

Finalmente, los materiales desarrollados presentaron una respuesta celular positiva tanto en contacto directo como los diferentes extractos. Por lo que podrían considerarse como buenos candidatos para aplicaciones de regeneración ósea, específicamente como estructuras para ingeniería de tejidos.

## 8.5. REFERENCIAS

- (1) Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:2529-2543.
- (2) Temenoff JS, Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(5):431-440.
- (3) Laurencin CT, Elamin SF, Ibim SE, Willoughby DA, Attawia M, Allcock HR et al. A highly porous 3-dimensional polyphosphazene polymer matrix for skeletal tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research* 1996; 30(2):133-138.
- (4) Elghannam A, Ducheyne P, Shapiro IM. Bioactive Material Template for In-Vitro Synthesis of Bone. *Journal of Biomedical Materials Research* 1995; 29(3):359-370.
- (5) Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated 3-Dimensional Biodegradable Foams for Use in Tissue Engineering. *Biomaterials* 1993; 14(5):323-330.
- (6) Pernot F, Zarzycki J, Bonnel F, Rabischong P, Baldet P. New Glass-Ceramic Materials for Prosthetic Applications. *Journal of Materials Science* 1979; 14(7):1694-1706.
- (7) Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 2000; 21(23):2405-2412.
- (8) Baksh D, Davies JE. Design Strategies for 3-dimensional in vitro bone growth in tissue-engineering scaffolds. In: Davies JE, editor. *Bone Engineering*. Toronto: 2000: 488-495.
- (9) Navarro M, Ginebra MP, Clement J, Martinez S, Avila G, Planell JA. Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society* 2003; 86(8):1345-1352.
- (10) Navarro M, Clement J, Ginebra MP, Martinez S, Avila G, Planell JA. Improvement of the stability and mechanical properties of resorbable phosphate glasses by the addition of TiO<sub>2</sub>. *Key Engineering Materials* 2002; 14:275-278.
- (11) Tuck C, Evans JRG. Porous ceramics prepared from aqueous foams. *Journal of Materials Science Letters* 1999; 18(13):1003-1005.
- (12) Tian JT, Tian JM. Preparation of porous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science* 2001; 36(12):3061-3066.
- (13) Gong WL, Abdelouas A, Lutze W. Porous bioactive glass and glass-ceramics made by reaction sintering under pressure. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 54(3):320-327.
- (14) Yuan HP, de Bruijn JD, Zhang XD, van Blitterswijk CA, de Groot K. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (R) (45S5). *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 58(3):270-276.

- (15) Dean-Mo L. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1997;(8):227-232.
- (16) Almirall A, Larrecq G, Delgado JA, Martinez S, Planell JA, Ginebra MP. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste. *Biomaterials* 2004; 25(17):3671-3680.
- (17) Yuan HP, Yang ZM, Li Y, Zhang XD, de Bruijn JD, de Groot K. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1998; 9:723-726.
- (18) Li SH, de Wijn JR, Layrolle P, de Groot K. Synthesis of macroporous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 61(1):109-120.
- (19) Pernot F, Etienne P, Boschet F, Datas L. Weibull parameters and the tensile strength of porous phosphate glass-ceramics. *Journal of the American Ceramic Society* 1999; 82(3):641-648.
- (20) Valutazione biologica dei dispositivi medici, prove per la citotossicità. UNI EN ISO 10993-5 2000.
- (21) Cornilsen BC, Condrate RA. Vibrational Spectra of a-Alkaline Earth Pyrophosphates. *Journal of Solid State Chemistry* 1978; 23:375-382.
- (22) de Fátima Gimenez I, Mazali IO, Alves OL. Application of Raman spectroscopy to the study of the phase composition of phosphate based glass-ceramics. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2001; 62:1251-1255.
- (23) Cornilsen BC, Condrate RA. The vibrational spectra of b-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> and g-Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. *Journal of Inorganic Nuclear Chemistry* 1979; 41:602-605.
- (24) Holmes RE. Bone Regeneration Within A Coralline Hydroxyapatite Implant. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1979; 63(5):626-633.
- (25) Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998; 19(1-3):133-139.
- (26) Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The Optimum Pore-Size for the Fixation of Porous-Surfaced Metal Implants by the Ingrowth of Bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1980;(150):263-270.
- (27) Lehr JR, Brown EH, Frazier AW, Smith JP, Thrasher RD. Crystallographic properties of fertilizer compounds. *Chemical Engineering Bulletin* 1967; 6:1-166.
- (28) Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997; 37(3):324-334.

- (29) Sun JS, Chang WHS, Chen LT, Huang YC, Juang LW, Lin FH. The influence on gene-expression profiling of osteoblasts behavior following treatment with the ionic products of sintered beta-dicalcium pyrophosphate dissolution. *Biomaterials* 2004; 25(4):607-616.