

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author

**DESARROLLO DE UN CEMENTO DE FOSFATO DE
CALCIO MACROPOROSO INYECTABLE: INFLUENCIA
DE LA POROSIDAD Y LA MICROESTRUCTURA EN EL
COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO**

Sergio del Valle Fresno

**Tesis presentada para obtener el título de Doctor por la
Universitat Politècnica de Catalunya**

Dirigida por la Prof. Dra. Maria Pau Ginebra i Molins

**Departament de Ciència de Materials i Enginyeria
Metal·lúrgica
E.T.S. d'Enginyeria Industrial de Barcelona
Universitat Politècnica de Catalunya**

Barcelona Enero 2011



Resumen

Los cementos de fosfato de calcio son biomateriales utilizados para la regeneración ósea. En esta tesis doctoral se estudia la influencia de la microestructura y la macroporosidad en el comportamiento biológico de un cemento de fosfato de calcio.

En la primera parte, se caracterizaron las propiedades físico-químicas y superficiales de dos sustratos de apatita deficiente en calcio con diferente microestructura obtenidos a partir de un cemento de fosfato de calcio (CPC) cuyo principal componente es el fosfato tricálcico en fase α . Se estudió la influencia de la microestructura en el comportamiento celular y la adsorción de proteínas como la albúmina, la fibronectina y la lisozima. El uso de dos agentes desorción (EDTA y SDS) permitió evidenciar la influencia de la morfología y tamaño de los cristales de apatita en la fuerza de adhesión de las proteínas estudiadas. Los cultivos celulares con la línea MG-63 mostraron el efecto de la microestructura y el intercambio iónico sobre la proliferación celular. Se observó asimismo una estimulación en la diferenciación celular en uno de los sustratos que fue atribuido a un efecto de la topografía.

En la segunda parte, se desarrolló un cemento macroporoso inyectable para aplicaciones médicas, utilizando como agente espumante una solución proteica de albumen. Se optimizó la obtención de la macroporosidad a partir de variables como: la distribución del tamaño de partícula, la relación entre la fase sólida y la fase líquida, la cantidad de agente espumante y la adición de un agente de cohesión como el alginato de sodio para posibilitar su inyección directa en el lugar de implantación.

Por último, se demostró mediante estudios *in vivo* en fémur de conejos un mayor potencial de regeneración ósea por parte del cemento macroporoso en comparación con su homólogo microporoso, al obtenerse una mayor cantidad de tejido óseo y una mayor reabsorción en el cemento macroporoso.

Palabras clave: cemento óseo, regeneración ósea, apatita deficiente en calcio, topografía, osteoblasto, *in vitro*, macroporosidad, inyectabilidad, *in vivo*.

Abstract

Calcium phosphate cements are biomaterials used in bone regeneration. The aim of this work was to study the influence of microstructure and macroporosity on the biological behavior of a calcium phosphate cement.

In the first part of this work, the physicochemical and surface properties of two different calcium deficient apatite substrates were characterized. The substrates were obtained from the low setting temperature of a calcium phosphate cement composed mainly of α -tricalcium phosphate.

The influence of the microstructure on the cell behavior and protein adsorption (albumin, fibronectin and lysozyme) was studied. Differences in protein adhesion strength due to the differences in the morphology and size of the apatite crystals was revealed with the use of two desorption agents (EDTA and SDS). Cell proliferation of osteoblast-like cells MG-63 was influenced by microstructure and topography-mediated ion exchange. The increase in differentiation observed in one of the substrate was attributed mainly to a topographical effect.

In the second part of the study, an injectable macroporous calcium phosphate cement for medical applications was developed using a protein solution (albumen) as foaming agent. The influence of different factors on the macroporosity was studied, namely the particle size distribution, the liquid to powder ratio, the amount of foaming agent and the use of sodium alginate as cohesion agent.

Finally, a higher potential in bone regeneration was evidenced by the macroporous cement in comparison to its microporous homologous in the *in vivo* experiments in rabbit femur, as proved by a higher bone tissue growth and a higher resorption of the macroporous cement.

Keywords: bone cement, bone regeneration, calcium deficient apatite, topography, osteoblast, *in vitro*, macroporosity, injectability, *in vivo*.

Agradecimientos

A lo largo de esta larga tesis doctoral me he cruzado con muchas personas con las cuales he tenido el placer de trabajar, compartir horas de laboratorio, de despacho, horas de conversación y horas de partidos etc... Todas ellas han contribuido de alguna u otra a la realización de esta tesis. Espero poder recoger mi agradecimiento hacia ellas en estas líneas.

Mi más sincero agradecimiento para la Doctora Maria Pau Ginebra, directora de esta Tesis Doctoral. Gracias por pensar en mí para la realización de esta tesis doctoral, algo que nunca imaginé que haría. Su ejemplo, trabajo, dedicación, rigor y capacidad de crítica me han guiado a lo largo de este trabajo y siguen siendo un referente en mi trabajo. Gracias también por el apoyo mostrado en la larga parte final.

Al Doctor Josep Anton Planell, por permitirme formar parte del Grupo de Biomateriales de la ETSEIB. Su dedicación a un proyecto como el de la investigación de biomateriales ha hecho que el Grupo de Biomateriales de la ETSEIB sea un referente tanto a nivel nacional e internacional. Su esfuerzo en la creación del Institut de Bioenginyeria de Catalunya, marca un camino a seguir.

A la Doctora Elisabet Engel por sus enseñanzas y su paciencia al hablar con un ingeniero sobre biología y células, por su ayuda y comentarios en el diseño y análisis de los experimentos. Gracias por tu buen humor.

Al Doctor George Altankov por sus enseñanzas y dedicación al iniciarme en el mundo del cultivo celular y de la microscopía confocal. Su cercanía y disponibilidad dieron un buen empuje a esta tesis.

A los Doctores José Angel Delgado, Jochi, y Amisel Almirall por su ayuda iniciarme en el mundo de los cementos de fosfatos de calcio. Por hablarme y explicarme cosas de Cuba,.... A la doctora Melba Navarro quién me ayudó en mis inicios en el mundo de la investigación y por ser un referente en el cual fijarse.

Al Doctor Jose María Manero por su disponibilidad e inestimable ayuda en las sesiones de microscopía electrónica. Por su buen humor y conversación durante las mismas.

Al Doctor Conrado Aparicio por sus consejos en la realización de la caracterización física de los materiales, sus comentarios y ayuda en el análisis de los mismos.

Al Doctor Javier Gil por su buen humor, ayuda y disponibilidad para cualquier cosa. Por pensar en mí, para ocupar el puesto de técnico dentro del grupo de biomateriales.

A los Doctores Fernando Muñoz, Mónica López, Natalia Miño y Antonio González del Hospital Veterinario Universitario Rof Codina de Lugo, perteneciente a la Universidad Santiago de Compostela. Parte de esta tesis no hubiera sido posible sin su ayuda en la realización de los experimentos in vivo. Por su buena acogida y hacerme sentir como en casa.

A la Doctora Karine Anselme, de l'Institut de Chimie de Surfaces et Interfaces, Mulhouse Francia, donde realicé parte de los experimentos sobre proteínas, donde aprendí otras formas de trabajar en temas bio. A mis compañeros de sala, Jean-Christophe, Unai, Jérôme, Seppi, Antoine y Anne.

A la doctora Maria Jesús López de la Plataforma de Nanotecnología del PCB y a la doctora Lidia Bardia de la Plataforma Científica de Microscopía del PCB por su ayuda en la adquisición de imágenes de microscopía electrónica, microscopía confocal y la microscopía de fluorescencia.

Me gustaría también agradecer especialmente a todos mis compañeros del Grupo de Biomateriales con los cuales he podido aprender con ellos y de ellos el mundo de los biomateriales, así mismo por los buenos momentos vividos junto a ellos. Especialmente a Montse Charles-Harris, con quien me crucé hace muchos años en Francia, compartí años de tesis y por la amistad que compartimos. Marta Pegueroles con quien he aprendido y compartido muchas horas de laboratorio a lo largo de cuatro de años, por su amistad. A Carolina Mochales, por hacer amenas las horas de laboratorio, por tu amistad. A Milena por su carácter crítico como investigadora, por horas de discusión y amistad. A Sebas, por compartir muchos ratos juntos, tanto fuera como dentro de la universidad. A Pablo, Meritxell, Aleix y Luis por estar siempre ahí cuando se necesitaba algo o había algún problema en el laboratorio, y por supuesto por muchas otras cosas. A Edgar y Román, con quienes coincidí al final de mi tesis, que hicieron que ésta fuera mucho más divertida. A Johan, el sueco, por echarme una mano siempre que lo necesitaba con las células y las horas de laboratorio compartidas. A los futuros docs, post-docs y docs: Alex, Aitor, Martin, Clara, Marta G., Gemma, Ramiro, Miguel, Lucía, Andy, Ana G., Tania, Izabella, Óscar, Damien y Miguel Ángel.

A Carlos y Nayar con los cuales compartí tesis y apartamento, por la amistad que me une a ellos. A Jessica, con quién también me crucé en Francia, compartí tesis y la amistad que nos une. A María, Gonzalo, Luca, Marta y Ovid por vuestra amistad. Jessica, Carlos, Nayar, Milena, Luca, Elena, Tomás, Gemma, Yadir, Gonzalo, Marta, Ovidi, Raul, Griselda, María por las muchas horas de discusión, debate y buenos momentos compartidos alrededor de un tupper durante las comidas a lo largo de toda la tesis. A todos mis compañeros de sala: Raúl, Zamir, Gemma, Giselle, Elena, Tomás, Carlos Alberto y Luca. A los integrantes del equipo de fútbol de *Materialistas*: Edu, Agus, Mathieu, Sebas, Gonzalo, Aleix, Román, Óscar y Michael.

A todos mis amigos que han compartido y sufrido en parte mi tesis, por su interés y por preguntar siempre que tal avanzaba y tener la paciencia de escucharme hablar de cementos, huesos y células. Gracias por estar ahí.

A mi hermana Yolanda, con la cual comparto muchas cosas y al mismo discuto de todo. Por apoyarme en todo y estar ahí para hacer de hermana mayor cuando se la necesita. A los nuevos miembros de la familia: Gerardo y el peque de la familia Nicolás, que acaba de asomar la cabeza, de alguna u otra forma han sufrido o sufrirán la tesis.

A mis padres, Mercedes y Gerardo, por ser como son, por apoyarme e insistir hasta lo indefinible que acabara la tesis. Gracias a ellos soy como soy. Nunca podré agradecerlos todo lo que habéis hecho y seguís haciendo por mí.

Prólogo

Las enfermedades del sistema músculo-esquelético cubren aproximadamente unas 200 tipologías, algunas tan comunes como el dolor de espalda. Este tipo de enfermedades o trastornos afectan al menos una vez a lo largo de la vida al ser humano de una forma u otra, incluidos niños.

El impacto de este tipo de enfermedades no sólo afecta a las personas y su calidad de vida, sino que también tienen un gran impacto económico en la sociedad debido a las bajas laborales y los elevados costes sanitarios asociados. Por otro lado, el envejecimiento de la población en los países desarrollados ejerce una gran presión sobre los servicios sociales de los distintos países. En Europa habrá más población por encima de 60 años que por debajo de 20 años en el 2015.

En este sentido, los avances en la prevención de enfermedades y en la búsqueda de soluciones mejores y más definitivas a las dolencias suponen una mejora tanto de la calidad de vida como un importante ahorro económico al conjunto de la sociedad. Es por ello que existe una gran cantidad de recursos dedicados a la mejora e investigación de los problemas óseos, y es en este marco global descrito en el que se desarrolla esta tesis, en la cual se investigan nuevos materiales para la regeneración ósea.

En la actualidad, se buscan biomateriales para la regeneración ósea denominados de tercera generación, materiales inteligentes, capaces de estimular una respuesta celular específica, bioactivos y que sean reabsorbidos por el organismo una vez restaurada la funcionalidad del lugar donde se han implantado. Estas nuevas exigencias hacen que la investigación en esta área se plantee con un enfoque interdisciplinar, abarcando no sólo la caracterización físico química del material sino también su interacción con las entidades biológicas.

Un grupo importante de biomateriales utilizados en la regeneración ósea son las cerámicas de fosfato de calcio. Comprenden una amplia gama de productos cuya principal característica es que su composición química es similar a la fase mineral del hueso. Dentro de este grupo encontramos los cementos de fosfato de calcio.

La principal característica de un sistema cementante es la capacidad de obtener una masa coherente y moldeable, que endurece, con el tiempo al mezclar una fase sólida con una fase líquida. Las principales ventajas

de los cementos de fosfato de calcio son su capacidad de fraguar *in vivo* una vez implantados, su alta biocompatibilidad y su moldeabilidad y buena adaptación al defecto óseo. Ciertos sistemas también pueden ser inyectados, pudiendo ser utilizados en técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas.

Sin embargo a pesar de su alta biocompatibilidad y de que son osteoconducentes, su velocidad de resorción es baja para algunas aplicaciones, pudiendo ser su tiempo de permanencia en el organismo de varios años.

Objetivos

Es desde esta perspectiva desde la cual se ha realizado esta Tesis Doctoral, dirigida al desarrollo de materiales de tercera generación para la regeneración ósea. Los objetivos de la misma se pueden desglosar en dos aspectos:

a) Estudio del efecto de la microestructura y las propiedades superficiales de un cemento de hidroxiapatita deficiente en calcio sobre la adsorción de proteínas y la respuesta celular *in vitro* de una línea celular osteoblástica (MG-63). Para ello se ha llevado a cabo la caracterización físico-química, microestructural y superficial de la hidroxiapatita deficiente en calcio obtenida a partir del fraguado de dos cementos de fosfato tricálcico alfa con la misma composición y distinta distribución de tamaño de partícula.

b) Obtención y desarrollo de un cemento macroporoso inyectable a partir de la introducción de un agente espumante de origen proteico en un cemento de fosfato tricálcico alfa. Estudio de la influencia del agente espumante, el tamaño de partícula del cemento, la relación líquido/polvo y el agente de cohesión en las propiedades finales del cemento macroporoso. Evaluación de la respuesta biológica *in vivo* del cemento macroporoso inyectable en comparación con su homólogo microporoso.

Artículos Publicados y Contribuciones a Congresos

Artículos Publicados

M. Navarro, S. del Valle, S. Martínez, S. Zeppetelli, L. Ambrosio, J. A. Planell, and M. P. Ginebra. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 25:4233-4241, 2004.

M. Navarro, S. del Valle, M.P. Ginebra, S. Martinez, and J.A. Planell. Development of a new calcium phosphate glass ceramic porous scaffold for guided bone regeneration. *Key Engineering Materials*, 254-256:945-948, 2004.

J.A. Delgado, I. Harr, A. Almirall, S. del Valle, J.A. Planell, and M.P. Ginebra. Injectability of a macroporous calcium phosphate cement. *Key Engineering Materials*, 284-286:157-160, 2005.

M. Charles-Harris, S. del Valle, E. Hentges, P. Bleuet, D. Lacroix, and J. A. Planell. Mechanical and structural characterisation of completely degradable polylactic acid/calcium phosphate glass scaffolds. *Biomaterials*, 28(30):4429-4438, 2007.

M.P. Ginebra, J.A. Delgado, A. Almirall, I. Harr, S. del Valle and J.A. Planell. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(2):351-361, 2007.

S. del Valle, N. Miño, F. Muñoz, A. Gonzalez, J.P. Planell, and M.P. Ginebra. In vivo evaluation of an injectable macroporous calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(2):353-61, 2007.

S. del Valle, E. Engel, S. Braak, J.A. Planell, and M.P. Ginebra. Effect of ionic exchange on osteoblast behaviour on bioactive tissue engineering substrates. *Key Engineering Materials*, 361-363:1051-1054, 2008.

E. Engel, S. del Valle, C. Aparicio, G. Altankov, L. Asin, J.A. Planell, and M.P. Ginebra. Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 14:1341-1351, 2008.

N. Miño-Fariña, F. Muñoz-Guzón, M. López-Peña, M.P. Ginebra, S. del Valle-Fresno, D. Ayala, and A. González-Cantalapiedra. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction of a macroporous calcium phosphate bone cement for the repair of a critical size defect in the femoral condyle. *The Veterinary Journal*, 179(2):264-272, 2009.

Contribuciones a Congresos

M. Navarro, S. del Valle, M.P. Ginebra, S. Martinez, S. Zeppetelli, L. Ambrosio and J.A. Planell. Macroporous calcium phosphate glass ceramic scaffold for bone regeneration. 7th World Biomaterials Congress, Sidney, Australia, 2004.

S. Del Valle, A. Almirall, J.A. Delgado, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Desarrollo de un cemento de fosfato de calcio macroporoso de base proteica con propiedades físicas adecuadas para su aplicación clínica. IV Jornades de Recerca en Enginyeria Biomèdica de Catalunya, JBEC 2004.

S. del Valle, A. Almirall, J.A. Delgado, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Development of a macroporous calcium phosphate cement stable in physiological conditions. BIOEVORA 2004, II Iberic Congress on Biomaterials and Biomechanics, Evora, Portugal.

J.A. Delgado, I. Harr, A. Almirall, S. del Valle, J.A. Planell and M.P. Ginebra. Injectability of a macroporous calcium phosphate cement. Bioceramics17, Proceedings of the 17th International Symposium on Ceramics in Medicine, The Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), New Orleans, Louisiana, USA, 8-12 December 2004

S. del Valle, E. Engel, C. Aparicio, J.A. Planell, M.P. Ginebra. Relationship between topography and cell behaviour in calcium phosphate cements: Influence of the powder particle size. ESB2005, 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy, September 2005.

M.Charles-Harris, S.del Valle, D. Lacroix, J.A. Planell. X-ray microtomography and Micromechanical Testing of Composite Scaffolds. ESB2005, 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy, September 2005.

C. Mochales, S. del Valle, C. L. Camiré, X. Solans, J.M. Manero, J. A. Planell and M.P. Ginebra. Silicon-Stabilized Tricalcium Phosphate: A Reactant

for a Novel Silicon Substituted Calcium Phosphate Cement. ESB2005, 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento, Italy, September 2005.

S. del Valle, E. Engel, C. Aparicio, J.A. Planell and M.P. Ginebra. In Vivo Evaluation of an Injectable Macroporous Calcium Phosphate Cement. ESB2006, 20th European Conference on Biomaterials, Nantes, France, September 2006.

S. del Valle, E. Engel, S. Braak, J.A. Planell and M.P. Ginebra. Effect of ionic exchange on osteoblast behaviour on bioactive tissue engineering substrates. Bioceramics20, 20th International Symposium on Ceramics in Medicine, The Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), Nantes, France, 24-26 October 2007.

S. del Valle, K. Anselme, M. Español, E. Engel, G. Altankov, M.A. Cabrerizo-Vilchez, J.A. Planell and M. P. Ginebra. Protein Adsorption on Calcium Phosphate Cements. ESB2007, 21st European Conference on Biomaterials 2007, Brighton, United Kingdom, September 2007.

Índice

Resumen	III
Abstract	V
Agradecimientos	VII
Prólogo	XI
Artículos Publicados y Contribuciones a Congresos	XIII
Índice de Tablas	XXVI
Índice de Figuras	XXXII
Abreviaturas	XXXIII
1. Introducción	1
1.1. Marco global de la presente tesis	1
1.2. Conceptos generales sobre el hueso	2
1.2.1. Definición y funciones	2
1.2.2. Clasificación de los huesos en función de su estructura macroscópica	3
1.2.3. Clasificación de los huesos en función de su anatomía .	5
1.2.4. Histología del Hueso	6
1.2.5. Fisiología del Hueso	9
1.2.6. Propiedades mecánicas del hueso	11
1.3. Remodelación y reparación ósea	13
1.3.1. Remodelación ósea	13
1.3.2. Reparación de una fractura ósea	15
1.4. Técnicas de Regeneración Ósea	17
1.5. Materiales para la regeneración ósea	19
1.5.1. Ingeniería de tejidos	19
1.5.2. Requisitos de los materiales para regeneración ósea . .	20
1.5.3. Polímeros biodegradables	22
1.5.4. Biocerámicas	23

1.5.5.	Moléculas Bioactivas	26
1.6.	Química de los fosfatos de Calcio	26
1.7.	Cementos de Fosfato de Calcio	29
1.7.1.	Características de los cementos de fosfato de calcio	32
1.7.2.	Variables que afectan a los CPC	33
1.8.	Desarrollo de cementos de fosfato de calcio macroporosos	36
1.9.	CPC para Ingeniería de Tejidos	38
	Referencias	40
2.	Caracterización superficial	51
2.1.	Introducción	51
2.2.	Objetivos	53
2.3.	Materiales y Métodos	55
2.3.1.	Obtención del α -TCP	55
2.3.2.	Cemento H	56
2.3.2.1.	Preparación de las muestras	56
2.3.3.	Granulometría: Difracción Láser	57
2.3.4.	Superficie específica	57
2.3.5.	Difracción de Rayos X	58
2.3.6.	Espectroscopía de Infrarrojos	58
2.3.7.	Porosimetría de intrusión de mercurio	59
2.3.8.	Microscopía Electrónica de Barrido	59
2.3.9.	Estudio de la Rugosidad	60
2.3.9.1.	Interferometría óptica	60
2.3.9.2.	Microscopía de Fuerzas Atómicas	62
2.3.9.3.	Parámetros de Rugosidad estudiados	63
2.3.9.4.	Filtros de Fourier	66
2.3.10.	Estudio del Ángulo de Contacto	68
2.4.	Resultados	70
2.4.1.	Caracterización del α -TCP	70
2.4.1.1.	Granulometría y Superficie Específica	70
2.4.1.2.	Difracción de Rayos X	70
2.4.2.	Caracterización del cemento H.	71
2.4.2.1.	Superficie específica y análisis de la porosidad por porosimetría de mercurio del Cemento H	71
2.4.2.2.	Difracción de Rayos X	72
2.4.2.3.	Espectroscopía de Infrarrojos	73
2.4.3.	Caracterización Microestructural	75
2.4.3.1.	Superficie	75
2.4.3.2.	Interior	78
2.4.4.	Caracterización Topográfica	79
2.4.4.1.	Interferometría óptica	79
2.4.4.2.	Microscopía de Fuerzas Atómicas	82
2.4.5.	Ángulo de Contacto	87

2.5.	Discusión	89
2.5.1.	Caracterización del α -TCP y del cemento H.	89
2.5.2.	Caracterización Microestructural	89
2.5.3.	Caracterización Topográfica: Interferometría óptica y AFM	90
2.5.4.	Ángulo de contacto	95
2.6.	Conclusiones	97
	Referencias	98
3.	Estudio de la Adsorción y desorción de Proteínas	105
3.1.	Introducción	105
3.1.1.	Importancia de la adsorción de proteínas	105
3.1.2.	Factores que influyen en la adsorción de proteínas sobre las superficies de un biomaterial	107
3.2.	Objetivos	113
3.3.	Materiales y Métodos	115
3.3.1.	Fabricación de las muestras	115
3.3.2.	Estudio de Adsorción de Proteínas	115
3.3.2.1.	Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima. Desorción mediante EDTA y SDS.	115
3.3.2.2.	Adsorción y desorción con SDS de Fibronectina y Albúmina marcadas con un marcador fluorescente (FITC)	122
3.3.2.3.	Adsorción de proteínas del medio de cultivo completo y desorción con SDS	124
3.4.	Resultados	125
3.4.1.	Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima. Desorción mediante EDTA y SDS.	125
3.4.2.	Desorción con SDS de Fibronectina y Albúmina marcadas con un marcador fluorescente (FITC)	127
3.4.3.	Adsorción de proteínas del medio de cultivo completo y desorción con SDS	128
3.5.	Discusión	129
3.5.1.	Introducción: estructura de la apatita	129
3.5.2.	Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima: Carácter ácido-base de las proteínas.	130
3.5.3.	Influencia del Tamaño de partícula en la adsorción de proteína	133
3.5.4.	Influencia del Tamaño de partícula en la fuerza de adhesión de las proteínas. Desorción con EDTA y SDS	136
3.6.	Conclusiones	139
	Referencias	141

4. Estudio del Comportamiento Celular <i>in vitro</i>	145
4.1. Introducción	145
4.1.1. Descripción de la línea celular osteoblástica: MG-63	146
4.1.2. Adhesión Celular	147
4.1.3. Proliferación celular	148
4.1.4. Diferenciación celular	148
4.2. Objetivos	151
4.3. Materiales y Métodos	153
4.3.1. Cultivos celulares en contacto directo con los sustratos	153
4.3.2. Adhesión celular	153
4.3.3. Proliferación celular	153
4.3.4. Diferenciación celular: Actividad de la fosfatasa alcalina y cuantificación de la secreción de osteocalcina.	154
4.3.5. Morfología Celular	156
4.3.5.1. Adhesión celular: Marcaje con FDA	156
4.3.5.2. Protocolo general para ensayos de inmunofluorescencia para observación por microscopía confocal láser.	156
4.3.5.3. Marcaje de la vinculina y de la actina	158
4.3.5.4. Marcaje de la fibronectina	158
4.3.6. Cuantificación de la producción inicial de matriz extracelular.	159
4.3.7. Microscopía electrónica de barrido	160
4.3.8. Cultivos celulares con extractos de CPC y con medios de cultivo con concentraciones bajas de Ca^{2+}	160
4.3.8.1. Preparación de los extractos	160
4.3.8.2. Proliferación y diferenciación celular.	160
4.3.9. Apoptosis	162
4.4. Resultados	164
4.4.1. Adhesión de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	164
4.4.2. Proliferación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	164
4.4.3. Diferenciación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	165
4.4.4. Morfología celular	166
4.4.4.1. Adhesión celular: tinción con FDA	166
4.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido	169
4.4.4.3. Microscopía confocal láser.	174
4.4.5. Matriz Extracelular	180
4.4.6. Intercambio iónico entre los sustratos de CPC y el medio de cultivo en presencia de células	181
4.4.7. Proliferación y diferenciación en los cultivos celulares realizados con extractos	183

4.4.8.	Apoptosis	185
4.5.	Discusión	188
4.5.1.	Adhesión de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	188
4.5.2.	Proliferación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	189
4.5.3.	Diferenciación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras	189
4.5.4.	Morfología celular	191
4.5.5.	Proliferación y diferenciación en los cultivos celulares realizados con extractos	193
4.6.	Conclusiones	197
	Referencias	198
5.	Desarrollo y caracterización de un cemento macroporoso	205
5.1.	Introducción	205
5.1.1.	Interés de los materiales macroporosos en medicina regenerativa ósea.	205
5.1.2.	Técnicas de Fabricación de Cerámicos Macroporosos .	206
5.1.3.	Técnicas de fabricación de cementos macroporosos para aplicaciones biomédicas	209
5.1.4.	Proceso de formación de una espuma	210
5.1.5.	Proteínas como agentes espumantes	213
5.1.5.1.	Agente espumante: Albumen	214
5.1.6.	Cementos de fosfato de calcio macroporosos con albumen como agente espumante	215
5.2.	Objetivos	217
5.3.	Materiales y métodos	219
5.3.1.	Materiales	219
5.3.1.1.	Cemento H	219
5.3.1.2.	Fase Líquida	219
5.3.1.3.	Agente Espumante: Solución de Albumen . .	219
5.3.1.4.	Preparación de los Cementos Microporosos o no Espumados	220
5.3.1.5.	Preparación de los Cementos Espumados o Macroporosos	221
5.3.1.6.	Diseño experimental	222
5.3.2.	Métodos de Caracterización	224
5.3.2.1.	Tiempo de cohesión	224
5.3.2.2.	Picnometría de helio: medida de la densidad real o esquelética	224
5.3.2.3.	Determinación de la porosidad	225
5.3.2.4.	Inyectabilidad	227
5.3.2.5.	Caracterización de la cinética de reacción por Difracción de Rayos-X	227

5.3.2.6.	Propiedades mecánicas	232
5.3.2.7.	Análisis Estadístico de los datos	232
5.4.	Resultados	233
5.4.1.	Tiempos de cohesión y Tiempos de Fraguado	233
5.4.2.	Microestructura de los CPC	233
5.4.3.	Porosidad	234
5.4.4.	Morfología de la Macroporosidad	237
5.4.5.	Análisis mediante Porosimetría de Intrusión de Mercurio	241
5.4.6.	Inyectabilidad	242
5.4.7.	Estudio de la cinética de la reacción de fraguado.	244
5.4.8.	Resistencia a la Compresión	248
5.5.	Discusión	250
5.5.1.	Cohesión	250
5.5.2.	Porosidad	251
5.5.3.	Morfología de la porosidad	253
5.5.4.	Inyectabilidad	254
5.5.5.	Estudio de la cinética de la reacción de fraguado	255
5.5.6.	Resistencia a la compresión	255
5.6.	Conclusiones	257
	Referencias	258

6. Respuesta *In Vivo* de un cemento de fosfato de calcio macroporoso 265

6.1.	Introducción	265
6.2.	Objetivos	271
6.3.	Materiales y Métodos	273
6.3.1.	Materiales	273
6.3.1.1.	Cementos objeto del estudio	273
6.3.1.2.	Esterilización de los materiales	273
6.3.1.3.	Caracterización de los cementos de fosfato de calcio implantados	274
6.3.2.	Animales	275
6.3.2.1.	Manejo de los animales	275
6.3.2.2.	Grupos de trabajo	275
6.3.3.	Métodos	275
6.3.3.1.	Realización de las operaciones	275
6.3.3.2.	Protocolo Anésteico	276
6.3.3.3.	Técnica Quirúrgica	276
6.3.3.4.	Evaluación postoperatoria, profilaxis y control	278
6.3.3.5.	Protocolo de eutanasia	278
6.3.3.6.	Estudio radiológico	278
6.3.3.7.	Preparación histológica de las muestras	278
6.3.3.8.	Análisis de la superficie de los implantes por Microscopía Electrónica de Barrido	280

6.3.3.9.	Análisis histomorfométrico	281
6.3.3.10.	Análisis histológico	282
6.4.	Resultados	284
6.4.1.	Caracterización de los materiales implantados <i>in vitro</i>	284
6.4.2.	Supervivencia de los animales	284
6.4.3.	Estudio radiológico	285
6.4.4.	Estudio de microscopía electrónica de barrido	286
6.4.4.1.	Control	286
6.4.4.2.	Cemento microporoso	288
6.4.4.3.	Cemento macroporoso	289
6.4.5.	Resultados de Histomorfometría	292
6.4.6.	Resultados de Histología	295
6.4.6.1.	Control	295
6.4.6.2.	Cemento microporoso	296
6.4.6.3.	Cemento macroporoso	300
6.5.	Discusión	303
6.6.	Conclusiones	309
	Referencias	310
	Conclusiones Generales	317
	General Conclusions	319
	Perspectivas Futuras	321

Índice de Tablas

1.1. Cifras del impacto social y económico de la osteoporosis y de la artritis	2
1.2. Proteínas y factores que regulan el metabolismo celular óseo	8
1.3. Propiedades mecánicas del hueso	12
1.4. Lista de Ortofosfatos de Calcio utilizados en aplicaciones biomédicas.	27
1.5. Lista de Cementos de Fosfato Comerciales	32
2.1. Características del tamaño de partícula obtenido después de aplicar ambos protocolos de molienda	70
2.2. Superficie específica del Cemento H una vez fraguado	71
2.3. Valores de Rugosidad obtenidos por interferometría óptica	80
2.4. Valores de Rugosidad obtenidos por Interferometría después de aplicar filtros Pasa-Banda	81
2.5. Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	86
2.6. Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	86
2.7. Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	86
2.8. Valores de los ángulos de contacto θ obtenidos para las dos técnicas utilizadas	88
3.1. Composición de los geles de poliacrilamida utilizados	121
3.2. Protocolo para la tinción con nitrato de plata	121
5.1. Composición del Albumen	215
5.2. Formulación de los cementos <i>convencionales</i> o <i>no espumados</i>	220
5.3. Formulación de los cementos espumados o macroporosos.	223
5.4. Picos de α -TCP (JCPDS:23-359) para la cuantificación de la cinética de reacción	232
5.5. Densidad esquelética, densidad aparente y porosidad de los cementos microporosos	234
5.6. Densidad esquelética, densidad aparente y porosidad de los cementos espumados	235

5.7. Efectos Principales para la Porosidad Total y para la Macro- porosidad.	237
5.8. Valores de porosidad obtenidos por inmersión en mercurio y por porosimetría de intrusión de mercurio	241
5.9. Inyectabilidad a los 5min.	243
5.10. Comparación de Porosidad entre las muestras inyectadas y las muestras no inyectadas	244
5.11. Valores de τ calculados según la ecuación 5.31 para un 95 % de confianza	245
5.12. Resultados de la resistencia a la compresión del diseño factorial	248
5.13. Efectos Principales para la Resistencia a la Compresión	249
6.1. Resultados de Histomorfometría. Cuantificación de la osteo- genesis del Control.	292
6.2. Resultados de Histomorfometría. Cuantificación de la osteoge- nesis y la reabsorción del cemento microporoso y del cemento macroporoso.	292

Índice de Figuras

1.1. Estructura del Hueso Compacto	4
1.2. Estructura jerárquica del hueso desde la macroestructura del hueso compacto hasta la microestructura	4
1.3. Estructura del Hueso Esponjoso	5
1.4. Diferentes tipos de hueso y su estructura interna	6
1.5. Procedencia de las distintas líneas celulares presentes en el hueso	9
1.6. Esquema de la remodelación ósea	15
1.7. Esquema ilustrativo de la ingeniería de tejidos	20
1.8. La arquitectura del andamio afecta la adhesión celular	22
1.9. Isotermas de Solubilidad en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$: log de [Ca] frente al pH a 37°C	28
1.10. Isotermas de Solubilidad en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$: log de [P] frente al pH a 37°C	29
1.11. Esquema del proceso de un cemento y de su comportamiento.	30
1.12. Microestructura de un cemento de fosfato de calcio	31
1.13. Reabsorción de Fracture Grout en perro después de 18 meses	37
1.14. Presencia de un cemento después de 6 años en una operación de muñeca	38
2.1. Influencia de la topografía en la adhesión celular	52
2.2. Fotografía de los moldes de Teflón usados para fabricar los discos usados en este estudio	57
2.3. Mercurio en contacto con un poro	59
2.4. Esquema de un Interferómetro	61
2.5. Interferometría: Coherencia de la luz y franjas de interferencia	61
2.6. Esquema de un AFM y punta de AFM	62
2.7. Perfil de una superficie y separación en sus tres componentes: Forma, ondulación y rugosidad	67
2.8. Ejemplo de aplicación de los distintos filtros de Fourier	68
2.9. Ángulo de contacto en Gota Sesil y ángulo de contacto en burbuja cautiva	69
2.10. Distribución de los tamaños de partícula de los protocolos de molienda: TP Grueso y TP Fino	70

2.11. Difracción de Rayos X del α -TCP después de los protocolo de molienda TP Fino TP Grueso	71
2.12. Función de Distribución del tamaño del poro vs. Diámetro de entrada al poro	72
2.13. Difracción de Rayos X del TP Fino y del TP Grueso fraguado	73
2.14. Espectro de infrarrojos del TP Grueso y del TP Fino antes y después de 20 días de incubación en Medio Completo	74
2.15. Imagen a 250 aumentos de la superficie de los CPC	75
2.16. Imagen a 1000 aumentos de la superficie de los CPC	76
2.17. Imagen a 3000 aumentos de la superficie de los CPC	76
2.18. Imagen a 6000 aumentos de la superficie de los CPC	76
2.19. Imagen a 15000 aumentos dde la superficie de los CPC	77
2.20. Imagen a 65000 aumentos de la superficie de los CPC	77
2.21. Imágenes mostrando la superficie y el interior de los CPC	78
2.22. Imagen a 6000 aumentos del interior de las muestras	79
2.23. Imagen de TP Grueso y TP Fino obtenidas por interferometría	79
2.24. Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM y AFM. Área escaneo: $1 \times 1 \mu\text{m}^2$	83
2.25. Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM y AFM. Área escaneo: $5 \times 5 \mu\text{m}^2$	84
2.26. Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM y AFM. Área escaneo: $20 \times 20 \mu\text{m}^2$	85
2.27. Ángulo de Contacto mediante el método de los dos líquidos	87
2.28. Ángulo de Contacto mediante el método de la burbuja cautiva	88
2.29. Esquema de la superficie mostrando la superficie de aglomerados semiesféricos formados por los cristales de apatita.	90
2.30. Comparación de la capacidad de resolución de distintos métodos para evaluar la topografía de una superficie	91
2.31. Evolución de S_a en función del área de escaneado, resultados de interferometría óptica y microscopía de fuerzas atómicas	93
3.1. Esquema de los sucesos que ocurren tras la implantación de un biomaterial en su superficie	106
3.2. Influencia de la topografía en la adsorción y conformación de proteínas	111
3.3. Estructura del EDTA en su forma neutra.	117
3.4. Estructura del SDS en su forma neutra.	117
3.5. Interacción del SDS con las proteínas	119
3.6. Esquema del funcionamiento de la electroforesis	120
3.7. Fórmula del reactivo Azul de Coomassie	122
3.8. Cantidad de proteína en el sobrenadante después de 1h de adsorción	126
3.9. Gel de poliacrilamida de la albúmina desorbida con EDTA y SDS	127

3.10. Cuantificación de la desorción con SDS al 10 % de Albúmina y Fibronectina marcadas con FITC	128
3.11. Adsorción-Desorción de proteínas a partir del Medio completo usando una solución de SDS al 10 %	129
3.12. Representación de la estructura cristalográfica de la hidroxapatita	130
3.13. Función de Distribución del tamaño del poro vs. Diámetro de entrada al poro	133
3.14. Imagen de Lupa Binocular mostrando restos de FN-FITC en muestras de CPC	134
3.15. Muestras de TP Grueso (izquierda) y TP Fino (derecha) después de 2h de inmersión en líquido de alta capacidad de penetración	135
3.16. Imagen de las agujas obtenidas de TP Fino vistas por TEM.	138
4.1. Influencia de la topografía en la adhesión celular	146
4.2. Degradación de la sal de tetrazolio WST-1 en formazán	154
4.3. Esquema de la preparación de los extractos y del cultivo celular realizado con los extractos.	161
4.4. Células apoptóticas inducidas mediante la adición de etanol	162
4.5. Adhesión celular después de 6, 12, and 24 h de cultivo de células MG-63	164
4.6. Proliferación celular en contacto directo con las muestras a los 3, 7, y 14 días medidos con WST	165
4.7. Actividad de la fosfatasa alcalina y de la producción de osteocalcina	166
4.8. Marcaje con FDA de células MG-63 después de 6h de cultivo	167
4.9. Marcaje con FDA de células MG-63 después de 24h de cultivo	168
4.10. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 2 días de cultivo	171
4.11. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 5 días de cultivo	172
4.12. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 15 días de cultivo	173
4.13. Imágenes de microscopía confocal láser: Marcaje de la vinculina y de la actina después de 2 días de cultivo	175
4.14. Imágenes de microscopía confocal láser: Marcaje de la vinculina y de la actina después de 5 días de cultivo	176
4.15. Imágenes de microscopía confocal láser: marcaje de vinculina en verde y de actina en rojo en células MG-63 después de 5 días de cultivo	177
4.16. Células MG-63 después de 5 días de cultivo sobre una muestra de TP Grueso. Descomposición en altura mostrando la adaptación de las estructuras celulares a la topografía del CPC	178

4.17. Células MG-63 después de 5 días de cultivo sobre una muestra de TP Grueso. Descomposición en altura mostrando la adaptación de las estructuras celulares a la topografía del CPC	179
4.18. Marcaje de la fibronectina presente en la matriz extracelular después de 5 días de cultivo	180
4.19. Cuantificación de la matriz extracelular producida por las células después de 5 días de cultivo en muestras de CPC	181
4.20. Evolución de la concentración de calcio en el medio de cultivo después de 96h	182
4.21. Evolución de la concentración de calcio en el medio de cultivo en las muestras de TP Grueso y TP Fino con o sin células durante el periodo de estudio	183
4.22. Evolución de la concentración de fosfato en el medio de cultivo en las muestras de TP Grueso y TP Fino con o sin células durante el periodo de estudio	184
4.23. Proliferación de células MG-63 cultivada con extractos de CPC y en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Ca^{2+} en placa de cultivo de 48 pocillos.	184
4.24. Actividad de la fosfatasa alcalina de células MG-63 cultivadas con extractos de TP Grueso y TP Fino y con medios con concentraciones decrecientes de Ca^{2+}	185
4.25. Concentración de calcio en el medio de cultivo después de estar en contacto con las células durante el estudio con los extractos de CPC.	186
4.26. Proliferación después de 7 días de las células MG-63 en contacto directo con los sustratos procedentes de CPC o con sus extractos en TCPS	187
4.27. % Porcentaje de células apoptóticas encontrados en los diferentes tiempos de estudio.	187
4.28. Comparación de la adhesión y proliferación entre los experimentos en contacto directo y con los extractos respecto al control interno de cada experimento.	195
5.1. Formación de una espuma. El borde de plateau y película delgada formada entre burbujas	211
5.2. Conformaciones de las proteínas en la interfase	214
5.3. Molécula de Alginato de Sodio	220
5.4. Esquema de la fabricación de un cemento espumado o macroporoso.	221
5.5. Esquema de un picnómetro de helio.	225
5.6. Microestructura de los cementos después del fraguado	234
5.7. Representación geométrica de los resultados de la Porosidad Total	236
5.8. Representación geométrica de los resultados de la Macroporosidad	236

5.9.	Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Visualización de la influencia de la cantidad agente espumante	238
5.10.	Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Influencia de la relación L/P	239
5.11.	Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Influencia de la Solución d ALG	240
5.12.	Función de distribución de tamaño de poro vs. Diámetro de entrada al poro. Comparativa entre cementos microporosos y cementos macroporosos.	242
5.13.	Función de distribución de tamaño de poro vs. Diámetro de entrada al poro. Comparativa de la influencia de la relación L/P en la interconexión de la porosidad.	243
5.14.	Muestras inyectadas a diferentes tiempos	244
5.15.	Difractogramas de F-ALG-40-BH+ a distintos tiempos de reacción	245
5.16.	Porcentaje de reacción en función del tiempo de reacción.	246
5.17.	Microestructura observada por SEM de las muestras F-ACC-40 y F-ALG-40-BH+ a distintos tiempo de fraguado	247
5.18.	Representación geométrica de los resultados de la Resistencia a la compresión	248
5.19.	Separación entre poros de la serie G-ACC-40-BH+	252
6.1.	Diferentes imágenes mostrando diferentes fases de la operación e inyectado del cemento en el defecto cavitario	277
6.2.	Imagen mostrando una muestra durante la preparación histológica	279
6.3.	Imagen de microscopía óptica ilustrando distintos parámetros histomorfométricos.	282
6.4.	Imagen de microscopía óptica ilustrando los conceptos de longitud, amplitud y área de osteoide.	283
6.5.	Imagen comparativa de la macroestructura de los cementos implantados	284
6.6.	Porosimetría Comparativa de los Cementos Microporoso y Macroporoso implantados	285
6.7.	Evolución radiológica del Control, del Cemento Microporoso y del Cemento Macroporoso	286
6.8.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido del control a los distintos tiempos del estudio	287
6.9.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento microporoso a los distintos tiempos del estudio	288
6.10.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento microporoso a las 12 semanas	289
6.11.	Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento macroporoso a los distintos tiempos del estudio	290

6.12. Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento macroporoso a las 12 semanas mostrando la unión directa entre el cemento y el hueso	291
6.13. Evolución del Volumen de Tejido Óseo y del Volumen de Hueso Neoformado en el Control y los Cementos Microporoso y Macroporoso	293
6.14. Evolución de la Longitud Total de Osteoide y de la Amplitud Media de Osteoide en los Cementos Microporoso y Macroporoso	294
6.15. Evolución del Porcentaje de Penetración del Tejido y del Volumen de Material No Reabsorbido en los Cementos Microporoso y Macroporoso	294
6.16. Evolución Macroscópica del Control	295
6.17. Evolución Macroscópica del cemento microporoso	297
6.18. Interfase entre el cemento microporoso y el hueso en la primera semana del estudio	298
6.19. Interfase entre el cemento microporoso y el hueso a las cuatro semanas del estudio	298
6.20. Interfase entre el cemento microporoso y el hueso a las cuatro semanas del estudio. La flecha blanca señala osteoblastos en la superficie del hueso nuevo. La flecha negra la formación de un vaso sanguíneo. La flecha azul la presencia de macrófagos. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).	298
6.21. Imagen izquierda: Interfase cemento-hueso donde se observa la formación de un vaso sanguíneo (flecha blanca) y la unión directa del hueso con el implante. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó). En la imagen derecha se puede ver la interfase entre cemento y hueso. Se distingue claramente un ribete de osteoide (flecha azul) y la presencia de osteoblastos (elipse) y de osteocitos. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).	299
6.22. Evolución Macroscópica del Cemento Macroporoso	300
6.23. Interfase cemento-hueso en el cemento macroporoso a la semana de implantarse	301
6.24. Zona de degradación del cemento macroporoso a las 4 semanas de implantarse	302
6.25. Zona de degradación del cemento macroporoso a las 12 semanas de implantarse	302
6.26. Imagen superiores: cemento macroporoso a las 4 semanas. Imágenes Inferiores: cemento macroporoso a las 12 semanas (Microscopía estereoscópica, tinción de Lévai-Lazckó).	306

Abreviaturas

- α -TCP: Fosfato Tricálcico en fase α ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- β -TCP: Fosfato Tricálcico en fase β ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)
- ACC: Solución ACC
- ACP: Fosfato de Calcio Amorfo ($\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
- AFM: microscopio de fuerzas atómicas
- ALG: Solución ALG
- ALP: fosfatasa alcalina
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMO: Amplitud media de osteoide (μm)
- ARN: Ácido ribonucleico
- BCA: Ácido bicinconínico
- BGP: Osteocalcina (Bone Gla-Protein)
- BH: cantidad de albumen espumado
- BMP: Proteína morfogénica ósea (Bone Morphogenetic Protein)
- BMU: unidad multicelular básica (Basic Multicellular Unit)
- BRU: unidad de remodelado óseo (Bone Remodelling Unit)
- BSA: Albúmina de suero bovino
- BSU: unidad estructural ósea (Bone Structural Unit)
- CDHA: apatita deficiente en calcio ($\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$)
- CPC: cemento de fosfato de calcio (Calcium Phosphate Cement)
- d: densidad (g/cm^3)
- DAPI: Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DCP: Fosfato Dicálcico anhídrico (CaHPO_4)
- DCPD: Fosfato Dicálcico dihidratado ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- DRX: difracción de rayos X
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ECM: Matriz extracelular
- ELISA: enzyme linked immunoassay
- EtOH: Etanol
- F: TP Fino
- FAK: Quinasa de adhesión focal
- FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- FN: Fibronectina
- G: TP Grueso
- HA: Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
- IA: Área del implante (mm^2)
- ICP-OES: espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (Induced coupled plasma-optical emission spectrometry)
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry
- IGF : factor de crecimiento insulínico
- IR: Infrarrojos
- ISO: International Organization for Standardization
- JCPDS: Joint Committee on Powder Diffraction Standards
- L_{den} : Densidad lineal
- L/P: relación líquido/polvo (ml/g)
- LTO: Longitud total de osteoide (μm)
- MCPA: Fosfato Monocálcico anhídrico ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$)
- MCPM: Fosfato Monocálcico Monohidratado ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- MSC: Células madres mesenquimales (Mesenchymal stem cell)
- MG-63: Línea celular ósea procedente de un osteosarcoma y SaOS-2
- M-PER: Mammalian Protein Extraction Reagent usado para la lisis celular
- OCP: Fosfato Octacálcico ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- OWLS: Optical waveguide lightmode spectroscopy
- P: Porosidad (%)
- P_c : Número de picos por unidad de longitud
- PBS: Tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline)
- PBS-Gly: 0,15g Glicina + 100ml PBS 10mM

- PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas
- PHA: Hidroxiapatita precipitada
- PPT: Porcentaje de Penetración del Tejido (%)
- RGD: péptido RGD (arginina-glicina-ácido aspártico)
- S_a : Media aritmética de la desviación de la superficie
- SaOS-2: Línea celular ósea procedente de un osteosarcoma
- SBF: Fluido biológico simulado(simulated body fluid)
- SDS: dodecilsulfato sódico
- SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
- S_{ku} : curtosis
- S_{in} : Índice de superficie real/área proyectada
- S_m : Distancia principal entre picos
- S_q : Media de la raíz cuadrada de las desviaciones de la superficie
- S_{sk} : asimetría (skewness)
- S_z : Altura de los diez puntos de una superficie
- SEM: Microscopía Electrónica de Barrido
- TCPS: poliestireno para cultivo celular (Tissue culture polystyrene)
- Solución ACC: 1 % de Na_2HPO_4 en agua destilada.
- Solución ALG: 1 % de Na_2HPO_4 y 1 % de Alginato de Sodio en agua destilada
- TE: Ingeniería de Tejidos
- TEM: Microscopía electrónica de transmisión
- TGF: Factor de crecimiento transformante (Transforming Growth Factor)
- TP: Tamaño de Partícula
- TP Grueso: Tamaño de Partícula Grueso
- TP Fino: Tamaño de Partícula Fino
- Triton-X100: surfactante
- TTCP: Fosfato Tetracálcico ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)
- VHN: Volumen de hueso neoformado(%)
- VMNR: Volumen de material no reabsorbido (%)
- VSI: Interferometría de escaneado vertical
- VTO: Volumen del tejido óseo (%)
- WST-1: Ensayo utilizado para determinar la proliferación celular

Capítulo 1

Introducción

1.1. Marco global de la presente tesis

Las enfermedades del sistema músculo-esquelético cubren aproximadamente un conjunto de unas 200 tipologías, desde las más comunes como el dolor de espalda hasta enfermedades denominadas raras como la esclerodermia [1]. Este tipo de enfermedades o trastornos afectan al menos una vez a lo largo de la vida al ser humano de una forma u otra, incluidos niños. Son causa de dolor crónico y representan la causa más común de incapacidad física y laboral en el mundo desarrollado. La importancia de este tipo de enfermedades se ve reflejada en los siguientes datos [2]:

- Los problemas relacionados con las articulaciones representan más de la mitad de las afecciones crónicas en personas de más de 65 años.
- Los problemas relacionados con la espalda son la segunda causa de baja laboral por enfermedad.
- El número de fracturas relacionadas con osteoporosis se ha duplicado en la última década. Se estima que 40 % del total de mujeres con más de 50 años de edad sufrirá alguna fractura osteoporótica. El número de fracturas de cadera aumentará aproximadamente de 1,7 millones en el año 1990 a 6,3 millones para el año 2050.
- Anualmente mueren en las carreteras del mundo unas 800.000 personas y entre 10 y 15 millones de personas resultan heridas o incapacitadas permanente a causa de estos accidentes. Algunas predicciones sobre los accidentes de carretera, los sitúan en el 2020 como la tercera causa de muerte, sólo por detrás de las enfermedades del corazón y de la depresión [3]. Las lesiones de tráfico asociadas se calcula que representarán para el año 2010 un 25 % de los gastos del sector de la salud en los países en vías de desarrollo.
- Algunas enfermedades del sistema músculo-esquelético dejan lisiados y

provocan deformaciones en muchos niños privándolos de un desarrollo normal.

Algunas cifras relativas al impacto social y económico de la osteoporosis y de la artritis se reflejan en la Tabla 1.1. La evaluación de dicho impacto está hecha en un sentido amplio, no sólo mirando las personas y su calidad de vida sino también como este tipo de enfermedades provoca bajas laborales con la consiguiente pérdida económica directa e indirecta al incrementarse los costes sanitarios y el hecho de que las dolencias de tipo crónico implican que parte de sus miembros activos hayan de jubilarse anticipadamente. Por otro lado, el envejecimiento de la población en los países desarrollados ejerce una gran presión sobre los servicios sociales de los distintos países. En Europa habrá más población por encima de 60 años que por debajo de 20 años en el 2015.

Tabla 1.1: Cifras del impacto social y económico de la osteoporosis y de la artritis en la población de Europa y EE.UU. [3]

Enfermedad	Continente	Población Afectada (millones per.)	Visitas Médicas	Costes Directos (billones \$)	Costes Indirectos (billones \$)
Osteoporosis	Europa	19	128.852	31	7,6
	EE.UU.	10	432000	13,8	4,6
Artritis	Europa	110	25% visitas	45,7	-
	EE.UU.	46	750000	80,80	47

En este sentido, los avances en la prevención de enfermedades y en la búsqueda de soluciones mejores y más definitivas a las dolencias suponen una mejora tanto de la calidad de vida como un importante ahorro económico al conjunto de la sociedad. Existe una gran cantidad de recursos dedicados a la mejora e investigación de los problemas óseos, y es en este marco global descrito arriba en el que se desarrolla esta tesis, en la cual se desarrollan nuevos materiales para la regeneración ósea.

En esta introducción se describirá el tejido óseo y las soluciones actuales empleadas para la sustitución de tejidos duros, poniendo especial énfasis en los materiales cerámicos, así como en las distintas estrategias adoptadas.

1.2. Conceptos generales sobre el hueso

1.2.1. Definición y funciones

El hueso es un tejido conectivo especializado que constituye, junto el cartílago, el sistema esquelético. Las tres funciones principales que ejerce son:

- Función mecánica, donde se constituye como soporte y lugar de inserción de los músculos

- Función protectora, siendo el tejido de protección para los órganos vitales y la médula ósea
- Función metabólica, participando en la homeostasis y ejerciendo de reservorio de iones importantes en la misma, como el calcio y el fósforo

1.2.2. Clasificación de los huesos en función de su estructura macroscópica

El hueso presenta una estructura compleja conformada por una fase mineral, una fase orgánica y agua, en proporciones que pueden cambiar apreciablemente de un hueso a otro. Esta combinación de fases brinda al hueso tanto dureza como elasticidad. Existen diversas maneras de clasificar los huesos: desde un punto de vista histológico o desde un punto de vista anatómico.

Al examinar la sección de cualquier hueso, ésta parece compuesta de dos tipos de tejido distintos. Uno es denso en su textura y se denomina hueso cortical o compacto. El otro consiste en finas fibras y laminillas que se unen formando una estructura reticulada denominado hueso trabecular o esponjoso [4].

El hueso cortical se encuentra siempre situado en el exterior de los huesos, mientras que el hueso trabecular en su interior. La relativa cantidad de ambos tipos de tejido varía en función del tipo de hueso y en diferentes partes del mismo hueso, según si la fuerza o la ligereza son el requisito principal.

Una observación más detallada del hueso cortical, muestra que este tejido es realmente poroso, por lo que la diferencia entre el hueso cortical y el hueso trabecular depende solamente de la cantidad de materia sólida, y del tamaño y del número de espacios en cada uno. Las cavidades o huecos son pequeñas en el hueso cortical y la cantidad de materia abundante, mientras que en el hueso esponjoso los espacios son grandes y la materia sólida está presente en menor proporción.

Las principales funciones del hueso cortical son mecánicas y de protección. Está calcificado en un 80-90 % de su volumen y representa el 75 % de la masa esquelética total [5]. La sustancia mineralizada se deposita en forma de capas o laminillas (ver Figuras 1.1 y 1.2). Las fibras de colágeno están muy ordenadas de forma que en cada laminilla todas las fibras de colágeno son paralelas, pero su orientación cambia de una laminilla a la siguiente. Las cavidades lenticulares, llamadas lagunas, que se observan en las imágenes citadas anteriormente están repartidas de forma más o menos regular y albergan cada una un osteocito. De cada laguna surgen canalículos en todas direcciones atravesando las laminillas llegándose a unir con los canalículos de las lagunas vecinas. Estos canalículos permiten la difusión y el intercambio de metabolitos.



Figura 1.1: Estructura del Hueso Compacto [5, 6]

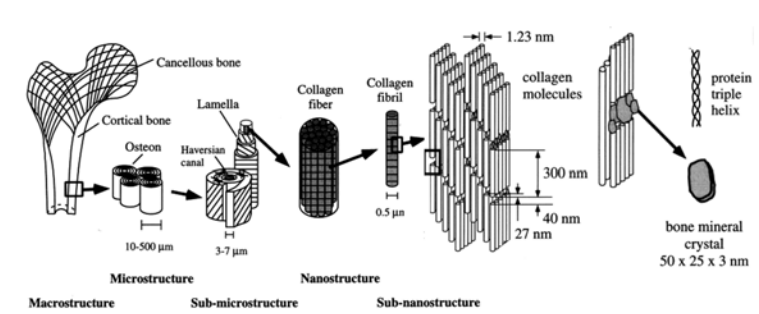


Figura 1.2: Estructura jerárquica del hueso desde la macroestructura del hueso compacto hasta la microestructura de las fibras de colágeno y cristales de apatita. A pesar que la macroestructura del hueso esponjoso difiere, la estructura de las fibras de colágeno es similar [7]

Las laminillas se disponen de tres formas distintas. La gran mayoría están dispuestas concéntricamente alrededor de un canal vascular del interior del hueso, formando unidades estructurales cilíndricas llamadas sistemas haversianos u osteonas. Entre estos sistemas haversianos, hay fragmentos de hueso laminar de forma y tamaño irregular son los sistemas intersticiales que corresponden a restos de antiguas osteonas. Como consecuencia de la continua reabsorción y deposición de hueso, las osteonas más jóvenes que están en crecimiento fagocitan a las más viejas adyacentes, menos activas. Algunos sistemas de Havers pueden llegar a perder su estructura y aparecen laminillas que no rodean a un canal central. Ambos sistemas están separados por unas líneas nítidamente marcadas llamadas líneas de cemento, compuestas principalmente por sustancia básica calcificada y una cantidad escasa de fibras de colágeno. En la superficie externa del hueso cortical, inmediatamente por debajo del periosteo y sobre su superficie interna, por debajo del endósteo, se encuentran las laminillas circunferenciales externas e internas. Son simi-

lares a los sistemas intersticiales pero ocupan zonas limitantes del hueso. Su origen se debe a la actividad osteogénica del periosteo y endósteo.

En el hueso compacto se distinguen dos tipos de conductos que contienen vasos y nervios para nutrir a los osteocitos. Los canales de Havers son longitudinales (con un diámetro de 20 a 40 μm), contienen uno o dos vasos sanguíneos y pasan por el centro de los sistemas Haversianos y nutren a los osteocitos de la osteona. Los conductos de Volkmann son canales transversales u oblicuos comunicando los canales Haversianos entre sí y también con la cavidad medular. Los vasos sanguíneos comunican desde el endósteo, y en menor medida desde el periosteo con los sistemas Haversianos a través de los canales de Volkmann.

El hueso trabecular es el otro tipo histológico de hueso y está constituido por una red delgada de trabéculas (ver Figura 1.3). Aporta una cuarta parte de la masa esquelética total, pero dos tercios de su superficie. La principal función del hueso trabecular es metabólica. También tiene laminillas con lagunas ocupadas por osteocitos. La diferencia reside en que, al ser delgadas las trabéculas óseas, los vasos no penetran en ellas y no hay verdaderos sistemas de Havers. Los osteocitos se nutren de los vasos próximos del conjuntivo hematopoyético a través de canaliculos.

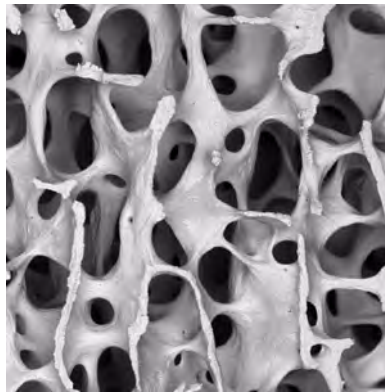


Figura 1.3: Estructura del Hueso Esponjoso [6]

1.2.3. Clasificación de los huesos en función de su anatomía

Después de la distinción anterior se puede realizar una segunda clasificación de los huesos en función de su forma (Ver Figura 1.4). En la mayoría de los vertebrados se distinguen tres tipos de hueso :

- Huesos largos: Tienen ambos extremos, denominados epífisis, con formas variables y una zona central, diáfisis, de forma cilíndrica. La transición entre las dos se denomina metáfisis y es de forma cónica. Las epífisis están constituidas por una fina capa de hueso cortical, siendo el

interior hueso trabecular con médula ósea roja. La diáfisis consiste en una gruesa capa de hueso cortical en cuyo interior hay inicialmente hueso esponjoso que desaparece con la remodelación, durante el desarrollo del hueso, quedando tejido adiposo que constituye la médula amarilla o tuétano del hueso. Un ejemplo típico: los huesos principales de las extremidades como el fémur.

- Huesos planos: Formados por dos finas capas de hueso compacto entre las que se encuentra una capa de hueso esponjoso en una estructura tipo sandwich. Se caracterizan por la ausencia de epífisis o de diáfisis. Ejemplos de huesos planos: costillas, cráneo, esternón y escápula.
- Huesos cortos y huesos irregulares: La capa externa o cortical es de hueso compacto que rodea una zona central compuesta por hueso trabecular o esponjoso en una estructura similar a la epífisis en los huesos largos. Ejemplos de huesos cortos: tarso y carpo. Ejemplos de huesos irregulares: vértebras y cara.

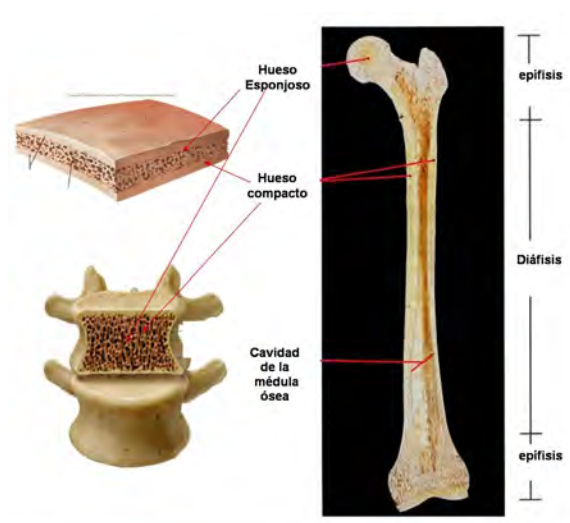


Figura 1.4: Diferentes tipos de hueso y su estructura interna. Arriba Izquierda: Estructura interna de un hueso plano mostrando la estructura en sandwich. Abajo Izquierda: Estructura interna de una vértebra mostrando el interior esponjoso rodeado de hueso compacto. Derecha: Estructura del fémur mostrando las distintas partes así como su estructura interna. Imagen derecha [8].

1.2.4. Histología del Hueso

El hueso es una estructura compleja a nivel microscópico. Las células se encuentran en una matriz ósea. Dicha matriz está compuesta por una matriz orgánica en la cual se encuentra embebida la fase mineral formada

por cristales de apatita. Las proporciones de las distintas fase pueden variar apreciablemente de una hueso a otro. La combinación de ambas fases es la que brinda al hueso sus especiales propiedades mecánicas de dureza y elasticidad en una estructura relativamente ligera.

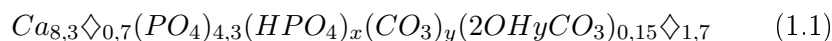
■ **Matriz Orgánica**

La matriz orgánica constituye el 35 % en peso del hueso y consiste principalmente en un 90 % de fibras de colágeno y otras proteínas no-colagénicas. El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo. Tal como se observa en la Figura 1.2 las fibras de colágeno se componen de sub-unidades denominadas tropocolágeno de 300 nm de longitud y 1,5 nm en diámetro. A su vez, el tropocolágeno está formado por tres hélices levóginas de polipéptidos. La composición de estas hélices es una secuencia con la fórmula Glicina-X-Y, donde X e Y son principalmente prolina e hidroxiprolina respectivamente [9]. El tropocolágeno se ensambla según un patrón organizado en el interior de la matriz orgánica y regula los sitios de nucleación de la fase mineral del hueso tal como refleja la imagen.

Las proteínas no-colagénicas tienen un papel muy importante en la remodelación ósea, en la osteogénesis e incluyen: factores de crecimiento, citoquinas, osteonectina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína, ácido hialurónico, trombospontina, proteoglicanos, fosfolípidos y fosfoproteínas. En la Tabla 1.2 se describe la principal función de algunas de ellas.

■ **Matriz inorgánica**

La fase mineral está constituida principalmente por cristales de apatita deficiente en calcio carbonatada integrados en la matriz de fibras de colágeno del hueso. Los cristales de apatita tienen forma de placa, con un tamaño que varía entre 30-50 nm de longitud por 15-30 nm de ancho y un espesor de 3-5 nm [9]. La composición química de la apatita puede ser representada aproximadamente por la siguiente fórmula [10]:



donde $x+y=1,7$ y \diamond representa una vacante. La cantidad de $(HPO_4)^{2-}$ y CO_3^{2-} puede variar considerablemente, sin embargo la suma de iones divalentes es constante en la mayoría de los tejidos óseos. Al ser su composición no estequiométrica incorpora en su estructura iones de Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- o F^- . La composición de la apatita puede variar de un tejido calcificado a otro y según la edad del individuo. La relación Ca/P varía entre 1,54 y 1,73 [10]. También muestra gran afinidad por metales pesados y ciertos contaminantes radioactivos.

La apatita biológica tiene dominios cristalinos muy pequeños presentando anchos picos en difracción de rayos-X en comparación con la hidroxiapatita estequiométrica. El tamaño pequeño de los cristales y/o la falta de estequiometría confiere a las apatitas biológicas la solubilidad necesaria para su reabsorción por parte de los osteoclastos, en comparación con las hidroxiapatitas estequiométricas cuya reabsorción en condiciones fisiológicas es muy lenta.

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del hueso. Las fibras colágenas le proporcionan flexibilidad y resistencia a la tensión mientras que las sales minerales le confieren dureza, rigidez y resistencia a la compresión.

Así, si el hueso se descalcifica conserva su forma original volviéndose tan flexible que puede ser doblado como una pieza de caucho. Si se extrae el componente orgánico del hueso, el esqueleto mineralizado conservará su forma original y cierta resistencia mecánica en compresión pero se volverá muy frágil fracturándose con facilidad.

Tabla 1.2: Proteínas y factores que regulan el metabolismo celular óseo [11, 12]

Proteína/Factor	Función
Osteopontina	Unión celular, regulación de la mineralización
Sialoproteína	Unión celular, iniciación de la mineralización
Osteonectina	Unión al Ca, interacción fase mineral-colágeno, regulación de la forma de la célula, regulación de la migración celular
Tetranectina	Regulación de la deposición mineral
Trombospondina	Modulación del metabolismo celular, unión al colágeno
Osteocalcina	Regulación de la maduración mineral
Fibromodulina	Interactúa con el colágeno del tipo I y II, unión a factores e crecimiento
Osteoglicanos	Unión a TGF- β
Trombomodulina	Interactúa con el colágeno del tipo I y II, unión a factores e crecimiento
Fibrilina	Anclaje de fibras de elastina
Vitronectina	adhesión celular
Tenacina	Diferenciación temprana de la mesenquima
Fibronectina	Interacción matriz-célula
Prostaglandina	Reabsorción
TGF α y β	Diferenciación y síntesis de proteínas
BMP 2-7	Diferenciación y Maduración
Calcitonina	Formación y reabsorción
Vitamina A	Diferenciación
Vitamina D	Diferenciación, reabsorción, síntesis de proteínas
Albúmina	Trasporte de proteínas, inhibición del crecimiento de la apatita

1.2.5. Fisiología del Hueso

En general, el tejido óseo tiene la capacidad de regenerarse y restablecer la continuidad de una zona dañada, sin presencia de una cicatriz de tejido fibroso a diferencia de otros tejidos. El tejido óseo está sujeto a una continua evolución, siendo reestructurado considerablemente por las células que conforman el tejido óseo para satisfacer adecuadamente las funciones de soporte específicas de dicha zona si es necesario. Los principales tipos de células que conforman el tejido óseo son los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. En la Figura 1.5 se puede observar la procedencia y evolución de las distintas líneas celulares presentes en el hueso.

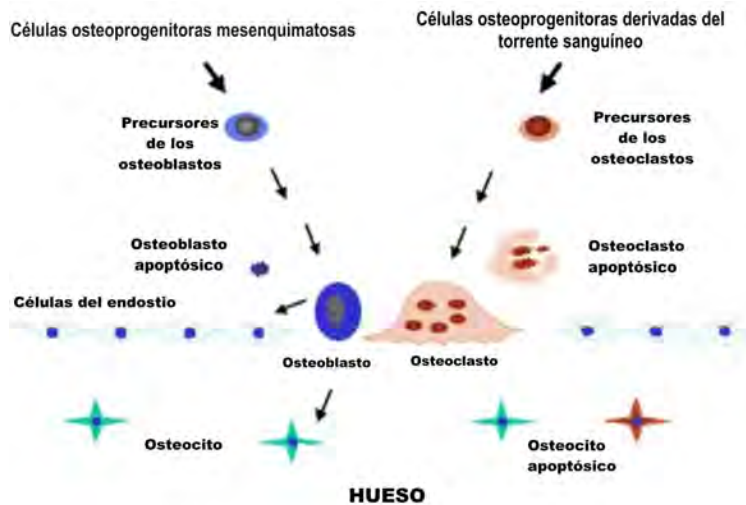


Figura 1.5: Procedencia de las distintas líneas celulares presentes en el hueso y descripción de su proceso de evolución [13].

- **Osteoblastos:** son las células responsables de la síntesis de los componentes de la matriz ósea así como de distintos factores autocrinos y paracrinos. Los osteoblastos se encuentran en las superficies óseas (endósteo y periosteo) y en las áreas de crecimiento, remodelación o desarrollo del hueso. Los osteoblastos derivan de células progenitoras de origen mesenquimal (MSC) que también pueden dar lugar a fibroblastos, condrocitos, mioblastos y adipocitos.

Las células osteoblásticas producen colágeno de tipo I, osteocalcina y sialoproteína, además de proteínas constitutivas de la matriz extracelular ósea, siendo sensibles a los efectos de las hormonas paratiroides y prostaglandinas, pero no para la calcitonina.

Se hallan en contacto directo con las superficies óseas en crecimiento formando grupos compactos de una sola capa de espesor. Morfológicamente son células grandes con forma redonda a poligonal, citoplasma

basófilo y ricas en una isoenzima específica de la fosfatasa alcalina. De manera característica, el núcleo de estas células se sitúa en el extremo opuesto a la superficie ósea sobre la que asientan. Su alta capacidad de síntesis proteica se observa por la presencia de un retículo endoplasmático bien desarrollado, uniforme y granular, característico de las células que sintetizan proteínas.

Los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estados funcionales:

- Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea, que en conjunto se denomina osteoide.
- Maduración de la matriz ósea (cambios en la composición y organización de la matriz que la hacen competente para ser mineralizada).
- Depósito de mineral: esta fase supone la mineralización del osteoide. Para ello, se van a emplear los iones de calcio almacenados en los osteoblastos.

Cuando cesa la neoformación ósea, los osteoblastos pueden quedar englobados en la matriz osteoide, pasando a convertirse en osteocitos, adquiriendo una morfología estrellada. O bien permanecer en las superficies óseas, una vez finalizan la síntesis de matriz. En este caso adquieren una morfología aplanada, pasando a ser osteoblastos inactivos o células del revestimiento (células del endósteo o "lining cells"). Estas células, a través de la producción de factores locales, parecen desarrollar un importante papel en el control del remodelado óseo.

- **Osteocitos:** son las células principales del hueso completamente formado, residen en las lagunas situadas en la matriz ósea calcificada. Presentan un aspecto fusiforme y se hallan en contacto entre sí y con las células de la superficie (células de revestimiento, osteoblastos) mediante finas prolongaciones tubulares de su citoplasma que recorren la matriz ósea en diversas direcciones. A través de estas uniones comunicantes o de intersticio se produce el paso directo de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles (aminoácidos, azúcares, nucleótidos y vitaminas) de una célula a otra célula, posibilitando la comunicación química y eléctrica.

Estas células se caracterizan por tener una relación núcleo/citoplasma mucho mayor que los osteoblastos, es decir, contienen menos orgánulos que los osteoblastos. Son células con una menor actividad metabólica en la síntesis de proteínas, pero no son células inactivas. Presentan una población estable. Están orientados uniformemente en el hueso con respecto a los ejes longitudinal y radial de las laminillas que lo conforman. No se dividen y tienen un papel muy importante en la preservación de la matriz ósea y en la regulación del remodelado óseo

en respuesta a las señales mecánicas. Se cree que los osteocitos son capaces de detectar las microlesiones (daño por fatiga) en la estructura ósea y de desencadenar un ciclo de remodelado que reemplaza el hueso dañado por hueso nuevo mecánicamente más competente.

- **Osteoclastos:** son las células encargadas de la reabsorción ósea. Son células móviles, redondeadas, multinucleadas (hasta 20 núcleos) y con un citoplasma acidófilo. Debido a su gran especialización han perdido su capacidad de división. Al igual que los osteoblastos, los osteoclastos activos muestran una evidente polaridad, en las que los núcleos se sitúan en la superficie externa de la célula de perfil liso, mientras que la membrana celular en contacto con el hueso muestra una estructura plegada, denominada borde en cepillo o rizado, con un anillo de sellado que circunda toda el área de contacto del osteoclasto con la superficie ósea.

Estas células se observan adosadas a la superficie de reabsorción ósea en unas cavidades poco profundas, llamadas lagunas de Howship o bahías de reabsorción, que se producen por la degradación del hueso por parte de los osteoclastos presentes en las lagunas adyacentes. Colaboran en la reabsorción ósea y poseen los mecanismos necesarios para la destrucción ósea mediante la disolución del hueso calcificado bajando localmente el pH mediante la producción de protones. El pH bajo incrementa la disolución de los cristales de apatita. Una vez eliminada la fase mineral, la fase orgánica es digerida. Además, en el proceso de degradación del tejido óseo, los osteoclastos son capaces de fagocitar los restos de osteocitos, colágeno y mineral.

Los osteoclastos se derivan de células pluripotenciales de la médula ósea, las cuales son precursoras hematopoyéticas que también dan origen a los monocitos y macrófagos. La capacidad de reabsorción ósea y la expresión de ciertos marcadores superficiales celulares (receptor de la calcitonina...), así como la síntesis de la enzima fosfatasa ácida, son las principales características que los diferencian de los macrófagos.

1.2.6. Propiedades mecánicas del hueso

Dada la amplia gama de movimientos del cuerpo, los huesos pueden estar sometidos a diversos tipos de fuerza, ya sea de compresión, tracción o cizalladura. El hueso cortical es el responsable de resistir la mayor parte de la carga a la que se ven sometidos los huesos, y trabaja tanto a compresión, a tracción como a cizalladura. El hueso trabecular, que tiene entre otras características la de proporcionar ligereza a los huesos sin detrimento de su solidez, trabaja fundamentalmente a compresión.

Así las propiedades mecánicas del hueso han sido objeto de numerosos estudios. Los huesos pueden ser analizados de distintas formas, por ejemplo

analizando el hueso en su totalidad o analizando sus componentes macroscópicos, es decir el hueso cortical y el hueso trabecular. Debido al tamaño de ciertos huesos sólo se pueden analizar en su totalidad mientras que en otros casos como el del fémur se pueden analizar también sus componentes por separado. Los huesos han sido analizados mediante ensayos tradicionales de sus propiedades mecánicas: compresión y tensión uniaxial, flexión tres o cuatro puntos. También han sido analizados mediante técnicas de ultrasonidos y mediante micro o nanoindentaciones.

Factores que influyen en las propiedades mecánicas del hueso son la localización concreta del hueso, la edad del especimen o si éste sufría algún tipo de enfermedad. Los valores registrados en los ensayos mecánicos vienen influidos por las condiciones experimentales, tales como temperatura, grado de humedad o si ha sido congelado para su conservación entre otras. En la Tabla 1.3 se muestran valores indicativos encontrados en la literatura [14].

Tabla 1.3: Propiedades mecánicas del hueso [14]

Tipo de Carga		Resistencia Máxima (MPa)	Módulo de Young (GPa)
Hueso Cortical			
Compresión	Longitudinal	131-224	17-20
	Transversal	106-133	6-13
Tracción	Longitudinal	79-151	17-20
	Transversal	51-56	6-13
Torsión		53-80	3,3
Hueso Trabecular			
Compresión		3-20	0,2-5
Tracción		1,5-5,0	0,1-3
Torsión		6,6	-

Las propiedades mecánicas de los huesos, formados fundamentalmente por tejido cortical, dependen de la dirección de aplicación de la carga. Los huesos largos son materiales ortotrópicos. En el plano transversal al eje longitudinal las propiedades elásticas son inferiores que en el eje longitudinal, dirección paralela al eje de las osteonas. La resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica de manera vertical al eje del longitudinal, mientras que cuando la fuerza actúa de forma oblicua el hueso la resistencia disminuye.

En los huesos constituidos por tejido esponjoso, la resistencia es mayor cuando la fuerza se aplica en la dirección principal de las trabéculas óseas. Los valores de la resistencia y del módulo de elasticidad dependen también en gran medida de la densidad aparente del mismo, que puede oscilar entre 0,1 y 1 g/cm³. La medida de las propiedades mecánicas del hueso trabecular es más compleja que en el caso del hueso cortical, debido al pequeño tamaño

de las trabéculas y a la poca cantidad presente en ciertos huesos.

En general el hueso es un material viscoelástico, es decir, sus propiedades mecánicas son dependientes de la velocidad de aplicación de la carga. Este comportamiento se evidencia en la dependencia del módulo elástico de la velocidad de deformación, observándose un comportamiento más rígido y resistente en el hueso a medida que la velocidad de deformación aumenta. El comportamiento a fatiga de los huesos también ha sido objeto de estudio y algunos resultados sugieren que la vida a fatiga depende en gran medida de la amplitud de la deformación, y que en la actividad normal el hueso acumula daño por fatiga constantemente. Es por este motivo que en el organismo se produce un proceso de remodelación ósea para mantener la integridad del sistema esquelético [14, 15].

1.3. Remodelación y reparación ósea

1.3.1. Remodelación ósea

La complejidad de la estructura ósea influye en el tipo de mecanismos que se ponen en marcha cuando el hueso sufre daño. Así los procesos de reparación y regeneración ósea dependerán si el daño se ha producido en el hueso trabecular o en el hueso cortical, si se ha producido en un hueso corto o un hueso largo, así como de la gravedad del daño.

El remodelado óseo es el proceso continuo por el cual la matriz ósea lamelar vieja es reemplazada por una nueva matriz, con un pequeño o ningún cambio neto en la cantidad de masa ósea o en la forma del hueso.

El remodelado óseo cumple dos funciones principales: la renovación del esqueleto de forma continua y los procesos de homeostasis. Los procesos de renovación tienen como principal objetivo evitar la pérdida de propiedades mecánicas ya sea bien por efecto del desgaste y de la fatiga, reparando principalmente la microfracturas que se producen en el día a día, así como de los procesos de adaptación de la estructura ósea a nuevas cargas, según la ley de Wolff [16]. De forma general, el 8% del tejido óseo es renovado anualmente en los adultos. Los procesos de homeostasis mineral responden a la función del esqueleto de reservorio de iones (Ca, P entre otros), por lo que el hueso es reabsorbido o creado en función de las necesidades de iones del organismo.

El remodelado óseo se lleva a cabo por la acción concertada de grupos de células óseas, llamadas unidades de remodelado óseo (Bone Remodelling Unit:BRUs) o unidades multicelulares básicas (Basic Multicellular Unit: BMUs), situadas en las superficies del hueso. El tejido óseo neoformado después de cada acción es llamado unidad estructural ósea (Bone Structural Unit: BSU).

La sustitución ósea ocurre de forma continua, pero no afecta a la estructura ósea debido a que el remodelado óseo se lleva a cabo mediante la acción sucesiva (acoplamiento) de osteoclastos y osteoblastos sobre una misma

superficie ósea. Cada ciclo de remodelado consta de cuatro fases: activación, reabsorción, inversión y formación, tal como queda reflejado esquemáticamente en la Figura 1.6.

- La fase *activación* implica el reclutamiento de precursores de osteoclastos, retracción de células óseas del revestimiento (lining cells) y fusión de células precursoras para la formación de osteoclastos maduros. La activación de los osteoclastos se cree que está influenciada por las células del revestimiento óseo o "lining cells" (células de linaje osteoblástico), que estimuladas por factores relacionados con la reabsorción digieren una fina capa de matriz no mineralizada presente en las superficies óseas permitiendo el acceso a los osteoclastos. Los factores concretos que determinan la localización del remodelado en una zona determinada no son conocidos, por ejemplo en los procesos de homeostasis. Sin embargo, la presencia de cambios en las propiedades mecánicas se cree que produce señales locales, bien sea a través de liberación de productos de la matriz ósea o a través de la comunicación con los osteocitos.
- En la fase *reabsorción*, un grupo de osteoclastos se diferencia a partir de sus precursores. Las células osteoclásticas se unen a la superficie del hueso a través de la integrinas creando una zona sellada, donde al acidificar el pH se disuelve primero la fase mineral y posteriormente producen enzimas que digieren la matriz orgánica y erosiona la superficie ósea dando lugar a las lagunas de Howship, que se visualizan como sacabocados. Una vez finalizada la reabsorción, los osteoclastos son eliminados por apoptosis.
- La fase de *inversiones* un período de aparente inactividad. Células liberadas de la matriz ósea (osteocitos) o células mononucleares alisan la superficie de reabsorción y la recubren con una sustancia cementante, pobre en colágeno y menos mineralizada que el hueso pero con una relación Ca/P mayor que la apatita que sirve como zona de cohesión entre el hueso viejo y el nuevo.
- La fase de *formación*, un grupo de osteoblastos se diferencia a partir de sus precursores y rellena con matriz ósea. Este proceso consta de dos partes o estadios. Primeramente se produce la secreción de elementos que conforman el tejido osteoide, como colágeno tipo I, y en menor proporción proteoglicanos, carbohidratos, lípidos y proteínas no colagénicas como la BGP, osteocalcina y ostectina. Esta capa se denomina ribete de osteoide y tiene un espesor aproximada de 10 μm . Posteriormente se producen cambios físico-químicos en la misma que la preparan para la mineralización. Una vez finalizada esta fase, los osteoblastos cambian su morfología allanándose y transformándose en las células de revestimiento.

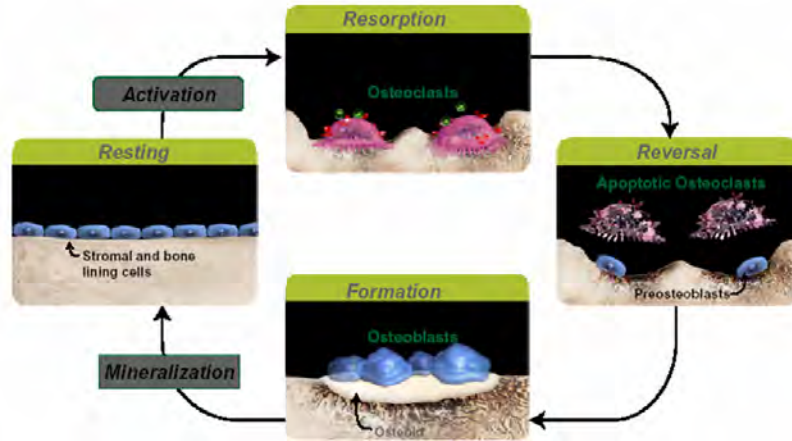


Figura 1.6: Esquema de la remodelación ósea con la presencia de las distintas fases: Activación, reabsorción, inversión y formación. [5]

1.3.2. Reparación de una fractura ósea

El caso de una fractura ósea puede ser similar al caso de la colocación de un implante, aunque hay autores que divergen sobre este punto. Algunos aducen que la presencia de un implante influencia la composición de los factores de crecimiento locales. Un aspecto que diferencia los procesos de remodelación ósea de los procesos de fractura es la discontinuidad en el tejido óseo en el lugar de la fractura, esta discontinuidad también estará presente en el caso de un implante. En ambos casos, los vasos sanguíneos son dañados y se produce una hemorragia. La curación en estos casos es un proceso muy complejo que incluye una multitud de eventos celulares y extracelulares. El proceso de curación se ve influenciado como se ha comentado antes, por el tipo de hueso (cortical o trabecular), la localización de la fractura o del implante, el grado de daño infligido, el grado de fijación, la edad. En los mamíferos la reconstitución completa del estado pre-dañado es un hecho único para el caso del hueso, ya que el resto de tejidos se curan siempre dejando una cicatriz como señal [17].

Como se ha mencionado previamente los vasos sanguíneos se dañan en una fractura, esta es la primera fase de la reparación. La hemorragia o hemostasis que se produce, resulta en la formación de un coágulo de sangre o hematoma, formado principalmente por fibrina. El coágulo por lo general permanece sólo unos cuantos días pero puede llegar hasta las dos semanas. Junto a la formación del coágulo se producen también otros dos fenómenos. En el lugar del hematoma, primero tiene lugar una vasoconstricción de los vasos dañados limitando la cantidad de sangre que llega al lugar de la fractura. Posteriormente se produce una retracción del coágulo de fibrina, ejercida por la activación de las plaquetas presentes en el hematoma. Esto provoca

la condensación del tapón hemostático y reduce el tamaño del hematoma en el lugar de la fractura.

En presencia de un implante hay tres factores que pueden ser de vital importancia. Primero, la interacción biológica que se produce con la superficie del implante a través de las proteínas y otras macromoléculas que son las primeras en llegar a la superficie del implante. El grado o la calidad de la interacción de las proteínas con la superficie del implante condicionará el comportamiento celular debido a que las células interactúan a través de dicha capa de proteínas con la superficie del implante. Segundo, la degradación de las plaquetas tiene como consecuencia la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que estimulan la regeneración de la fractura. En tercer lugar, la topografía y rugosidad de los implantes se ha demostrado que influyen en el número y grado de activación de las plaquetas así como en la aglomeración de glóbulos rojos.

La necrosis celular que tiene lugar en los alrededores de la fractura y del hematoma es consecuencia de la vasoconstricción. Es un proceso celular complejo con múltiples factores de señalización, mitógenos, etc... y es el paso previo a la eliminación del coágulo por parte de los leucocitos. Al mismo tiempo la circulación sanguínea se distribuye hacia los vasos sanguíneos no dañados y se produce una remodelación del conjunto de vasos sanguíneos en la zona afectada. Inicialmente, el tipo de leucocitos más numeroso presente en la zona afectada son los neutrófilos, posteriormente son desplazados por los macrófagos. El coágulo y el tejido necrosado son eliminados mediante procesos de fagocitosis tanto extracelulares como intracelulares. El hecho de que los macrófagos puedan llegar a la superficie de los implantes puede tener gran importancia en el tipo de interacción que se desarrolla en la superficie del implante [18].

El siguiente paso es la formación de un tejido granuloso, que debe su apariencia principalmente a la gran cantidad de vasos sanguíneos que se forman en la zona y dura unas tres semanas. Los macrófagos presentes en la zona del coágulo, los metabolitos y otras sustancias de degradación son eliminadas de la zona a través de los vasos neoformados. La demanda de oxígeno en la zona central del hematoma supera en estos casos el suministro, debido a que esta zona todavía está pobremente irrigada. Este hecho provoca el aumento de lactato en la zona, que junto a los ácidos y las enzimas lisosomales liberadas durante la fagocitosis de las células necrosadas, actúan como señal quimotáctica para las células endoteliales y mesenquimales, favoreciendo los procesos de angiogénesis.

La angiogénesis se inicia predominantemente en las venulas postcapilares. Las células endoteliales degradan la membrana basal, migran y proliferan formando capilares vacíos. Estos nuevos vasos son formados en la dirección del gradiente quimotáctico, aunque ello no implica que se puedan ir cerrando entre ellos a medida que se forman. Los fibroblastos presentes en la zona producen la matriz reticular que provee el soporte mecánico al nuevo sistema

vascular que se desarrolla en la zona. La población de macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y células pluripotenciales hace que el hematoma inicial desaparezca formándose un tejido fibroso vascularizado necesario para que la formación de hueso pueda tener lugar.

Las células con potencial osteogénicos son reclutadas y migran una vez formado el tejido fibroso. Este proceso se conoce como osteoconducción. Este hecho es muy importante ya que la migración de células conlleva la contracción de la herida y de la matriz extracelular debido a la fuerza que ejercen las propias células durante su desplazamiento. Dicha matriz está unida también a la superficie del implante. En el caso de que ésta se despegara de la superficie del implante, podría comprometer el proceso de curación [19]. Las características superficiales del implante han mostrado influenciar la fuerza con que la matriz de fibrina se adhiere, favoreciendo en ciertos casos una mejor osteointegración [20, 21]. Una superficie rugosa ha mostrado favorecer dicha fuerza de adhesión, ciertos autores especulan que simula al entorno que dejan los osteoclastos después de resorber la matriz ósea.

La formación de hueso, no pasa sólo por el reclutamiento de células con potencial osteogénico, sino también por la diferenciación de éstas en células maduras que segreguen la matriz ósea. Este proceso se realiza en etapas sucesivas partiendo desde la superficie de hueso viejo. Las células constituyen un frente de avance hacia la superficie sólida, sea del hueso viejo o del implante, se diferencian y empiezan a sintetizar matriz extracelular. Estas células diferenciadas sintetizan la matriz ósea y dejan de migrar formando lo que se llama un nódulo de mineralización. Una nueva población de células inmaduras con potencial osteogénico comienza el ciclo de migración y avance, diferenciación y síntesis de matriz ósea. Así sucesivamente hasta llegar a la superficie sólida. Las células diferenciadas o bien se desplazan hacia la superficie debido a la deposición de la matriz ósea o bien quedan atrapadas en la misma convirtiéndose en osteocitos.

Finalmente se inicia el proceso de mineralización a partir de las proteínas adsorbidas en la superficie sólida (hueso viejo o implante), el cual es continuado por el crecimiento de cristales de fosfato de calcio, y el ensamble de las capas de matriz colagínosa con las mineralizadas dando como resultado el hueso nuevo.

1.4. Técnicas de Regeneración Ósea

Anteriormente se han citado brevemente los mecanismos y las etapas mediante las cuales el hueso se remodela o se repara en el caso de una fractura. Sin embargo, no siempre el organismo es capaz de regenerar el tejido dañado, debido a la extensión del daño. A veces implica un largo periodo de recuperación. Es en estos casos cuando se requiere la utilización de un biomaterial. Anteriormente se ha mencionado que los procesos de regeneración

ósea son similares en el caso de la colocación de un implante, pero el éxito de un implante dependerá de las características del mismo.

Las técnicas usadas para la reparación ósea dependen en gran manera del tipo de daño a reparar y pueden abarcar desde injertos de origen animal, humano o materiales sintéticos (polímeros y cerámicas principalmente). La situación ideal sería la remodelación total de defecto con la desaparición del biomaterial y la recuperación óptima de las propiedades mecánicas locales, como puede suceder en los casos de trasplante de hueso trabecular. Sin embargo en muchos casos, el material implantado o parte del mismo permanece ocluido en el nuevo hueso formado, con lo cual no se consigue una recuperación óptima de las propiedades mecánicas del tejido.

En el caso de las fracturas se puede requerir el uso de dispositivos de fijación elaborados a partir de materiales con prestaciones mecánicas capaces de soportar las cargas durante el periodo de regeneración y consolidación del hueso.

La velocidad de cada etapa de la regeneración puede depender de las características propias del implante, así un implante de un material determinado, si es poroso puede facilitar el proceso de vascularización, lo que permite que las células colonicen el implante más rápidamente acelerando la reconstrucción del defecto.

Entre las técnicas usadas para la reparación ósea se encuentran:

- Autoinjertos : es la técnica más utilizada cuando se necesita un sustituto óseo. Se emplea en más del 50 % de los casos y consiste en la extracción de tejido óseo de una parte del esqueleto del propio paciente y su trasplante a la zona dañada. Este método tiene la ventaja de que al ser el tejido del propio paciente no se producen problemas de rechazo y no hay reacciones inmunológicas. Además, el tejido trasplantado contiene todos los elementos necesarios para una buena respuesta del organismo, una matriz osteoconductiva (que tiene la capacidad de guiar el crecimiento del tejido óseo), factores de crecimiento osteoinductivos (que inducen la diferenciación de las células pluripotenciales en células óseas) y la presencia de células osteoprogenitoras.

Esta técnica tiene el inconveniente de que sólo se puede extraer del propio organismo una cantidad muy reducida de tejido, además de que se requiere de otra intervención quirúrgica con riesgo de trauma, infección y dolor, y que hace más lenta la recuperación del paciente [22, 23].

- Aloinjertos: esta técnica consiste en la utilización tejidos u órganos provenientes de individuos de la misma especie. Para la obtención de un aloinjerto óseo, se extrae el tejido óseo de cadáveres que tras someterse a una serie de controles y procesos, se trasplanta al paciente. Este tipo de injertos puede producir reacciones de rechazo inmunológico. En la mayoría de los casos la substitución de fragmentos de hueso por tejidos ajenos al individuo conduce a una mala unión y la tasa de formación de hueso no es tan buena como en el caso de los autoinjertos. Además el uso de este tipo de injertos puede ser perjudicial debido a la posible transmisión de

enfermedades [24], a pesar de las mejoras realizadas en los últimos años en las técnicas de esterilización. La disponibilidad de un donante continúa siendo un gran obstáculo para esta técnica [23].

- Xenoinjerto: consiste en la utilización de tejidos provenientes de individuos de otra especie. Un ejemplo sería el uso de hueso de origen bovino. Esta técnica permite obtener mayores cantidades de tejido óseo, con una estructura determinada, lo cual es un factor importante para el crecimiento óseo. Esta técnica presenta, no obstante, riesgos como la posibilidad de transmitir enfermedades infecciosas.

- Materiales Sintéticos: los problemas que generan los autoinjertos en cantidad de tejido del propio donante, o la necesidad de una segunda operación, los aloinjertos en cantidad de tejido o problemas de rechazo inmunológico, esto último al igual que los xenoinjertos, han hecho que sea necesaria la búsqueda de materiales sintéticos para poder ser utilizados en los problemas de reparación ósea. En este sentido se han desarrollado materiales de diversos tipos que pretenden alcanzar una buena respuesta biológica y/o mantener la funcionalidad en el sitio implantado.

1.5. Materiales para la regeneración ósea

1.5.1. Ingeniería de tejidos

En la década de los 60 y 70, el principal objetivo para escoger un biomaterial era conseguir unas propiedades físicas adecuadas con una respuesta tóxica mínima. Se buscaba que los materiales fueran lo más inerte posible. En la década de los 80, se empezaron a introducir la denominada segunda generación de biomateriales. El objetivo no era sólo conseguir que la respuesta fuera lo menos tóxica sino una interacción controlada con el organismo. Este tipo de materiales suponía un avance respecto a la biocompatibilidad. Dentro de este grupo de materiales se pueden encontrar los materiales bioactivos. Materiales que producían una respuesta en el organismo llegando a formar una unión directa con el mismo. Otro grupo de materiales de segunda generación, era los materiales reabsorbibles. Este grupo de materiales se degradaba *in vivo* una vez cumplida su función [25].

La tendencia actual en el mundo de los biomateriales es la búsqueda de lo que se ha denominado como biomateriales de tercera generación: aunar los conceptos de bioactividad y reabsorción en un sólo biomaterial y además se pretende que provoquen respuestas celulares específicas a nivel molecular. Las nuevas exigencias con las cuales se diseñan estos biomateriales, hace que la investigación en este área sea interdisciplinar entre distintos campos científicos. Es bajo este nuevo concepto de investigación que ha aparecido lo que se ha denominado como *Ingeniería de Tejidos*.

La Ingeniería de Tejidos, según la definición clásica de Langer y Vacanti, es la aplicación de los principios de la biología y de la ingeniería para

el desarrollo de *sustitutos funcionales* para un tejido dañado. Las principales áreas de investigación van encaminadas a la reparación o sustitución de hueso, cartílago, piel, vasos sanguíneos y válvulas cardíacas [26]. Otra definición de la ingeniería de tejidos, propuesta por Lysaght y Hazlehurst. [27], serían los productos o procesos que (1) combinan células con biomateriales, (2) utiliza células como terapia, (3) genera tejidos *in vitro* para su implantación terapéutica y (4) provee materiales o tecnología para que cualquiera de estas vías de aproximación sea posible. Una representación visual de lo que representa la Ingeniería de Tejidos puede verse en la Figura 1.7. Principalmente se pueden distinguir dos filosofías dentro de la Ingeniería de Tejidos:

*Sistemas acelulares, en los cuales no se han cultivado células *in vitro*. Emplean materiales reabsorbibles utilizados como relleno, que con el tiempo son eliminados por el organismo para dejar paso al tejido recién formado. Por lo general suelen ser materiales porosos que facilitan la rápida colonización de las células y soportan el crecimiento de tejido en su interior.

* Sistemas celulares, emplean materiales diseñados con una estructura altamente porosa tridimensional sobre los cuales se cultivan células *in vitro* antes de su implantación. El sustrato sirve de soporte espacial a modo de andamiaje o "scaffold" para guiar el crecimiento *in vitro* de células del propio paciente que deben dar lugar al tejido manteniendo una estructura determinada.

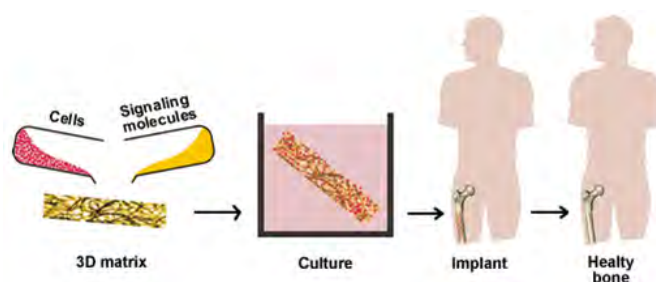


Figura 1.7: Esquema ilustrativo de la ingeniería de tejidos. Adaptado de [28]

1.5.2. Requisitos de los materiales para regeneración ósea

Uno de los conceptos básicos, en la ingeniería de tejidos sería la definición de andamio o *scaffold*, término usado para describir todas las estructuras que son utilizadas para restaurar la *funcionalidad de un órgano* de forma permanente o temporal [29]. Un andamio o *scaffold* ideal para la regeneración ósea debe poseer [24, 30]:

- Biocompatibilidad: la ausencia de reacciones alérgicas, inmunitarias, de rechazo, etc, en el contacto entre los tejidos del organismo y el material.

- **Bioactividad:** capacidad del material de provocar una respuesta del organismo que le permita formar un enlace directo con el hueso sin interposición de una cápsula fibrosa. De esta forma se garantiza una buena integración material-hueso, que permite la presencia de las células óseas necesarias para el proceso de regeneración sobre la superficie del material.
- **Resistencia mecánica:** también es importante que el material diseñado posea las propiedades mecánicas adecuadas para restablecer la funcionalidad del esqueleto desde los primeros momentos de la recuperación.
- **Una degradación controlada y/o una velocidad de reabsorción** que sea similar a la velocidad del crecimiento del tejido tanto *in vivo* y/o *in vitro*. Esto favorecería una rápida recuperación de la zona dañada, aprovechando la estimulación inicial del andamio para posteriormente pasar a un proceso de curación normal. Los productos de degradación no deben ser tóxicos y deben ser metabolizados o eliminados por el organismo en los procesos fisiológicos normales.
- **Capacidad para facilitar el proceso de revascularización** en la zona para garantizar el suministro de nutrientes y oxígeno, así como la llegada de precursores celulares y diversas moléculas que intervienen en el proceso de regeneración, como ciertas hormonas o las proteínas morfogenéticas.
- **Alta porosidad interconectada** con el tamaño suficiente para permitir la invasión por parte de las células y el transporte de fluidos para hacer llegar los nutrientes y eliminación de residuos.
- **Propiedades superficiales** que estimulen la adhesión, proliferación y diferenciación celular.
- **Facilidad de uso** en un sentido amplio del mismo. El diseño del material debe facilitar la manipulación, los procesos de esterilización y por último facilitar la práctica quirúrgica, es decir que ésta sea lo menos complicada posible y lo menos agresiva de cara al paciente. Un material teóricamente superior una vez implantado, puede verse condenado al fracaso por la dificultad en la colocación por parte del cirujano en un escenario tan complicado como puede ser un quirófano.

Son muchos los materiales investigados hasta el momento para su aplicación en la regeneración ósea e ingeniería de tejidos, pero ninguno de ellos es capaz de cumplir con todas las propiedades o requerimientos citados anteriormente. Los esfuerzos se están concentrados principalmente en los polímeros biodegradables y en los materiales cerámicos. Los metales porosos, en general, estarían englobados dentro de los sustitutos óseos junto a ciertos

materiales cerámicos. Aunque ciertos autores consideran también que los implantes metálicos porosos especialmente si son bioactivos podrían incluirse en el grupo de materiales para aplicaciones en Ingeniería de Tejidos [29], sin embargo no serán tratados aquí. Estas líneas de investigación no son cajas estancas, sino que tienen numerosas conexiones y combinaciones dando lugar a infinidad de materiales compuestos. Además también se investiga la incorporación a los mismos de moléculas biológicas que estimulen la regeneración ósea o el crecimiento celular *in vitro* según sea el caso.

Ciertas áreas de investigación que pueden ser identificadas como pueden ser la obtención de materiales, la fabricación de scaffolds adecuados, la incorporación y cultivo de células en el scaffold que permita el crecimiento de tejido en bioreactores y la integración del scaffold dentro del tejido receptor. Un ejemplo de la importancia de la fabricación del material podría verse de forma esquemática en la Figura 1.8. La fabricación de la estructura porosa del material en microfibras o nanofibras puede afectar a la morfología celular. Así, podemos encontrar desde geles blandos usados como transportadores de células a andamios rígidos biodegradables de fosfato de calcio. Estos últimos serán una parte del objetivo de la presente tesis y serán explicados con más detalle a continuación.

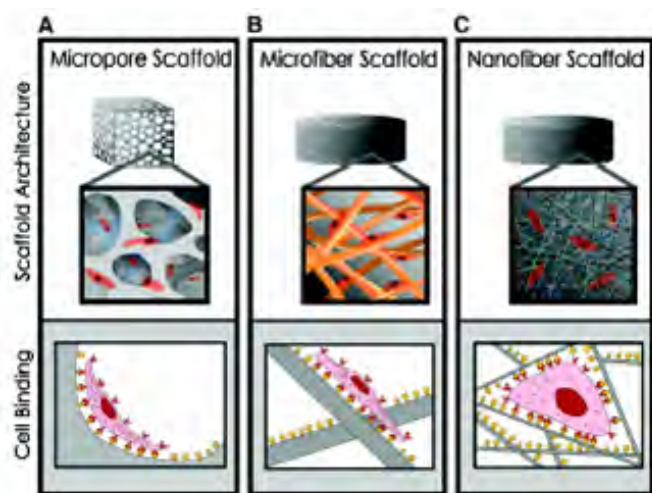


Figura 1.8: La arquitectura del andamio afecta la adhesión celular. A) y B) representan andamios con arquitecturas en el orden de las micras, las células adquieren una morfología plana y extendida como en los cultivos 2D. C) Scaffolds con arquitecturas en el orden de la nanoescala tienden a una mayor área de adhesión y las células se encuentran en un ambiente más parecido al de matriz extracelular. Adaptado de [31]

1.5.3. Polímeros biodegradables

En el grupo de los materiales de origen polimérico es necesario hacer dos distinciones, aquellos derivados de origen natural o los polímeros sin-

tetizados en laboratorio. Estos materiales tienen diferentes características como el hecho que son biodegradables bien por reacciones químicas o a través de la interacción con células y enzimas. Sus productos de degradación son biocompatibles y generalmente son metabolitos producidos por el propio cuerpo como producto de desecho como el caso del ácido poliláctico o la policaprolactona [32, 33].

Entre los polímeros de origen natural podemos distinguir aquellos formados a partir de polisacáridos de origen natural como la celulosa, la quitina, el ácido hialurónico, el alginato o aquellos cuya base sea una proteína como el colágeno, la gelatina, la seda de las arañas entre otros [24, 34–37]. También existen los poli(hidroxicanoatos), poliésteres producidos por bacterias como sustancias de reserva como podría el polihidroxibutirato, el polihidroxi valerato, el polihidroxioctanato y el polihidroxihexanato.

También se pueden considerar aquellos polímeros cuya base sea una proteína recombinante obtenida a través de bacterias, por ejemplo se están estudiando aplicaciones cuya base es la elastina [38].

En el grupo de los polímeros obtenidos de mediante síntesis químicas podemos encontrar polímeros de muy diversa índole: poliésteres como la policaprolactona, el ácido poliglicólico y el ácido poliláctico; poliéteres como el polietilenglicol [24] junto a polímeros derivados a partir de polipéptidos sintetizados en laboratorio, capaces de autoensamblarse dando lugar a fibras o cápsulas.

Muchos de estos materiales intentan utilizar las propiedades intrínsecas del propio material, caso de los polímeros derivados naturalmente como la elastina y el colágeno. Otros, de sus propiedades en cuanto a biodegradación. En algunos casos estos materiales son susceptibles de ser funcionalizados, con lo cual podrían modificarse para incorporar respuestas específicas. También se han usado como liberadores de fármacos o en combinación con moléculas bioactivas. El procesamiento de estos materiales es fundamental. La propia arquitectura de los materiales en forma de fibras, películas, etc. es la que puede dar la clave en sus aplicaciones y es en ese tipo de interacciones sobre las cuales se está haciendo especial énfasis.

1.5.4. Biocerámicas

El campo de las biocerámicas incluye una gran variedad de materiales. Algunos materiales cerámicos son usados por sus especiales propiedades de resistencia a la abrasión, que las hace candidatas en lugares donde las sollicitaciones mecánicas son muy exigentes, como es el caso de los acetábulos de las prótesis de cadera. En este sentido podemos encontrar materiales como la zircona. Sin embargo, son los materiales bioactivos los que presentan un mayor interés dentro de los materiales para regeneración ósea. Dentro de este último grupo podemos encontrar:

- Vidrios bioactivos de base silicio: El óxido formador de red de este tipo

de materiales es el SiO_2 . Su estructura básica está formado por largas cadenas de tetraedros donde el silicio ocupa el átomo central y estos se interconectan unos con otros a través del oxígeno. La adición de distintos óxidos a su formulación tienen por principal característica variar la red de tetraedros de SiO_2 . Los vidrios bioactivos fueron introducidos por Hench *et al.* en los años 70 [39]. Se descubrió que un vidrio de base silicio, con sodio, calcio y fósforo en su composición era capaz de formar una unión directa con el hueso a través de una capa biológicamente activa de apatita carbonatada formada en la superficie del vidrio *in vivo*. Existen actualmente muchas composiciones dentro de este grupo de biocerámicas, algunas composiciones se utilizan bajo la forma de vitrocerámicos. La introducción de las técnicas de sol-gel han permitido una gran versatilidad tanto a nivel de las composiciones que se pueden obtener, como a la posibilidad de obtener estructuras porosas [40–42]. También se han utilizado en composites en combinación con hidroxiapatita, ejerciendo de refuerzo y como modificador de las propiedades superficiales [43, 44]. La posibilidad de obtener materiales mesoporosos de base silicio o de vidrio de base silicio (poros entre 2nm y 50nm) permite la incorporación de fármacos o moléculas bioactivas en su seno [45]. Sin embargo, se considera que su tasa de reabsorción es baja en comparación con otros materiales y en especial para algunas aplicaciones biomédicas, aunque las nuevas estructuras obtenidas a través de técnicas de sol-gel o estructuras ordenadas mesoporosas han mostrado una mayor capacidad de reabsorción [45].

- Vidrios de base fosfato: Este tipo de vidrios se caracteriza por tener como óxido formador de la red el P_2O_5 . En este caso la estructura básica está formada, como en el caso de los vidrios de silicio, por largas cadenas de tetraedros donde ahora el átomo central está ocupado por fósforo y éstos se unen a su vez a través de átomos de oxígeno por tres de sus 4 vértices. Debido a la pentavalencia del fósforo uno de los oxígenos está unido mediante un enlace π . Este tipo de vidrios son conocidos desde hace más de 100 años y presentan unas interesantes propiedades ópticas en comparación con los vidrios de silicio, a la vez que poseen puntos de fusión más bajos que estos últimos. Sin embargo, uno de los problemas que tienen este tipo de vidrios es su relativa baja estabilidad química que los hace propensos a la degradación. Es esta especial característica lo que los hace especialmente interesantes para aplicaciones biomédicas al degradarse *in vivo*. Las composiciones para aplicaciones biomédicas están basadas principalmente en P_2O_5 y CaO , elementos que componen la fase mineral del hueso. Su velocidad de degradación puede ser controlada mediante adiciones de elementos como el Na, Ti o Fe. Esto abre la posibilidad de obtener una abanico de composiciones en función de la aplicación deseada, con una aplicación

a más largo o corto plazo. Este tipo de materiales también presenta una moderada bioactividad, llegándose a formar también sobre su superficie una capa de apatita [46–50].

- **Ortofosfatos de Calcio:** Este grupo comprende una amplia gama de composiciones cuya principal característica es que su composición química está formada por los componentes de la fase mineral del hueso. Dentro de este grupo podemos distinguir los fosfatos de calcio obtenidos a alta temperatura: Fosfato Tricálcico α y β (α ó β -TCP), Fosfato Tetracálcico (TTCP). Su obtención se realiza por lo general a través de reacciones en estado sólido o por tratamientos térmicos o sinterización de compuestos con la misma composición química. Entre los fosfatos que se pueden obtener a bajas temperaturas se encuentran, el Fosfato de Calcio Amorfo (ACP), el Fosfato Octacálcico (OCP), el Fosfato Dicálcico (DCP), el Fosfato Dicálcico Dihidratado (DCPD) y la Hidroxiapatita Precipitada (PHA). Este grupo de fosfatos de calcio se obtiene por precipitación a través de reacciones de hidrólisis, ácido-base y precipitación a través de soluciones saturadas. Es en este grupo de materiales donde está englobado el trabajo de investigación de la presente tesis, a continuación se hace una explicación más detallada de los mismos [51].

En el caso de la Hidroxiapatita, se puede obtener tanto a alta temperatura y se la denomina generalmente Hidroxiapatita sinterizada (HA) como a baja temperatura denominada hidroxiapatita precipitada (PHA). Las propiedades obtenidas por una u otra vía difieren considerablemente. Así la hidroxiapatita sinterizada es altamente cristalina dando lugar a una baja bioactividad en comparación con la hidroxiapatita precipitada generalmente de menor cristalinidad y mucho más reactiva.

Existen sin embargo, numerosos estudios en busca de la fabricación de composites entre biocerámicas y polímeros para obtener la funcionalidad característica que presenta cada grupo por separado. Así, se busca la incorporación de apatita o biovidrios sobre estructuras poliméricas tanto como refuerzo mecánico como para aumentar su bioactividad, caso de los composites de ácido poliláctico-vidrio de fosfato de calcio [52], poliláctico-apatita [53] entre otros. Un aspecto interesante también en este grupo de materiales es la aparición de los llamados star-gels materiales híbridos inorgánico-orgánico constituidos de un centro orgánico con brazos flexibles que terminan en grupos alcoxisilanos, con propiedades mixtas entre una goma y un vidrio que abre nuevas vías de investigación y aplicaciones [54].

1.5.5. Moléculas Bioactivas

El principal interés de implantar un material con moléculas bioactivas es la liberación de señales químicas que favorezcan la migración y la activación de células mesenquimales hacia el andamio favoreciendo una rápida respuesta celular [55].

Un ejemplo, sería la proteína morfogenética del hueso (BMP). Esta molécula introducida en defectos óseos actúa sobre las células mesenquimales, provocando su migración a la zona del defecto y su diferenciación a osteoblastos maduros. En este sentido también podemos citar: los factores de crecimiento insulínico (IGF) que regulan el crecimiento celular y determinan la calcificación de la matriz ósea; el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) estimula la proliferación de células indiferenciadas en el proceso de reparación ósea y también es capaz de estimular la angiogénesis; el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) estimula la proliferación de fibroblastos y osteoblastos considerándose uno de los más importantes en el proceso de regeneración del tejido óseo [56].

Las investigaciones que se desarrollan en la actualidad tienen como objetivo conseguir biomateriales que actúen como portadores de factores de crecimiento, de forma que puedan mejorar la velocidad, cantidad y calidad de la regeneración ósea en el lugar de la implantación. Ejemplos de estos estudios son el uso de andamios de fosfato de calcio como vector de TGF [57] o BMP [58] y compuestos de colágeno-hidroxiapatita/TCP como vector de TGF [53]. El uso de estos factores en combinación con andamios ha mostrado una mayor cantidad de tejido óseo que en los controles negativos. Otra vía es la utilización de proteínas que favorezcan la adhesión celular inicialmente como sería el caso de la fibronectina, o que los materiales contengan pequeñas cadenas de polipéptidos como la secuencia *RGD* que favorece la adhesión celular [59, 60].

1.6. Química de los fosfatos de Calcio

Los fosfatos de calcio mayormente utilizados dentro del campo de los biomateriales están recogidos en la Tabla 1.4. Hace más de 30 años que se sabe que la hidroxiapatita es capaz de formar una unión directa con el hueso de tal forma que si se quiere extraer un implante del hueso circundante, es imposible sin romper el hueso o bien el implante propiamente [61]. Sin embargo, es sabido también que la bioactividad de los fosfatos de calcio es mayor en función de su semejanza a la fase mineral del hueso. Es por ello que se investiga hacia la obtención de apatitas no estequiométrica, pobremente cristalizadas, deficientes en calcio con relaciones molares de Ca/P que varían entre 1,67 y 1,50. En los trabajos siguientes, se pueden encontrar una buena revisión sobre los fosfatos de calcio para aplicaciones biomédicas [39, 51, 62].

1.6. Química de los fosfatos de Calcio

Sus pobres propiedades mecánicas suponen una de las mayores limitaciones para un uso más generalizado de los mismos. Este hecho los hace inviables como implantes en lugares con una sollicitación mecánica elevada. Es bien sabido que las propiedades mecánicas de los materiales bajan drásticamente con la porosidad. El uso de este tipo de materiales está limitado a cargas bajas o como recubrimientos de implantes metálicos donde la carga es lógicamente soportada por el metal.

Tabla 1.4: Lista de Ortofosfatos de Calcio utilizados en aplicaciones biomédicas.

Ca/P	Nombre	Abreviación	Fórmula	Aplicación
0,5	Fosfato Monocálcico Monohidratado	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Cementos
0,5	Fosfato Monocálcico anhídrico	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Cementos
1,0	Fosfato de Dicálcico Dihidratado	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Cementos
1,0	Fosfato Dicálcico	DCP	CaHPO_4	Cementos
1,33	Fosfato Octacálcico	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Cementos
1,5	Fosfato Tricálcico	α ó β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Cerámicas, Composites PM, Cementos Recubrimientos
	Fosfato de Calcio Amorfo	ACP	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Cementos, PM Recubrimientos
1,67	Hidroxiapatita	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Cerámicas, Composites Recubrimientos, PM*
2,0	Fosfato Tretacálcico	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	Cerámicas, Composites Recubrimientos, PM*

Los fosfatos de calcio obtenidos a alta temperatura sólo pueden producirse en forma de gránulos, bloques o como recubrimientos, para su implantación se requieren procedimientos quirúrgicos complicados y tienen el inconveniente de que no se ajustan del todo al defecto a tratar, o en el caso de los gránulos puede haber migración fuera del sitio del implante [39, 63, 64].

Los fosfatos de calcio obtenidos por precipitación se caracterizan por presentar una gran superficie específica, característica que contribuye a que estos materiales sean más activos biológicamente. Además, los mismos pueden encontrarse en los tejidos humanos y muchos de ellos son considerados precursores de la apatita biológica, fundamentalmente el OCP, el DCPD y el ACP [51]. Estos fosfatos de calcio pueden obtenerse en casi cualquier forma (gránulos o bloques) y porosidad, lo que los hace en extremo interesantes cuando se desea una rápida reabsorción o cuando se requieren una superficie específica grande, como el caso de la ingeniería de tejidos o los sistemas de

liberación de medicamentos [63].

La solubilidad de los fosfatos de calcio depende de las condiciones de pH, de la concentración iónica y de la temperatura. En las Figuras 1.9 y 1.10 se presentan las isotermas de solubilidad a 37°C de los distintos compuestos presentados en la Tabla 1.4. Estos diagramas son válidos para el sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C. Las composiciones se han obtenido equilibrando una determinada sal en una solución acuosa sólo de ácido fosfórico (H_3PO_4) o de hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y no en una solución que contenga otro tipo de compuestos diferentes de los del sistema. Una variación en el pH implica simultáneamente una variación en la concentración de iones calcio o iones fosfato.

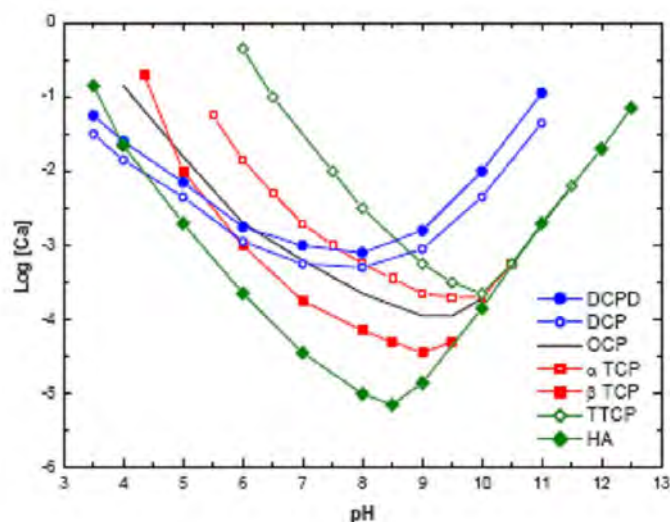


Figura 1.9: Isotermas de Solubilidad de soluciones en equilibrio con distintas sales de fosfatos de calcio en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C en una representación del log de [Ca] frente al pH [65].

Si bien son varios los fosfatos de calcio que pueden obtenerse por precipitación, desde el punto de vista termodinámico sólo hay dos fases estables en contacto con una solución acuosa, el DCPD a $\text{pH} < 4,2$ y la PHA para $\text{pH} > 4,2$. Sin embargo, desde el punto de vista cinético pueden precipitar otras fases más fácilmente, como el OCP para pH entre 5 y 7. El pH fisiológico de los organismos está alrededor de 7,4 es por ello que la fase mineral presente en los vertebrados es la apatita al ser el fosfato de calcio menos soluble. Esto implica que bajo determinadas condiciones y de acuerdo a las isotermas de solubilidad DPCP, DCP, OCP, α y β -TCPA y TTCP se disolverán dando como producto de precipitación apatita en el interior de un organismo.

Cabe comentar que la apatita fisiológica debido a la falta de estequiometría (sección 1.2.4) es más soluble que la hidroxiapatita estequiométrica

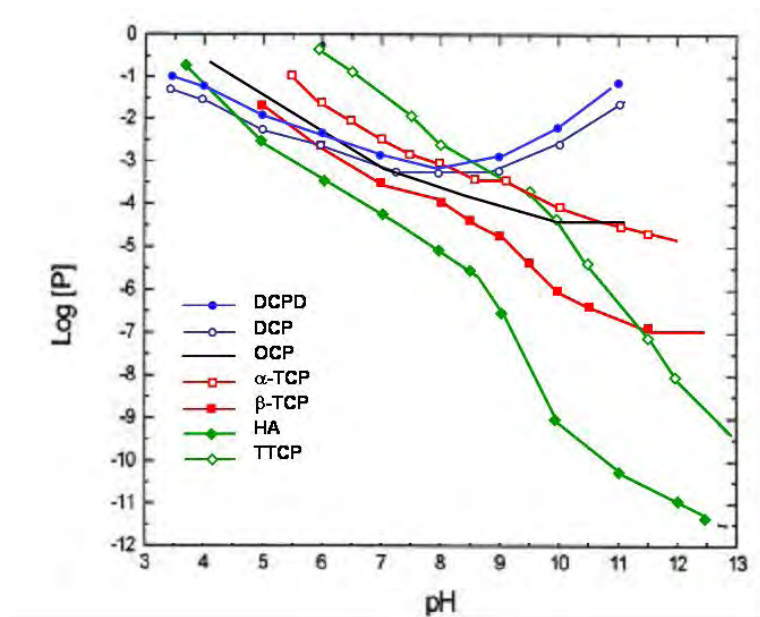


Figura 1.10: Isotermas de Solubilidad de soluciones en equilibrio con distintas sales de fosfatos de calcio en el sistema $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ a 37°C en una representación del log de [P] frente al pH [65].

que se llega a considerar insoluble en ciertos casos, así la solubilidad se ve incrementada a medida que la relación Ca/P disminuye, la presencia de ciertos iones en su estructura también afecta su solubilidad. El tamaño pequeño de sus cristales ($50 \times 25 \times 3$ nm) también incrementa la solubilidad al poseer estos una elevada superficie de contacto con el fluido fisiológico. Por lo tanto, el comportamiento in vivo de los fosfatos de calcio estará en gran medida determinado por su solubilidad, de esta forma aquellos minerales menos solubles que la apatita biológica no se degradarán o lo harán muy lentamente, mientras que aquellos más solubles serán degradados.

1.7. Cementos de Fosfato de Calcio

Los cementos de fosfato de calcio (CPC) se basan en el principio expuesto anteriormente de las diferencias en la solubilidad de los distintos fosfatos de calcio. En el año 1983, W.E. Brown y L.C. Chow [66] descubrieron la posibilidad de obtener apatita monolítica a temperatura ambiente a través de una reacción de tipo cemento entre una fase sólida formada por polvos de fosfatos de calcio y una fase líquida. Un sistema cementante se puede entender en base a la capacidad de una fase sólida que al ser mezclada con una fase líquida forma una masa coherente y moldeable que endurece con el tiempo presentando cierta resistencia mecánica.

La transformación de la pasta inicial en un cuerpo rígido se produce

en dos etapas. En la primera etapa, el fraguado, la pasta obtenida a partir de la mezcla de los componentes pierde su plasticidad de tal forma que si vuelve a ser mezclada o se añade más agua la masa pierde su coherencia o se deshace. Posteriormente ocurre el proceso de endurecimiento, etapa en la que aumenta la dureza y la resistencia mecánica a medida que ocurre el proceso de consolidación hasta obtenerse un cuerpo sólido. Este proceso se representa esquemáticamente en la Figura 1.11.

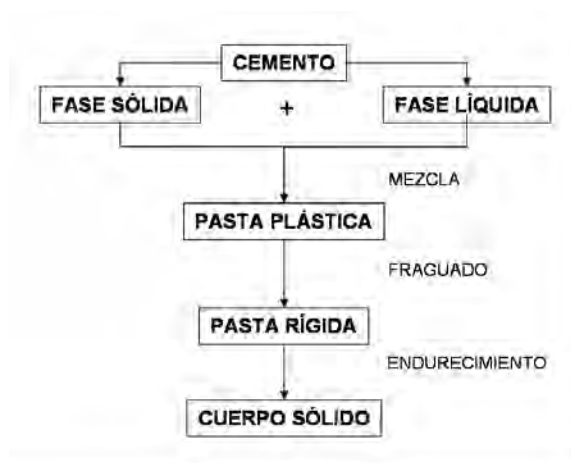


Figura 1.11: Esquema del proceso de un cemento y de su comportamiento.

Las reacciones de fraguado y endurecimiento se describen conjuntamente como reacciones de hidrólisis, disolución y precipitación para el caso de los cementos de fosfato de calcio. A medida que los nuevos cristales van precipitando se van entrecruzando entre sí, creándose un entramado que le confiere al cemento su dureza y las propiedades mecánicas. Un ejemplo de la microestructura de un cemento de fosfato de calcio puede observarse en la Figura 1.12. Junto al entrecruzamiento mecánico de los cristales es posible también que se produzcan interacciones de tipo Van der Waals y puente de hidrógeno.

Teóricamente todos los fosfatos de calcio obtenidos a baja temperatura pueden ser el producto final de una reacción de fraguado de un CPC según los diagramas de solubilidad (ver Figuras 1.9 y 1.10). Sin embargo de todas las posibles combinaciones usadas o investigadas hasta el momento, los productos finales son sólo dos: apatita precipitada (PHA) y brushita (DCPD). Estos dos compuestos, tal como se ha comentado previamente, son las dos sales de fosfato de calcio más estables, brushita a $\text{pH} < 4,2$ y apatita a $\text{pH} > 4,2$.

En el caso de los cementos cuya fase final es apatita podemos distinguir tres casos distintos [67]:

*CPC monocomponentes: una sola sal de fosfato de calcio se hidroliza para formar bien PHA o CDHA. Debido a que la apatita es la fase más estable

a $\text{pH} > 4,2$, cualquier sal de fosfato de calcio tenderá a disolverse y PHA tenderá a precipitar. Como resultado de la reacción H_3PO_4 o CaOH_2 pueden ser liberados como subproducto de la reacción de fraguado. El único CPC monocomponente conseguido hasta el momento está basado en la hidrólisis de α -TCP [68, 69]. Debido a que el ratio Ca/P inicial y final es el mismo no son liberados subproductos ácidos o básicos.

*CPC con dos Componente: uno ácido y otro básico que fraguan mediante una reacción ácido-base. El componente con carácter básico es usualmente TTCP, único fosfato de calcio con un ratio Ca/P superior a PHA. Este es combinado con uno o más fosfatos de calcio que tengan un ratio Ca/P inferior de forma que se puede obtener PHA o CDHA. La combinaciones más estudiadas son TTCP+DCPD y TTCP+DCP [66, 70].

*CPC con más de dos componentes: este grupo usa fosfatos de calcio y otras sales como por ejemplo carbonato de calcio o estroncio. Un ejemplo de este tipo de cementos sería α -TCP+MCPM+ CaCO_3 . Ver Tabla 1.5 para otros ejemplos.

Los cementos cuyo producto final es la brushita son cementos mucho más reabsorbibles al ser ésta metaestable en medio fisiológico [71–73]. Sin embargo, se ha demostrado que *in vivo* la brushita tiende a convertirse en PHA [74]. Los cementos de brushita son obtenidos como resultado de una reacción ácido-base. Diversas composiciones han sido propuestas, entre ellas β -TCP+MCPM, β -TCP+ H_3PO_4 y TTCP+MCPM. Cabe recordar que la brushita sólo es estable a $\text{pH} < 4,2$ por lo que la pasta de cemento es ácida durante la reacción de fraguado. Posteriormente, el pH evoluciona hacia el pH de equilibrio, que depende de los puntos singulares del sistema.

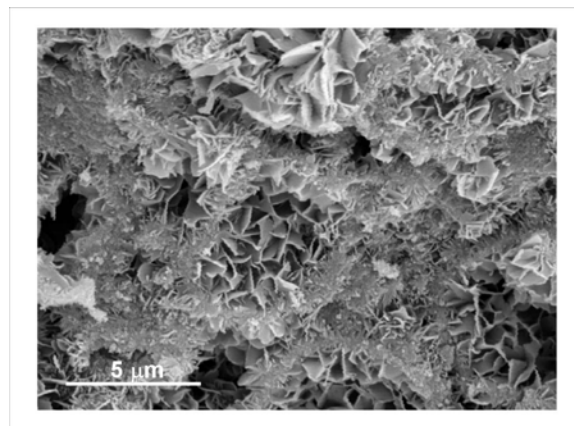


Figura 1.12: Microestructura de un cemento de fosfato de calcio donde se puede observar el entrecruzamiento de los cristales del producto de fraguado.

Capítulo 1. Introducción

Tabla 1.5: Lista de Cementos de Fosfato Comerciales. Adaptado de [75]

Compañía	Nombre Comercial	Composición	Producto Final
ETEX	α -BSM Embarc Biobon	Polvo: ACP (50%), DCPD (50%) Solución: H ₂ O (solución salina no tamponada)	apatita
Stryker-Leibinger Corp.	BoneSource	Polvo: TTCP (73%), DCP (27%) Solución: H ₂ O, mezcla de Na ₂ HPO ₄ y NaH ₂ PO ₄	apatita
Teknimed	Cementek	Polvo: α -TCP, TTCP, Na Glicerofosfato Solución: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄	apatita
	Cementek LV	Polvo: α -TCP, TTCP, Na Glicerofosfato, dimetilsiloxano Solución: H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄	apatita
Biomet	Calcibon	Polvo: α -TCP (61%), DCP (26%), CaCO ₃ (10%), PHA (3%) Solución: H ₂ O, mezcla de Na ₂ HPO ₄	apatita
	Mimix	Polvo: α -TCP, TTCP, C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ ·2H ₂ O Solución: H ₂ O, C ₆ H ₈ O ₇	apatita
	Quicset Mimix	Polvo: * Solución: *	apatita
Mitsubishi materials	Biopex	Polvo: α -TCP (75%), TTCP (20%), DCPD (5%), HA (2%) Solución: H ₂ O, succinato de sodio (12%), condroitín sulfato sódico (5%)	apatita
	Biopex-R	Polvo: α -TCP, TTCP, DCPD, HA, Mg ₃ HP ₄ , NaHSO ₃ Solución: H ₂ O, succinato de sodio (12%), condroitín sulfato sódico (5%)	apatita
Kyphon	KyphOS	Polvo: α -TCP (77%), Mg ₃ (PO ₄) ₂ (14%), Mg ₃ HP ₄ (4,8%) SrCO ₃ (3,6%) Solución: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ (3,5M)	apatita
Skeletal Kinetics	Callos	Polvo: * Solución: *	apatita
Shangai Rebone Biomaterials Co. Ltd	Rebone	Polvo: TTCP, DCP Solución: H ₂ O	apatita
Synthes-Norian	Norian SRS	Polvo: α -TCP (85%), CaCO ₃ (12%), MCPM (3%) Solución: H ₂ O, Na ₂ HPO ₄	apatita
	Norian CRS chronOS Inject	Polvo: β -TCP (73%), MCPM (21%), MgHPO ₄ ·3H ₂ O MgSO ₄ (<%), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₄ ·7H ₂ O (<1%) Solución: H ₂ O, hialuronato sódico (0,5%)	brushita
Kasios	Eurobone	Polvo: β -TCP (98%), Na ₄ P ₂ O ₇ Solución: H ₂ O, H ₃ PO ₄ (3,0M), H ₂ SO ₄ (0,1M)	brushita
CalciphOs	VitalOs	Componente 1: β -TCP (1,34g), Na ₄ P ₂ O ₇ (0,025g) solución de PBS al 0,05M (pH 7,4) Componente 2: MCPM (0,78g), CaSO ₄ ·H ₂ O (0,39g), H ₂ O H ₃ PO ₄ (0,05M)	brushita

1.7.1. Características de los cementos de fosfato de calcio

Las principales características que presenta un cemento de fosfato de calcio como biomaterial son las siguientes:

- Ausencia de toxicidad.
- Bioactividad.

- Ausencia de efectos exotérmicos durante el fraguado que puedan producir necrosis celular debido al aumento local de temperatura.
- Moldeabilidad, no es necesario dar forma previa al implante, sino que el mismo cirujano moldea el material *in situ* al introducir la pasta en la cavidad que conviene rellenar.
- Capacidad de fraguar en contacto con los fluidos intracorporales, resistiendo la invasión de líquido en su seno evitando la pérdida de cohesión
- Tiempos de fraguado y endurecimiento razonables.
- Ausencia de contracción de volumen durante el fraguado. Se consigue, por lo tanto, una fijación mecánica al sitio del implante, evitando los problemas de migración que plantean algunas cerámicas en forma de gránulos.
- Buena aposición del cemento al tejido circundante al poder se moldeado *in situ* y no experimentar contracción una vez fraguado. Esta propiedad es de vital importancia para que se pueda dar el crecimiento óseo.
- Adquisición de una resistencia mecánica adecuada al sitio de implantación.
- Inyectabilidad, algunas formulaciones pueden tener suficiente fluidez inicial para que puedan ser inyectadas. Esto puede suponer minimizar al máximo la incisión que ha de practicar el cirujano.
- Reabsorción por lo que el material será progresivamente reemplazado por hueso nuevo consiguiéndose una reparación total del lugar dañado.

1.7.2. Variables que afectan a los CPC

Las características y propiedades del cemento depende de diversas variables, así cementos con la misma composición química pueden ser o no inyectables en función de las propiedades que se quieran conseguir. Las variables que pueden ser modificadas son:

- Componentes de la fase sólida: la composición de la fase sólida de los productos de partida así como la proporción entre los mismos determinará la reacción o reacciones que puedan haber lugar. Puede ser posible escoger componentes que reaccionen rápidamente y otros más lentamente para obtener diferentes fases o proporción entre las mismas.
- Tamaño de partícula fase sólida: Este parámetro de forma general tiene gran influencia sobre diversas propiedades de la fase final del cemento como son la porosidad, la resistencia mecánica a parte de influenciar

el tiempo de fraguado y la viscosidad inicial de la pasta de cemento. De manera general, se considera que un menor tamaño de partícula reducirá los tiempos de fraguado (aumento reactividad por incremento superficie específica) y la porosidad del cemento. Por otro lado aumenta la viscosidad inicial de la pasta y puede afectar a la microestructura final de los cristales precipitados [76].

- Aditivos fase sólida: para acelerar la reacción de fraguado a veces se añaden agentes nucleantes de la cristalización (llamados comúnmente semillas). Esto son pequeñas cantidades de PHA o CDHA de tamaño nanométrico por lo general. Sin embargo, una cantidad excesiva, puede ser contraproducente al poder reducir drásticamente el tiempo disponible de trabajo para obtener una pasta homogénea y de aplicación al sitio de implantación [77]. Otro tipo de aditivos pueden ser la adición de agentes porogénicos en forma de cristales solubles [78], etc...
- Aditivos fase líquida: en general es una solución acuosa. La fase líquida es el vehículo para la disolución de los reactivos y la precipitación de los productos. La variación del pH o la adición ciertos iones tiene influencia en la velocidad a la que tienen lugar la disolución y/o la precipitación [79, 80], tal como se deduce de los diagramas de solubilidad (Figuras 1.9 y 1.10). Se pueden añadir a la misma agentes retardadores de reacción [81], agentes de cohesión [82, 83] o agentes porogénicos disueltos que puedan descomponerse dando lugar a burbujas de aire.
- Relación líquido/polvo: la relación de ambas fases influencia en la plasticidad de la pasta inicial. A menor cantidad de agua, la mezcla se vuelve más seca y hay que trabajar más la mezcla para obtener una pasta homogénea. Al mismo tiempo que se reduce el tiempo de espera para introducir en los líquidos al aumentarse la cohesión intrínseca de la pasta. Sin embargo, se aumenta el tiempo de fraguado del cemento, y la porosidad. El aumento de la relación L/P puede permitir que una mezcla pase de no inyectable a inyectable [80, 84].

El diseño de un CPC óptimo exige soluciones de compromiso a la hora de establecer las diferentes variables. La modificación de una o de varias de ellas pueden hacer mejorar y empeorar unas u otras propiedades. Así por ejemplo, un aumento de la relación L/P tiene como consecuencia la mejora de la inyectabilidad pero implica el aumento de la porosidad final y por lo tanto una caída en las propiedades mecánicas tal como se ha comentado arriba.

Aunque no es posible establecer de forma teórica las combinaciones de fosfato de calcio que darán como resultado un sistema cementante, ya que esto puede depender de muchos factores como la reactividad de los productos de partida, el tamaño de partícula de los componentes de la fase sólida,

el tamaño y morfología de los cristales resultantes de la reacción de precipitación, etc. En la Tabla 1.4 se recoge la composición de algunos de los cementos de fosfato de calcio comerciales existentes en el mercado. Estudios de diversos sistemas cementantes pueden ser encontrados en [77, 85–88], así mismo se puede encontrar un amplio review sobre cementos de fosfato de calcio en [62, 67].

En concreto, la formulación del CPC que se utilizará a lo largo de la presente tesis está basado en un 98 % de α -TCP y un 2 % de PHA usado como semilla o agente de nucleación. La fase final del fraguado que se obtiene es una apatita deficiente en calcio, detallada en la reacción química descrita a continuación [69]:



A lo largo de la tesis se desarrollarán varios aspectos sobre este tipo de cemento que son comentados dentro de los Objetivos donde al mismo tiempo se sitúa la motivación específica de la misma en base al estado actual de los cementos y de la ingeniería de tejidos.

1.8. Desarrollo de cementos de fosfato de calcio macroporosos

Uno de los principales factores por los que los cementos de fosfato de calcio son utilizados es su alta biocompatibilidad debido a la similitud del producto de fraguado con la fase mineral del hueso. Este es un aspecto compartido por los fosfatos de calcio en general. Sin embargo, los cementos de fosfato de calcio presentan una mayor velocidad de reabsorción que los obtenidos a altas temperaturas debido a la menor cristalinidad y su mayor superficie específica [89].

Existen dos mecanismos de reabsorción asociados a los fosfatos de calcio: la reabsorción pasiva y/o la reabsorción activa. La reabsorción pasiva es la degradación química del material, su disolución en los fluidos corporales no saturados respecto a ciertos fosfatos de calcio y que son continuamente renovados. En este proceso influyen numerosos factores como la solubilidad del material obtenido como producto de la reacción de fraguado, la porosidad, la superficie específica, la cristalinidad, etc. Por su parte, la reabsorción activa es el resultado de la actividad celular específicamente, debida a la acción de osteoclastos, macrófagos y otras células inflamatorias.

En los CPC, hay que distinguir dos casos respecto a su reabsorción: si la fase final es apatita o brushita. Tal como se ha comentado previamente, los cementos brushíticos son metaestables en medios fisiológicos por lo que su velocidad de reabsorción es mayor. Sin embargo, la disolución de la brushita a veces va acompañada de una reprecipitación de apatita *in vivo* en el sitio implantado. Ciertos productos químicos, impiden esta reprecipitación hacia apatita [75]. También se han observado en ciertos casos, reacciones inflamatorias debido a la necesidad de tener un pH bajo durante el proceso de precipitación [73].

Los CPC cuya fase final es apatita pueden estar presentes en el organismo varios años antes de ser resorbidos completamente, llegando en algunos casos a un estado estacionario. Los trabajos de Frankeburg *et al.* [90] muestran la presencia de un CPC (Norian SRS) en perros incluso después de 18 meses implantados, a pesar de experimentar una reabsorción importante, tal como se puede observar en la Figura 1.13. La actividad del organismo de los perros es superior que las de los humanos [91, 92], por lo que es de suponer una mayor tiempo de reabsorción en éstos. En la Figura 1.14 se puede observar la presencia del mismo cemento (Norian SRS) en la muñeca de un paciente 6 años después de ser implantado [93]. En este sentido, lo que en un principio es beneficioso para el paciente, es decir una rápida recuperación inicial debida al rápido crecimiento óseo, puede convertirse en un problema relativo. La presencia de elementos extraños en el interior del hueso modifica en cierta parte su capacidad de remodelación y readaptación a las cargas mecánicas impidiendo por lo tanto una recuperación total a medio plazo.

El principal problema para mejorar la reabsorción del cemento y fa-

vorecer el periodo de incorporación radica en la microestructura del propio cemento. Los CPC son materiales altamente porosos (entre 40 y un 50 %), sin embargo, dicha porosidad no tiene el tamaño suficiente para permitir que las células invadan el seno del cemento. En la Figura 1.12, se puede observar la alta porosidad del material, pero esta tiene un tamaño por lo general inferior a las 5 micras insuficiente para el paso de las células a través del material. De esta forma, los CPC apatíticos son reabsorbidos por etapas a partir de su superficie de contacto con el hueso. Sin embargo, no es suficiente únicamente un tamaño de porosidad que permita el paso de las células sino que la porosidad ha de tener un tamaño adecuado para permitir el desarrollo del tejido óseo, es decir de todas sus estructuras desde las osteonas o trabéculas óseas hasta los vasos sanguíneos. En los años 70 Hulbert *et al.* hallaron que el tamaño mínimo de poro para que se puede desarrollar tejido óseo era de 100 micras, siendo necesario 150 micras para la formación de osteonas [94]. Hoy en día, se establece que el tamaño ideal está entre las 100-400 micras pero que el aspecto más importante en este sentido es el tamaño de la interconexión de los poros [95–97].

La inclusión de macroporosidad en el uso de los fosfatos de calcio sinterizados a alta temperatura está ampliamente extendido, sin embargo este aspecto es de difícil aplicación en el caso de los CPC, debido a sus especiales características [64, 89].

Actualmente se está estudiando la incorporación de macroporosidad en los CPC, con tal de mejorar no sólo la reabsorción al aumentar el área de contacto con los fluidos corporales al mismo tiempo que se favorece la colonización celular, mejorando por un lado la osteointegración del implante y los procesos de reabsorción activa por parte de las células. Aun sin conseguir que la porosidad sea totalmente interconectada, la sola inclusión de esta disminuye el tiempo de reabsorción tal como demuestran Böhner *et al.* en un estudio teórico sobre la reabsorción de los fosfatos de calcio porosos, obteniendo conclusiones cercanas a los modelos actualmente en experimentación *in vivo* [97].

Los trabajos elaborados por del Real *et al.* [98, 99], con la fabricación de un soporte poroso a partir de un cemento de fosfato de calcio previamente fraguado *in vitro* y su posterior implantación *in vivo* mostraron la desaparición de un 81 % del cemento después de 10 semanas en conejos. Otros tra-



Figura 1.13: Reabsorción de Fracture Grout en perro después de 18 meses

bajos, con scaffolds porosos de apatita deficiente en calcio también muestran la mejora en la reabsorción que se produce una vez implantados [100].

En este sentido han aparecido numerosos trabajos en la literatura que han mostrado vías de obtener cementos porosos, como los publicados por Takagi *et al.* [78], Xu *et al.* [101–103], Bohner *et al.* [104], Almirall *et al.* [105], Sardá *et al.* [106]. Muchos de los métodos propuestos hasta el momento para la obtención de cementos porosos sólo son aplicables para la obtención de andamios pre-fraguados para Ingeniería de Tejidos en sistemas celulares con el objetivo de conseguir apatita a baja temperatura, y no ha sido estudiada su viabilidad *in vivo*.

Los requisitos de los agentes porogénicos usados en los CPC para aplicaciones médicas son muy restrictivos al tener que ser biocompatibles, eliminados por el organismo y no afectar a la viabilidad del cemento *in vivo* (cohesión, fraguado, propiedades mecánicas aceptables, etc.)

Los trabajos del grupo Ginebra *et al.* [107, 108] van dirigidos a la obtención de cementos porosos inyectables para su aplicación directa en defectos óseos biomédicas bajo la formulación de cementos.

1.9. CPC para Ingeniería de Tejidos

Otra aplicación de los CPC que se está investigando es su utilización para la fabricación de andamios o scaffolds para Ingeniería de Tejidos en sistemas celulares, tal como se ha comentado brevemente en la sección anterior. Los CPC cumplen con los requisitos de bioactividad y reabsorción

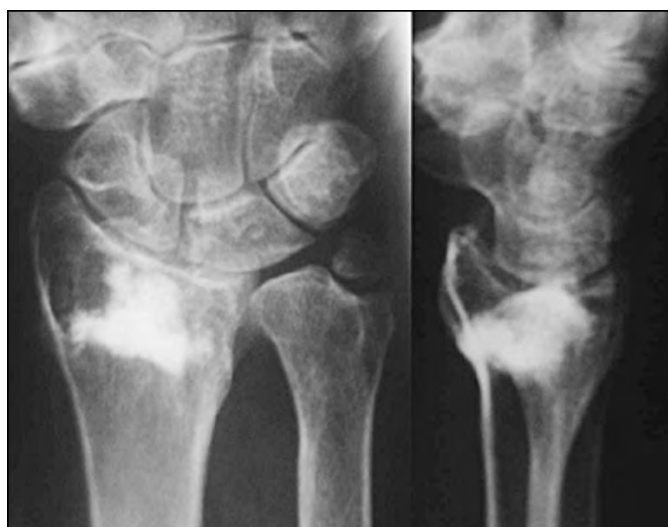


Figura 1.14: Presencia de cemento Norian SRS después de 6 años en una operación de muñeca. Obsérvese la aposición del hueso a la del cemento y la mayor densidad del cemento en la zona de implantación. Adaptado de [93]

por su propia naturaleza. La inclusión de macroporosidad abre la vía de que estos materiales sean utilizados *in vitro* como andamios o scaffolds.

Uno de los aspectos clave en cuanto a los andamios en Ingeniería de Tejidos es la micro/nanoestructura y las propiedades superficiales de los materiales empleados [109–113]. Un ejemplo clásico, es el efecto de la rugosidad de los implantes de titanio en su osteointegración [114, 115]. Aunque otros aspectos de la topografía tienen una gran influencia como la distancia entre defectos, la regularidad de los mismos etc. [116, 117]. En la Figura 1.8 se muestra gráficamente el efecto que la microestructura puede tener sobre las células.

El caso de los fosfatos de calcio, no es ajeno a estas propiedades. Así Habibovic *et al.* encontraron diferencias sustanciales en la capacidad de osteoinducción de dos implantes porosos de hidroxiapatita de cristalinidad similar. Los autores establecen como el principal factor las diferencias encontradas en la microestructura del interior de los poros [118]. Este resultado también fue encontrado por Yuan *et al.* [119] en dos implantes de hidroxiapatita fabricados de forma diferente pero con porosidades muy similares. Los autores también adujeron como principal diferencia la microestructura del interior de los poros.

Un cambio en la microestructura de un fosfato de calcio, en especial si es reactivo, puede tener influencias en otras propiedades al variar también por ejemplo la superficie específica [89] o en el caso de los cementos de fosfato de calcio, el tamaño de los cristales del producto de fraguado [76]. A su vez estos cambios pueden afectar al intercambio iónico con los fluidos fisiológicos y a la adsorción de proteínas y por lo tanto al comportamiento celular [120–124].

Estos aspectos importantes para la obtención de CPC con propiedades óptimas tanto en su aplicación médica directa como para andamios o "scaffolds" son estudiados en la presente tesis, mediante la variación del tamaño de partícula inicial de la fase sólida.

Referencias

- [1] <http://www.arma.uk.net/>.
- [2] <http://www.boneandjointdecade.org>.
- [3] D. Tout and W. Collie. Health economics and advocacy: Practical training seminar. 2007. Presented at the Bone and Joint Decade 2007 International Patient Advocacy Seminar <http://www.boneandjointdecade.org/Default.aspx?Contid=1910>.
- [4] <http://www.bartleby.com/107/18.html>.
- [5] Baron R. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott Williams and Wilkins, 1997.
- [6] <http://www.brsoc.org.uk/gallery/index.htm>.
- [7] J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, and P. Zioupos. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering and Physics*, 20:92–102, 1998.
- [8] http://www.daviddarling.info/images/long_bone_2.jpg.
- [9] M. J. Olszt, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y. Kim, M.J. Kaufman, E. P. Douglas, and L.B. Gower. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58:77–116, 2007.
- [10] J.C.Elliot. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium ortophosphates*. Elsevier, first edition, 1994.
- [11] W.S.S. Jee. *Integrated Bone Tissue Physiology.In: Bone Mechanics Handbook.*, volume 1. Boca Raton, 2001.
- [12] J.D. Termine and P.G. Robey. *Bone Matrix Proteins and the Mineralization Process.In: Primers on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott-Raven.
- [13] <http://depts.washington.edu/bonebio/asbmred/cells.html>.
- [14] I. Proubasta, F.J. Gil, and J.A. Planell. *Fundamentos de biomecánica y biomateriales*. Ergorn, 1997.
- [15] M. Ontañon, C. Aparicio, M.P. Ginebra, and J.A. Planell. *Structure and Mechanical properties of bone. In Structural and Biological Materials*. Pergamon, 2000.

-
- [16] A.G. Robling, A.B. Castillo, and C. H. Turner. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Reviews: Biomedical Engineering*, 8:455–498, 2006.
- [17] J.E. Davies and M.M Hosseini. *Bone engineering*. Em Squared Inc, 2000.
- [18] P. Thomsen and L.E. Ericsson. *The bone-biomaterial interface*. University of Toronto Press, 1991.
- [19] J.F. Osborn and H. Newesely. *Dental implants: Materials and Systems. Dynamics aspects of the implant-bone interface*. Carl Hanser Verlag, 1980.
- [20] K.A. Thomas, J.F. Kay, S.D. Cook, and M. Jarcho. The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strength and histologic profiles of titanium implant materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21:1395–1414, 1987.
- [21] A. Wennerberg, A. Ektessabi, T. Albrektsson, C. Johansson, and B. Andersson. A 1-year follow-up of implant of differing surface roughness placed in rabbit bone. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 12:486–494, 1997.
- [22] D.C. Fredericks, J.A. Bobst, and E.B. Petersen et al. Cellular interactions and bone healing responses to a novel porous tricalcium phosphate bone graft material. *Orthopedics*, 27:167–173, 2004.
- [23] L. Lidgren. Bone substitutes. <http://www.karger.com/gazette/65/lidgren/>, 2002.
- [24] K. J. L. Burg, S. Porter, and J. F. Kellam. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 21(23):2347–2359, 2000.
- [25] L.L. Hench and J.M. Polak. Third-generation biomedical materials. *Science*, 295:1014–1017, 2002.
- [26] R. Langer and J.P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, 260:920–926, 1993.
- [27] M.J. Lysaght and A.L. Hazlehurst. Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Engineering*, 10:309–320, 2004.
- [28] <http://www.btec.cmu.edu>.
- [29] M. Bohner, G.H. van Lenthe, S. Grunfelder, W. Hirsiger, R. Evison, and R. Muller. Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials*, 26:6099–6105, 2005.

- [30] D.W. Hutmacher. Scaffolds in tissue engineering: bone and cartilage. *Biomaterials*, 24:2529–2543, 2000.
- [31] M.M. Stevens and J.H. George. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310:1135–1138, 2005.
- [32] M.Navarro. *Desarrollo y Caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya and Barcelona, 2005.
- [33] Y.H. An, S.K Woolf, and R.J. Friedman. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. *Biomaterials*, 21:2635–2652, 2000.
- [34] D. W Green. Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering. *Biomedical Materials*, 3, 2008.
- [35] I. Bonzani, J. H. George, and M. M. Stevens. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10:568–575, 2006.
- [36] I.Y. Kim, S.J. Seo, H.S. Moon, I.Y Park, B.C. Kim, and C.S. Cho. Chitosan and its derivatives for tissue engineerign applications. *Biotechnol Adv.*, 26, 2008.
- [37] J.A. Klugea, O. Rabotyagovaa, G. G. Leiska, and D. L. Kaplana. Spider silks and their applications. *Trends in Biotechnology*, 26:244–251, 2008.
- [38] F. J. Arias, V. Reboto, S. Martín, I. López, and J.C. Rodríguez-Cabello. Tailored recombinant elastin-like polymers for advanced biomedical and nano(bio)technological applications. *Biotechnology Letters*, 28:687–695, 2006.
- [39] L. L. Hench. Bioceramics - from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7):1487–1510, 1991.
- [40] P. Sepulveda, J.R. Jones, and L. L. Hench. Characterization of melt-derived 45S5 and sol-gel-derived 58s bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(6):734–740, 2001.
- [41] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, and L. L. Hench. Optimising the strength of macroporous bioactive glass scaffolds. volume 254-256 of *Key Engineering Materials*, pages 981–984, 2004.
- [42] P. Sepulveda, J. R. Jones, and L. L. Hench. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(2):340–348, 2002.

-
- [43] M. A. Lopes, F. J. Monteiro, J. D. Santos, A. P. Serro, and B. Saramago. Hydrophobicity and surface tension and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(4):370–375, 1999.
- [44] da Prado, A. F. Lemos, I. R. Gibson, J. M. F. Ferreira, and J. D. Santos. Porous glass reinforced hydroxyapatite materials produced with different organic additives. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 304(1-3):286–292, 2002.
- [45] M. Vallet-Regí. Revisiting ceramics for medical applications. *Dalton Trans.*, 44:5211–5220, 2006.
- [46] J. Clement, G. Avila, M. Navarro, S. Martinez, M. P. Ginebra, and J. A. Planell. Chemical durability and mechanical properties of calcium phosphate glasses with the addition of Fe_2O_3 , TiO_2 and ZnO . *Key Engineering Materials*, 192-195:621–624, 2001.
- [47] M. Navarro, M. P. Ginebra, J. Clement, S. Martinez and G. Avila, and J. A. Planell. Physicochemical degradation of titania-stabilized soluble phosphate glasses for medical applications. *Journal of the American Ceramic Society*, 86(8):1345–1352, 2003.
- [48] I. Ahmed, M. Lewis, I. Olsen, and J. C. Knowles. Phosphate glasses for tissue engineering: Part 2. processing and characterisation of a ternary-based"p. 2004.
- [49] J. Vogel, P. Wange, and P. Hartmann. Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glastechnische Berichte-Glass Science and Technology*, 70(7):220–223, 1997.
- [50] M. Navarro, S. del Valle, S. Martínez, S. Zeppetelli, L. Ambrosio, J. A. Planell, and M. P. Ginebra. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. *Biomaterials*, 25:4233–4241, 2004.
- [51] S. V. Dorozhkin and M. Epple. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*, 41:3130–3146, 2002.
- [52] M. Charles-Harris. *Development and Characterisation of Completely Degradable Composite Tissue Engineering Scaffolds*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya and Barcelona, 2007.
- [53] J.S. Sun, F.H. Lin and Y.J. Wang and Y.C. Huang, S.C. Chueh, and F.Y. Hsu. Collagen-hydroxyapatite/tricalcium phosphate microspheres as a delivery system for recombinant human transforming growth factor- β -1. *Artificial Organs*, 27:605–612, 2003.
-

- [54] M. Vallet-Regí, A.J. Salinas, and D. Arcos. From the bioactive glasses to the star gels. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 17:1011–1017, 2006.
- [55] M.P. Ginebra, T. Traykova, and J.A. Planell. Calcium phosphate cements: competitive drug carriers for the musculoskeletal system? *Biomaterials*, 27(10):2171–2177, 2006.
- [56] E. Canalis. *Regulation of Bone Remodeling.In: Primers on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Lippincott-Raven.
- [57] R. O. Huse, Q. Ruhe, J.G.C. Wolke, and J.A. Jansen. The use of porous calcium phosphate scaffolds with transforming growth factor beta i as an onlay bone graft substitute: An experimental study in rats. *Clinical oral implants research*, 15:741–749, 2004.
- [58] P.Q. Ruhé, H.C. Kroese, J.G.C. Wolke, P.H.M Spauwen, and J.A. Jansen. Bone inductive properties of rhbmp-2 loaded porous calcium phosphate cement implant in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*, 25:2123–2132, 2004.
- [59] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. Garcia. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(2):247–259, 2003.
- [60] El Ghannam, P. Ducheyne, M. Risbud, C. S. Adams, I. M. Shapiro, D. Castner, S. Golledge, and R. J. Composto. Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 68(4):615–627, 2004.
- [61] M. Jarcho. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin.Orthop.Relat Res.*, (157):259–278, 1981.
- [62] S.V. Dorozhkin. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. *Journal of Materials Science*, 42:3028–3057, 2008.
- [63] D.Tadic and M. Epple. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*, 25:987–994, 2004.
- [64] G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, and P. Weiss. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(3):195–200, 2003.
- [65] L.C. Chow. Development of self-setting calcium phosphate cements. *Journal of the Ceramic Society of Japan Int. Ed.*, 99:927–936, 1991.

-
- [66] W.E. Brown and L.C. Chow. A new calcium phosphate setting cement. *Journal of Dental Research*, 62:672, 1983.
- [67] M.P. Ginebra. *Calcium Phosphate Bone Cements. In Orthopaedic Bone Cements*. Woodhead Publishing, 2008.
- [68] H. Monma, M. Goto, and T. Komura. Effect of additives on hydration and hardening of tricalcium phosphate. *Gypsum Lime*, 188:11–16, 1984.
- [69] M. P. Ginebra, E. Fernandez, E.A.P. De Maeyer, R. M. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C. Driessens, and J.A. Planell. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research*, 76(4):905–912, 1997.
- [70] K. Ishikawa, S. Takagi, L.C. Chow, Y. Ishikawa, E.D. Eanes, and K. Asaoka. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dental Materials*, 10:26–32, 1994.
- [71] F. Theiss, D. Apelt, B. Brand, A. Kutter, K. Zlinszky, M. Bohner, S. Matter, C. Frei, J.A. Auer, and B. von Rechenberg. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 26:4383–4394, 2005.
- [72] A. Gisepp, R. Wieling, M. Bohner, S. Matter, E. Schneider, and B. Rahn. Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 66A:532–540, 2003.
- [73] B. R. Constantz, B. M. Barr, I. C. Ison, M. T. Fulmer, J. Baker, L. McKinney, S. B. Goodman, S. Gunasekaran, D. C. Delaney, J. Ross, and R. D. Poser. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(4):451–461, 1998.
- [74] M. Bohner, F. Theiss, D. Apelt, W. Hirsiger, R. Houriet, G. Rizzoli, E. Gnos, C. Frei, J. A. Auer, and von Rechenberg. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials*, 24(20):3463–3474, 2003.
- [75] U. Gbureck M. Bohner and J. E. Barralet. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*, 26(33):6423–6429, 2005.
- [76] M.P. Ginebra, F.C. Driessens, and J.A. Planell. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 25(17):3453–3462, 2004.
-

- [77] M.P. Ginebra. *Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-alfa para aplicaciones quirúrgicas*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, 1996.
- [78] S. Takagi and L. C. Chow. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 12(2):135–139, 2001.
- [79] M.P. Ginebra, E. Fernández, F.C.M. Driessens, and J.A. Planell. The effect of Na_2HPO_4 addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. *Bioceramics*, 11:243–246, 1998.
- [80] I. Khairoun, M.G. Boltong, F.C. Driessens, and J. A. Planell. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(8):425–428, 1998.
- [81] M. Bohner, P. van Landuyt, G. Trophardy, H. Merkle, and J. Lemaître. Effect of several additives and their mixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11:111–116, 2000.
- [82] I. Khairoun, F. C. M. Driessens, M.G. Boltong, J.A. Planell, and R. Wenz. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 20(4):393–398, 1999.
- [83] K. Ishikawa, Y. Miyamoto, M. Kon, M. Nagayama, and K. Asaoka. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials*, 16(7):527–532, 1995.
- [84] M. Bohner and G. Baroud. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*, 26(13):1553–1563, 2005.
- [85] E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, and S.M. Best. Production and characterization of new calcium phosphate bone cement in the CaHPO_4 - $\alpha\text{Ca}_3\text{PO}_4$ system: pH, workability and setting times. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 10:223–230, 1999.
- [86] F.C.M. Driessens, E.A.P. De Maeyer, E. Fernández, M.G. Boltong, G. Berger, R.M.H. Verbeeck, M.P. Ginebra, and J.A. Planell. Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. *Bioceramics*, 9:231–234, 1996.
- [87] F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, O. Bermúdez, J.A. Planell, M.P. Ginebra, and E. Fernández. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5:164–170, 1994.

-
- [88] F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, O. Bermúdez, and J.A. Planell. Formulation and setting times of some calcium ortophosphate cements: a pilot study. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 4:503–508, 1993.
- [89] P. Ducheyne and Q. Qiu. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 20(23-24):2287–2303, 1999.
- [90] E. P. Frankenburg, S. A. Goldstein, T. W. Bauer, S. A. Harris, and R. D. Poser. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, 80(8):1112–1124, 1998.
- [91] M.A.K. Liebschner. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25:1697–1714, 2004.
- [92] H.I.Roach, J.R. Shearer, and C.Archer. The choice of an experimental model. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 71-B:549–553, 1989.
- [93] P. Kopylov. *Injectable Calcium Phosphate Bone Substitute In Distal Radial Fractures*. PhD thesis, Lund University Hospital, 2001.
- [94] S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, and F.H. Stelling. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4:433–456, 1970.
- [95] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, and P. Hardouin. Porous ha ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(8):679–682, 2001.
- [96] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M.Neo, T. Kokubo, and T.Nakamura. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-ct based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 27:5892–5900, 2006.
- [97] M.Bohner and F. Baumgart. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials*, 25(17):3569–3582, 2004.
- [98] del Real, E. Ooms, J. G. Wolke, M. Vallet-Regi, and J. A. Jansen. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 65(1):30–36, 2003.
-

- [99] del Real, J. G. C. Wolke, M. Vallet-Regi, and J. A. Jansen. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23(17):3673–3680, 2002.
- [100] B. Bourgeois, O. Laboux, L. Obadia, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Daculsi, and J. M. Bouler. Calcium-deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 65(3):402–408, 2003.
- [101] H.H.K. Xu, J.B. Quinn, S. Takagi, L.C. Chow, and F.C. Eichmiller. Strong and macroporous calcium phosphate cement: effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57:457–466, 2001.
- [102] H. H. Xu and C. G. Simon Jr. Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: reinforcement and macropores and cell response. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 69(2):267–278, 2004.
- [103] H. H. Xu, M. D. Weir, E. F. Burguera, and A. M. Fraser. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*, 27(24):4279–4287, 2006.
- [104] M. Bohner. Calcium phosphate emulsions: possible applications. *Key Engineering Materials*, 192-195:765–768, 2001.
- [105] A. Almirall, G. Larrecq, J. A. Delgado, S. Martinez, M. P. Ginebra, and J. A. Planell. Fabrication of low temperature hydroxyapatite foams. *Bioceramics, Vol 16*, 254-2:1001–1004, 2004.
- [106] S. Sarda, M. Nilsson, M. Balcells, and E. Fernandez. Influence of surfactant molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65A(2):215–221, 2003.
- [107] M.P. Ginebra, J.A. Delgado, A. Almirall, I. Harr, S. del Valle, and J.A. Planell. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(2):351–361, 2007.
- [108] A. Almirall. *Desarrollo y Caracterización de Cementos Óseos Macroporosos de Fosfato de Calcio*. PhD thesis, Instituto Superior Politécnico Jose Antonio Echevarría, La Habana, 2006.
- [109] A. Curtis and C. Wilkinson. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18:1573–1583, 1997.

-
- [110] M.J.Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, and R.O.C. Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 2007.
- [111] M. Bigerelle and K. Anselme. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 72A(1):36–46, 2005.
- [112] M. Lampin, R. WarocquierClerout, C. Legris, M. Degrange, and M. F. SigotLuizard. Correlation between substratum roughness and wettability and cell adhesion and cell migration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(1):99–108, 1997.
- [113] K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21:667–681, 2000.
- [114] C. Aparicio, F. J. Gil, J. A. Planell, and E. Engel. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(12):1105–1111, 2002.
- [115] M. Bächle and R.J. Kohal. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation and differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG-63 cells. *Clinical Oral Implant Research*, 15:683–692, 2004.
- [116] C.Aparicio. *Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya and Barcelona, 2004.
- [117] B.D. Boyan and Z. Schwartz. *Bone engineering*. Em Squared Inc, 2000.
- [118] P. Habibovic, H. Yuan, C. van der Valk, Gert Meijer, C.van Blitterswijk, and K. De Groot. 3d microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26(17):3565–3575, 2005.
- [119] H. Yuan, K. Kurashina, J.D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, and X. Zhang. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20(19):1799–1806, 1999.
- [120] Thomas A. Horbett. The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(1-3):225–240, 1994.
- [121] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):475–483, 2000.
-

- [122] C. Combes and C. Rey. Adsorption of proteins and calcium phosphate materials bioactivity. *Biomaterials*, 23:2817–2823.
- [123] T. Kawasaki. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *Journal of Chromatography*, 544:147–184, 1991.
- [124] E. Engel, S. del Valle, C. Aparicio, G. Altankov, L. Asin, J.A. Planell, and M.P. Ginebra. Discerning the role of topography and ion exchange in cell response of bioactive tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering Part A*, 14:1341–1351, 2008.

Capítulo 2

Caracterización superficial

2.1. Introducción

Cuando un biomaterial es implantado en el organismo, se adhiere sobre él una capa de agua en cuestión de nanosegundos. Posteriormente se adhieren proteínas y otras moléculas. De tal forma que antes que ocurra ninguna interacción entre las células y el material, su superficie puede estar recubierta con un amplio espectro de proteínas y otras moléculas [1].

La relación que se establece entre un tejido biológico y un implante médico se genera por lo tanto a través de las capas más externas del material implantado. De igual forma ocurre *in vitro*.

Es por ello, que la caracterización de las propiedades físico-químicas de la superficie de un biomaterial o implante es de vital importancia para poder entender la respuesta biológica del mismo. Los factores que afectan las interacciones biológicas son la topografía, la química, la energía superficial, el intercambio iónico entre la superficie del material y el entorno así como la transferencia de carga.

En la actualidad, parte importante de la investigación en biomateriales está enfocada a la mejora de las propiedades superficiales de biomateriales ya existentes. Estos biomateriales pueden poseer por ejemplo propiedades mecánicas adecuadas a su aplicación, pero se busca mejorar su respuesta biológica mediante la modificación de las propiedades superficiales. El objetivo es que las células puedan reconocer la superficie del material buscando así una respuesta biológica determinada. Un claro ejemplo, serían los implantes de titanio bioactivos, donde se mejora la osteointegración al precipitar *in vivo* de forma íntima una capa de apatita sobre la superficie del titanio [2, 3].

La influencia de la topografía, especialmente en implantes óseos, su cuantificación así como su influencia en el comportamiento celular ha sido y continúa siendo extensamente estudiada. Los trabajos citados a continuación son sólo algunos ejemplos [4–8].

Una ilustración de como afecta la topografía al comportamiento celular puede verse en la Figura 2.1. La caracterización topográfica cubre un

amplio rango de escala: desde el nanómetro hasta el milímetro. Defectos laterales y verticales mayores de $100\mu\text{m}$ son importantes por ejemplo para la estabilización mecánica del implante ya que proveen puntos de anclaje para el tejido óseo [2]. Defectos verticales y laterales en el rango de 1 a $100\mu\text{m}$ influyen la formación ósea, la polaridad, la adhesión y la morfología celular [9–11]. El rango de defectos inferiores a $1\mu\text{m}$ tiene gran influencia en las adhesiones focales, en la organización del citoesqueleto celular afectando al mismo tiempo a la adhesión, morfología y orientación celular [9, 12]. Rangos por debajo de los 100nm afectan a la adhesión de proteínas [13, 14].

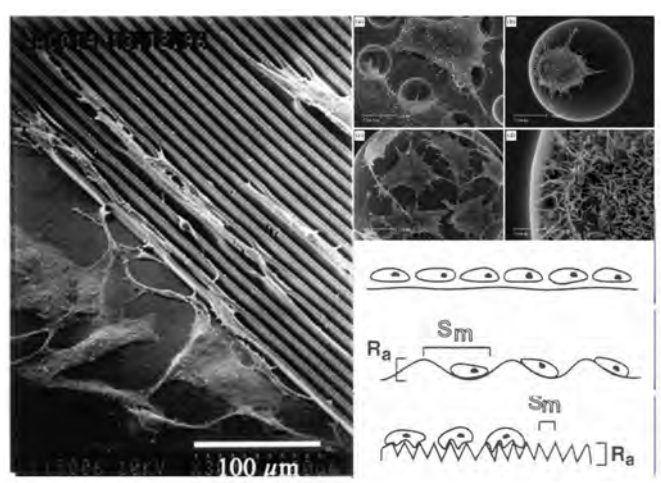


Figura 2.1: Influencia de la topografía en la adhesión celular. Imagen Izquierda [15] Imagen Superior Derecha [6] Imagen Inferior Derecha [16]

En el mismo sentido juega la química de la superficie y su influencia en la mojabilidad de los implantes, como muestran los trabajos de Altankov *et al.* [15, 17]. La química de la superficie no sólo afecta a la cantidad de proteína adsorbida, sino que puede inducir cambios conformacionales que bien no permitan la manipulación posterior de la proteína por parte de la célula evitando que la célula construya un entorno que le es viable o que inactive parcialmente partes de las proteínas muy activas en la adhesión celular como la secuencia RGD en el caso de la fibronectina [18].

Es por ello que cambios en el comportamiento celular entre materiales muy similares pueden ser debidos a pequeños cambios superficiales que son de vital importancia en el comportamiento biológico.

En este capítulo se detalla la caracterización de las superficies objeto de estudio. La adsorción de proteínas sobre estas superficies y el comportamiento celular *in vitro* son estudiados en capítulos posteriores.

2.2. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es la obtención y la caracterización físico-química de dos sustratos de hidroxiapatita deficiente en calcio con diferentes características microestructurales. Dichos sustratos se obtienen a partir de un cemento de fosfato de calcio (CPC), compuesto principalmente por fosfato tricálcico en fase α (α -TCP), variando el tamaño de partícula del polvo inicial de cemento. Los sustratos obtenidos se caracterizarán en términos de estructura cristalográfica, porosidad, microestructura, topografía superficial y mojabilidad. En capítulos posteriores se evaluará la interacción biológica de los sustratos obtenidos

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Obtención del α -TCP

El Fosfato Tricálcico en fase α (α -TCP), principal componente del cemento usado en este trabajo, se obtiene mediante una reacción en estado sólido a partir de Carbonato de Calcio, $CaCO_3$ (Sigma, Ref. C-4830) e Hidrógeno Fosfato de Calcio, $CaHPO_4$ (DCP, Sigma, Ref. C-7263). Estos reactivos se mezclan estequiométricamente según la reacción:



La mezcla de ambos componentes es homogeneizada en un molino y posteriormente colocada en un crisol de Platino-Rodio. La reacción en estado sólido se lleva a cabo en un Horno de Mufla (HOBERSAL CRN-HS). El ciclo térmico aplicado es descrito a continuación:

1. Rampa de calentamiento hasta 300°C, a una velocidad de 2,5 °C/min.
2. Mantenimiento de la temperatura a 300°C durante 2h.
3. Rampa de calentamiento hasta 1100°C a 2,5°C/min.
4. Mantenimiento de la temperatura a 1100°C durante 2 horas para que la reacción 2.1 tenga lugar, obteniéndose a esta temperatura β -TCP.
5. Rampa de calentamiento hasta 1400°C a 2,5°C/min.
6. Mantenimiento de la temperatura a 1400°C durante 2 horas para estabilizar la fase α .
7. Temple en aire para mantener la estructura cristalina monoclinica del α -TCP.

Después del temple, se analiza mediante difracción de Rayos-X la pureza del polvo de α -TCP obtenido.

Molido del α -TCP

El α -TCP es entonces reducido a polvo en un molino centrífugo de bolas, modelo Pulverisette 6, (Fritsch GmbH). Para ello, el α -TCP se coloca en un recipiente de ágata con una capacidad de 500 ml y la molienda se realiza mediante bolas de ágata. El primer paso es una premolienda, en la cual aproximadamente 45 g de α -TCP son introducidos en el recipiente de ágata junto a 4 bolas de $\varnothing=30$ mm y 8 bolas de $\varnothing=10$ mm, a 490 rpm durante 20 min. El objetivo de este primer paso es homogeneizar las partículas de tamaño diverso de α -TCP obtenidas durante el temple a un polvo fino más homogéneo.

El segundo paso es la molienda propiamente dicha. En esta tesis, se establecieron dos protocolos de molienda dando como resultado dos distribuciones de tamaño de partícula diferentes. Así, hablaremos de los CPC

obtenidos con ambos protocolos de molienda como *Tamaño de Partícula Grueso* (TP Grueso) y *Tamaño de Partícula Fino* (TP Fino). Las condiciones de molienda para obtener estos dos tamaños de partícula son detallados a continuación.

- Tamaño de Partícula Grueso:
 - velocidad: 605 rpm
 - 4 bolas de $\varnothing=30$ mm durante 30 min
 - 8 bolas de $\varnothing=10$ mm durante 30 min
- Tamaño de Partícula Fino:
 - velocidad: 650 rpm
 - 4 bolas $\varnothing=30$ mm durante 3 h
 - 8 bolas $\varnothing=10$ mm durante 3 h

2.3.2. Cemento H

El cemento H consiste en una mezcla homogénea de α -TCP con un 2% en peso de Hidroxiapatita Precipitada (Merck, Re. 2143) utilizada como semilla.

Este cemento ha sido estudiado en la literatura [19–22]. Se conoce la influencia de diversos parámetros de preparación (tamaño de partícula, relación L/P, uso de Na_2HPO_4 como acelerante, temperatura, etc.) en las propiedades del mismo (características del fraguado y endurecimiento, propiedades mecánicas, inyectabilidad, etc.). También se ha estudiado la reacción de hidrólisis del α -TCP que permite el fraguado del cemento H:



En esta parte de la tesis se caracteriza la influencia del tamaño de partícula inicial del cemento (TP Grueso o TP Fino) en la topografía y en las propiedades superficiales para evaluar en los dos capítulos siguientes su influencia en la adsorción de proteínas (Capítulo 3) y en el comportamiento celular *in vitro* (Capítulo 4). Para ello, se ha utilizado la formulación más sencilla posible del Cemento H, utilizando únicamente agua destilada como fase líquida y una relación líquido-polvo de 0,35 ml/g. No fue añadido ningún tipo de acelerante o agente de cohesión a las muestras.

2.3.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras utilizadas fueron discos de diámetro de 15mm y un espesor de 2mm. Para su preparación se recurrió a unos moldes desmontables de teflón. La cara estudiada fue la cara inferior que estuvo en contacto con el teflón. Esto se hizo para asegurar que la rugosidad inducida en las muestras

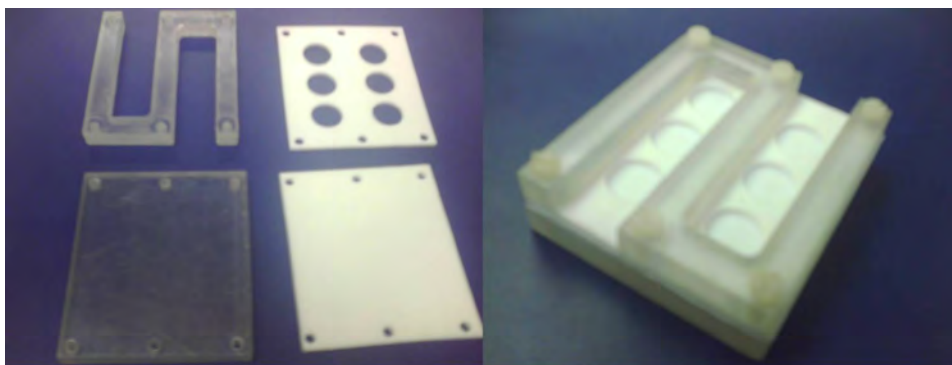


Figura 2.2: Fotografía de los moldes de Teflón usados para fabricar los discos usados en este estudio

era debida principalmente al cemento, y que no se introducían defectos en la superficie que pudiera afectar a los experimentos tanto de esta parte como del estudio *in vitro*, al asegurar así una cara relativamente plana.

La Figura 2.2 muestra una imagen de los moldes usados. Las placas de metacrilato que aparecen en la imagen servían para evitar que el cemento fluyera entre las placas de teflón al ejercer presión sobre ellas.

El cemento se preparó mezclando con la ayuda de una espátula la fase en polvo con la fase líquida hasta conseguir una pasta homogénea. Las muestras fueron incubadas en Solución de Ringers (0,9 g/l de NaCl) durante siete días a 37°C. Una vez completada la reacción de fraguado, las muestras fueron desmoldeadas sin tocar o ejercer presión en la cara en contacto con el molde. Se lavaron las muestras sumergiéndolas en agua destilada y se dejaron secar en un incubador a 37°C. Una vez secas, las muestras se guardaron hasta su utilización.

2.3.3. Granulometría: Difracción Láser

Se determinó la distribución de tamaños de partícula del α -TCP utilizado como componente principal de la fase en polvo del cemento por medio de la técnica de difracción láser, en un analizador de tamaño de partículas Beckman Coulter LS. Para el análisis, las muestras en polvo fueron dispersadas en etanol durante 5 min en un baño ultrasónico.

2.3.4. Superficie específica

La superficie específica (m^2/g) se determinó mediante adsorción de nitrógeno siguiendo el método de Brunnauer–Emmet–Teller (BET). El equipo utilizado fue ASAP 2020 Micromeritics. Se basa en la adsorción de un gas inerte a baja temperatura sobre una superficie sólida hasta formar una monocapa de moléculas del gas sobre la superficie del sólido, conociendo el tamaño de una molécula del gas es posible determinar la superficie ocupada por la monocapa.

Para la determinación de la superficie específica, es necesario pretratar las muestras sólidas para eliminar los contaminantes adsorbidos debidos a la exposición atmosférica. Esto se consigue mediante la aplicación de calor, vacío y/o la aplicación de una corriente de gas. Una vez la muestra ha sido pretatada, ésta es sometida en vacío a temperaturas criogénicas para poder realizar la adsorción de nitrógeno.

2.3.5. Difracción de Rayos X

La identificación de fases en el α -TCP de partida y en el cemento una vez fraguado, se realizó mediante difracción de rayos X (DRX). El equipo utilizado fue un difractómetro de geometría Bragg-Brentano $\theta/2\theta$ Siemens D-500 con radiación $\text{CuK}\alpha$.

Para la identificación de las fases y la indexación de los picos se utilizaron las fichas cristalográficas del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS). Para el α -TCP se utilizó la ficha JCPDS-09-348, para el β -TCP la JCPDS-09-169 y para la hidroxiapatita la JCPDS-09-432.

Se molieron las muestras a mano en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino y homogéneo para poder realizar el ensayo de Difracción de Rayos X.

2.3.6. Espectroscopía de Infrarrojos

La espectroscopia de infrarrojos permite el estudio de las vibraciones moleculares cuando se produce una interacción de la radiación electromagnética con la materia. La información que da el espectro infrarrojo es característica de la sustancia analizada, proporcionando información específica sobre la química y la orientación de las estructuras químicas. Por lo tanto permite caracterizar sustancias con un cierto grado de especificidad. El espectro infrarrojo se divide en tres regiones diferentes: el infrarrojo cercano entre 0,75 y 2,5 micras ($13330\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), el infrarrojo medio de 2,5 a 25 micras ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo lejano de 25 a 1000 micras ($400\text{-}10\text{ cm}^{-1}$).

Las muestras analizadas fueron los cementos de ambas granulometrías después de la reacción de fraguado para analizar la estructura de la apatita deficiente en calcio producto de la reacción de fraguado.

El equipo utilizado fue un espectrómetro de infrarrojos por Transformada de Fourier Bomem MB-120, con un rango de trabajo de 350 a 4500 cm^{-1} y una resolución de 1cm^{-1} .

La preparación de las muestras consistió en raspar con sumo cuidado la superficie de las muestras para intentar obtener los cristales más superficiales. Posteriormente, se prepararon las muestras para medidas de intensidad de IR transmitida. El polvo raspado fue suspendido en un medio transparente a los IR como es el bromuro de potasio (KBr). La mezcla fue colocada en un troquel especial y se aplicó una presión de 700 a 1000 kg/cm^2 . Como patrón, se utilizó una muestra de KBr puro preparado en las mismas condiciones.

2.3.7. Porosimetría de intrusión de mercurio

Para la determinación de la porosidad por intrusión de mercurio se utilizó un porosímetro Micromeritics Autopore IV 9500. El rango de tamaño de entrada de poro que este equipo puede medir está entre 350 y 0,003 μm . El funcionamiento básico del porosímetro de mercurio se basa en la baja mojabilidad del mercurio sobre la mayoría de sustancias. El mercurio no penetra por acción capilar en el interior de los poros de un material, se ha de ejercer presión para que ello ocurra. La ecuación de Washburn (ecuación 2.3) relaciona la presión aplicada con el diámetro del capilar o del poro en el cual el mercurio es forzado a penetrar [23]:

$$D = \frac{-4\gamma \cos\theta}{P} \quad (2.3)$$

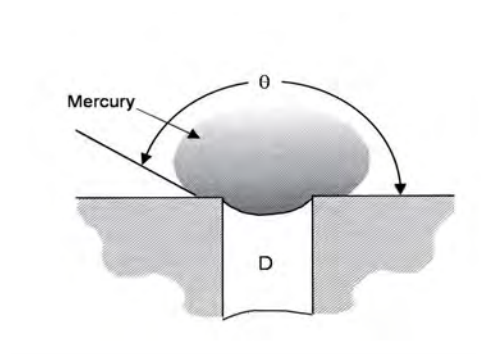


Figura 2.3: Mercurio en contacto con un poro

Para un determinado sistema líquido-sólido, el numerador de la ecuación 2.3 es constante. El tamaño de poro por lo tanto es inversamente proporcional a la presión aplicada. La información que nos proporciona el porosímetro de mercurio es la densidad aparente de la muestra y la distribución de tamaño de entrada de los poros.

En los análisis realizados, se ha utilizado para los cálculos una tensión superficial del mercurio de 485 dyne/cm y un ángulo de contacto de 130° y $\rho_{Hg} = 13,5335g \cdot cm^{-3}$. El rango de presiones va de 100 Pa a 200 MPa (0,015-30000 psia). El tiempo de equilibrado entre presiones fue de 30s. Se introdujeron un mínimo de 2 muestras en cada análisis. Se realizaron dos ensayos por tipo de muestra.

2.3.8. Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de la superficie del cemento en contacto con el teflón y el interior de las muestras fue analizada por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para observar la morfología de la superficie y del interior. Se usaron dos equipos distintos para la observación de la morfología un Jeol

JSM-6400 y un microscopio electrónico de barrido de alta resolución (HR-SEM), Strata DB235 fabricado por FEI.

Las muestras que fueron observadas en el microscopio Jeol fueron recubiertas por una fina capa de oro para asegurar una buena conductividad. En el caso de las muestras observadas en el HR-SEM esto no fue necesario, ya que es posible aplicar voltajes muy bajos, lo que permite la observación de las muestras sin necesidad de recubrirlas.

2.3.9. Estudio de la Rugosidad

Existen tres problemas fundamentalmente cuando se mide la topografía:

-La medida experimental de topografías en todo el rango de interés: este rango puede ir desde los nanómetros hasta los milímetros en una misma muestra. Es difícil que una sola técnica pueda cubrir todo el rango de interés, es por ello que la combinación de técnicas puede aportar la información buscada.

-Los perfiles 2-D de una superficie, aunque son más fáciles de analizar, no reflejan adecuadamente las propiedades de la superficie a nivel tecnológico. Así por ejemplo en tribología una superficie caracterizada por la presencia de poros o agujeros aumenta la lubricación al retener aceite. Así una medida 3D por ejemplo puede recoger de mejor forma este hecho.

-La evaluación de los datos topográficos en simples parámetros de amplitud como R_a o R_q no reflejan tampoco las características de una superficie. Así superficies muy diferentes entre sí pueden tener el mismo R_a . La superposición de rugosidades a diferentes escalas también puede quedar enmascarada por la contribución de los defectos de mayor tamaño a los parámetros de amplitud. Bajo este último aspecto radica también el análisis de una superficie descomponiéndola en sus componentes de frecuencia.

2.3.9.1. Interferometría óptica

La microscopía óptica interferométrica se basa en las interferencias obtenidas a partir de las diferencias de camino óptico entre la luz reflejada en la superficie de la muestra y de la luz reflejada en una superficie de referencia. La forma de las franjas obtenidas puede ser usada para determinar la topografía de la superficie. En la Figura 2.4 se muestra el esquema de un microscopio óptico interferométrico estándar.

Una fuente de iluminación, en este caso una bombilla de halógeno de tungsteno, está unida a un sistema óptico con diferentes objetivos interferométricos. La selección del objetivo depende de la superficie de la muestra y del tamaño de los defectos a observar. La luz se divide en dos haces, uno es transmitido a la superficie de la muestra y el otro a una superficie de referencia. La luz reflejada en ambas superficies se recombina y forman un dibujo de franjas de interferencia (ver Figura 2.5), la intensidad del cual es

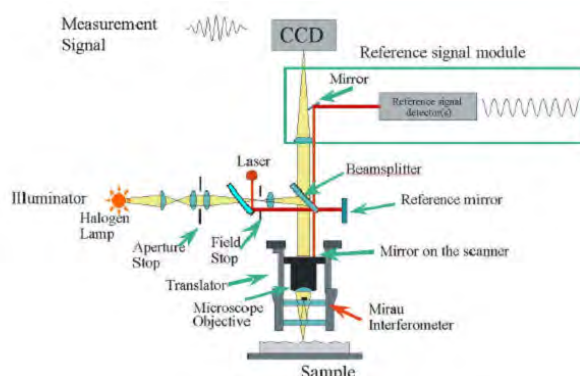


Figura 2.4: Esquema de un Interferómetro [24]

registrada por una cámara CCD. La poca coherencia de la luz blanca hace que se reciba un máximo de luz para aquellos puntos a la misma distancia que la superficie de referencia. En el método VSI (Vertical Scanning Interferometry), el microscopio se mueve en el eje vertical, comparando a cada altura la luz reflejada en la muestra y en la superficie de referencia, registrando los datos de la intensidad. Estos datos son posteriormente analizados por el software del equipo para determinar la altura de cada punto de la superficie devolviendo una imagen tridimensional de la superficie analizada.

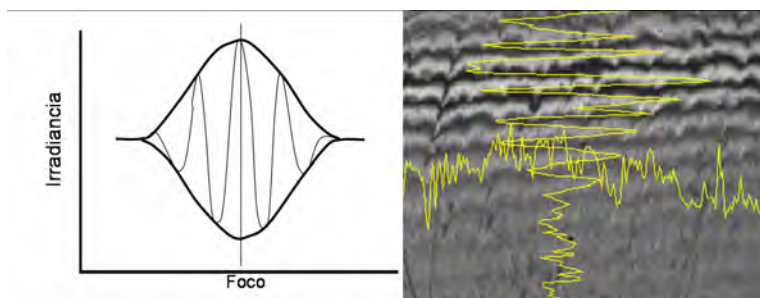


Figura 2.5: Imagen Derecha: Ilustración del concepto de coherencia de la luz en torno del punto de foco. Imagen derecha: Franjas de interferencia sobre una muestra.

El microscopio óptico interferométrico utilizado fue un WYKO NT1100 (Veeco). Este equipo puede alcanzar resoluciones laterales de hasta 400nm. La resolución máxima en altura (z) es de 1 nm. Es útil para la observación y medida cuantitativa de perfiles de muestras relativamente grandes que quedan fuera del rango del microscopio de fuerzas atómicas (AFM) pero que son posibles de medir mediante microscopía óptica, dado que este tipo de microscopía incrementa la profundidad de campo que normalmente tiene un microscopio óptico al poder moverse en el eje vertical. Su software, además, permite obtener perfiles de las diferentes secciones de la muestra observada.

El método de medición utilizado fue el VSI (Vertical Scanning Interferometry) con un objetivo de 50 aumentos, que proporciona una área

de escaneado de $124 \times 96 \mu\text{m}^2$. El equipo también puede medir en modo PSI (Phase Shift Interferometry), aunque es un método utilizado para muestras muy lisas que no es el caso estudiado en la presente tesis. Se midieron 5 pastillas de cada granulometría realizando una media de 5 medidas en cada una.

2.3.9.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas

El microscopio de fuerzas atómicas (AFM) consiste básicamente en una micropalanca con una punta de un tamaño en el orden de los nanómetros (ver Figura 2.6). La punta al aproximarse a una superficie sufre una flexión, siguiendo la ley de Hooke, debido a las fuerzas de interacción atómica tanto atractivas como repulsivas, generadas entre la superficie y la punta. La magnitud de las fuerzas está en el rango de 10^{-7} - 10^{-9} N. El movimiento de flexión es registrado por un haz láser consiguiendo de esta forma registrar la deformación de la punta que al moverse sobre una superficie permite obtener la topografía de la misma. La punta está situada sobre una plataforma equipada con cristales piezoeléctricos que permiten controlar el desplazamiento en z para evitar que la punta choque con la superficie y en (x,y) para que pueda escánear la superficie.

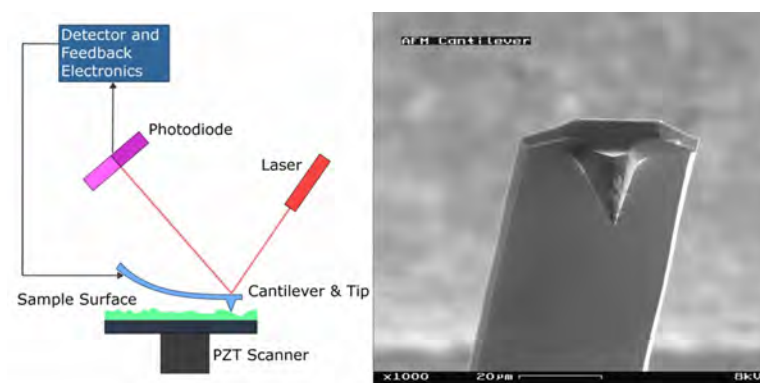


Figura 2.6: Imagen izquierda: Esquema del movimiento de flexión de una punta de AFM. Imagen derecha: Punta de AFM observada por microscopía electrónica de barrido. [25]

El valor de la fuerza de interacción depende de la distancia entre la punta (normalmente de silicio o de nitruro de silicio) y la superficie, lo que permite obtener, tanto en materiales conductores como aislantes, mapas de la topografía superficial con una resolución prácticamente atómica bajo ciertas condiciones (resolución vertical máxima de 1 \AA , resolución lateral máxima de 50 \AA). Estas fuerzas de interacción entre la punta y la muestra pueden ser de los siguientes tipos:

- Fuerzas repulsivas de corto alcance (distancia $\sim 0.1 \text{ nm}$), son consecuencia de la interacción entre las nubes electrónicas de los átomos de la punta y la muestra.

- Fuerzas de largo alcance (distancia ~ 1 nm) son debidas a fuerzas de Van der Waals (atractivas) o a fuerzas eléctricas, magnéticas (atractivas o repulsivas) entre otras.

Dado que estas fuerzas no dependen de la naturaleza de la muestra, la técnica es aplicable a prácticamente todos los materiales sin necesidad de preparación previa. Los microscopios de fuerza atómica pueden trabajar en dos modos: modo de contacto y modo de no contacto. Mientras que el modo de contacto trabaja con la punta situada a 0,1 a 0,3 nm de la superficie de la muestra y se basa en las fuerzas de repulsión, el modo de no contacto trabaja a distancias entre 1 y 2 nm, donde predominan las fuerzas de atracción. La variación de estas fuerzas al escanear la superficie y reseguir la topografía provoca la deformación de la micropalanca y permite así obtener la imagen de la superficie.

Sin embargo, los microscopios de fuerza atómica comerciales utilizan habitualmente el contacto intermitente, en el cual la palanca y la punta se hacen oscilar con una amplitud de unos 100nm provocando un contacto intermitente entre la muestra y la punta. Esta variante del método pretende aprovechar la mejor resolución que presenta trabajar en modo contacto, evitando las fuerzas de fricción que aparecen entre la punta y la muestra.

Las medidas se realizaron en un microscopio Multimode Extended equipado con el software de control Nanoscope IIIA (Digital Instruments) y en un microscopio Multimode Extended equipado con el software de control Nanoscope IV (Digital Instruments). Se analizaron tres muestras de ambas granulometrías de 16mm de diámetro. Las áreas escaneadas fueron de 1×1 , 5×5 y $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. Las medidas se hicieron con una punta de Si con una fuerza entre 35-64 N/m en modo tapping al aire. La velocidad de barrido fue de 1600 Hz.

La microscopía de fuerzas atómicas tiende a curvar la superficie y por ello es necesario realizar un aplanado ("flatten") de las áreas de barrido de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ se hizo un aplanado de grado 2 y para las de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ un aplanado de grado 1. La manipulación de las imágenes se hizo con el software Nanoscope 5.12r5. La naturaleza de las puntas de AFM impiden el escaneado de superficies muy verticales o con cambios bruscos de altura, al mismo tiempo que limita el rango vertical de escaneado a unos pocos micrómetros ($< 5 \mu\text{m}$).

2.3.9.3. Parámetros de Rugosidad estudiados

Para la comparación cuantitativa de superficies es necesario proporcionar una serie de parámetros que permitan establecer valores y/o argumentos en base los cuales poder discutir. Esto es necesario tanto para la comparación del mismo tipo de superficie que ha sufrido diferentes procesos, por ejemplo de desgaste, como para superficies totalmente distintas entre sí. Existen multitud de parámetros en la literatura científica, así como en las normativas

vigentes. Sin embargo como norma general es necesario proporcionar uno o varios parámetros de descripción vertical (altura) y distribución horizontal (espaciado) de los defectos o sucesos de una superficie, las condiciones de medida y los filtros o variables utilizados en el cálculo de los parámetros.

La utilización de técnicas como la interferometría óptica y el microscopio de fuerzas atómicas permite obtener perfiles 3D de la superficie y por lo tanto el cálculo de parámetros tridimensionales. El software Vision 32 del interferómetro permite también la descomposición de la superficie en perfiles 2D, permitiendo el cálculo de parámetros bidimensionales.

A continuación se describen los parámetros de rugosidad usados en este estudio.

a) Parámetros de altura

- S_a (Media aritmética de la desviación de la superficie): es el equivalente tridimensional al parámetro R_a , habitualmente usado para cuantificar de forma general la rugosidad de una superficie. Representa la media aritmética del valor absoluto de las distancias del plano medio al perfil de la muestra. El plano medio es un plano de referencia para el cálculo de los distintos parámetros, que se determina por el método de los mínimos cuadrados respecto a la superficie total.

$$S_a = \frac{1}{MN} \cdot \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta(x_i, y_i) \quad (2.4)$$

- S_q (Media de la raíz cuadrada de las desviaciones de la superficie): es un parámetro de altitud ampliamente usado ya que tiene un significado estadístico al representar la desviación estándar de la distribución de alturas respecto a la superficie. Este parámetro es más sensible a los valores extremos que S_a debido a la operación cuadrática.

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{MN} \cdot \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta^2(x_i, y_i)} \quad (2.5)$$

- S_z (Altura de los diez puntos de una superficie): es un parámetro de altitud con cierto carácter extremo ya que representa el valor medio de los cinco picos más altos (h_{pi}) y de los cinco valles más profundos (h_{vi}) medidos sobre toda la superficie analizada. La definición de pico y valle 3D difiere con respecto a su definición 2D. En este caso un valle es un punto situado por debajo de sus 8 vecinos más próximos. La distancia entre picos y valles está restringida de tal forma que han de estar separados como mínimo un 1% en "x" e "y" respecto a la dimensión de la superficie medida.

$$S_z = \frac{\sum_{i=1}^5 |h_{pi}| + \sum_{i=1}^5 |h_{vi}|}{5} \quad (2.6)$$

b) Parámetros de espaciado horizontal

- S_m (Distancia principal entre picos): en este caso se ha calculado usando la definición 2D del parámetro. Es la distancia media entre picos a lo largo de la longitud de medida. En este caso un pico es definido como el punto más alto del perfil que atraviesa tanto en la subida como en la bajada la línea del plano medio.

$$S_m = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N S_i \quad (2.7)$$

- P_c (Número de picos por unidad de longitud): es otro parámetro 2D. Representa el número de pares pico-valle (ciclo) por unidad de longitud a lo largo de la línea del perfil dentro de la longitud de muestra. Para el cálculo de este parámetro es necesario establecer dos líneas paralelas de medición, una por encima y otra por debajo del perfil de referencia. En nuestro caso se estableció a una distancia equivalente a S_a . En función de donde se establezcan las líneas de medición, el valor de este parámetro variará. Para que un par pico-valle sea contado como tal es necesario que el pico y el valle estén respectivamente por encima y por debajo de las líneas de medición.

$$P_c = \frac{N}{L} \quad (2.8)$$

- L_{den} (Densidad lineal): es el número de veces que se “cruza el cero” por unidad de longitud calculada sobre el eje central de las X y el eje central de las Y. Un punto que cruza el cero es un punto donde el valor de Z pasa a través del cero independientemente de la pendiente. Este parámetro sólo es referenciado para los valores de rugosidad medidos por el AFM a través del software Nanoscope 5.12r5.

c) Parámetros estadísticos

- S_{sk} (skewness): es un parámetro estadístico que evalúa la asimetría de las desviaciones de la superficie con respecto al plano medio. Este parámetro describe la forma de la distribución de alturas de la superficie. Para una superficie con una distribución gaussiana de las alturas, su valor es 0. Si el valor es <0 indica un predominio de valles y si el valor es >0 indica un predominio de picos.

$$S_{sk} = \frac{1}{nS_q^3} \cdot \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta^3(x_i, y_i) \quad (2.9)$$

- S_{ku} (kurtosis): es otro parámetro estadístico que evalúa lo afilado de la distribución de alturas de la superficie con respecto al plano medio. Una superficie gaussiana tiene una kurtosis de 3. Una superficie con predominancia de defectos (picos o valles) puntiagudos y bruscos tiene un valor de la kurtosis >3 . Una superficie con alternancia de picos y valles de forma progresiva tiene un valor de la kurtosis <3 . Define por lo tanto si una superficie se caracteriza por defectos con carácter local $S_{ku} > 3$ o si existe un patrón geométrico $S_{ku} < 3$.

$$S_{ku} = \frac{1}{MNS_q^4} \cdot \sum_{j=1}^N \sum_{i=1}^M \eta^4(x_i, y_i) \quad (2.10)$$

d) S_{in} (Índice de superficie real/área proyectada): es el cociente entre la superficie real incluyendo los valles y picos dividido para el área de escaneado o el área proyectada.

$$S_{in} = \frac{S_{real}}{S_{proyectada}} \quad (2.11)$$

En el estudio de interferometría óptica se han utilizado $S_a, S_q, S_z, S_m, P_c, S_{in}, S_{sk}$ y S_{sku} . En el estudio de microscopía fuerzas atómicas se han utilizado : $S_a, S_q, L_{den}, S_{in}, S_{sk}$ y S_{sku}

2.3.9.4. Filtros de Fourier

El primer paso en el análisis de la rugosidad es filtrar los datos adquiridos para eliminar las frecuencias más altas atribuidas a defectos ópticos en el caso de la interferometría óptica o a vibraciones en el caso de la perfilometría que pueden falsear los datos obtenidos. El siguiente paso es separar la topografía en sus tres componentes: rugosidad, ondulación y forma. La Figura 2.7 ilustra estos tres conceptos. Esto puede ser llevado a cabo mediante el uso de líneas de referencia, métodos envolventes, filtros digitales y fractales entre otros. Después del filtrado, se cuantifica la rugosidad mediante el uso de diferentes parámetros [26, 27].

La transformada de Fourier es considerada la mejor técnica para poder analizar y caracterizar una superficie después de haber obtenido un perfil de rugosidad [26]. La transformada de Fourier es una operación bien conocida y disponible en muchos aparatos. Se basa en la descomposición de una función, en este caso un perfil 2-D o 3-D en un sumatorio de funciones sinusoidales. En la ecuación 2.12 se muestra la fórmula general de la transformada de Fourier de un perfil 2-D.

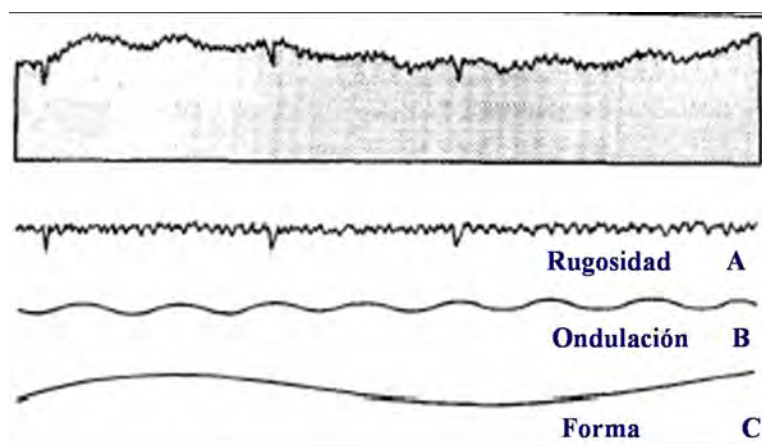


Figura 2.7: Perfil de una superficie y separación de la misma en sus tres componentes: Forma, ondulación y rugosidad [27].

$$f(x/L) = \frac{A_0}{2} + \sum_{n=1}^{N/2} [A_n \sin(f_n \frac{x}{L}) + B_n \cos(f_n \frac{x}{L})] \quad (2.12)$$

Los filtros digitales de Fourier permiten suprimir selectivamente componentes de frecuencia debidas al ruido o seleccionar aquellas componentes que interese estudiar. El uso de Filtros de Fourier elimina las frecuencias indeseadas sin alterar el resto de datos al contrario por ejemplo de los filtros de suavizado que alteran el valor en un punto en función de los puntos de alrededor. Existen tres tipos de filtros:

-Filtro Pasa-Bajos: Elimina las componentes de frecuencia por encima de la frecuencia de corte. Este tipo de filtros se caracteriza por poner en relieve los defectos de mayor tamaño.

-Filtro Pasa-Altos: Elimina las componentes frecuenciales por debajo de la frecuencia de corte. Este tipo de filtros se caracteriza por acentuar los aspectos de la rugosidad eliminando los aspectos de forma.

-Filtro Pasa-Banda: Solo permite ver las componentes de frecuencia situadas entre dos frecuencia determinadas que actúan como límites.

La Figura 2.8 muestra la aplicación de los distintos de filtros existentes. El perfil *a* está compuesto de los perfiles *b*, *c*, *d* y *e*. En estos perfiles, la frecuencia disminuye a medida que vamos pasando de *b* a *e*. Así, la aplicación de un filtro Pasa-Bajos filtra las frecuencias altas dejando únicamente las frecuencias bajas. La aplicación de un filtro Pasa-Altos realiza justamente lo contrario. En el caso de un filtro Pasa-Banda nos deja ver la suma de los perfiles individuales, en este caso la suma de *c* y *d*

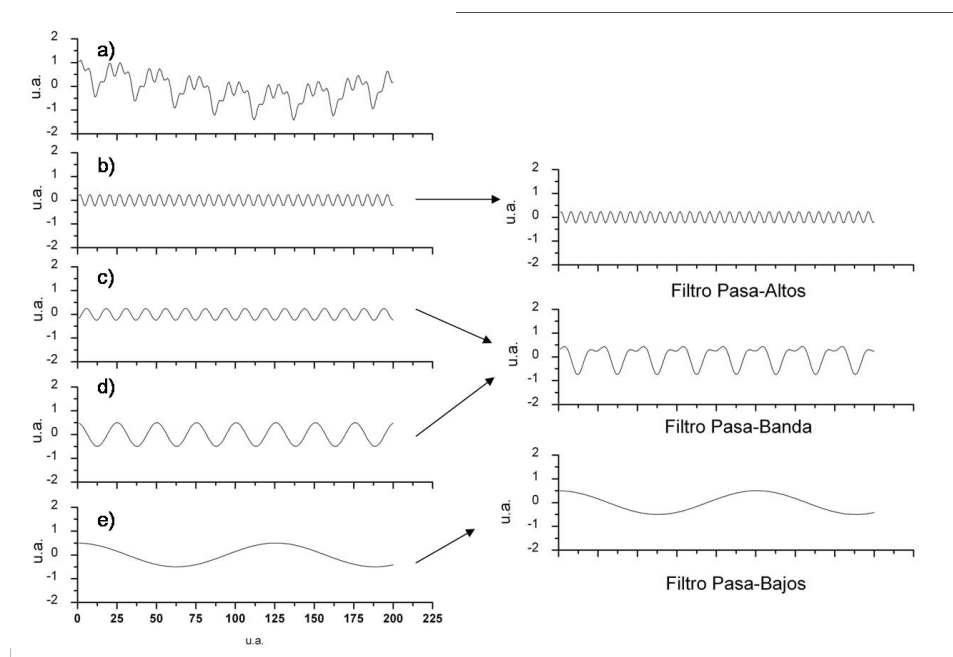


Figura 2.8: Ejemplo de aplicación de los distintos filtros. El perfil a) es el perfil a analizar. a) está compuesto de la suma de los perfiles b), c), d), e). Los perfiles de la derecha muestran la aplicación de los filtros aplicados sobre el perfil de análisis a). (u.a. son unidades arbitrarias de longitud)

2.3.10. Estudio del Ángulo de Contacto

Para la determinación de la mojabilidad de las superficies estudiadas se utilizó la técnica conocida como ángulo de contacto. El ángulo de contacto (θ), es el ángulo formado por un líquido en la frontera donde las fases líquida, gaseosa y sólida intersectan (ver figura más adelante).

En nuestro caso debido a la porosidad inherente de las muestras, el uso de la técnica de la gota sesil no fue posible debido a que el líquido penetraba rápidamente en el interior de la muestra no siendo posible su determinación. Para la medición del ángulo de contacto se recurrió entonces al uso de dos técnicas diferentes, el método de los dos líquidos y el método de la burbuja cautiva.

El método de los dos líquidos consiste en reemplazar la fase gaseosa por un segundo líquido no miscible en el primero. En este caso las muestras fueron sumergidas en octano durante una noche, para favorecer una correcta penetración del líquido en el interior de la muestra. Se dispensó posteriormente una gota de agua destilada con un volumen de $2 \mu\text{l}$ en el interior del octano. El agua cae sobre la muestra al tener una mayor densidad y se forma una gota sobre la superficie a estudiar. Se captaron imágenes cada 3 segundos durante 5 minutos midiendo de forma automática el ángulo formado. El equipo utilizado fue un Krüss G2. Se midieron un total de 5 muestras por

tipo y 3 medidas por muestra.

En el segundo método se utilizó el método de la burbuja cautiva (“captive bubble”). En este caso el método consiste en invertir las fases gaseosas y líquidas. Se sumerge una muestra en un líquido y se introduce una burbuja de aire en el interior del líquido. La burbuja de aire asciende hasta entrar en contacto con la muestra formando así la interfase sólida, líquida y gaseosa. Este método es utilizado cuando los líquidos a estudiar tienen una alta afinidad por la superficie del sólido ó en el caso de sólidos porosos. En estos casos la medición con la técnica de la gota sesil es prácticamente imposible al ser la forma de la gota prácticamente plana y no poder los programas de captación hacer una buena aproximación. El equipo utilizado fue un OCA 15+ equipado con el software SCA20. Mediante esta técnica se midieron 3 muestras de cada tipo con 5 medidas por muestra.

La Figura 2.9 muestra los conceptos de medición de ángulo de contacto en una gota sesil, que sería también aplicable a la técnica de los dos líquidos y en una burbuja cautiva.

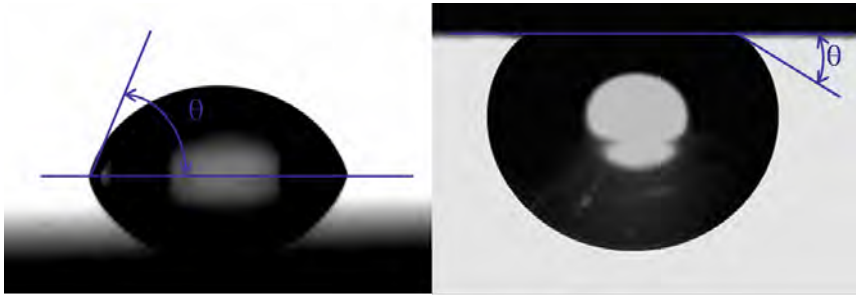


Figura 2.9: Imagen Izquierda: Ángulo de contacto en Gota Sesil. Imagen Derecha: ángulo de contacto en burbuja cautiva. Imágenes sacadas de [28]

2.4. Resultados

2.4.1. Caracterización del α -TCP

2.4.1.1. Granulometría y Superficie Específica

La Figura 2.10 muestra la distribución de los tamaños de partícula de los protocolos de molido TP Grueso y TP Fino.

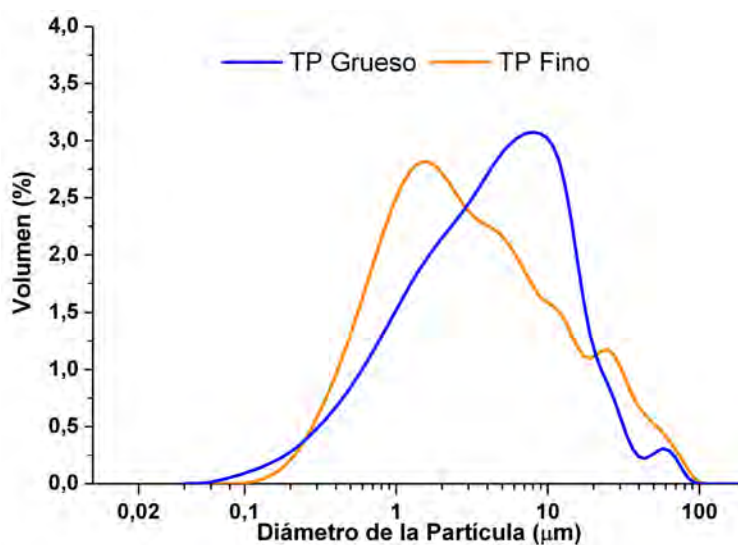


Figura 2.10: Distribución de los tamaños de partícula de los protocolos de molienda: TP Grueso y TP Fino

En la Tabla 2.1 se muestran las principales características de ambos protocolos de molienda. El TP Grueso tiene un tamaño mediano de $4,75 \mu\text{m}$ y una superficie específica de $2,29\text{m}^2/\text{g}$. El TP Fino tiene un tamaño mediano de $2,59 \mu\text{m}$ y una superficie específica de $3,41\text{m}^2/\text{g}$.

Tabla 2.1: Características del tamaño de partícula obtenido después de aplicar ambos protocolos de molienda. D10 significa que el 10 % de partículas analizadas tiene un tamaño inferior al indicado. D50 y D90 indican respectivamente el 50 % y el 90 % de partículas analizadas tienen un tamaño inferior al indicado.

Muestra	D10 (μm)	Mediana D50 (μm)	D90 (μm)	Sup.Específica α -TCP (m^2/g)
TP Grueso	0,729	4,75	19,28	2.29 ± 0.01
TP Fino	0,690	2,59	12,40	3.41 ± 0.02

2.4.1.2. Difracción de Rayos X

Los espectros de difracción de Rayos X del α -TCP después de los protocolos de molienda se muestran en la Figura 2.11. En ellos se puede

observar que todos los picos corresponden a α -TCP (JCPDS-09-348). Se puede observar un ensanchamiento de los picos en el espectro del TP Fino debido a la reducción del tamaño de cristal causado por una molienda más severa.

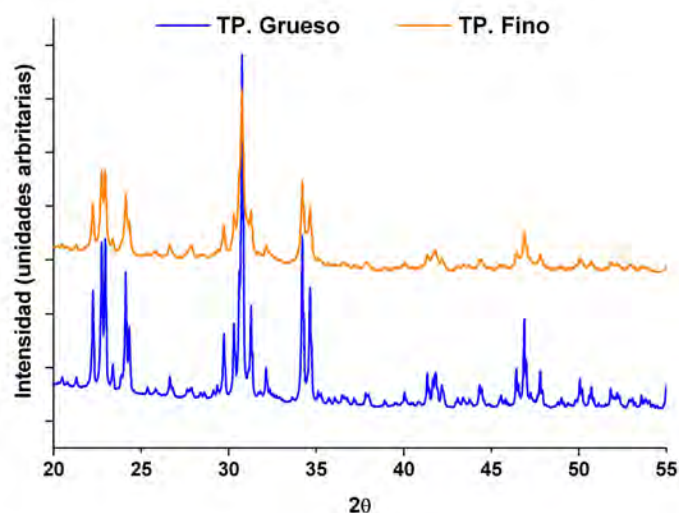


Figura 2.11: Difracción de Rayos X del α -TCP después de los protocolo de molienda TP Fino TP Grueso

2.4.2. Caracterización del cemento H.

2.4.2.1. Superficie específica y análisis de la porosidad por porosimetría de mercurio del Cemento H

La superficie específica de las muestras una vez fraguado el cemento es de $17,28 \pm 0,07 \text{ m}^2/\text{g}$ para las muestras obtenidas con el TP Grueso y de $22,04 \pm 0,023,41 \text{ m}^2/\text{g}$ para las de TP Fino.

Tabla 2.2: Superficie específica del Cemento H una vez fraguado

Muestra	Sup. Específica Cemento H (m^2/g)
TP Grueso	$17,28 \pm 0,07$
TP Fino	$22,04 \pm 0,02$

La Figura 2.12 muestra la distribución del tamaño de poro en función del diámetro de poro de las muestras utilizadas a lo largo del estudio. La porosidad obtenida mediante porosimetría de mercurio fue para el TP Grueso de un $41,11 \pm 1,5 \%$ y para el TP Fino $41,39 \pm 1,1 \%$. Tal como se puede observar la interconexión de la porosidad presente en las muestras está por debajo de los 100nm, y es ligeramente inferior para el TP Grueso que para

el TP Fino. En este caso la interconexión de la porosidad es debida a los espacios entre los cristales de apatita. En las imágenes de microscopía electrónica de barrido se pudo observar la presencia de poros con tamaños en el orden de los micrómetros, sin embargo estos están rodeados y aislados por los cristales de apatita.

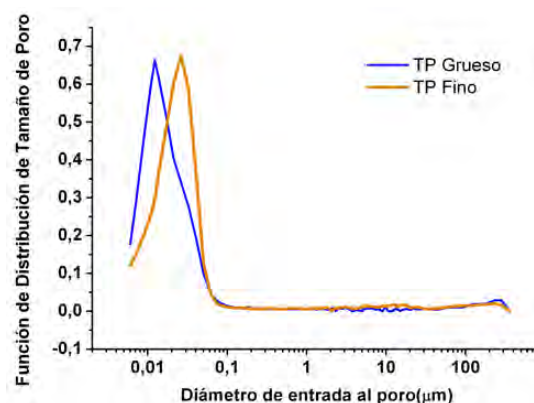


Figura 2.12: Función de Distribución del tamaño del poro vs. Diámetro de entrada al poro

2.4.2.2. Difracción de Rayos X

Los espectros de difracción de Rayos X después de 7 días en solución de Ringers se muestran en la Figura 2.13. En ellos se puede observar que todos los picos corresponden a hidroxapatita (JCPDS-9-342). Al cabo de 7 días, no se encuentra ningún rastro evidente de α -TCP, significando que la reacción se ha completado, en un tiempo inferior a 7 días.

En el difractograma del cemento H se observa la presencia de un pequeño pico en torno a 31° . Este pico corresponde al pico de máxima intensidad del β -TCP (JCPDS-9-169). La presencia de β -TCP en los difractogramas del cemento H fraguado indican que en el polvo de α -TCP hay una pequeña cantidad de β -TCP. En el difractograma del α -TCP es difícil detectarlo al estar los picos de máxima intensidad para ambas fases muy cerca.

Una de las cosas que se pueden remarcar del espectro es la menor definición y mayor anchura de los picos para el TP Fino, indicativo de una menor cristalinidad [20]. Al ser la relación Ca/P del polvo inicial de 1,5 es de esperar que la apatita obtenida sea una apatita deficiente en calcio con una relación Ca/P cercana a 1,5 y no una hidroxapatita estequiométrica que tiene una relación Ca/P de 1,67. Sin embargo, las pequeñas diferencias cristalográficas entre ambas fases no pueden ser observadas por Difracción de Rayos-X [29], aunque si pueden ser observadas por espectroscopía de infrarrojos.

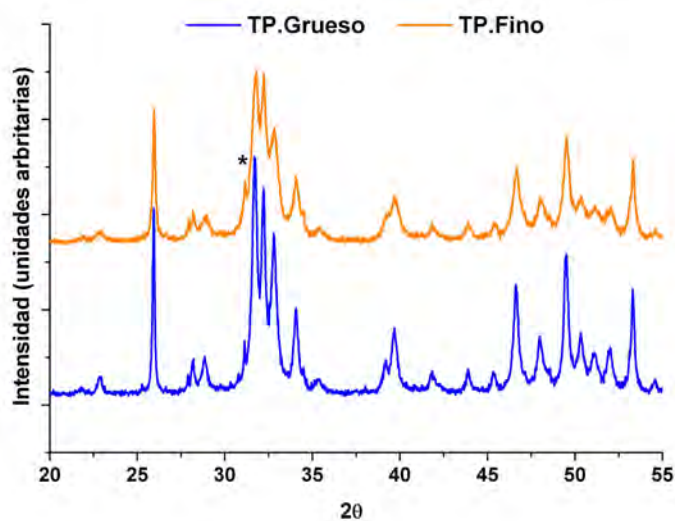


Figura 2.13: Difracción de Rayos X del TP Fino y del TP Grueso fraguado

2.4.2.3. Espectroscopía de Infrarrojos

En la Figura 2.14 se pueden observar los espectros infrarrojos de las muestras de TP Grueso y Fino una vez ha fraguado el cemento.

Se pueden observar las bandas características que definen las apatitas deficientes en calcio como son las bandas correspondientes a los grupos HPO_4^{2-} como son 1210 , 1130 y 870 cm^{-1} . Las otras bandas señaladas en la figura son también características de la hidroxiapatita estequiométrica.

También se puede observar la amplia banda en torno a 3400 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de deformación del agua y una banda menor en torno a 1625 cm^{-1} características de los fosfatos de calcio obtenidos por precipitación, que contienen una gran cantidad de agua adsorbida.

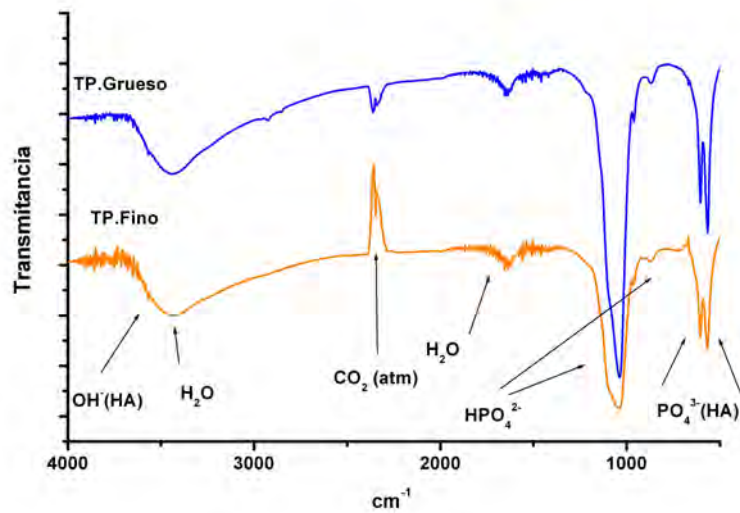


Figura 2.14: Espectro de infrarrojos del TP Grueso y del TP Fino antes y después de 20 días de incubación en Medio Completo

2.4.3. Caracterización Microestructural

2.4.3.1. Superficie

Las Figuras 2.15 y 2.16 muestran la morfología de la superficie de las muestras obtenidas a pocos aumentos. Se pueden observar los defectos en la superficie inherentes al proceso de obtención de las muestras. La morfología de la superficie obtenida desde un punto de vista macroscópico presenta defectos de forma aleatoria. El cemento ha replicado por un lado los defectos del molde de teflón, como son las rayas que éste tiene. En las figuras también aparecen un segundo tipo de defectos de mayor tamaño que pueden aparecer en las muestras, como son las burbujas de aire que pueden quedar atrapadas durante el proceso de llenado de los moldes, y que aparecen posteriormente como poros en la superficie. En el caso de que alguna muestra presentara defectos muy marcados, se descartaba para los estudios de rugosidad, de ángulo de contacto, adsorción de proteínas (Capítulo 3) y estudios celulares *in vitro* (Capítulo 4).

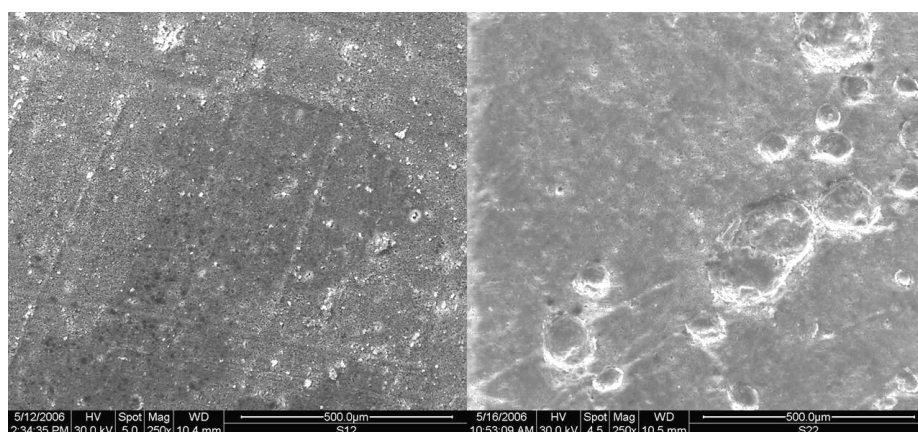


Figura 2.15: Imagen a 250 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

En las Figuras 2.17 y 2.18 se observa que la superficie para ambos tipos de muestra está formada por estructuras semiesféricas. En el caso de las muestras de TP Grueso estas esferas tienen un tamaño aproximado entre 4 y 8 μm . Mientras que en el caso de las de TP Fino, estas esferas son más pequeñas, aproximadamente la mitad, entre 1 y 4 μm . Anteriormente se ha comentado que durante el proceso de fabricación de las muestras se introducen ciertos defectos que son difíciles de evitar. Cabe destacar también que las semiesferas de aglomerados cristalinos no forman una superficie continua sino que hay poros y valles a una menor escala que los defectos de fabricación. Esto es evidente en la Figura 2.18. Existe a su vez una diferencia de tamaño en este tipo de defecto entre ambos tipos de TP debido al diferente tamaño de los aglomerados.

Las semiesferas o aglomerados cristalinos están formados por cristales

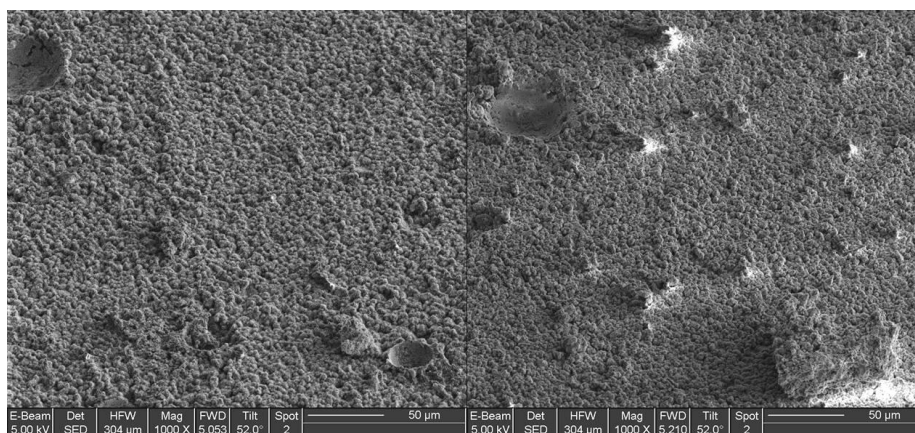


Figura 2.16: Imagen a 1000 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

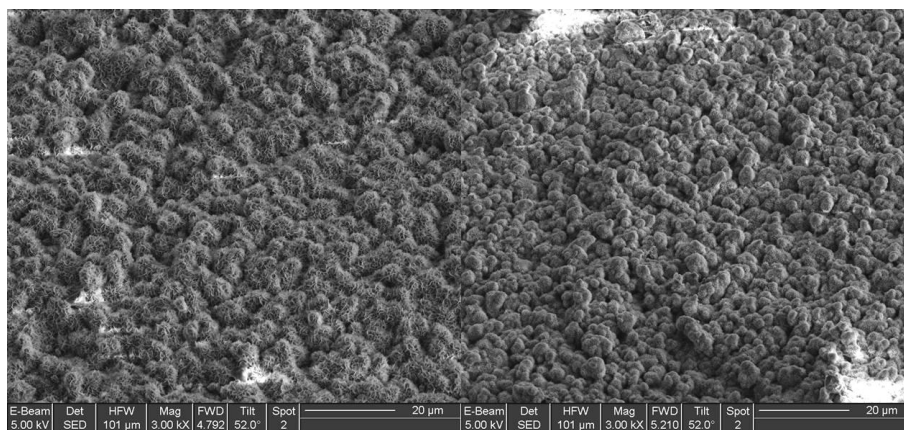


Figura 2.17: Imagen a 3000 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

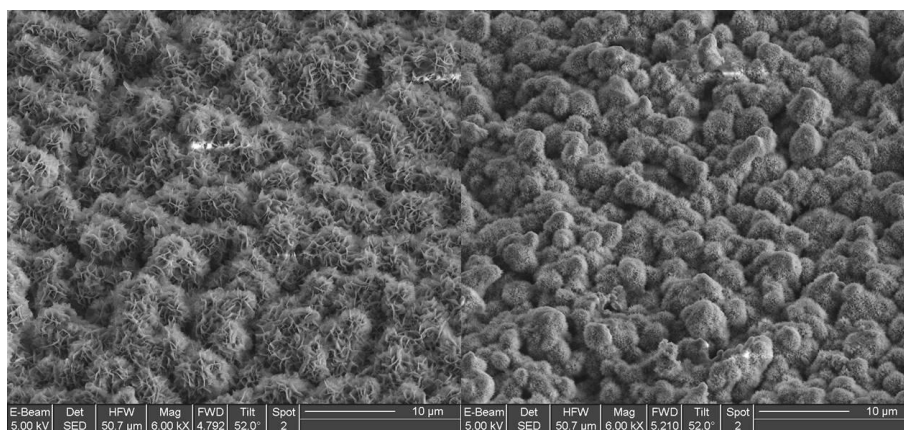


Figura 2.18: Imagen a 6000 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

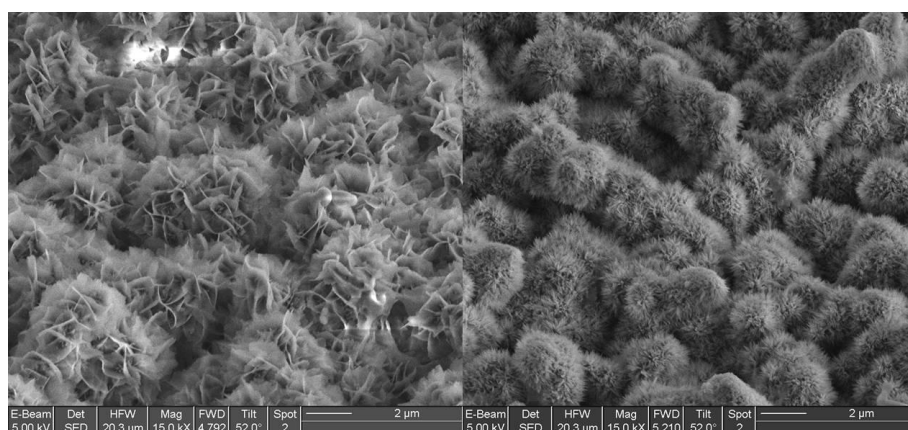


Figura 2.19: Imagen a 15000 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino.

entrecruzados de apatita, tal como se puede observar claramente en las Figuras 2.19 y 2.20. En el caso de las muestras obtenidas a partir del TP Grueso, se puede observar que los cristales de apatita tienen una morfología en forma de placas. Algunos cristales tienen un tamaño superior a la micra. Estos cristales se entrecruzan entre sí formando los aglomerados de forma semejante a las estructuras minerales llamadas “rosas del desierto”. En la Figura 2.20, puede verse cristales de menor tamaño entre las placas. En algunos casos corresponden a placas que no han podido crecer más debido a la oposición de otros cristales de mayor tamaño. También se observan algunos cristales en forma de aguja.

Los cristales de apatita en el caso de las muestras obtenidas a partir del TP Fino tienen una morfología de aguja. El tamaño de las agujas es inferior al de las placas. Su longitud es inferior a los 500 nm y su diámetro inferior a 100 nm. Los aglomerados formados por las agujas también se entrecruzan formando sin embargo, una estructura de tipo erizo.

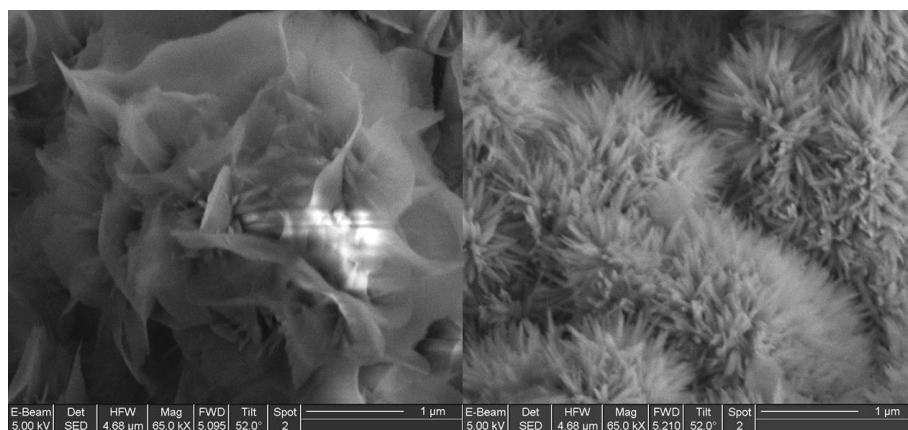


Figura 2.20: Imagen a 65000 aumentos de la superficie de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino.

2.4.3.2. Interior

Las figuras anteriores mostraban la morfología de la superficie donde los cristales de apatita han crecido contra la superficie interna del molde. La existencia de una película de líquido entre la pared del molde y el cemento favorece que en esta zona, seguramente, las partículas de α -TCP estén ligeramente más separadas entre sí, facilitando el crecimiento de los cristales.

En el interior de la muestra, el crecimiento de los cristales está mucho más restringido tal como se observa en la Figura 2.21. Hay una gran diferencia entre la superficie y el interior de las muestras. En el interior no es posible ver definidos tan claramente los cristales. La zona de crecimiento libre equivale aproximadamente a un espesor de uno o dos aglomerados esto equivale en el caso de TP Grueso aproximadamente unos $8-10\mu$ y en el caso de TP Fino unos $4-6\mu\text{m}$.

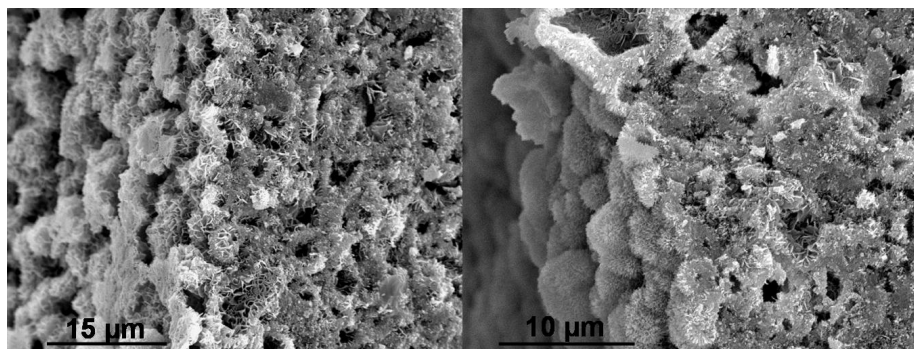


Figura 2.21: Imágenes mostrando la superficie y el interior de los CPC. Imagen Izquierda: TP Grueso (2000x). Imagen Derecha: TP Fino (3300x)

En la Figura 2.22 se muestra una zona interior de la muestra alejada de la superficie. En la muestra de TP Grueso se observa la morfología de cristales en zona de placas presentes en la superficie aunque también la existencia de cristales de menor tamaño, correspondientes a la transformación en apatita de las partículas de menor tamaño. En la muestra de TP Fino, se observan una estructura densa con poros intercalados. Estos poros corresponden a las partículas de mayor tamaño de α -TCP. Durante el proceso de precipitación las agujas característica del TP Fino no son capaces de ocupar el espacio de la partícula. A veces en el interior de estos poros, se observan cristales de apatita de un tamaño mayor. La precipitación de las agujas alrededor de la partícula dificulta posteriormente la difusión del agua, dando mayor tiempo al crecimiento de los cristales durante el proceso de precipitación.

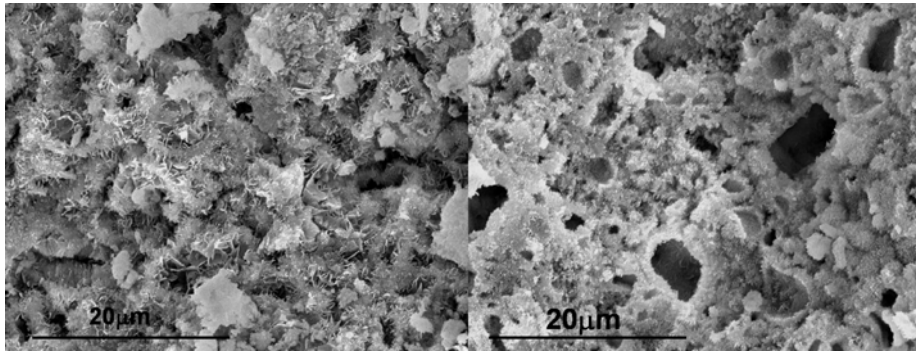


Figura 2.22: Imagen a 6000 aumentos del interior de las muestras. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

2.4.4. Caracterización Topográfica

2.4.4.1. Interferometría óptica

La Figura 2.23 muestra a la misma escala dos imágenes de las medidas de rugosidad obtenidas por Interferometría óptica. Las imágenes de la izquierda corresponden a la medida tal cual ha sido obtenida, y la imagen de la derecha es el resultado obtenido después de la aplicación de los filtros. El filtro aplicado en el caso de TP Grueso ha sido un Pasa-Banda de $1-20\ \mu\text{m}$ y en el TP Fino un Pasa-Banda de $1-10\ \mu\text{m}$.

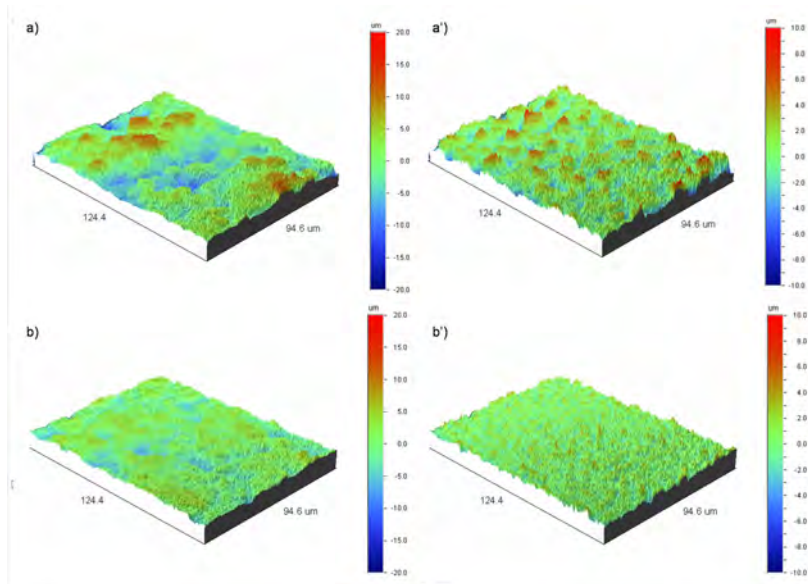


Figura 2.23: Imagen de TP Grueso (a,a') y TP Fino (b,b') obtenidas por interferometría. a) después de aplicar filtro Pasa-Banda $1-20\ \mu\text{m}$ y b') después de aplicar filtro Pasa-Banda $1-10\ \mu\text{m}$. La escala de colores corresponde a las diferentes alturas (rojo para picos, azul para valles, verde para valores de altura cercanos al plano medio).

La imagen del CPC obtenido a partir TP Grueso muestra una superficie con una mayor presencia de valles y picos de gran profundidad y bastante anchos. En la muestra de CPC obtenida con el TP Fino, se observa un perfil más homogéneo con menores diferencias en altura.

Los valores de rugosidad obtenidos por microscopía óptica interferométrica se presentan en la Tabla 2.3. En la obtención de estos valores se ha aplicado un filtro Pasa-Bajos de $0,05\mu\text{m}$ que tiene como objeto la eliminación de defectos ópticos puntuales, que provocan la aparición de picos y valles puntiagudos y elevados. Los defectos ópticos aparecen en las medidas de interferometría cuando en la muestra a analizar existen cambios bruscos de pendiente. Los defectos ópticos no afectan significativamente a los valores medios en altura al ser evaluados sobre toda una superficie, pero sí pueden alterar los valores espaciales ya que dependen localmente de la altura. La aparición de estos defectos ópticos está originada en nuestras muestras por los diferentes cambios de pendiente asociados a cristales de apatita, la aglomeración de cristales o a defectos de fabricación. En las distintas imágenes de SEM mostradas anteriormente, pueden observarse estos cambios de pendiente y los defectos de fabricación de los cementos (véanse Figuras 2.18 y 2.19). La observación de las imágenes de SEM y de las medidas y perfiles de interferometría permitió tras varios análisis la elección de los filtros más adecuada con respecto a las superficies observadas.

Tabla 2.3: Valores de Rugosidad obtenidos por interferometría óptica. El área de escaneado es de $94 \times 124 \mu\text{m}^2$. Valores obtenidos después de aplicar un filtro Pasa-Bajos de $0,05\mu\text{m}$ para eliminar los defectos ópticos.

Muestra	$S_a(\mu\text{m})$	$S_q(\mu\text{m})$	$S_z(\mu\text{m})$	$S_m(\mu\text{m})$	$P_c(1/\text{mm})$	S_{in}	S_{sk}	S_{ku}
TP Grueso	$3,42 \pm 0,63$	$4,35 \pm 0,35$	$21,37 \pm 2,35$	$11,10 \pm 1,58$	$10,42 \pm 3,61$	$2,55 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,47$	$3,42 \pm 1,24$
TP Fino	$1,62 \pm 0,52$	$2,17 \pm 0,80$	$12,78 \pm 2,61$	$8,44 \pm 1,81$	$20,61 \pm 6,69$	$2,02 \pm 0,16$	$-0,13 \pm 0,86$	$4,00 \pm 0,99$

Los resultados muestran las diferencias entre ambas superficies tanto en los valores de los parámetros de altura como son S_a , S_q y S_z , así como los parámetros de espaciado S_m y P_c . La rugosidad de las muestras de CPC de TP Grueso es aproximadamente el doble que las de TP Fino. El valor de S_z muestra la presencia de picos y valles mucho más pronunciados en el caso de las muestras de Partícula Grande que para Partícula Pequeña, de acuerdo a la Figura 2.23 de interferometría óptica que se muestra como representación de las medidas realizadas.

El parámetro espacial P_c depende del valor de S_a para su cálculo. Un par pico-valle (ciclo) es considerado como tal si está por encima y por debajo respectivamente de las líneas de medición. En este caso las líneas de medición se sitúan a una distancia de S_a del plano medio (ver sección 2.3.9.3). Vemos por lo tanto la alternancia más frecuente de valles y picos en torno a la línea media para el caso de las muestras de TP Fino que de TP Grueso. En este último caso, un par pico-valle necesita una diferencia mínima de altura de

$6\mu\text{m}$, mientras que para el TP Fino es de $3\mu\text{m}$.

En cierto modo, el parámetro 2D S_m es considerado la inversa del parámetro P_c , aunque en su cálculo se tengan en cuenta características de espaciado diferentes. Este valor también muestra una mayor distancia de picos en las muestras de TP Grueso de acuerdo con el mayor tamaño inicial de partícula y en concordancia con el valor de P_c .

En cuanto a los parámetros de la distribución estadística de altura S_{sk} y S_{ku} , muestran que las superficies de estudio tienen valores cercanos a los considerados como estándares de una superficie gaussiana, con distribución homogénea de la superficie sin predominio de valles o picos. En este sentido no hay variaciones significativas entre ambos tipos de muestras estudiadas. Las superficies obtenidas después del fraguado corresponden por lo tanto a superficies gaussianas con una distribución homogénea de los defectos. Estos valores de S_{sk} y S_{ku} son acordes con las observaciones de SEM donde se muestra una superficie muy heterogénea con defectos topográficos a diferentes escalas, pero isotrópica al ser de características similares en toda la superficie.

La rugosidad en este rango está definida principalmente por la superposición de aglomerados cristalinos de apatita, que vienen determinados por el tamaño de partícula del α -TCP. Este factor es el que configura los picos y valles de la superficie de las muestras. La contribución individual de los cristales de apatita en este rango es muy pequeña en comparación.

En la Tabla 2.4 se recogen los datos de rugosidad obtenidos después de aplicar los filtros Pasa-Banda en las muestras de CPC de TP Grueso y TP Fino. El objetivo de este análisis es evaluar la rugosidad debida a los aglomerados cristalinos por sí mismos mediante la aplicación de Filtros de Fourier, opción que nos permitía el software Vision32.

Tabla 2.4: Valores de Rugosidad obtenidos por Interferometría después de aplicar filtros Pasa-Banda: TP Grueso $1\text{-}20\mu\text{m}$ y para el TP Fino $1\text{-}10\mu\text{m}$. El área de escaneo es de $94\text{x}124\mu\text{m}^2$.

Muestra	$S_a(\mu\text{m})$	$S_q(\mu\text{m})$	$S_z(\mu\text{m})$	$S_m(\mu\text{m})$	$P_c(1/\text{mm})$	S_{in}	S_{ku}	S_{sk}
TP Grueso	$1,68\pm 0,17$	$2,15\pm 0,22$	$15,54\pm 1,37$	$7,24\pm 0,56$	$37,45\pm 3,34$	$2,51\pm 0,08$	$-0,12\pm 0,06$	$3,67\pm 0,36$
TP Fino	$0,73\pm 0,11$	$0,95\pm 0,15$	$8,60\pm 1,52$	$4,34\pm 0,24$	$79,97\pm 7,14$	$1,98\pm 0,15$	$-0,15\pm 0,39$	$3,94\pm 0,59$

Los valores de los filtros fueron escogidos en función del tamaño de los defectos observados en SEM. Se midió el tamaño medio de los aglomerados de cristales de apatita para ambas muestras. En el caso de las muestras de TP Grueso, los límites donde empiezan un aglomerado y termina otro no están tan bien definidos en comparación a las muestras de TP Fino. El diámetro medio de aglomerado fue entre 1 y $3\mu\text{m}$ para el TP Fino y entre 4 y $8\mu\text{m}$ para el TP Grueso. Los filtros de Fourier escogidos fueron los filtros *Pasa-Banda*. Este tipo de filtro nos permite seleccionar o aislar los defectos que se ajusten a la ventana de frecuencias escogidas (ver Figura 2.8). El filtro

para el TP Fino fue de 1-10 μm y para el TP Grueso 1-20 μm . La elección de estas ventanas nos permite evaluar de forma adecuada la aglomeración de los cristales de apatita, por un lado filtrando los defectos ópticos de la medida y por otro lado los defectos más grandes que corresponden más bien a defectos de fabricación y a la replicación parcial de las irregularidades de los moldes comentados anteriormente.

En los perfiles que muestran las imágenes de interferometría se pueden observar conjuntos de aglomerados cristalinos y el tamaño de los mismos está de acuerdo con lo observado en SEM. En este caso se puede ver la reducción drástica de la rugosidad que se produce al filtrar, mostrando un valor más cercano al que correspondería al tamaño de los aglomerados cristalinos si estuvieran relativamente ordenados sobre la superficie de estudio. La Figura 2.19 puede ser un ejemplo de lo aquí comentado.

Los valores tanto espaciales como de altura muestran diferencias estadísticamente significativas mostrando la mayor rugosidad de las muestras de TP Grueso también a esta escala. Los parámetros espaciales reflejan aproximadamente valores de espaciado del orden de magnitud que sería de esperar para el tamaño de defectos observados por microscopía. En cuanto a los valores de kurtosis y de skewness como en el caso de los resultados sin filtrar muestran superficies gaussianas con una distribución de picos y valles de forma homogénea, de acuerdo a su vez con las imágenes de SEM.

2.4.4.2. Microscopía de Fuerzas Atómicas

Una de las principales ventajas que posee el AFM con respecto de otras técnicas para medir la rugosidad es su elevada resolución tanto vertical como lateral, del orden del nanómetro. Sin embargo una de sus limitaciones es su incapacidad para seguir el perfil de muestras muy rugosas o con cambios de perfil muy bruscos como es el caso de las muestras analizadas. El AFM no es adecuado cuando en las muestras existen saltos superiores a $5\mu\text{m}$.

En la Figura 2.24 puede verse la reconstrucción de una imagen obtenida por AFM, en un área de escaneado de $1 \times 1\mu\text{m}^2$. En comparación con las imágenes de SEM puestas como punto de referencia se puede observar como en el caso del TP Grueso, la imagen obtenida corresponde a varias placas parcialmente escaneadas, con los diferentes valles formados entre ellas. La imagen del TP Fino corresponde a lo que se puede describir como la parte superior de un conjunto de cristales de apatita. Se pueden distinguir los espacios entre las agujas, aunque no es posible precisar con que profundidad es capaz el AFM de penetrar entre las mismas.

Al aumentar el área de escaneado a $5 \times 5\mu\text{m}^2$ (véase Figura 2.25), se puede ver como el AFM sigue siendo capaz de distinguir y perfilar el espaciado entre los distintos cristales de apatita en forma de placa. En este caso es posible también observar a veces placas de menor tamaño y también placas cuyo perfil no acaba de ser determinado por el AFM al salirse de la

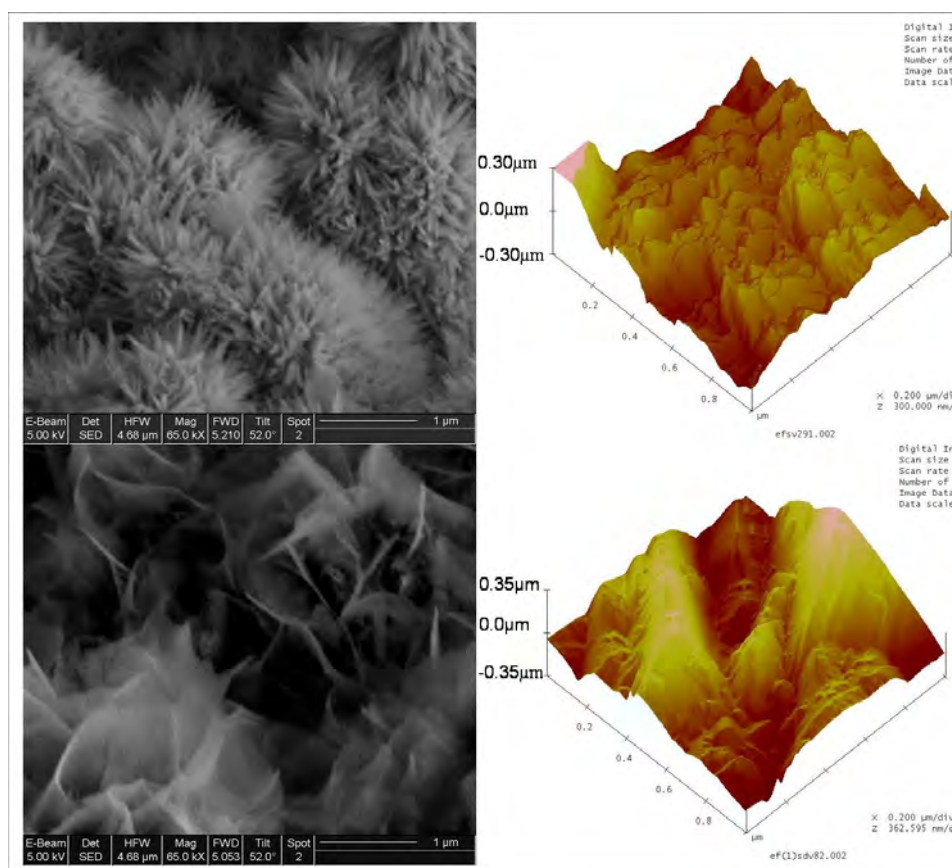


Figura 2.24: Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM (izquierda) y la reconstrucción 3D de la superficie obtenida por AFM (derecha). El área escaneada en AFM es de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$. Imágenes superiores: TP Fino. Imágenes inferiores: TP Grueso.

zona de escaneado. En el caso del TP Fino y para un área de escaneado de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, se observan ya distintos grupos de aglomerados cristalinos, donde se puede ver la parte superior de un aglomerado formando un valle en la zona central y el principio de otros aglomerados en los bordes del área de escaneado.

Si se aumenta el área de escaneado, $20 \times 20 \mu\text{m}^2$, se pueden observar aglomerados cristalinos para ambos tipos de partículas, y también distintos tipos de accidentes como valles y picos formados por los aglomerados cristalinos entre sí (Véase Figura 2.26). Las imágenes obtenidas por AFM son relativamente comparables a las observadas por SEM. Una de las cosas que ocurren al aumentar el área de escaneado, es la dificultad de obtener imágenes adecuadas, ya que la punta de AFM en numerosas ocasiones no es capaz de reseguir un perfil tan abrupto como el que realmente presentan las muestras de CPC. Este hecho filtra en cierta manera la medida de rugosidad, al ser sólo capaz de obtener medidas en áreas con diferencias de altura menores a la profundidad de campo que es de $5 \mu\text{m}$.

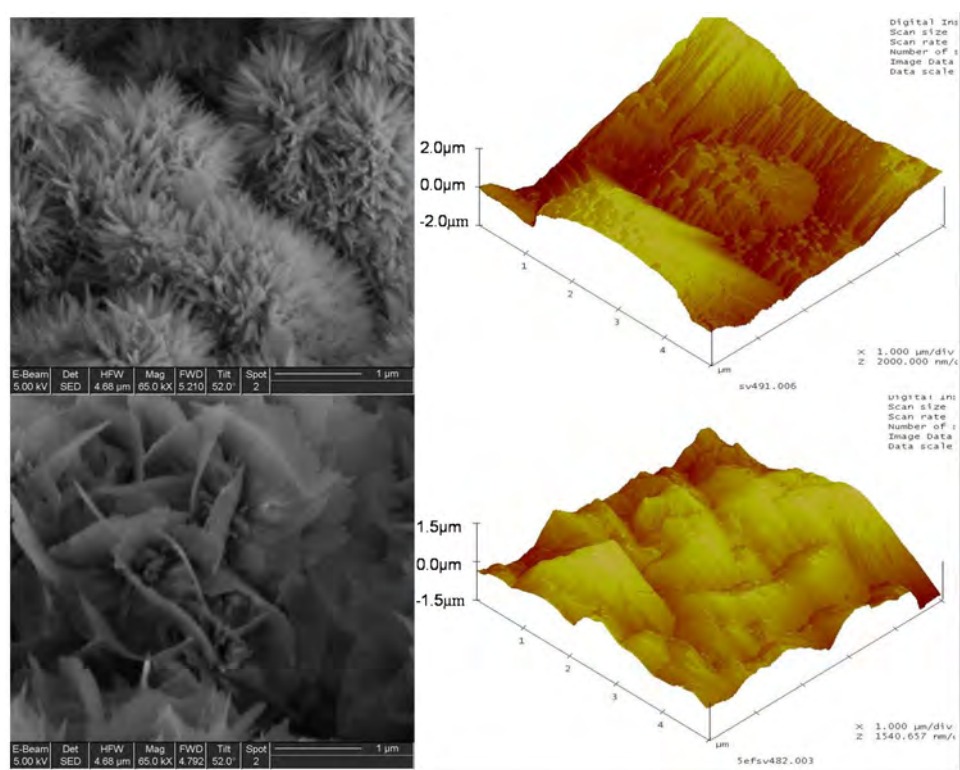


Figura 2.25: Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM (izquierda) y la reconstrucción 3D de la superficie obtenida por AFM (derecha). El área escaneada en AFM es de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. Imágenes superiores: TP Fino. Imágenes inferiores: TP Grueso.

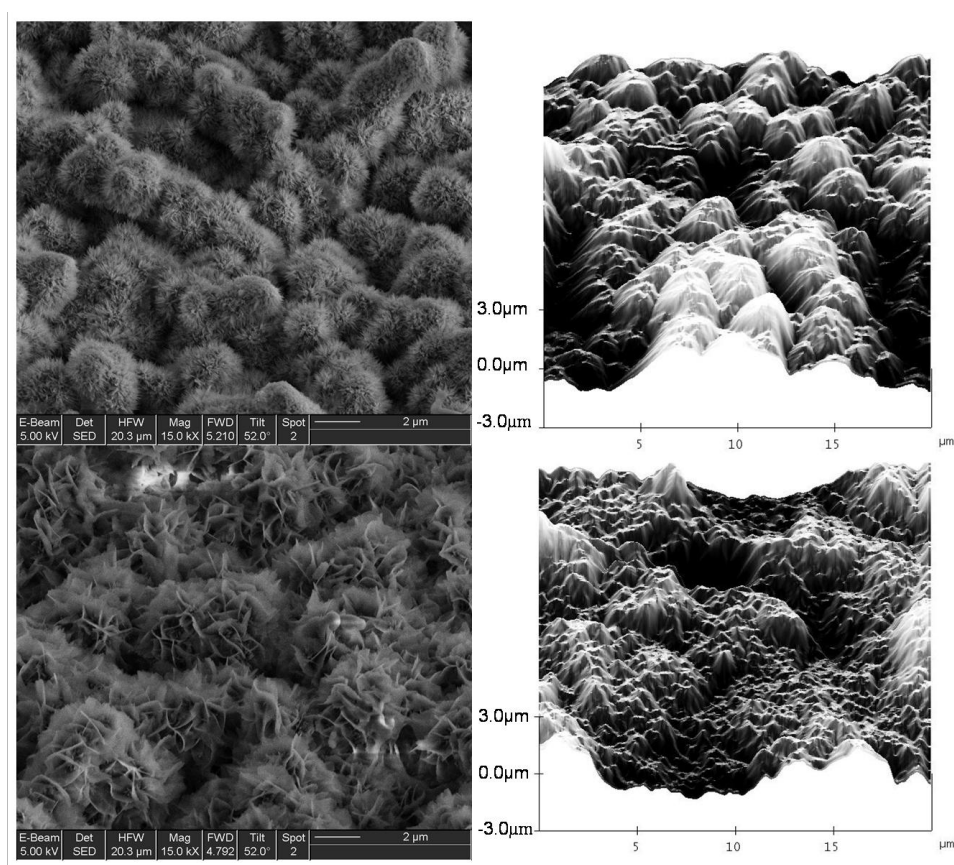


Figura 2.26: Comparación entre la morfología de la superficie observada por SEM (izquierda) y la reconstrucción 3D de la superficie obtenida por AFM (derecha). El área escaneada en AFM es de $20 \times 20 \mu\text{m}^2$. Imágenes superiores: TP Fino. Imágenes inferiores: TP Grueso.

Los resultados de rugosidad obtenidos mediante la técnica de Microscopía de Fuerzas Atómicas para las distintas áreas de escaneado se recogen en las Tablas 2.5, 2.6 y 2.7. Los parámetros analizados en este caso no son tan numerosos como en el caso de la interferometría óptica, pero corresponden a dos parámetros de altura (S_a , S_q), un parámetro espacial (L_{den}) y dos parámetros que evalúan la distribución estadística de la altura (S_{ku} , S_{sk}) y el índice de área real vs. área proyectada (S_{in}).

Tabla 2.5: Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

Muestra	S_a (nm)	S_q (nm)	L_{den} ($/\mu\text{m}$)	S_{in}	S_{sk}	S_{ku}
TP Grueso	41 ± 24	52 ± 31	$3,95 \pm 1,68$	$1,41 \pm 0,30$	$-0,23 \pm 0,40$	$3,33 \pm 0,63$
TP Fino	64 ± 27	81 ± 35	$5,30 \pm 3,22$	$1,86 \pm 0,48$	$0,09 \pm 0,59$	$3,93 \pm 1,85$

Tabla 2.6: Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $5 \times 5 \mu\text{m}^2$

Muestra	S_a (nm)	S_q (nm)	L_{den} ($/\mu\text{m}$)	S_{in}	S_{sk}	S_{ku}
TP Grueso	135 ± 45	171 ± 54	$1,18 \pm 0,56$	$1,38 \pm 0,13$	$-0,11 \pm 0,43$	$3,52 \pm 0,63$
TP Fino	222 ± 91	278 ± 113	$0,66 \pm 0,26$	$1,36 \pm 0,12$	$-0,18 \pm 0,46$	$3,20 \pm 1,17$

Tabla 2.7: Valores de Rugosidad obtenidos por AFM, área de escaneado $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

Muestra	S_a (nm)	S_q (nm)	L_{den} ($/\mu\text{m}$)	S_{in}	S_{sk}	S_{ku}
TP Grueso	571 ± 219	709 ± 252	$0,23 \pm 0,12$	$1,28 \pm 0,17$	$-0,13 \pm 0,19$	$2,92 \pm 0,83$
TP Fino	675 ± 137	748 ± 283	$0,30 \pm 0,11$	$1,46 \pm 9,21$	$-0,14 \pm 0,23$	$3,14 \pm 0,38$

Los parámetros S_a y S_q aumentan a medida que aumenta el área de escaneado. Esto ocurre al aumentarse también la probabilidad de captar defectos de mayor tamaño. El índice de área real vs. área proyectada permanece relativamente estable y constante en las distintas áreas de escaneado.

La media de la kurtosis (S_{ku}) es ligeramente inferior a 0, en las muestras analizadas, sin embargo tanto el valor absoluto como la desviación estándar del valor muestran que este valor en las muestras analizadas pasa por valores tanto positivos como negativos. Un valor marcadamente negativo de la kurtosis como se ha comentado anteriormente sería indicativo de una superficie donde predominan los valles. Un valor marcadamente positivo sería indicativo de una superficie con preponderancia de picos. En este caso, el valor muestra que la superficie obtenida está compuesta tanto de picos como de valles de forma alterna, sin la presencia de zonas planas.

El valor de la "skewness" es superior a 3 para las superficies analizadas. Un valor cercano a 3 sería la correspondiente a una superficie con una distribución homogénea de los puntos en torno al plano medio. Los valores encontrados muestran que existe una alternancia alrededor del 3, mostrando

una distribución homogénea de la superficie, aunque con pequeñas variaciones de carácter local.

El valor de L_{den} es un parámetro con carácter espacial que representa el número de veces que la superficie cruza el zero o el plano medio en los dos ejes centrales de la imagen dividido por la longitud de dichos ejes. Es una forma de evaluar el número de picos-valles que hay en las dos líneas centrales. Cuando el área de escaneado es de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ el valor es superior en el caso del TP Fino que en el caso del TP Grueso, al definirse con mayor precisión las agujas de apatita. Cuando aumenta el área de escaneado, en el caso del Polvo Grueso sigue siendo posible determinar la rugosidad de diversas agujas. En el TP Fino, al aumentar el área a $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ es posible detectar ya varios aglomerados cristalinos, lo cual disminuye por tanto el número de veces que se cruza el 0. Si se sigue aumentando el área de escaneado, la geometría debida a los cristales de apatita no es posible detectarla y se ve claramente enmascarada por la formación de los distintos aglomerados cristalinos, con un tamaño mucho mayor, reduciéndose por lo tanto el número de veces que se cruza el zero en la muestra.

2.4.5. Ángulo de Contacto

La Figura 2.27 muestra dos imágenes de la técnica de los dos líquidos aplicados sobre las muestras de CPC. En ellas, se puede observar la gota de agua sobre las superficies. El octano en el cual están sumergidas las muestras es transparente facilitando así la toma de la imagen. La observación de las gotas mostró que el agua iba desplazando poco a poco al octano penetrando así en la muestra por lo que se tomaron como referencia únicamente los valores obtenidos durante los primeros 60s.



Figura 2.27: Ángulo de Contacto mediante el método de los dos líquidos. Imagen izquierda: TP Grueso. Imagen Derecha: TP Fino

La Figura 2.28 muestra dos imágenes captadas de la técnica de la burbuja cautiva aplicada sobre los CPC. Puede verse como la burbuja de aire sobre ambos CPC forma una circunferencia casi completa mostrando así la buena mojabilidad de los cementos. En la imagen también se pueden ver pequeñas burbujas de aire en la superficie que no fue posible eliminar

completamente de la superficie. Las medidas se tomaron en zonas libres de burbujas.

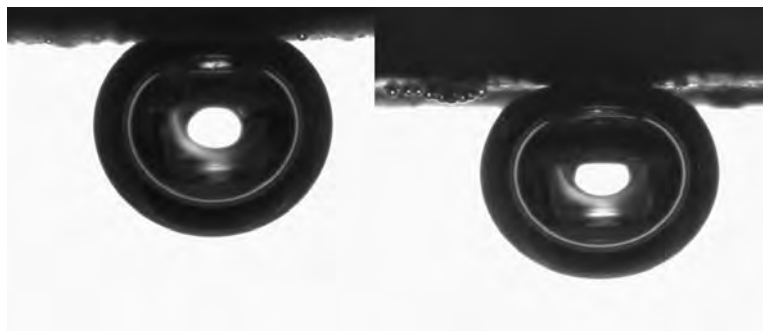


Figura 2.28: Ángulo de Contacto mediante el método de la burbuja cautiva. Imagen izquierda:TP Grueso. Imagen Derecha:TP Fino

Como se ha comentado en la sección de 2.3.10 se estudiaron un total de 10 muestras con 3 gotas o burbujas por muestra. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 2.8. Los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticamente significativas con ninguna de las dos técnicas utilizadas. La dispersión de los valores es elevada debido a la especial topografía de las muestras, con rugosidades a diferentes niveles tal como se ha podido comprobar en los apartados anteriores. El valor del ángulo de contacto obtenido con la técnica de los dos líquidos difiere del obtenido usando agua-aire como medio de medición al cambiar las propiedades del medio de contacto. El ángulo obtenido mediante la técnica de la burbuja cautiva es el ángulo que se representa en la Figura 2.9.

Tabla 2.8: Valores de los ángulos de contacto θ obtenidos para las dos técnicas utilizadas (Media \pm Desviación estándar)

Muestra	2 Líquidos ($^{\circ}$)	Burbuja Cautiva ($^{\circ}$)
TP Grueso	$28,56 \pm 4,72$	$35,96 \pm 3,74$
TP Fino	$32,27 \pm 5,03$	$34,425 \pm 3,32$

2.5. Discusión

La influencia del tamaño de partícula en las propiedades mecánicas, en la inyectabilidad, en la cinética de reacción de los CPC se ha estudiado extensivamente en trabajos anteriores [20, 29–34].

En este capítulo la atención se concentra especialmente en su efecto en las propiedades superficiales de los cementos fraguados.

2.5.1. Caracterización del α -TCP y del cemento H.

El proceso de molido influye tanto en la obtención del tamaño de partícula final como en el estado del polvo final en sí mismo, pudiendo llegar a transformarlo parcialmente tal como muestran Ginebra *et al.* [20, 29] y Camiré *et al.* [35]. El polvo puede amorfizarse parcialmente aumentando la reactividad del material y reduciendo la cristalinidad de la apatita deficiente en calcio obtenida posteriormente [35]. Tal como se observa en la Figura 2.13, la cristalinidad después del fraguado es menor en las muestras de TP Fino que en el TP Grueso. El menor tamaño de partícula inicial por lo tanto tiene una doble acción: una mayor velocidad de reacción del TP Fino y un menor tamaño final de cristal tal como se ha observado en las imágenes de SEM y por lo tanto una menor cristalinidad, tal como se ha visto en la difracción de rayos-X.

La presencia de β -TCP es consecuencia del proceso de obtención del α -TCP a alta temperatura, que durante el proceso de templado si no se realiza suficientemente rápido puede dar lugar a la aparición de una pequeña cantidad de β -TCP. Ciertas impurezas en los reactivos de partida también pueden lugar a la estabilización de cierta cantidad de β -TCP a alta temperatura. La aparición de una pequeña cantidad de β -TCP fue observada a lo largo de toda la tesis. [20]

2.5.2. Caracterización Microestructural

La observación de las muestras por SEM ha revelado una composición muy compleja de la superficie, con detalles topográficos a distintas escalas. Existen también diferencias entre el interior y la superficie de las muestras.

Analizando la microestructura de las muestras, se puede afirmar que la superficie de las mismas está formada por distintos tipos de estructuras superpuestas. El primer nivel correspondería los cristales de apatita resultantes de la reacción de fraguado (véase Figura 2.20). Los dos tipos diferentes de granulometrías de polvo de cemento usados en esta tesis, tienen como consecuencia la formación en superficie de cristales en forma de agujas (TP Fino) o placas (TP Grueso) . El segundo nivel está formado por aglomerados semiesféricos, que son agrupaciones de cristales de apatita (véase Figura (véase Figura 2.18 y Figura 2.19). El origen de estos aglomerados está en las partículas originales de α -TCP, cuya disolución inicia el proceso de fraguado

del cemento. De hecho, diversos estudios han mostrado que la formación de CDHA tiene lugar alrededor de las partículas de polvo inicial [34]. La Figura 2.29 intenta reflejar esquemáticamente los dos primeros niveles de la topografía, los aglomerados semiesféricos (segundo nivel) formados por los cristales de apatita (primer nivel). El tercer nivel de rugosidad correspondería a los diferentes defectos topográficos que los aglomerados cristalinos forman sobre la superficie.



Figura 2.29: Esquema de la superficie mostrando la superficie de aglomerados semiesféricos formados por los cristales de apatita.

El interior de las muestras presenta una estructura mucho más densa. El crecimiento de los cristales de apatita está más restringido que en superficie. Las observaciones realizadas por SEM muestran que la microestructura interior para ambos tipos de muestras no está tan claramente diferenciada como en superficie. Se puede observar una mezcla de ambos tipos de cristales de apatita (agujas y placas) (véase Figura 2.22) con predominio de unos u otros en función de la granulometría inicial. Esto es debido a la distribución del tamaño de partícula de los dos productos de partida y a la propia reacción de fraguado. A pesar de que las distribuciones del tamaño de partícula son diferentes, existe cierto solapamiento entre ellas. La morfología de los cristales viene determinada por la disolución de las partículas que componen el polvo del cemento [20, 29].

Uno de los aspectos que tienen gran influencia en el comportamiento celular es la topografía de la muestra. La evaluación bajo parámetros cuantitativos permite comparar el comportamiento celular frente a diversas topografías estudiadas.

2.5.3. Caracterización Topográfica: Interferometría óptica y AFM

Uno de los principales objetivos de este capítulo es la cuantificación de la topografía de las muestras utilizadas con el fin de analizar un efecto en la interacción con entidades biológicas (células y proteínas). Sin embargo, la compleja morfología de las mismas dificulta su cuantificación. No existen técnicas que sean capaces de evaluar con precisión las diferentes escalas observadas al mismo tiempo. Podemos encontrar un buen resumen de la resolución de cada técnica, así como de los rangos usuales de uso en [4].

La resolución de una técnica en una medida depende de la muestra en cuestión a medir y del área que se quiera medir. Así, si se quiere medir una

gran área utilizando un AFM, es a costa de perder resolución. La imagen de la izquierda de la Figura 2.30 compara la resolución y el rango de distintas técnicas. La resolución aumenta hacia el origen y el rango aumenta a medida que nos alejamos del origen. Para un punto P, podemos calcular el ratio entre resolución y medida utilizando la regla de la palanca de forma similar a un diagrama de fases. La imagen de la derecha es una buena visualización de las limitaciones de ciertas técnicas para resolver detalles laterales pequeños debido a las diferencias en el elemento medidor utilizadas. Tal como reflejan estos diagramas no es posible la elección de una sola técnica para la caracterización de la rugosidad en las muestras de este estudio. Es por ello que se escogieron dos técnicas diferentes, la interferometría óptica de luz blanca (método de escaneado vertical) y la microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

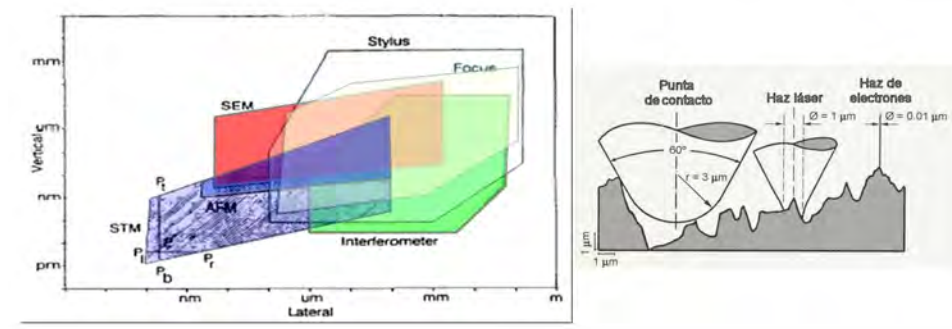


Figura 2.30: Comparación de la capacidad de resolución de distintos métodos para evaluar la topografía de una superficie. Imagen izquierda adaptada de [36]. Imagen derecha adaptada de [4]

En el caso del interferómetro, su capacidad de resolución vertical teórica está en el rango de los 3nm y la resolución lateral en torno a 450nm [24, 37]. La resolución lateral por lo tanto está en el rango de las agujas de apatita y del espesor de las placas. En este sentido, no es posible cuantificar la aportación individual ni de las agujas ni de las placas a la rugosidad total a partir de su perfil individual. La rugosidad medida con el interferómetro es por lo tanto la debida al conjunto de aglomerados cristalinos y a los defectos que estos componen. Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, la interferometría de luz blanca tiene dificultad para medir cambios bruscos de pendiente y se ve afectada por la propia reflectividad del material. En este caso se hicieron pruebas metalizando las muestras. Los resultados obtenidos reflejaron que disminuía un poco la aparición de defectos ópticos de la medida, sin llegar a eliminarlos, aunque la resolución seguía siendo insuficiente para identificar los cristales de apatita.

Los defectos ópticos en las muestra aparecen como picos muy altos o puntas que son fácilmente eliminados con la aplicación de un filtro. Entre

los diferentes filtros se escogió un filtro Pasa-Bajos de $0,5\mu\text{m}$, eliminado así el ruido y la posible aportación individual de los cristales de apatita que el interferómetro hubiera podido captar y que eran difíciles de distinguir de los defectos ópticos. La aportación de estos defectos a los valores medios en altura (S_a y S_q) era inferior a los 100 nm. Al ser el parámetro S_z más dependiente de los valores extremos su aportación es más significativa, del orden de los 500 nm para las muestras de TP Grueso y $2\mu\text{m}$ para las de TP Fino.

El AFM tiene una resolución vertical del orden del Å y lateral del orden del nm, pero en muestras con condiciones de superficie muy concretas, con defectos en el rango de pocos nanómetros. Uno de los aspectos limitantes es la propia geometría del palpador (Figura 2.6) y el sistema piezoeléctrico donde va montado. Tal como se puede observar en la Figura 2.24, el AFM es capaz de resolver los cristales de apatita para las muestras de TP Grueso. Sin embargo, no es capaz de resolver de forma individual las agujas de TP Fino, sino sólo la parte superior de las mismas. En este caso se presenta un doble problema; el palpador debe recorrer en altura el aglomerado al mismo tiempo que descender de forma individual las agujas. Los resultados, aunque aparecen sesgados, nos ayudan a situar el orden de magnitud de la rugosidad debida a estos defectos topográficos. En el caso del TP Grueso, al aumentar el área de escaneado, el AFM no es capaz de seguir en altura los valles y picos más profundos y sólo se puede evaluar la rugosidad en zonas “relativamente” planas. Sin embargo, sí es capaz de mostrar el perfil de las placas al escanear áreas pequeñas. El rango vertical del AFM está en el entorno de las $5\mu\text{m}$ [36] [26], mientras que la diferencia entre los valles y picos más altos (S_z) medida por interferometría para las muestras de TP Grueso es de $\approx 15\mu\text{m}$ y para el TP Fino es de $\approx 8\mu\text{m}$. Por lo tanto los valores de rugosidad para el TP Grueso y el TP Fino en áreas de escaneado de $20 \times 20\mu\text{m}^2$ deberían ser mayores a los reflejados por el AFM, pero estos aparecen filtrados por la limitación en el rango vertical de la técnica tal como se ha comentado antes.

Otras posibles técnicas que se podían haber usado podrían haber sido la perfilometría láser con una resolución lateral de $1\mu\text{m}$ y vertical de 50nm [26] y la microscopía confocal láser cuya resolución lateral es de $0,25\mu\text{m}$ y vertical 500nm. Ambas técnicas están en el rango de la interferometría óptica. Sin embargo, estas técnicas también se ven afectadas por los cambios de pendiente pronunciados al ser técnicas ópticas dando lugar a defectos ópticos tal como se ha comentado anteriormente. Además la mayor resolución sólo es posible si se miden áreas pequeñas [4]. En nuestro caso, la información aportada hubiera sido similar a la de la interferometría óptica.

El análisis de la rugosidad en función del área de escaneado por Chauvy *et al.* [38] o en función de la longitud de onda por Wieland *et al.* [26, 39] muestra la utilidad de ambos enfoques en el análisis de la rugosidad en muestras con defectos en diversos rangos. Estos análisis permiten por ejemplo ver la rugosidad debida a diferentes tratamientos o ver la aparición de defectos

a distintas escalas que pueden ser enmascarados dentro de un perfil general.

En esta tesis, se ha utilizado el concepto de Wieland en el uso del interferómetro con la aplicación de los filtros. La Figura 2.31 muestra el uso de los conceptos expuestos por Chauvy en su artículo [38], En ella, se observa la evolución de S_a en función del área de escaneado combinando los valores obtenidos para AFM e interferometría óptica. A medida que ampliamos el área de escaneado, se observa una inversión de los valores máximos de rugosidad entre TP Grueso y TP Fino. En áreas pequeñas de escaneado es posible escanear diversas agujas de apatita mientras que sólo es posible escanear una placa de apatita. A medida que se aumenta el área de escaneado el mayor tamaño de los cristales y de los aglomerados de TP Grueso hace aumentar rápidamente el valor de la rugosidad.

La rugosidad en ambos casos aumenta en función del área de escaneado. Teóricamente por encima de cierta área o longitud de escaneado la rugosidad para una superficie determinada llega a un máximo. En el caso del TP Fino podría decirse que seguir aumentando el área de escaneado no aporte más información sobre la superficie. En el caso del TP Grueso faltaría ampliar más el área de escaneado y ver si aporta más información.

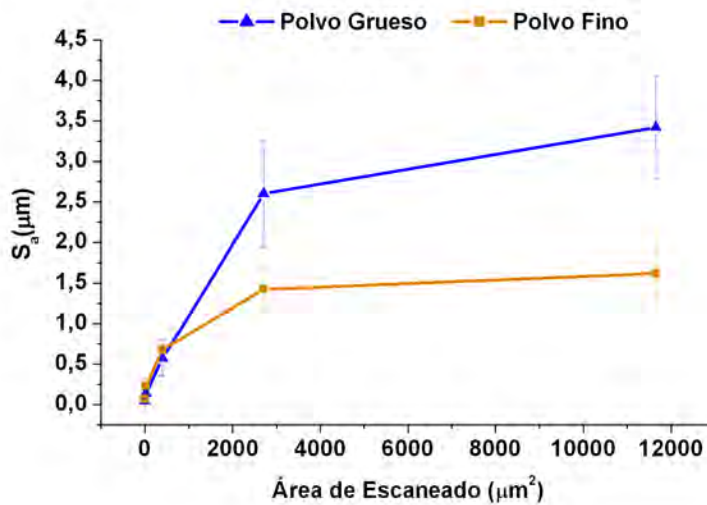


Figura 2.31: Evolución de S_a en función del área de escaneado, resultados de interferometría óptica y microscopía de fuerzas atómicas

Estableciendo una comparativa de los resultados obtenidos en este trabajo con el trabajo de Wieland *et al.* [39] usando el concepto del análisis de la rugosidad en función de la longitud de onda, sobre superficies de titanio atacadas con ácido superponiendo esta rugosidad a un granallados previo o topografías regulares de cavidades hemiesféricas a través de diferentes técnicas, las conclusiones son muy similares. Las técnicas allí empleadas (perfilometría laser e interferometría de luz blanca) son capaces de resolver la

topografía general pero no así la rugosidad debida al ataque ácido que está en el orden de magnitud de los cristales de apatita aquí encontrados. En su caso, el AFM está todavía más fuera de rango que en las superficies aquí estudiadas debido a las grandes diferencias en altura, superiores a las de este trabajo.

El análisis de las medidas ha puesto de manifiesto también la dispersión existente entre las medidas de una misma muestra y entre muestras. Una forma de reducir este factor es el análisis de áreas más grande. Esto es posible realizarlo en el microscopio de interferometría óptica, sin embargo al mismo tiempo que se amplía el área de escaneado también se pierde resolución y se aumenta la dispersión de la luz que capta el interferómetro en este tipo de muestras. El área de escaneado y los aumentos utilizados son adecuados en relación a los defectos a escanear. El aumento del número de muestras medidas, así como las medidas realizadas por muestra también ayudan a acotar la dispersión de los resultados. De hecho, las diferencias encontradas mediante interferometría óptica son estadísticamente significativas y la dispersión es similar en ambos tipos de muestra.

Bigerelle *et al.* analizan la influencia de la rugosidad en la proliferación celular mediante el uso de diversos acabados superficiales y diversos materiales (acero, titanio puro y aleaciones de titanio) [40]. En su trabajo, usan parámetros clásicos de amplitud y de espaciado (S_a , S_K , P_c ...), al igual que otros como la longitud de autocorrelación, el parámetro G que representa el número de inflexiones por unidad de longitud o un parámetro de orden dando un valor de 0 a 100 en función de superficie aleatoria o superficie periódica. Sus conclusiones muestran que son los parámetros que evalúan la morfología de la topografía los más importantes a la hora de evaluar la interacción celular con una superficie mostrando como una topografía con carácter aleatorio es mejor que una superficie ordenada. Este es el caso que estudiado en esta tesis donde se tienen superficies con carácter aleatorio.

En los trabajos de cultivos celulares sobre cementos de fosfato de calcio la medida de la rugosidad no suele ser objeto de estudio. Los trabajos de Yuasa *et al.* [41] reportan para sus cementos “anti-washout” valores de R_a entre 1,6 y 1,7 μm medidos con un perfilómetro de no-contacto. Estos valores corresponderían a la rugosidad del cemento de TP Fino, aunque es difícil establecer comparaciones. Varían tanto el método de medición como la composición del cemento. Otros autores no indican ningún valor de la rugosidad en sus estudios celulares con CPC, aunque las imágenes de las topografías de sus trabajos son similares a las de esta tesis [42–48].

Otros artículos con los cuales se puede establecer comparación son aquellos donde se utiliza apatita estequiométrica sinterizada. Rouahi *et al.* [49] da valores de S_a entre 0,065 y 4,35 μm medido mediante perfilómetro. Okumura *et al.* [50] en sustratos de apatita estequiométrica sinterizada reportan un valor de R_a de 0,29 μm medido mediante perfilómetro. Deligianni *et al.* [51] en sustratos de apatita sinterizada consigue diferentes perfiles de

rugosidad mediante el uso de paños diferentes de pulido con rugosidades entre $0,733$ y $4,860\mu\text{m}$ además de conseguir una geometría de líneas paralelas. En los trabajos realizados por Webster *et al.* [52] con hidroxiapatita sinterizada nanométrica consiguen valores de R_a inferiores a los 100 nm mediante AFM. Dos Santos *et al.* [35, 53] obtienen valores entre 100 y 200 nm medidos con AFM. Cabe comentar la diversidad de los valores de rugosidad obtenidos en las apatitas sinterizadas, debido al mayor control que se puede obtener en ese tipo de técnicas.

2.5.4. Ángulo de contacto

En cuanto a las medias de ángulo de contacto, los valores obtenidos muestran que la superficie de los CPC obtenida es muy hidrofílica. hay que mencionar que las dos técnicas empleadas no reflejan diferencias estadísticamente significativas entre los valores encontrados para las muestras obtenidas con TP Grueso y con TP Fino, existiendo una dispersión en los valores de entre 3 y 5° . En los sustratos tan rugosos y porosos como los aquí encontrados es difícil la determinación del ángulo del contacto.

La técnica de la gota sesil, de uso habitual en la determinación del ángulo de contacto, ha sido utilizada con éxito en el estudio de la mojabilidad de suelos, mediante la formación de un monocapa de partículas aunque su mojabilidad era menor a la aquí encontrada. Otras técnicas que se podrían utilizar podrían ser el “capilar rising” donde se introducen partículas en un tubo de cristal y se observa la velocidad con la que sube la columna de agua entre las partículas [54]. La medición del ángulo del contacto quizás requiera de un estudio de mayor profundidad y comparativa con más técnicas. Sin embargo, los resultados obtenidos permite anticipar que las diferencias existentes entre ambos sustratos no serán muy grandes.

El ángulo de contacto encontrado para los cementos de CDHA difiere del encontrado por ejemplo por Webster *et al.* [52] en apatita sinterizada nanocrystalina con un valor de $6,5^\circ$ para un tamaño de grano de 67 nm a $11,5^\circ$ para un tamaño de grano de 179 nm, en ambos casos con rugosidades nanométricas. Orabe *et al.* en apatita sinterizada encuentran valor de 70° , llegando a reducirlo hasta valores de 10° - 40° mediante implantación iónica [55]. Lopes *et al.* encontraron valores 59° para hidroxiapatita sinterizada [56]. Henriques *et al.* encuentran un valor de 53° [57]. Monkawa *et al.* en apatita sinterizada y pulida encuentra un valor de ángulo de contacto de $64,3^\circ$ [58], Monkawa *et al.* en nanoapatita precipitada sobre una capa de oro obtienen un valor de $44,4^\circ$ [59], esta capa de apatita fue posteriormente usada para análisis con microbalanza de cuarzo. Kawasaki *et al.* encuentran un ángulo de contacto de 65° en hidroxiapatita aunque no hacen referencia a su Ca/P [60]. Los valores de ángulo de contacto referenciados anteriormente muestran una gran dispersión, esto puede ser debido a los diferentes orígenes de las apatitas obtenidas. También cabe decir que pocos hacen referencia al protocolo de

limpieza seguido así como a la rugosidad de las muestras, esto puede tener una gran influencia ya que el protocolo de limpieza tal como muestran Harnett *et al.* [61] influye en el valor del ángulo de contacto obtenido. En los sustratos de apatita estudiados aquí el único método de limpieza seguido fue la inmersión en agua destilada, para eliminar la presencia de la solución de Ringers. No es posible la limpieza con ultrasonidos ya que daña la superficie de la muestra al afectar a los aglomerados cristalinos de apatita. La limpieza con líquidos orgánicos también podía haberse utilizado, pero las muestras fueron siempre tratadas de la misma forma, por lo que los valores obtenidos a nivel comparativo son válidos para establecer que, con las técnicas usadas, no se observan variaciones importantes en el ángulo de contacto entre los dos cementos con diferentes microestructuras. Los valores aquí encontrados se situarían en una zona intermedia en comparación con los de la literatura. Si establecemos cierta influencia de la rugosidad, tal como muestra Queré [62] para un sustrato rugoso tenemos que

$$\cos \theta^* = r \cos \theta \quad (2.13)$$

donde θ^* es el ángulo de contacto efectivo observado, θ es el ángulo de contacto en una superficie idealmente lisa y r es el ratio entre la superficie real y la superficie aparente. Siendo siempre $r > 1$, de esta ecuación se deduce que $\theta^* < \theta < 90^\circ$ y $\theta^* > \theta > 90^\circ$. Esto implica que la rugosidad incrementa la mojabilidad para sustratos hidrofílicos y la disminuye para sustrato hidrofóbicos. En nuestro caso r se sitúa en valores de 1,41-1,26 para TP Grueso medido por AFM en función del área de escaneado y para TP Fino entre 1,86-1,46 (Ver sección 2.4.4.2). Esto podría explicar entonces el menor ángulo de contacto observado junto a la naturaleza de las apatitas analizadas en comparación con los valores encontrados en la literatura.

Una de las cosas a citar es que aparte de la combinación de defectos topográficos en el rango submicrométrico y micrométrico, la ausencia de contaminación superficial proveniente de la atmósfera puede aumentar la energía superficial, (reduciendo el ángulo de contacto) provocando un efecto de sinergia en el comportamiento celular, tal como muestran Zhang *et al.* [12] sobre titanio. Sin embargo, es un aspecto que no se ha tenido en cuenta en esta tesis a la hora de realizar los estudios celulares.

2.6. Conclusiones

El producto final de la reacción de fraguado del cemento de fosfato tricálcico alfa corresponde, para los dos tamaños de partícula inicial, a una hidroxiapatita deficiente en calcio, tal como se deduce de los estudios de difracción de Rayos X y de espectroscopía infrarroja. Sin embargo, las diferencias detectadas en la anchura de los máximos de difracción de Rayos X indican que la cristalinidad del producto es menor para las muestras obtenidas del TP Fino.

La microestructura y topografía superficial de los cementos de fosfato de calcio son complejas, presentando estructuras organizadas a dos niveles: los cristales individuales y los aglomerados cristalinos. Por este motivo la caracterización de la rugosidad superficial requiere del uso complementario de distintas técnicas, como la interferometría óptica de luz blanca y el microscopio de fuerza atómica, para poder caracterizar correctamente los parámetros topográficos a diferentes escalas. La interferometría óptica permite caracterizar la rugosidad debida a los aglomerados de cristales de apatita, mientras que la microscopía de fuerza atómica permite poner de relieve la rugosidad debida a los cristales individuales.

La utilización de distintos tamaños de partícula iniciales en el cemento afecta la microestructura y por tanto la topografía final, tanto a nivel del tamaño de los cristales individuales como a nivel del tamaño de los aglomerados cristalinos. Las muestras de CPC obtenidas con TP Grueso muestran una rugosidad más elevada en el rango vertical con valores de $S_a=3,42\mu\text{m}$ frente a $S_a=1,62\mu\text{m}$ para las muestras de TP Fino. Sin embargo, las muestras de TP Fino se caracterizan por tener más presencia de picos y valles y menor distancia entre estos defectos con valores de $P_c=20,61/\text{mm}$ y $S_m=8,44\mu\text{m}$ frente a $P_c=10,42/\text{mm}$ y $S_m=11,1\mu\text{m}$ para las muestras de TP Grueso.

4. Los estudios de porosimetría de intrusión de mercurio revelan que los cementos obtenidos con la relación $L/P=0,35\text{ml/g}$ presentan un 40 % de porosidad abierta, con interconexiones en el rango de los 100nm, siendo ligeramente mayor para el TP Fino que para el TP Grueso.

Referencias

- [1] Bengt Kasemo. Biological surface science. *Surface Science*, 500(1-3):656–677, 2002.
- [2] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Kokubo, and T. Nakamura. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-ct based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 27:5892–5900, 2006.
- [3] C. Aparicio, F. J. Gil, J. A. Planell, and E. Engel. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(12):1105–1111, 2002.
- [4] J. Vöros, M. Wieland, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, and D.M. Brunette. *Titanium in Medicine: material science and surface science and engineering and biological responses and medical applications*. Springer, 2001.
- [5] C. Aparicio. *Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya and Barcelona, 2004.
- [6] O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, and D. Landolt. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*, 25(14):2695–2711, 2004.
- [7] M.J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, and R.O.C. Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 2007.
- [8] K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21:667–681, 2000.
- [9] C.D.W. Wilkinson and M. Riehle, M. Wood, J. Gallagher, and A.S.G. Curtis. The use of materials patterned on a nano- and micro-metric scale in cellular engineering. *Materials Science and Engineering C*, 19:263–269, 2002.
- [10] A. Curtis and C. Wilkinson. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18:1573–1583, 1997.
- [11] J. Lincks, B.D. Boyan, C.R. Blanchard, C.H. Lohmann, Y. Liu, D.L. Cochran, D.d. Dean, and Z. Schwartz. Response of MG63 osteoblast-like

- cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19:2219–2232, 1998.
- [12] G. Zhao, A.L.Raines, M. Wieland, Z. Schwartz, and B.D. Boyan. Requirement for both micron- and submicron scale structure for synergistic responses of osteoblasts to substrate surface energy and topography. *Biomaterials*, 28:2821–2829, 2007.
- [13] P.Roach, D. Farrar, and C.C. Perry. Interpretation of protein adsorption: Surface induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127:8168–8173, 2005.
- [14] B. Kasemo and J. Gold. Implant surfaces and interface processes. *Adv. Dent. Res.*, 13:8–20, 1999.
- [15] R. Tzoneva, T. Groth, G. Altankov, , and D. Paul. Remodeling of fibrinogen by endothelial cells in dependence on fibronectin matrix assembly. effect of substratum wettability. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 13:1235–1244, 2002.
- [16] B.D. Boyan and Z. Schwartz. *Bone engineering*. Em Squared Inc, 2000.
- [17] G. Altankov, F. Grinnell, and T. Groth. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30:385–391, 1996.
- [18] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. Garcia. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(2):247–259, 2003.
- [19] M. P. Ginebra, E. Fernandez, E.A.P. De Maeyer, R. M. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C. Driessens, and J.A. Planell. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *Journal of Dental Research*, 76(4):905–912, 1997.
- [20] M.P. Ginebra, F.C. Driessens, and J.A. Planell. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 25(17):3453–3462, 2004.
- [21] M.P. Ginebra, E. Fernández, F.C.M. Driessens, and J.A. Planell. The effect of Na_2HPO_4 addition on the setting reaction kinetics of an α -TCP cement. *Bioceramics*, 11:243–246, 1998.
- [22] S. Sarda, E. Fernandez, J. Llorens, S. Martinez, M.Nilsson, and J. A. Planell. Rheological properties of an apatitic bone cement during initial setting. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(10-12):905–909, 2001.
-

- [23] P. A. Webb and C. Orr. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*. 1997.
- [24] Veeco Metrology Group. *Wyko Surface Profiler Technical Reference Manual*, 1999.
- [25] http://en.wikipedia.org/wiki/atomic_force_microscopes.
- [26] M. Wieland, P. Hänggi, W. Hotz, M. Textor, and B. A. Keller and N. D. Spencer. Wavelength-dependent measurement and evaluation of surface topographies: application a new concept of window roughness and surface transfer function. *Wear*, 237:231–252, 2000.
- [27] K. J. Stout and L. Blunt. *Three-dimensional surface topography*. Penton, 2000.
- [28] <http://www.kruss.de/en/newsletter/newsletter-archives/2008/issue-19/application/application-02.html>.
- [29] M. P. Ginebra. *Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-alfa para aplicaciones quirúrgicas*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, 1996.
- [30] M. Bohner and G. Baroud. Injectability of calcium phosphate pastes. *Biomaterials*, 26(13):1553–1563, 2005.
- [31] C. L. Camiré, U. Gbureck, W. Hirsiger, and M. Bohner. Correlating crystallinity and reactivity in an α -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 26(16):2787–2794, 2005.
- [32] M. Bohner, A. K. Malsy, C. L. Camiré, and U. Gbureck. Combining particle size distribution and isothermal calorimetry data to determine the reaction kinetics of α -tricalcium phosphate–water mixtures. *Biomaterials*, 2:343–348, 2006.
- [33] I. Khairoun, M. G. Boltong, F. C. Driessens, and J. A. Planell. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(8):425–428, 1998.
- [34] M. P. Ginebra, E. Fernández, F. C. M. Driessens, and J. A. Planell. Modeling of the hydrolysis of α -TCP. *Journal of American Ceramic Society*, 82, 1999.
- [35] E. A. dos Santos, A. B. R. Linhares, A. M. Rossi, M. Farina, and G. A. Soares. Effects of surface undulations of biphasic calcium phosphate tablets on human osteoblast behavior. *Journal Biomedical Materials Research: Part A*, 74:315–324, 2005.

-
- [36] K.J.Stout and L.Blunt. Nanometres to micrometres:three-dimensional surface measurements in bio-engineering. *Surface and Coatings Technology*, 71:69–81, 1995.
- [37] S. C. H Thian, W. Feng, Y. S. Wong, J. Y. H. Fuh, H. T. Loh, K. H. Tee, Y. Tang, and L. Lu. Dimensional measurement of 3d microstruture based on white light interferometer. *Journal of Physics: Conference Series*, 48:1435–1446, 2006.
- [38] P.F.Chauvy, C.Madore, and D. Landolt. Variable length scale analysis of surface topography:characterization of titanium surfaces for biomedical applications. *Surface and Coatings Technology*, 110:48–56, 1998.
- [39] M.Wieland, M.Textor andN.D. Spencer, and D.M.Brunette. Wavelength-dependent roughness:a quantitative approach to characterizing the topography of rough titanium surfaces. *The international Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 16:163–181, 2001.
- [40] M. Bigerelle and K. Anselme. Statistical correlation between cell adhesion and proliferation on biocompatible metallic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 72A(1):36–46, 2005.
- [41] T. Yuasa, Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, Y. Momota, S. Tatehara, and M.Nagayama. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(7-8):1159–1166, 2004.
- [42] Y. J. Lee, J. S. Ko, and H. M. Kim. The role of cell signaling defects on the proliferation of osteoblasts on the calcium phosphate apatite thin film. *Biomaterials*, 27(20):3738–3744, 2006.
- [43] D. Richard andN. Dumelié, H.Benhayoume, S.Bouthors, C.Guillaume andN.Lalun, G.Balossier, and D. Laurent-Maquin. Behavior of human osteoblast-like cells in contact with electrodeposite calcium phosphate coatings. *Journal of Biomedical Material Research Part B:Applied Biomaterials*, 79B:108–115, 2006.
- [44] M. Julien, I. Khairoun, R.Z. LeGeros, S. Delplace, P. Pilet, P. Weiss, G. Daculsi, J.M. Bouler, and J. Guicheux. Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calicum phosphates. *Biomaterials*, 28:956–965, 2007.
- [45] F. Chai andN. Blanchemain, A. Lefevre, and H. F. Hildebrand. In vitro studies on the influence of precultural conditioning method on osteoblast reactions of a new type of injectable calcium cement material. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.*, 77(1):104–113, 2006.
-

- [46] Y. F. Chou, W. Huang, J. C. Dunn, T. A. Miller, and B. M. Wu. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials*, 26(3):285–295, 2005.
- [47] U.Hempel, A. Reinstorf, M.Poppe, U. Fischer, M. Gelinsky, W. Pompe, and K.W. Wenzel. Proliferation and differentiation of osteoblasts on bio cement d modified with collagen type i and citric acid. *Journal of Biomedical Material Research Part B:Applied Biomaterials*, 71:130–143, 2004.
- [48] C.Knabe, F.C.M. Driessens, J.A.Planell, R.Gildenahaar, G.Berger, D.Reif, R.Fitzner, R.J.Radlanski, and U.Gross. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *Journal of Biomedical Material Research*, 52:498–508, 2000.
- [49] M. Rouahi, O. Gallet, E. Champion, J.Dentzer, P. Hardouin, and K. Anselme. Influence of hydroxyapatite microstructure on human cell response. *Journal of Biomedical Material Research*, 76, 2006.
- [50] A. Okumura, M. Goto, T. Goto, M. Yoshinari, S. Masuko, T. Katsuki, and T. Tanaka. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (SaOS-2). *Biomaterials*, 22(16):2263–2271, 2001.
- [51] D. D. Deligianni, N.D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1):87–96, 2001.
- [52] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):475–483, 2000.
- [53] E. A. dos Santos, M. Farina, G. A. Soares, and K. Anselme. Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 19:2307–2316, 2008.
- [54] J. Bachman, S.K. Woche, M.O. Goebel, M.B. Kirkham, and R. Horton. Extended methodology for determining wetting properties of porous media. *Water resources research*, 39:1353, 2003.
- [55] Y. Okabe, S. Kurihara, T. Yajima, Y. Seki, I.Nakamura, and I. Takano. Formation of super-hydrophilic surface of hydroxyapatite by ion implantation and plasma treatment. *Surface and Coatings Technology*, 196:303–306, 2005.

- [56] M. A. Lopes, F. J. Monteiro, J. D. Santos, A. P. Serro, and B. Saramago. Hydrophobicity and surface tension and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(4):370–375, 1999.
- [57] M. Henriques, J. Azeredo, and R. Oliveira. Adhesion of candida albicans and candida dubliniensis to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 33:235–241, 2004.
- [58] A. Monkawa, T. Ikoma, S. Yunoki, K. Ohta, and J. Tanaka. A dewetting process to nano-pattern collagen on hydroxyapatite. *Materials Letters*, 60:3647–3650, 2006.
- [59] A. Monkawa, T. Ikoma, S. Yunoki, T. Yoshioka, J. Tanaka, D. Chakarov, and B. Kasemo. Fabrication of hydroxyapatite ultra-thin layer on gold surface and its application for quartz crystal microbalance technique. *Biomaterials*, 27:5748–5754, 2006.
- [60] K. Kawasaki, M. Kambara, H. Matsumura, and W. Norde. A comparison of the adsorption of saliva proteins and some typical proteins onto the surface of hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32:312–334, 2003.
- [61] E. M. Harnett, J. Alderman, and T. Wood. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55:90–97, 2007.
- [62] D. Queré. Rough ideas on wetting. *Physica A*, 313:32–46, 2002.

Capítulo 3

Estudio de la Adsorción y desorción de Proteínas

3.1. Introducción

3.1.1. Importancia de la adsorción de proteínas

El estudio de la adsorción y comportamiento de las proteínas sobre las superficies es de vital importancia en campos tan diversos como la biología, la medicina, la biotecnología, el transporte de líquidos, la purificación de agua, la industria alimentaria, las estructuras y el transporte marítimo.

En el campo de los biosensores, la durabilidad, especificidad y sensibilidad de los mismos dependen de la adsorción de proteínas sobre la superficie del sensor. Por citar un ejemplo, la viabilidad de un detector de glucosa *in situ* para administración de insulina depende que la superficie del sensor esté libre de proteínas adheridas de forma no específica que bloqueen la señal [1].

La adsorción y/o desorción controlada de proteínas sobre materiales puede permitir una mejor administración de fármacos, de manera más controlada y localizada [2, 3]. La adhesión de anti-cuerpos sobre nano-partículas permitiría por ejemplo una mejor localización de células tumorales abriendo el campo a nuevas terapias para la cura del cáncer [3].

En el campo industrial, la adherencia de microorganismos sobre la superficie de barcos, tuberías, depósitos, etc., también viene precedida de la adsorción de una capa de proteínas y/o polisacáridos. La corrosión debida a los microorganismos puede ser incrementada o inhibida en función de los microorganismos presentes en el biofilm que se forme [4]. Una de las estrategias buscadas es la no adsorción de proteínas, superficies denominadas “anti-fouling”, mediante el recubrimiento por ejemplo con polietilenglicol. Otras estrategias buscan recubrir las superficies con una capa que atraiga de forma específica ciertas especies inocuas para las superficies [4, 5].

La Figura 3.1 ilustra de forma sencilla la sucesión de eventos que tienen lugar cuando un implante o biomaterial es implantado en el organismo y la

respuesta del organismo. Después de la implantación de un biomaterial en un ser vivo, pueden observarse proteínas en un espacio de tiempo inferior a un segundo sobre la superficie del biomaterial. En cuestión de minutos, una monocapa de proteínas se adsorbe sobre la mayoría de las superficies. La adsorción de las proteínas ocurre bastante antes de que tenga lugar cualquier interacción con las células. De este hecho se deduce que las células, cuando llegan a la superficie de un biomaterial, ven la capa de proteínas adsorbida en vez de la superficie propiamente dicha del biomaterial [6, 7].

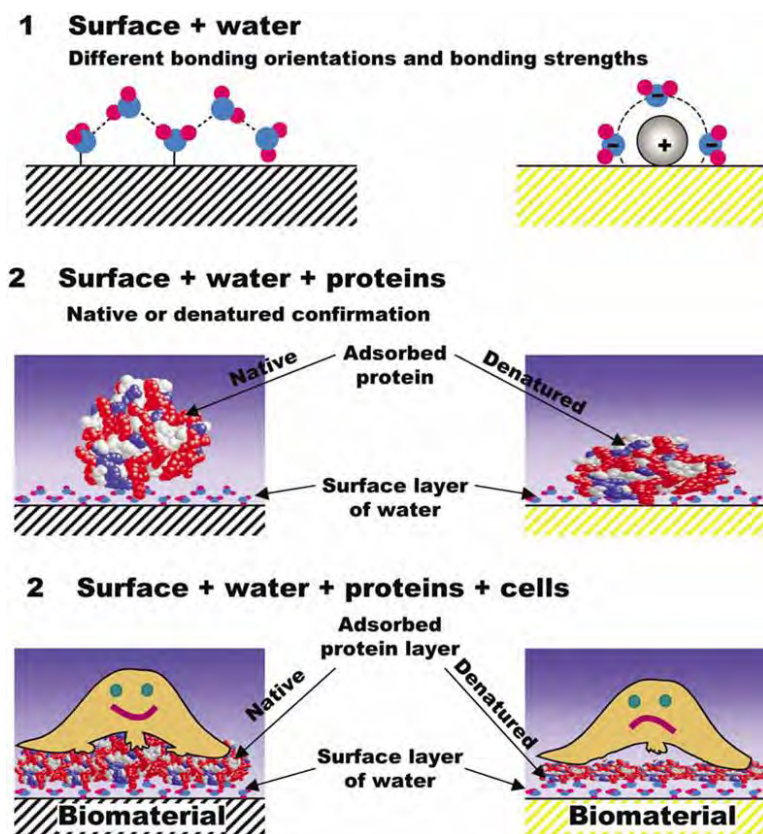


Figura 3.1: Imagen esquemática de los sucesos que ocurren *in vivo* después de la implantación de un biomaterial y respuesta del organismo al mismo [7].

Así, materiales tan dispares como polímeros, cerámicos o metales, que exhiben diferentes propiedades superficiales, desde comportamiento hidrofílicos a comportamiento hidrofóbicos, duros o blandos, pueden inducir una respuesta similar *in vivo*, a pesar de su diferencia [8].

Esto es debido a la adsorción no-controlada de material biológico (proteínas, polisacáridos, células, etc..) sobre la superficie de los dispositivos o implantes en contacto con medio biológico. Las superficies no imitan la estructura natural y su función en el lugar de implantación, llegando a causar reacciones adversas en el organismo, como la encapsulación fibrosa, inflamación crónica y aguda, oclusión de los vasos sanguíneos artificiales de menor

diámetro o infección, [5].

En contraste, los procesos biológicos emplean superficies complejas de proteínas y/o polisacáridos, empleando mecanismos moleculares específicos para el control de la respuesta biológica, como por ejemplo los mecanismos que intervienen en la adhesión celular entre la matriz extracelular y la superficie de las células via las integrinas. Es por esto que los organismos parecen relativamente insensibles a las superficies de los implantes, ya que la química relativamente sencilla de éstas en comparación con las superficies biológicas no es capaz de desencadenar los mecanismos complejos que intervienen en los procesos biológicos tal como se ha comentado anteriormente. En este sentido, se ha usado un considerable esfuerzo científico en modificar las superficies y recubrirlas con moléculas señalizadoras apropiadas y poder controlar la adsorción de proteínas. Una gran cantidad de esfuerzo ha sido dedicado a superficies resistentes a la adsorción de proteínas, “non-fouling surfaces” y más recientemente a superficies que buscan una adsorción específica y controlada de proteínas, buscando así una respuesta específica del organismo.

3.1.2. Factores que influyen en la adsorción de proteínas sobre las superficies de un biomaterial

La interacción entre las superficies y las proteínas es un proceso complejo en el cual intervienen fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas y enlaces de puentes de hidrógeno así como la topografía [6]. A su vez, factores como la carga iónica de la solución y el pH influyen en los diferentes dominios de aminoácidos hidrofóbicos/hidrófilicos y en las cargas de estos últimos modificando el proceso de adsorción [9, 10].

Las propiedades intrínsecas de las proteínas, como pueden ser la carga, el tamaño, la estabilidad de su estructura y la secuencia y composición de aminoácidos y la conformación estérica afectan también a su adsorción. En términos de estabilidad de las proteínas, por ejemplo, se habla de:

- *-proteínas blandas* como la albúmina que son susceptibles de cambios en cualquier tipo de superficie.
- *-proteínas duras* como la lisozima, menos proclives a cambios independientemente de la superficie [1].

Se considera de forma general, que la capa de proteínas adsorbida sobre una superficie es una capa monomolecular. La estructura concreta de la capa adsorbida es complicada, dependiendo de la superficie y del tipo de proteína. Para las proteínas consideradas rectangulares ($a \times b \times c$), existen por ejemplo dos tipos de adsorción uno sobre su eje largo (“end-on type”) y otro sobre su eje corto (“side-on type”).

El tipo de adsorción de estas proteínas es extrapolado habitualmente a partir de la cantidad adsorbida sobre una superficie [1]. Por ejemplo para

el caso del fibrinógeno existen varias configuraciones tanto para superficies hidrofílicas como hidrofóbicas, ver Figura 3.2b más adelante en el texto [1, 11]

Desde un punto de vista de los biomateriales en contacto con el interior de un organismo, las proteínas provenientes del plasma sanguíneo o del exudado peritoneal son las proteínas con mayor probabilidad de unirse a su superficie en sus primeras fases. Es por lo tanto la adsorción de proteínas del plasma sanguíneo la que determinará en gran medida la respuesta posterior por parte del organismo. Las proteínas no solubles, como el colágeno, que no está presente en el plasma sanguíneo, no poseen generalmente la capacidad de fluir libremente hacia el material, sino que son depositadas sobre la superficie por las células.

La mayoría de las proteínas solubles presentan formas esféricas o globulares (el fibrinógeno sería una excepción), con los aminoácidos con grupos polares en su superficie, mientras que los diferentes aminoácidos con grupos apolares residen en su interior. Según Horbett, las proteínas solubles del plasma desde un punto de vista físico-químico se pueden representar esquemáticamente como gotas de cera (aminoácidos apolares) envueltas en una capa con carga positiva y negativa repartida por su superficie (aminoácidos polares) [6].

En la interacción con las superficies por lo tanto son principalmente los grupos polares los que entran inicialmente en contacto, mientras que para que los grupos apolares puedan interactuar, la proteína ha de perder de alguna forma su estructura secundaria y/o terciaria, dando lugar a los llamados cambios conformacionales. Estos cambios dependen del tiempo de contacto con las superficies. Los cambios conformacionales dan oportunidad a las interacciones de los aminoácidos hidrofóbicos con regiones hidrofóbicas de la superficie de los materiales, incrementando por lo tanto los puntos de interacción, sobre todo en sustratos hidrofóbicos.

Debido a las interacciones que tienen lugar entre una proteína y una superficie durante su adsorción, este proceso suele ser considerado irreversible. Se llega a la inmovilización de la proteína sobre la superficie. Si se retira una solución conteniendo proteínas por una solución limpia, la capa de proteínas adsorbida no se “despega” de la superficie. Las condiciones para que ello ocurra han de ser particulares, variación en la fuerza iónica de la solución, adición de un surfactante que se adhiera fuertemente a la proteína y a la superficie en cuestión, etc...

Los autores suelen hablar por lo tanto de un estado “adsorbido”, diferente del estado en solución. La funcionalidad de una proteína, por ejemplo su actividad enzimática, puede depender si está en solución o adsorbida. Muchas proteínas en solución no son activas, mientras que sí lo son en su estado adsorbido. Las plaquetas sólo se adhieren al fibrinógeno una vez adsorbido y no en solución. Lo mismo ocurre con otros factores de coagulación.

Puede existir, a su vez, un fenómeno de cooperación en la adsorción de

ciertas proteínas que sólo son activas en presencia de otras proteínas también adheridas. Esto no significa necesariamente que las proteínas se unan entre sí, sino que la adsorción de una segunda proteína no desplaza a la primera por “efecto Vroman” (explicado más adelante) sino que la obliga a cambiar su conformación [12, 13].

La adsorción de proteínas procedentes de una solución que contenga diversas proteínas presenta un carácter selectivo, debido a la limitación de espacio en superficie, las diferentes proteínas entrarán en competición entre ellas. Así podemos tener un enriquecimiento en superficie de una proteína u otra dependiendo del medio, la mezcla de proteínas, la concentración de cada proteína y de la superficie en cuestión.

A su vez, el tipo de proteínas adsorbido sobre una superficie puede variar con el tiempo de adsorción. Las proteínas de menor tamaño pueden ser desplazadas de la superficie por las proteínas de mayor tamaño una vez ya adsorbidas. Esto es conocido como el efecto “el efecto Vroman” [13, 14]. La composición de la capa de proteínas que llega a una superficie será por lo tanto una mezcla de las proteínas que llegan rápidamente a la misma, junto aquellas que llegan posteriormente pero que tienen una mayor afinidad por la misma [15].

La concentración de la proteína en solución es otro factor que influye en la forma en la cual la proteína se adsorbe y sufre cambios conformacionales. Por ejemplo, para el caso de la albúmina sobre TiO_2 , los cambios conformacionales parecen depender, de la concentración inicial en solución. A concentraciones bajas ($<0,04$ mg/ml), la proteína no sufre aparentemente cambios conformacionales significativos. Sin embargo, a concentraciones superiores a $0,2$ mg/ml la adsorción ocurre en dos etapas, una primera rápida y una segunda donde la capa crece debido a cambios conformacionales de la proteína en dirección al plano de la superficie que permiten una mayor adsorción sobre la superficie [1]. En el primer caso, la concentración de albúmina sobre la superficie no es suficiente para que exista una interacción entre moléculas de albúmina adyacentes, mientras que al ir aumentando la concentración en superficie se produce una mayor interacción entre las moléculas de albúmina, dando lugar a los cambios conformacionales.

El fibrinógeno adsorbido sobre una superficie hidrofóbica ($-\text{CH}_3$) o hidrofílica ($-\text{OH}$), en función de la concentración en superficie también puede sufrir un cambio en su modo de adsorción, pasado del tipo “side-on” a “end-on”, en función de la concentración de fibrinógeno en superficie, pudiéndose observar una adsorción en dos etapas [11], este ejemplo es ilustrado en la Figura 3.2b.

La química de la superficie afecta en sobremanera la forma en la que se adhiere una proteína a una superficie. De forma general, las proteínas se adhieren en mayor cantidad sobre las superficies hidrofóbicas que sobre las superficies hidrofílicas. También experimentan una mayor interacción con la superficie en función del grado de hidrofobicidad al haber una mayor

actividad de los grupos hidrófobos presentes en la proteína [1, 11, 16, 17].

En términos de estabilidad intrínseca de las proteínas, las proteínas *blandas*, como la albúmina (humana y bovina) tienden generalmente a adsorberse en todas las superficies independientemente de las interacciones electrostáticas debido a una ganancia en su entropía conformacional después de su adsorción. Para las denominadas proteínas *duras*, la cantidad absorbida sobre superficies hidrofílicas es pequeña a menos que haya interacciones electrostáticas que lleven a cambios conformacionales después de la adsorción [1].

Este hecho no es trivial, ya que una mayor fuerza de adhesión de una proteína sobre una superficie puede implicar que las células no puedan modificar la proteína en superficie y crear un microambiente adecuado para poder realizar su funcionalidad. Altankov et al [18] estudiaron la reorganización de la fibronectina pre-adsorbida por parte de fibroblastos, sobre diferentes sustratos cuyas químicas superficial variaba, siendo los ángulos de contacto con agua entre 25° y 111°. La pre-adsorción de fibronectina mejoraba la adhesión celular sobre todos los sustratos en comparación con los sustratos sin fibronectina. Únicamente sobre el sustrato más hidrofílico, superficie de vidrio, los fibroblastos fueron capaces de reorganizar la capa de fibronectina pre-adsorbida eficazmente. Al ir incrementando la hidrofobicidad los fibroblastos eran cada vez menos capaces de reorganizar la fibronectina pre-adsorbida. Resultados similares fueron obtenidos con células endoteliales con respecto al fibrinógeno y a la fibronectina pre-adsorbida también por el grupo de Altankov [19].

Keselowsky *et al.* también mostraron la influencia del sustrato sobre la proteína adsorbida, variando la química superficial para obtener grupos terminales concretos en superficie (-CH₃, -OH, -COOH, -NH₂) mostrando diferencias en la conformación de la fibronectina y su efecto sobre el cultivo posterior de osteoblastos [12] y fibroblastos [16]. Los estudios de Garcia muestran que los diferentes cambios conformacionales de la fibronectina sobre las diferentes superficies afecta a la secuencia RGD expuesta a las células. Las células se adhieren a las superficies a través de las integrinas, algunas de las cuales actúan específicamente con esta secuencia de tres péptidos. Si está expuesta y disponible, la adhesión celular puede tener lugar.

Otro de los factores que afecta a la adsorción de proteínas sobre una superficie es la topografía de la misma. En la Figura 3.2 se muestra de forma gráfica el efecto que tienen la topografía de los materiales sobre la adsorción de las proteínas.

La interacción específica de cada tipo de proteína con una superficie determinada hace que éstas reaccionen a factores como la curvatura de diferente formas. Esto implica un cambio en la conformación de la proteína y la exposición de diferentes grupos en función de la topografía.

Roach et al [17] estudiaron los cambios conformacionales del fibrinógeno y de la albúmina en función del radio de curvatura sobre nanoesferas de sílica. En el caso del fibrinógeno, Figura 3.2.c, en partículas de menor

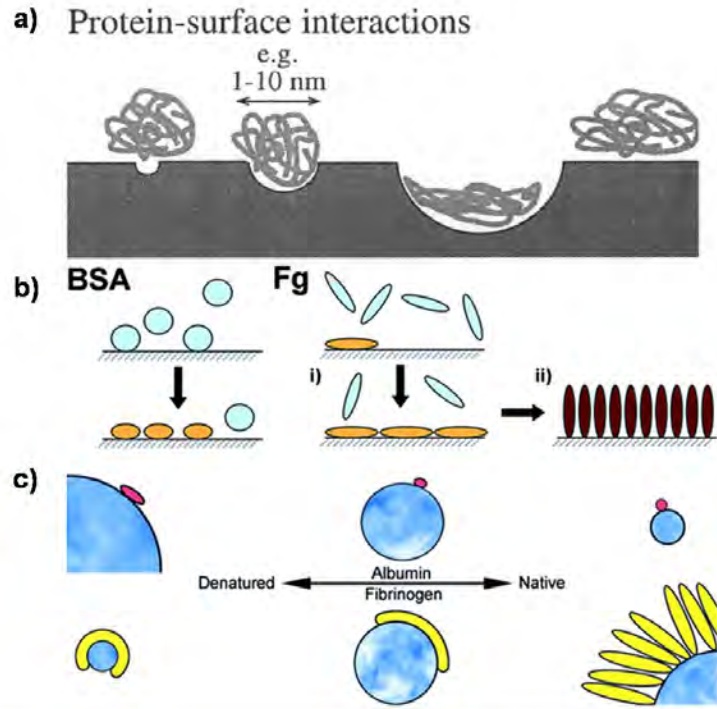


Figura 3.2: Defectos topográficos en el orden de magnitud de una proteína ($<20\text{nm}$) en la superficie de un implante influyen en la adsorción y conformación de las proteínas de diferente forma a por ejemplo una superficie plana. a) extraído de [15]. b) extraído de [11]. c) extraído de [17].

radio la proteína se adhiere sobre su eje más largo paralelo a la superficie (side-on), mientras que al aumentar el radio la proteína cambia su modo de adsorción con su eje largo perpendicular a la superficie (end-on). En las partículas de menor radio, la proteína experimenta cambios conformacionales mayores. El mismo experimento fue llevado a cabo con albúmina, siendo los cambios conformacionales mayores cuando menor era el radio de curvatura.

La actividad enzimática de la lisozima por ejemplo se ve afectada al adsorberse sobre partículas de sílica con $r=100\text{nm}$ mientras que conserva una mayor actividad enzimática sobre partículas con una gran curvatura, $r<20\text{nm}$ [20]. Esto implica que existe una mayor interacción entre la lisozima y las superficies planas perdiendo su actividad debido a los cambios conformacionales. Lunqvist *et al.* observaron resultados similares con respecto a la anhidrasa carbónica [10]. Denis et al [21] observaron también influencias sobre la organización de moléculas de colágeno sobre un sustrato liso en comparación con un sustrato nanorugoso, observando la formación de fibrillas de colágeno para un sustrato liso, mientras que un sustrato nanorugoso no permitía dicha formación de fibrillas. Kondo *et al.* también muestran los cambios conformacionales que ocurren con la hemoglobina humana al ad-

sorberse sobre partículas finas de sílica. [22]

El conocimiento de los cambios conformacionales y el establecimiento de las condiciones de adsorción de una proteína sobre una superficie es necesario para entender los mecanismos que gobiernan la adsorción. Esto permitiría, por ejemplo, obtener el estado óptimo de funcionalidad después de la adsorción. Este hecho es de vital importancia por ejemplo en biosensores o la inmovilización de proteínas para ensayos tipo ELISA.

La cantidad de proteínas adsorbida sobre una superficie puede estudiarse a partir del sobrenadante, o monitorizarse en continuo por distintas técnicas como la microbalanza de cuarzo, la elipsometría o la “optical waveguide lightmode spectroscopy” (OWLS) [23].

Las diferencias en la conformación pueden ser estudiadas mediante la desorción con surfactantes, la unión de anticuerpos, la espectroscopía de infrarrojos, el dicroísmo circular, el microscopio de fuerzas atómicas, la espectrometría de masas y la resonancia nuclear magnética [10]. Sin embargo, muchas de las técnicas requieren de una condiciones muy concretas para realizar los experimentos, que no son aplicables sobre sustratos como los obtenidos a partir del fraguado de un cemento de fosfato de calcio.

La adsorción de las proteínas sobre apatitas es un tema de mucha importancia, no sólo desde un punto de vista de su aplicación como biomateriales, sino también por ejemplo en procesos de cromatografía y separación de proteínas para diversas aplicaciones.

3.2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo es el estudio de la adsorción y desorción de proteínas sobre dos sustratos de hidroxiapatita deficiente en calcio con diferencias microestructurales obtenidos y caracterizados en el Capítulo 2 de la presente tesis, con el fin de establecer correlaciones entre los fenómenos de adsorción y las propiedades topográficas del sustrato. Dicho estudio se ha desglosado en dos objetivos específicos:

a) Estudio a partir de soluciones monoproteicas de fibronectina, albúmina y lisozima. Evaluación de la proteína adsorbida y de la desorción usando diferentes agentes de desorción (SDS y EDTA).

b) Estudio de la adsorción y desorción proteica a partir de medio de cultivo completo.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Fabricación de las muestras

En esta parte de la tesis se evalúa la influencia de la microestructura de los cementos obtenidos en el Capítulo 2 en la adsorción de proteínas. El cemento está compuesto por un 98 % en peso α -TCPy un 2 % en peso de PHA. Las muestras fueron fabricadas con una relación líquido-polvo de 0,35 ml/g utilizando agua desionizada.

Las muestras fueron fabricadas con unas dimensiones de 6mm de diámetro y 2mm de espesor utilizando moldes de teflón similares a los usados en la obtención de las muestras del Capítulo 2. El cemento se preparó mezclando, con la ayuda de una espátula, la fase en polvo con la fase líquida hasta conseguir una pasta homogénea.

Las muestras fueron incubadas en Solución de Ringers (0,9 g/l de NaCl) durante siete días a 37°C. Una vez completada la reacción de fraguado, las muestras fueron desmoldeadas sin tocar o ejercer presión en la cara en contacto con el molde. Se lavaron las muestras sumergiéndolas en agua destilada y se dejaron secar en un incubador a 37°C. Una vez secas las muestras se guardaron hasta su utilización.

Las muestras de esta parte del estudio fueron esterilizadas mediante calor seco a 180°C durante 2 horas, debido a la facilidad que supone esta técnica de esterilización.

3.3.2. Estudio de Adsorción de Proteínas

Se realizaron diferentes estudios de adsorción-desorción de proteínas para ver las diferencias existentes los dos tipos de cementos estudiados en esta Tesis. Parte de este trabajo, se realizó en el laboratorio de “Interaction de Chimie des Surfaces et Interfaces” (ICSI-CNRS) en Mulhouse, Francia, bajo la supervisión de la Dra. Karine Anselme.

3.3.2.1. Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima. Desorción mediante EDTA y SDS.

3.3.2.1.1. a) Adsorción.

El primer estudio consistió en la adsorción de proteínas a partir de soluciones monoproteicas de fibronectina, 50 μ g/ml (Sigma F-2518), albúmina, 200 μ g/ml (Sigma A-7888) y lisozima, 300 μ g/ml (Sigma L-4631) en PBS.

La adsorción se realizó introduciendo las muestras en placas de cultivo de 48 pocillos. Se añadieron 300 μ l de la solución de proteína durante 1h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo de adsorción, se recogió el sobrenadante y se guardó en eppendorfs en frío hasta su posterior utilización.

La cantidad de proteína adsorbida se determinó analizando la cantidad de proteína remanente en el sobrenadante mediante un test de Bradford (500-0203, Bio Rad).

Todo el material necesario para realizar el experimento fue previamente esterilizado.

3.3.2.1.2. b) Desorción.

Se realizaron estudios de desorción mediante el uso de dos agentes de desorción distintos: el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante del calcio que asegura una casi completa desorción de las proteínas de la superficie de la apatita, y un surfactante, el dodecilsulfato sódico (SDS) en solución acuosa.

Las concentraciones de las soluciones de desorción fueron:

- 0,5M de EDTA a pH de 10
- 10 % de SDS en PBS.

En el proceso de desorción, las muestras fueron lavadas con PBS dos veces para eliminar la solución de proteína remanente. Las muestras fueron entonces introducidas en eppendorfs y se añadieron 500 μ l de la solución de desorción correspondiente. La desorción se realizó durante una hora a temperatura ambiente y en agitación continua a 200-300rpm (Agitador Orbital, Heildoph). Una vez finalizado el tiempo de desorción se procedió a extraer la muestra de la solución de desorción. Posteriormente, se guardó el eppendorf en frío hasta su análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Esta técnica nos permite hacer un análisis semicuantitativo de la proteína presente comparando la intensidad de las bandas de estudio.

La desorción de proteínas no se puede medir mediante el test de Bradford, debido a las interferencias que los agentes de desorción usados, EDTA y SDS, tienen con el test.

-Descripción del EDTA

El EDTA o ácido etilendiaminotetraacético es una sustancia utilizada como agente quelante que puede crear complejos con muchos metales de transición. La forma deprotonada de la molécula se une a los iones metálicos, con una constante de equilibrio para la mayoría de metales elevada, y por lo tanto en presencia de iones metálicos se encuentra formando distintos complejos. Muchas de las reacciones dependen del pH, especialmente para los complejos formados con Ca^{2+} y Mg^{2+} . A pH 10, el EDTA se compleja con los iones Ca^{2+} , reaccionando primero con los iones en solución.

En el caso de utilizarlo en presencia de hidroxiapatita, la eliminación de los iones del medio provocará una disolución de la apatita para reequilibrar su producto de solubilidad. De esta forma el EDTA consumirá los iones Ca^{+2} de la superficie de la apatita, liberando de esta forma las proteínas adheridas

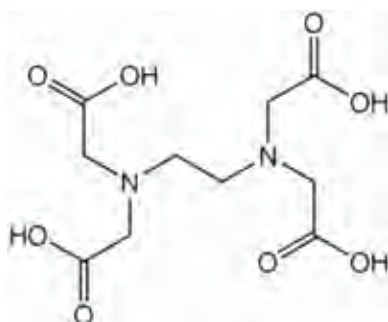


Figura 3.3: Estructura del EDTA en su forma neutra.

a la superficie. La capacidad del EDTA para liberar las proteínas adsorbidas dependerá del pH de la solución y de la concentración de EDTA en solución.

-Descripción del SDS

El dodecilsulfato sódico (SDS) es uno de los surfactantes más utilizados en la industria, empleado en gran variedad de productos de higiene personal. El SDS es utilizado como agente de desorción de proteínas ([24–27]) y en los estudios de SDS-PAGE.

El SDS es un tensioactivo aniónico formado por una cadena hidrófoba de 12 átomos de carbono y una parte hidrofílica (grupo sulfato) soluble en agua. Los surfactantes o tensioactivos tienden a unirse a las superficies para reducir su energía libre al ubicarse en la interfase y satisfacer parcial o totalmente su doble afinidad. Tal adsorción ocurre también cuando una sola afinidad está satisfecha como en el caso de la adsorción en la superficie aire-agua o líquido-sólido. En tal caso, el llamado efecto hidrófobo es la principal fuerza motriz, ya que remueve el grupo apolar del agua. En presencia de una interfase entre un sólido y un líquido, la polaridad relativa del sólido y del líquido puede inducir al surfactante a adsorberse por la parte polar (cabeza) o por la parte apolar (cola) en función de la polaridad o apolaridad de la superficie.

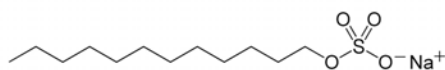


Figura 3.4: Estructura del SDS en su forma neutra.

La tendencia de los surfactantes a adsorberse sobre una superficie es uno de los factores a la hora de desorber proteínas al entrar en competición por la superficie presente. La interacción directa del surfactante con la superficie desplaza la proteína adsorbida, creando dominios de surfactante que comprimen la capa de proteína adsorbida. Esto llega a provocar la ruptura de la capa de proteína adsorbida previamente, haciendo que la proteína se desplace y se agrupe, y llegado cierto punto la proteína es finalmente desorbida

de la superficie.

Otro factor es la interacción del surfactante con la propia proteína, creando un complejo proteína-surfactante el cual posee una menor actividad superficial. Dependiendo de la forma de unión entre el surfactante y la proteína, la fuerza de interacción entre la superficie y el complejo proteína-surfactante se ve afectada de diferente forma. En soluciones diluidas y a valores de pH por debajo del punto isoelectrico de la proteína, la unión estequiométrica de los surfactantes aniónicos con aminoácidos catiónicos crea un complejo menos hidrofílico, aumentando su adsorción. A grandes concentraciones de surfactante, existe una unión cooperativa a las proteínas mediante interacciones hidrofóbicas de las colas del surfactante de forma similar a la formación de micelas. Esto incrementa su solubilidad como resultado del incremento de carga en el complejo surfactante-proteína. Al mismo tiempo, la acumulación de carga aumenta las interacciones electrostáticas entre la superficie y el complejo, como entre complejos vecinos, desestabilizando la capa adsorbida. Adicionalmente al hecho de cambiar las fuerzas de interacción entre la proteína y la superficie, y las fuerzas electrostáticas con proteínas vecinas, la unión del surfactante con la proteína puede alterar al mismo tiempo su conformación, cambiando por lo tanto también las interacciones estéricas entre otras con proteínas vecinas [28].

La capacidad del SDS para desorber proteínas de una superficie depende de varios factores como son: la superficie, la proteína a desorber, la concentración de proteína adsorbida, la concentración de surfactante, la fuerza iónica del medio y el tiempo que la proteína ha estado en contacto con la superficie [29].

3.3.2.1.3. c) Electroforesis en geles de poliacrilamida: SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es un método desarrollado por Ulrich Laemmli en 1970, ampliamente utilizada en bioquímica, genética, biología molecular. El objetivo de esta técnica es separar las proteínas en función de su movilidad electroforética, en función de la longitud de la cadena aminoácidos, masa molecular mediante la aplicación de un campo eléctrico a través de una matriz porosa.

Para poder separar las proteínas en función de su masa molecular es necesario desnaturalizarlas primero rompiendo las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las mismas. Esto permite eliminar la influencia de la estructura tridimensional de la proteína en su movimiento a través de la matriz porosa, al estar la cadena de aminoácidos completamente estirada, por lo que sólo influenciará su tamaño (longitud). Esto se consigue mediante la adición de SDS.

La capacidad del SDS para desnaturalizar las proteínas parte de la naturaleza anfifílica compartida por las proteínas y el surfactante. El grupo sulfato del SDS interactúa con los aminoácidos de las proteínas, cuyas

cadenas laterales están cargadas positivamente. Al mismo tiempo la cadena alquilo del SDS interacciona con los aminoácidos cuyas cadenas laterales son hidrofóbicas [30]. Esto provoca la ruptura de los enlaces no covalentes de las proteínas, perdiendo así su conformación nativa, tal como muestra esquemáticamente la Figura 3.5.

La proporción de moléculas del SDS que se unen a una proteína es de una molécula de SDS por cada dos aminoácidos. La unión del SDS con las proteínas confiere al complejo proteína-surfactante una carga global negativa proporcional al número de aminoácidos de la proteína. Esta carga negativa es superior a la carga neta inicial de la proteína. Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migrarán hacia el polo positivo atravesando la matriz porosa del gel de poliacrilamida. Es bajo estas circunstancias que las proteínas se separan en función de su tamaño, siendo las proteínas de menor tamaño las que son capaces de atravesar más fácilmente la red de poros y por lo tanto son las que más correrán.

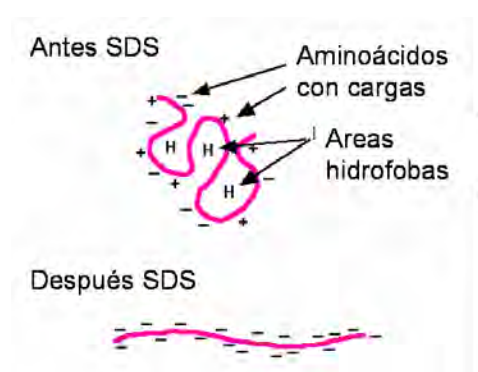


Figura 3.5: Interacción del SDS con las proteínas. La parte superior muestra una proteína en su conformación nativa, con aminoácidos con carga eléctrica principalmente en superficie y áreas hidrofóbicas. En la parte inferior se muestra la proteína después de su interacción con el SDS donde la cadena de aminoácidos de la proteína está estirada y el complejo SDS-proteína posee una carga global negativa.

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones. En estos casos se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La concentración se produce por isotacoforesis de la muestra en el primer gel (“stacking”). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS, que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl^- de los tampones de carga en el gel de apilamiento (“stacking”). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies migran a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo

se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl^- si hay una región de “campo de fuerza”. “El campo de fuerza” es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración. El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que $[\text{Cl}^-] > [\text{proteína-SDS}] > [\text{glicinato}]$. Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl^- y del glicinato [31].

La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo tampón. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl^- deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad. En la Figura 3.6 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de un dispositivo SDS-PAGE, como el relatado.

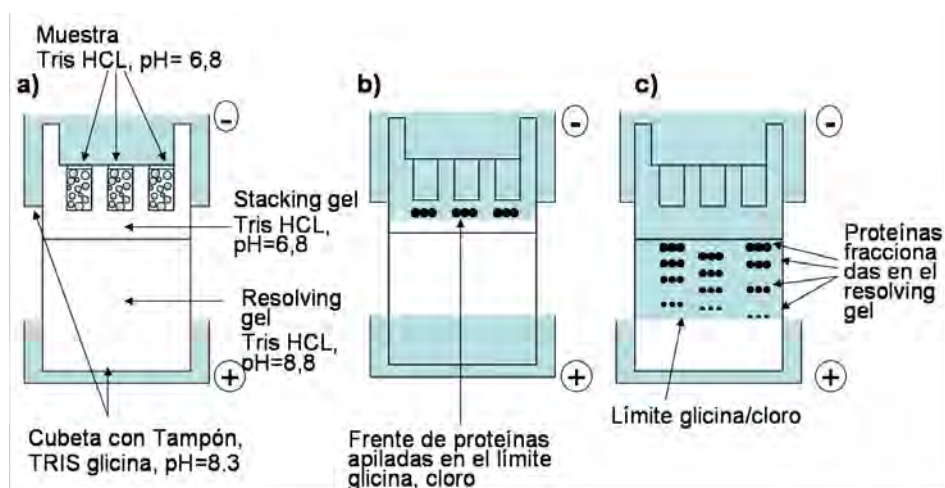


Figura 3.6: Esquema donde se muestra secuencialmente la situación en (a) al principio de la electroforesis, (b) durante el proceso de apilamiento ('stacking') y c) durante la separación en el gel resolutivo.

En la tabla 3.1 se recogen las formulaciones empleadas para realizar el “stacking gel” y el “resolving gel”.

La visualización de las proteínas en el gel después de la electroforesis se realizó mediante tinción con nitrato de plata, siguiendo el protocolo descrito a continuación (Tabla 3.2).

3.3.2.1.4. d) Ensayo de Bradford

La cuantificación de las proteínas presentes en el sobrenadante se realizó utilizando el Kit de Bradford (500-0203, Bio Rad). Este kit está diseñado

3.3. Materiales y Métodos

Tabla 3.1: Composición de los geles de poliacrilamida utilizados

Resolving gel	Stacking Gel	Función
Agua - 3,3ml	Agua - 3,4ml	
Acrylamida - 4,3ml	Acrylamida - 0,83ml	monómero
Tris 8,8 - 2,5ml	Tris 6,8 - 0,63ml	Tampón
SDS 10 % - 0,1ml	SDS 10 % - 50 μ l	Permite obtener proteínas lineares
APS 10 % - 0,1ml	APS 10 % - 50 μ l	Iniciador de polimerización
TEMED - 5,3 μ l	TEMED - 5 μ l	Catalizador de polimerización

Tabla 3.2: Protocolo para la tinción con nitrato de plata de los geles de poliacrilamida

Solución de fijación	30min	20ml Ethanol 95 % 5ml ácido acético Completar hasta 50ml con agua
“Sensitizing” solution	30min	15ml EtOH 95 % 250 μ l Glutaraldeido 25 % 2ml Tiosulfato sódico (5 % w/v) 3,4g Acetato de sodio
Enjuagar 3 veces	3x5min	3x50ml agua
Solución de plata	20 min	5ml nitrato de plata (2,5 %w/v) 20 μ l formaldehido (37 %w/v) Completar hasta 50ml con agua
Enjuagar 2 veces	2x1min	2x50ml agua
Solución para revelar	2-7min	1,25g Carbonato sódico 10 μ l Formaldehido (37 %w/v) Completar hasta 50ml con agua
Solución para parar reacción	10min	0,73g EDTA.Na2 Completar hasta 50ml con agua
Enjuagar 3 veces	3x5min	3x50ml agua

para medir un rango de proteínas en solución 0,125 a 20 mg/ml. El ensayo se ha realizado siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo.

El ensayo Bradford es un ensayo de colorimetría de proteínas, basado en los cambios de absorbancia del colorante Azul de Coomassie (ver fórmula en Figura 3.7). En condiciones ácidas, el colorante está predominantemente en su forma protonada doble. En este estado tiene un color rojizo en solución y presenta absorbancia a 470nm. Al reaccionar con las proteínas, pasa a su forma desprotonada. Cambia su color a azul y presenta absorbancia a 595nm.

El mecanismo de reacción con las proteínas es a través de los aminoácidos básicos (principalmente la arginina) y a los aminoácidos con grupos aromáticos. El cambio de absorbancia puede fácilmente ser medido por un espectrofotómetro, la absorbancia es proporcional a la concentración de pro-

teínas en solución en el rango mencionado antes.

Este método tiene como problema su susceptibilidad a interferencias con algunos productos: el SDS y el EDTA interfieren cuando están en concentraciones superiores a 0,008M para el EDTA y 0,001 % para el SDS. Esto nos impide utilizar este ensayo para evaluar desorción, ya que las diluciones necesarias harían que el rango de proteínas estuviera por debajo del rango de detección del ensayo.

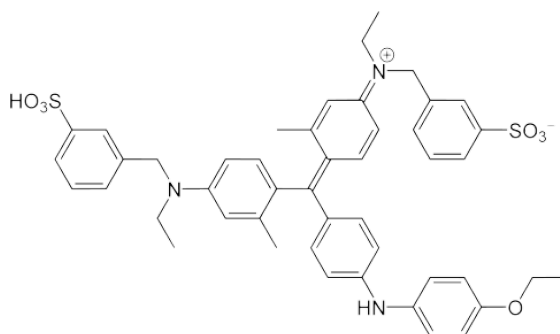


Figura 3.7: Fórmula del reactivo Azul de Coomassie utilizado en el ensayo de Bradford para la cuantificación de proteínas en solución.

3.3.2.2. Adsorción y desorción con SDS de Fibronectina y Albúmina marcadas con un marcador fluorescente (FITC)

En esta segunda parte del estudio de proteínas, se estudió más en detalle la adsorción y desorción de las proteínas con la solución de SDS para la cuantificación de la cantidad de proteína desorbida y confirmar los resultados obtenidos en el primer estudio.

Las proteínas en este estudio fueron marcadas con un marcador fluorescente previo a la adsorción. El marcador utilizado fue el isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich F2502). Este marcador es usado ampliamente en microbiología por ejemplo en microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y ensayos basados en inmunofluorescencia como “Western Blotting” y “ELISA”. El FITC reacciona con las aminas libres de las proteínas. La fluorescencia de esta molécula es muy elevada, este hecho nos permite detectar en un fluorímetro proteínas en solución en cantidades muy pequeñas que mediante otras técnicas no sería posible. El protocolo de marcaje de las proteínas empleado se describe más adelante.

3.3.2.2.1. a) Adsorción

Las concentraciones utilizadas en solución fueron para la fibronectina de 40 μ g/ml y para la albúmina de 100 μ g/ml en PBS. Las muestras fueron introducidas en placas 48 pocillos y sumergidas en 300 μ l de la solución

correspondiente de fibronectina o de albúmina. Los tiempos de adsorción fueron de 1 y 2h a 37°C y 5 % CO₂ y una humedad del 100 %.

3.3.2.2.2. b) Desorción

Las muestras, una vez completada la adsorción, fueron lavadas una primera vez con PBS durante 5 min en agitación continua a 200-300 rpm (Agitador Orbital, Heidolph). Posteriormente fueron traspasadas a una nueva placa y lavadas 2 veces más con PBS durante 5 min también bajo agitación. La desorción de la proteína adsorbida se llevó a cabo utilizando 500 μ l de una solución acuosa de SDS al 10 % un tiempo de 5h y bajo agitación continua (200-300rpm) a temperatura ambiente.

Tanto la adsorción como la desorción se realizó manteniendo las muestras protegidas de la luz, para evitar la pérdida de fluorescencia.

Las soluciones conteniendo la proteína desorbida fueron traspasadas a tubos eppendorf y fueron medidas a continuación en un Fluorímetro. La longitud de onda de excitación fue 488nm y la longitud de emisión fue de 530nm.

La cantidad de proteína desorbida fue cuantificada mediante la realización de una curva patrón a partir de la solución inicial de la proteína correspondiente. Las distintas disoluciones fueron también hechas en una solución de SDS al 10 % para evaluar posibles interacciones del SDS en la medida de fluorescencia.

El ensayo fue repetido dos veces con 4 muestras por tiempo.

3.3.2.2.3. c) Marcaje de proteínas con isotiocianato de fluoresceína (FITC)

Se preparó una solución de 2mg/ml de Albúmina o de un 1mg/ml de Fibronectina en una solución tamponada de 0.1M de Bicarbonato de Sodio (pH=9.1) de esta forma se consigue que la proteína pierda su estructura terciaria exponiendo los grupos aminos primarios y terminales amino.

Se disolvió el FITC en dimetil sulfóxido (DMSO) con una concentración de 1mg/100 μ l.

Posteriormente se añadieron 10 μ l de la solución de FITC por cada ml de solución de proteína y se dejó reaccionar 2h a temperatura ambiente en la oscuridad, para evitar que el FITC perdiera su capacidad de fluorescencia. En esta parte las moléculas de FITC se fijan a los grupos amino de las proteínas.

Una vez transcurridas las 2h, se separó la proteína marcada de la proteína no marcada y de las moléculas de FITC que no habían reaccionado mediante una columna cromatográfica, conteniendo un gel de Sephadex G-625, previamente equilibrada en PBS. La columna separa por exclusión de tamaño las distintas fracciones.

Las fracciones de proteína marcada fueron posteriormente analizadas mediante espectrofotómetro UV-Vis (UV Mini 1240, Shimadzu), para cuantificar la concentración final para su posterior uso.

3.3.2.3. Adsorción de proteínas del medio de cultivo completo y desorción con SDS

3.3.2.3.1. a) Adsorción.

En esta parte se caracterizó la desorción con SDS de proteínas adsorbidas a partir del medio cultivo completo. El medio de cultivo utilizado fue McCoys 5A Medium Modified (Sigma ref.M8403) con un 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS), 1 % de penicilina-estreptomicina (Sigma ref. P0781), 1 % de L-glutamina (Sigma ref. G7513).

Las pastillas correspondientes a ambas granulometrías con un diámetro de 6mm fueron introducidas en placas de 48 pocillos y sumergidas en medio completo en cámara de cultivo celular a 37°C en atmósfera con un contenido en CO₂ del 5 %. Los tiempos para los cuales se estudió la adsorción de proteína fueron 1, 2, 24 y 96h de incubación. Las muestras permanecieron en el medio completo durante este tiempo sin cambiarse el medio en ningún momento.

3.3.2.3.2. b) Desorción.

Después del periodo de incubación, las muestras fueron cambiadas de placa y lavadas 3 veces con PBS (Phosphate Buffer Solution, Sigma) durante 5 min bajo agitación a 200-300 rpm. La desorción se realizó en 500 μ l de una solución acuosa de SDS al 10 % en PBS durante 5 horas bajo agitación continua a 200-300rpm (agitador de placas Vortex Mixer) a temperatura ambiente.

Después de la desorción, se recogieron 100 μ l de la solución con las proteínas desorbidas para determinar la concentración de proteína y el resto de la solución se guardó en frío.

La cantidad de proteína desorbida se cuantificó mediante el método del ácido bicinonínico tal como se describe a continuación. Se realizaron 3 ensayos independientes con 4 muestras por tiempo (n=12).

3.3.2.3.3. c) Ensayo de ácido bicinonínico (BCA)

La cuantificación de las proteínas desorbidas se realizó mediante un ensayo de BCA (Micro BCATM, 23235 Pierce). Este ensayo está indicado para medir pequeñas concentraciones de proteínas 1-200 μ g/ml, teniendo un rango lineal entre 1-40 μ g/ml.

El ensayo para la determinación de proteínas del ácido bicinonínico es un análisis bioquímico similar al análisis de proteína de Lowry, o de Bradford.

Como en estos ensayos, la concentración de proteína se muestra a través de un cambio de color de la solución, en este caso del verde al púrpura, que es proporcional a la cantidad de proteínas presente en solución. Este cambio de color es fácilmente medible mediante técnicas colorimétricas.

El ensayo de BCA se basa principalmente en dos reacciones. En la primera reacción, los péptidos de las proteínas reducen el Cu^{2+} del sulfato de cobre a Cu^{1+} en medio alcalino conteniendo tartrato de sodio (reacción de biuret). Esta reacción depende de la temperatura, el ensayo se puede realizar de 37°C a 60° . Las mediciones fueron hechas todas a 37°C . La cantidad de Cu^{2+} reducido es proporcional a la cantidad de proteína en solución. Posteriormente, dos moléculas de BCA se unen a un catión de Cu^{1+} produciendo un quelato, de color púrpura que absorbe luz a una longitud de onda de 562nm .

La reacción que lleva a la formación del color del BCA se ve fuertemente influenciada por la presencia de cuatro residuos ácidos (cisteína, cistina, tirosina, y triptófano) en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, a diferencia de los métodos basados en el azul de Coomassie, la cadena de aminoácidos de las proteínas también contribuye a la formación del color, ayudando a minimizar la variabilidad causada por las diferencias de composición de las proteínas.

La cantidad de proteína es cuantificada comparando la absorción con soluciones de proteínas de concentraciones conocidas. En nuestro caso la curva patrón se realizó utilizando soluciones de 0 a $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ de albúmina bovina (Sigma ref. A7909-50G) en una solución acuosa de SDS al 10 %.

3.4. Resultados

3.4.1. Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima. Desorción mediante EDTA y SDS.

La Figura 3.8 muestra los resultados de concentración de proteínas existente en el sobrenadante después que las distintas soluciones hayan estado una hora en contacto con las muestras. En los tres casos, se obtiene una menor cantidad de proteína en el sobrenadante para las soluciones que han estado en contacto con las muestras de CPC de tamaño de partícula fino en comparación con las muestras de TP Grueso. Los valores obtenidos en este caso están en el rango de la concentración inicial.

También se puede observar la poca cantidad de lisozima adsorbida, para ambos tipos de CPC, teniendo en cuenta que es la proteína que presentaba una mayor concentración en la solución inicial ($300\ \mu\text{g}/\text{ml}$).

Los resultados de los estudios de desorción de albúmina con EDTA y SDS se presentan en la Figura 3.9. Se puede observar la mayor capacidad de desorción del EDTA en frente al SDS en la intensidad de las bandas obtenidas.

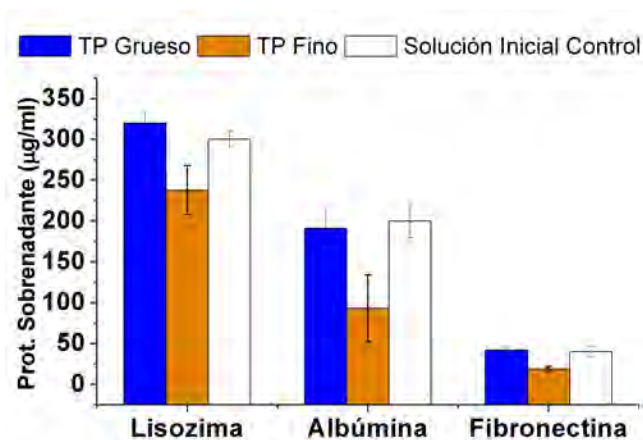


Figura 3.8: Cantidad de proteína en el sobrenadante después de 1h de adsorción

Como se ha comentado en la introducción, el EDTA forma complejos con los iones Ca^{2+} , por lo que tiende a reducir drásticamente la presencia de Calcio en el medio, favoreciendo la disolución del calcio superficial. Esto provoca al mismo tiempo un desplazamiento de las proteínas en superficie y por lo tanto su solubilización, mostrándose por lo tanto un agente de desorción eficaz.

Se observó una mayor intensidad de las bandas de albúmina en las muestras desorbidas con EDTA en el caso del TP Fino en comparación con el TP Grueso. Este resultado está en concordancia con la mayor adsorción de proteína tal como han mostrado los resultados obtenidos a partir del sobrenadante (ver Figura 3.8).

Los resultados con SDS sin embargo están en contradicción con la desorción de EDTA, se observa una mayor intensidad en las bandas de CPC TP Grueso que en las bandas de TP Fino. En la desorción con SDS, varios factores pueden influir en su capacidad de desorción como son la interacción entre las proteínas y la superficie, las interacciones electrostáticas entre la superficie y el tensioactivo y de carácter electrostático e hidrófobo entre las proteínas adsorbidas y el tensioactivo. La eficacia del SDS dependerá por lo tanto de la la superficie como de la posible conformación que haya adquirido la proteína después de su adsorción. El cambio de intensidad entre las bandas de TP Grueso y TP Fino con la desorción con SDS puede indicar diferencias en los mecanismos de interacción entre las proteínas y las distintas microestructuras de los CPC obtenidos.

Para poder confirmar que existe una mayor desorción de proteína mediante SDS en las muestras de TP Grueso respecto al TP Fino sería conveniente cuantificar la cantidad de proteína desorbida. En el caso del análisis por SDS-PAGE, la cuantificación de proteína desorbida no es posible realizarla debido al carácter cualitativo de la técnica. Al ser la cantidad de proteína desorbida con SDS muy pequeña, no es posible tampoco realizar el

test de Bradford o el BCA, ya que está por debajo del rango de detección. Al mismo tiempo el test de Bradford es incompatible con los porcentajes de EDTA y de SDS utilizados en solución. Es por ello que se recurrió al marcaje mediante fluorescencia de las proteínas.

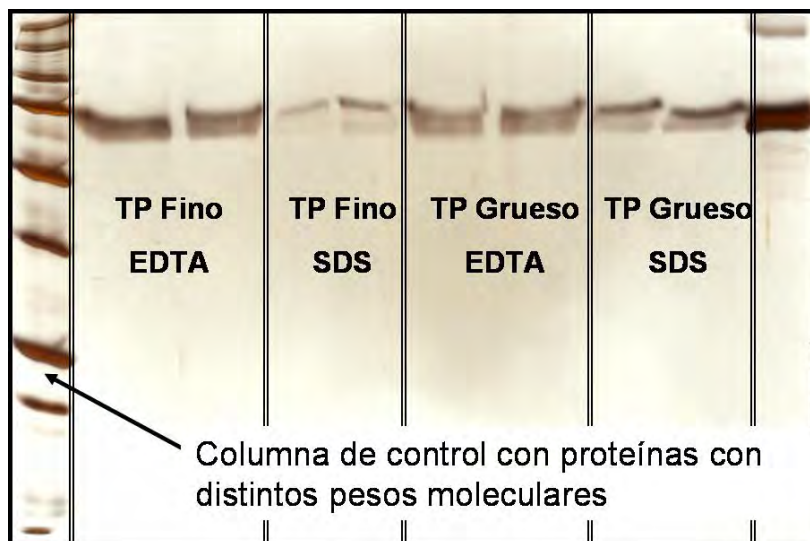


Figura 3.9: Imagen de un gel de poliacrilamida mostrando la intensidad de las bandas de albúmina desorbida con EDTA y SDS de las muestras de CPC hechas con TP Grueso y TP Fino. La primera columna de cada gel corresponde al control de diferentes proteínas y la última columna corresponde al control de una solución únicamente de albúmina.

3.4.2. Desorción con SDS de Fibronectina y Albúmina marcadas con un marcador fluorescente (FITC)

El marcaje de proteínas con moléculas fluorescentes permite la cuantificación de pequeñas cantidades de proteínas en solución mediante fluorescencia. Esta técnica nos permite cuantificar la proteína desorbida en los experimentos realizados.

La desorción en este caso se realizó únicamente con la solución de SDS al 10 %, para poder confirmar la tendencia observada con la técnica de SDS-PAGE. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.10.

Tal como se observa en la Figura 3.10, la cantidad de proteína desorbida es superior para las muestras de TP Grueso que para las muestras de TP Fino.

Estos resultados confirman, la menor intensidad de las bandas de desorción obtenidas para las muestras de TP Fino y SDS observadas en los Geles de SDS-PAGE (ver Figura 3.9).

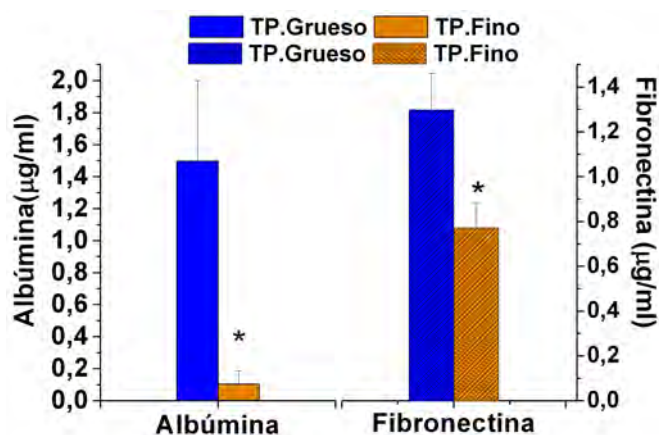


Figura 3.10: Cuantificación de la desorción con SDS al 10 % de Albúmina y Fibronectina marcadas con FITC. El "*" indica diferencias estadísticamente significativas.

3.4.3. Adsorción de proteínas del medio de cultivo completo y desorción con SDS

Los valores de adsorción calculados a partir del sobrenadante, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, teniendo desviaciones bastante elevadas en la adsorción debido a la gran cantidad de proteína presente en el medio completo. A continuación se muestran los valores obtenidos del sobrenadante para 1h de adsorción.

-TP Fino: 6586 ± 276 µg/ml.

-TP Grueso: 6425 ± 346 µg/ml

Sin embargo, la desorción mediante SDS evaluada en la Figura 3.11, nos muestra una mayor cantidad de proteína desorbida para el caso de las muestras de TP Fino en todos los tiempos estudiados, con diferencias estadísticamente significativas con respecto a las muestras de TP Grueso. La gran cantidad de proteínas diferentes presente en el medio de cultivo completo sin embargo no nos permite extraer ninguna información adicional.

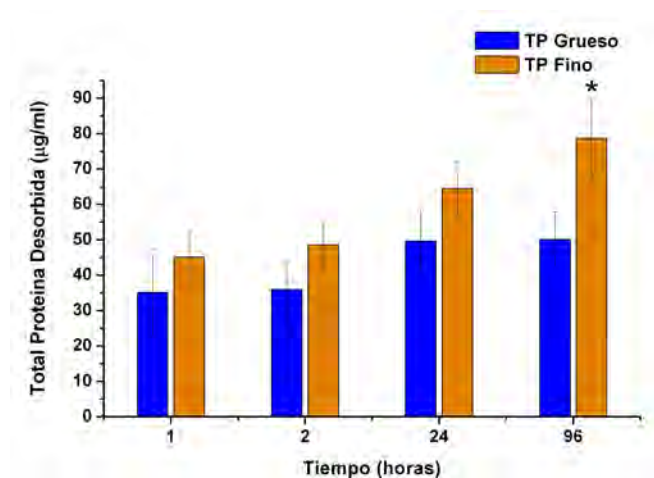


Figura 3.11: Adsorción-Desorción de proteínas a partir del Medio completo usando una solución de SDS al 10 %. El "*" indica diferencias estadísticamente significativas.

3.5. Discusión

3.5.1. Introducción: estructura de la apatita

La fórmula general de la apatita puede escribirse como



donde Me es un catión bivalente, XO_4 un anión trivalente e Y un anión monovalente. Se ha mostrado mediante difracción de rayos-X la similitud de la apatita biológica a la hidroxiapatita estequiométrica cuya fórmula sería $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Sin embargo, una de las propiedades más importantes de las apatitas es su gran tendencia a contener sustituciones iónicas y vacantes. Los seres vivos han sabido adaptar esta funcionalidad en los tejidos vivos mineralizados para cumplir sus necesidades fisiológicas y funcionales. Tal como se ha comentado en la Introducción de esta tesis la apatita biológica es una apatita deficiente en calcio y en hidróxido, con múltiples sustituciones iónicas. La morfología de los cristales de apatita encontrada en el hueso es en forma de placa y su tamaño varía entre 30-50 nm de longitud por 15-30 nm de ancho y 3-5nm de alto.

La estructura cristalográfica de la apatita corresponde al grupo espacial $P6_3/m$, donde $a=b=0,943\text{nm}$ y $c=0,688$. La hidroxiapatita presenta dos sitios de adsorción o unión en su superficie. Estos sitios de adsorción son conocidos como sitios "C" y "P" y pueden verse representados en la Figura 3.12

- Los sitios C están cargados positivamente y están formados por iones positivos o iones de calcio expuestos en la superficie de la hidroxiapatita por disolución de OH^- . Los sitios C juegan por lo tanto el papel de intercambiador de aniones, atrayendo los grupos acídicos. Los sitios C

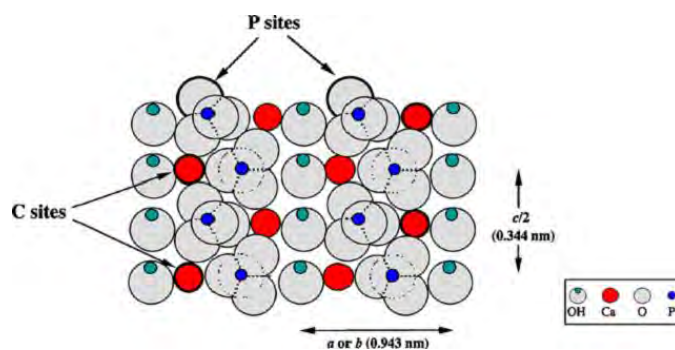


Figura 3.12: Representación de la estructura cristalográfica de la hidroxiapatita. Proyección perpendicular al eje c. [32]

están situados sobre las caras ac o bc de los cristales, espaciados de forma rectangular separados entre sí 0,943nm en la dirección a ó b, y separados en el eje c 0,344 nm.

- Los sitios **P** carecen de iones de calcio o con carga positiva. Están por lo tanto cargados negativamente, formados por iones fosfato, jugando el rol de intercambiador de cationes, atrayendo a los grupos básicos. Los sitios P están situados de forma hexagonal sobre las caras ab con una distancia mínima de 0,943nm [33, 34].

Las proteínas por lo tanto pueden adsorberse en los sitios C mediante la unión con grupos carboxilos o grupos fosfatos y en los sitios P mediante grupos ϵ -amino y/o grupos guanidilo.

Las proteínas ácidas ($pI < 7$) son principalmente adsorbidas en los sitios C mientras que las proteínas básicas ($pI > 7$) son adsorbidas en sitios P.

La adsorción de proteínas sobre las apatitas por lo tanto dependerá de su composición química [35–37], la morfología y tamaño de los cristales [34, 38] y variación de las propiedades superficiales de los cristales [32, 39]. Estas variables tienen gran influencia en las caras en contacto con el medio y a su vez en el intercambio iónico y en la adsorción de las proteínas [33, 34, 37, 40]. Otros factores macroscópicos que influyen en su comportamiento son la microestructura de los cristales obtenidos rugosidad superficial, meso- y microporosidad.

3.5.2. Adsorción de fibronectina, albúmina y lisozima: Carácter ácido-base de las proteínas.

Los estudios de adsorción a partir de monoproteínas muestran la baja afinidad de la lisozima en ambos tipos de morfología en comparación con su alta concentración en solución y su pequeño tamaño, debería en principio haberse adsorbido potencialmente más que las otras dos proteínas estudiadas.

Este hecho puede ser debido a dos factores. El primero sería la baja afinidad en general de la lisozima por su adsorción en superficies hidrofílicas, es una de las proteínas consideradas duras [1]. El segundo sería el carácter básico de esta proteína, cuyo punto isoeléctrico $pI=11,1$, la convierte en una proteína cargada positivamente a $pH=7,4$. Las otras dos proteínas estudiadas, cuyos puntos isoeléctricos son para la albúmina $pI=4,7$ y la fibronectina $pI=5,5-6$, se encuentran cargadas negativamente a $pH=7,4$.

Tal como se ha comentado en el apartado anterior, las proteínas ácidas ($pI < 7$) son principalmente adsorbidas en los sitios C mientras que las proteínas básicas ($pI > 7$) son adsorbidas en sitios P. Este hecho está relacionado con los sitios expuestos para adsorción que dependen de la morfología de los cristales de apatita obtenidos.

Kawasaki en su review sobre la hidroxiapatita como sustrato para cromatografía líquida analiza diferentes apatitas en función del ratio Ca/P de 1,52 a 1,67, la morfología de los cristales de hidroxiapatita obtenidos y su relación con las caras expuestas en los mismos [33].

En esta tesis, no se han realizado estudios de TEM que revelen las caras expuestas sobre las superficies de los cristales obtenidos en las muestras de CPC. Sin embargo, la morfología de los cristales obtenidos tanto para las muestras de CPC de TP Fino como de TP Grueso corresponde con dos tipos de cristales descritos por Kawasaki en su review así como con las imágenes mostradas [33].

La estructura cristalina de las muestras de CPC de TP Fino, correspondería a la estructura descrita por Kawasaki como tipo aguja, con un Ca/P de 1,52-1,54. En este tipo de estructura el eje del cristal es paralelo al eje c y las caras expuestas son por lo tanto en su mayoría tipo ac o bc , ricas en sitios C. Las caras ab están por lo tanto expuestas en los extremos de los cristales [33].

La estructura cristalina de las muestras de CPC de TP Grueso correspondería a la estructura descrita por Kawasaki como "rosa del desierto" con un Ca/P de 1,61-1,64. En este tipo de estructura cristalina, la superficie de las paredes laterales de las lamelas corresponde con el plano cristalino (100) o superficie ac o bc , por tanto rica en sitios C. Los sitios P estarían presentes sólo en las superficies libres superiores de las lamelas y en mucha menor proporción [33]. Se podría establecer una cierta correspondencia entre ambos tipos de cristales, así una lamela podría ser descrita como la sucesión continua de agujas.

Los resultados aquí obtenidos con el estudio de la lisozima, albúmina y fibronectina reflejan la preferencia por las proteínas ácidas de la apatita deficiente en calcio obtenida en los CPC, aunque sería conveniente realizar más experimentos con proteínas básicas para confirmar esta preferencia. Este resultado estaría en concordancia con los resultados expuestos en el trabajo de Kawasaki [33], donde se establece que los principales sitios de adsorción expuestos en las superficies de los cristales son de tipo C para la morfología

de apatita obtenida.

La baja adhesión de la lisozima sobre la apatita también ha sido reflejada por Kandori *et al.* [34, 40], sobre apatitas deficientes en calcio con relación Ca/P entre 1,5 y 1,59. En su trabajo comparan la adsorción de albúmina frente a lisozima en una solución de KCl. Las partículas de apatita estudiada tienen una morfología de agujas. El tamaño de las partículas varía principalmente en longitud (entre 0,12 y 5,21 μm) mientras que el espesor de cristal sufre una menor variación (entre 0,02 y 0,47 μm). Las caras expuestas en este tipo de cristales son caras ac ricas en sitios de adsorción C. Kandori muestra el incremento de afinidad de la albúmina en comparación con la lisozima al incrementar la longitud de los cristales debido a la disminución de sitios P con respecto a los sitios C. Resultados similares fueron encontrados por Mueller *et al.* [41], sobre un polvo de apatita con un tamaño sobre los 100nm.

Un resultado diferente del obtenido por el grupo de Norde (Kawasaki *et al.* [42]), donde obtienen una mayor adsorción de lisozima con respecto a la albúmina sobre superficies de hidroxiapatita. La solución usada en este trabajo para la solución de proteínas es una solución de 10mM PB (“Phosphate Buffer”, pH=10). Sin embargo, obtienen una mayor adsorción de albúmina que de lisozima si a la solución anterior le añaden CaCl_2 . En su trabajo, no hay una descripción detallada del tipo de partículas de hidroxiapatita que utilizan. Pero muestran la importancia, de la influencia iónica sobre la adsorción de proteínas.

Otras morfologías de cristal con relaciones Ca/P mayores no muestran esta divergencia en la afinidad por la lisozima siendo adsorbida de forma parecida a la albúmina. En los tipos de hidroxiapatita denominados tipos “S” y tipo tipo “H” en el trabajo de Kawasaki [33], con morfología de cristal diferente a los obtenidos en este trabajo, muestran una adsorción similar entre la albúmina y la lisozima. En ambos tipos de morfología no especifican los sitios de adsorción expuestos en superficie.

Akazawa *et al.* [43] obtiene también una mayor adsorción de lisozima que de albúmina sobre dos hidroxiapatitas nanocristalina con diferentes morfologías de cristalinas. En su trabajo evalúan que ambos tipos de apatita que estudian tienen una mayor presencia de sitios P que de sitios C.

Los resultados obtenidos en esta tesis así como los encontrados en la literatura sobre la adsorción de la albúmina y la lisozima muestran la importancia de la morfología de los cristales de apatita y de los sitios de adsorción expuestos en las caras en contacto con el medio. La diferencia entre los diferentes patrones de adsorción de los diferentes tipos de apatita implicarán probablemente variaciones en su comportamiento biológico, aunque esta extrapolación es difícil de realizar al poseer el suero humano gran cantidad de diferentes proteínas.

3.5.3. Influencia del Tamaño de partícula en la adsorción de proteína

Los resultados reflejados en el apartado 3.4.1 muestran una mayor adsorción de lisozima, fibronectina y albúmina en las muestras de CPC con tamaño de partícula fino que sobre las muestras con tamaño de partícula grueso.

Las muestras de CPC con TP Fino tienen una superficie específica de $22,04\text{m}^2/\text{g}$ y una microestructura formada por agujas finas con un tamaño inferior a los 500nm . Las muestras de TP Grueso tienen una superficie específica de $17,28\text{m}^2/\text{g}$ y una microestructura formada por placas con un tamaño superior a la micra, tal como ha sido reflejado en el capítulo de 2 de esta tesis.

La mayor adsorción de proteína sobre las muestras de TP Fino concuerda bien por lo tanto con una mayor superficie específica. Sin embargo, uno de los problemas principales, en este estudio es saber si la adsorción se ha producido principalmente en superficie o ha sido homogénea a través de toda la muestra o si existe un gradiente de penetración.

La porosidad de las muestras estudiadas gira en torno del 40 % para ambos tipos de muestras, tal como se ha visto en el capítulo 2. Sin embargo, el tamaño de la interconexión de la porosidad se sitúa en un rango inferior a los 100nm . El pico de la porosidad para las muestras de TP Fino está situado en los 26nm mientras que el pico para las muestras de TP Grueso está situado en torno a los 13nm tal como se puede ver en la Figura 3.13, incluida también en este capítulo para facilitar la lectura. Este tamaño de poro corresponde principalmente a la separación entre los cristales de apatita.

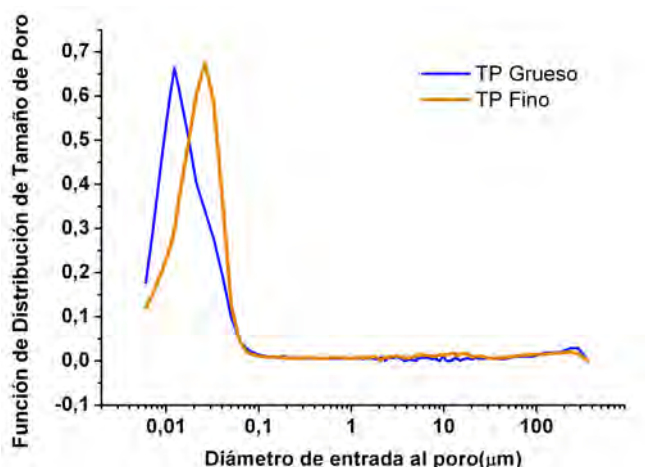


Figura 3.13: Función de Distribución del tamaño del poro vs. Diámetro de entrada al poro

Si nos fijamos en el tamaño de las proteínas utilizadas, éste está en el rango de la interconexión de los poros, tal como queda reflejado a continuación.

- albúmina: 4x4x14 nm [17]
- fibronectina: 2-3nm de espesor y 130nm longitud
- lisozima: 3x3x4,5 nm

La gran proporción de poros en el rango del tamaño de una proteína, impedirá que las proteínas pasen. Cabe esperar por lo tanto que la difusión de las proteínas hacia el interior de las muestras sea muy complicada, debido a la tortuosidad y tamaño de las porosidad. Otro factor que afecta a la difusión de las proteínas hacia el interior de las muestras es la propia adhesión de las proteínas sobre los cementos que restringirá el tamaño de poro existente, impidiendo que otras proteínas no adheridas se difundan hacia el interior. El tamaño de poro para que la albúmina pueda penetrar y adherirse sobre las paredes de los poros ha de estar como mínimo entre 30-50nm, dependiendo del modo de adsorción de la proteína y de las distintas interacciones proteína-sustrato [44, 45]. Esto implica que en los CPC aquí estudiados no toda la superficie específica está disponible para la adsorción.

Este hecho fue confirmado mediante la observación mediante lupa binocular de muestras con proteína marcada con FITC después de una hora de adsorción. La Figura 3.15 refleja la aparición de una capa superficial inferior a las 200 μm . No fue posible observar la presencia de un gradiente de penetración de la proteína al no observarse diferentes niveles de fluorescencia en el interior de las muestras. Sin embargo, esto puede ser debido a la autofluorescencia de este tipo de materiales y que prime un efecto de borde sobre la fluorescencia total en la adquisición de las imágenes. Un estudio mediante microscopía confocal permitiría establecer mejor la profundidad de penetración. Sin embargo, la observación mediante lupa permite concluir que no existe una penetración total hasta el centro de las muestras, ya que debería haberse visto una fluorescencia más marcada.

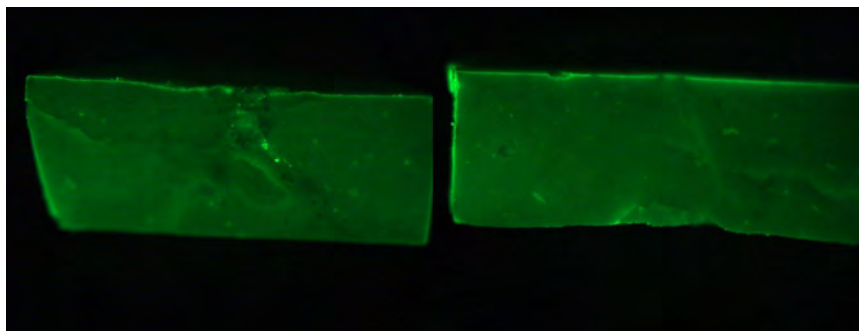


Figura 3.14: Fibronectina- FITC sobre muestras de TP Grueso (izquierda) y TP Fino (derecha) después de 1h de adsorción tomadas con Lupa binocular. Tamaño de las muestras 2mm de espesor y diámetro 6mm.

Diferentes experimentos cualitativos realizados, mostraron que la difusión y adsorción de las proteínas en este rango de porosidad es efectivamente

muy difícil. Se realizó un experimento para poder visualizar la capa de proteínas, sometiendo a las muestras con proteína adherida a un horno de vacío hasta 600°C. Este experimento permitió degradar y carbonizar las proteínas. La posterior observación de las muestras mostró también la presencia de una zona superficial de color grisáceo muy marcada y el resto de un color homogéneo. El grosor de esta capa correspondería con lo observado mediante fluorescencia.

Otros experimentos realizados con colorantes como la safranina, el azul de metileno y líquidos con alta capacidad de penetración usados en la industria para la detección de grietas, mostraron siempre la existencia de una zona donde no eran capaces de penetrar incluso después de estar inmersos en solución 24h, debido al tamaño y tortuosidad de la porosidad. En la Figura 3.15 se muestran dos imágenes de CPC después de estar inmersas durante 2h en un líquido de alta fluidez. En ellas, se puede observar cómo el líquido sólo ha sido capaz de penetrar hasta una cierta profundidad.

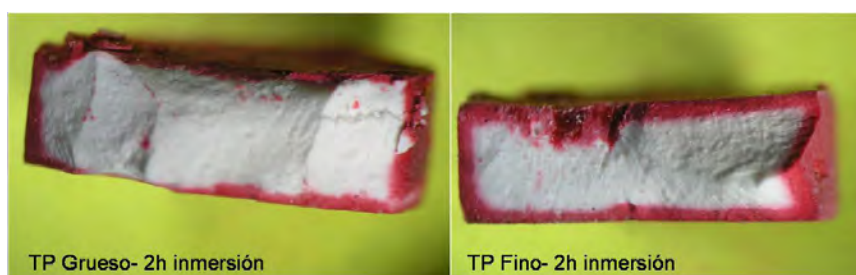


Figura 3.15: Muestras de TP Grueso (izquierda) y TP Fino (derecha) después de 2h de inmersión en líquido de alta capacidad de penetración. Tamaño de las muestras 2mm de espesor y diámetro 6mm.

El control del tamaño de partícula inicial de la fase sólida así como la relación líquido/polvo permiten la variación de la microestructura en el tamaño inferior a 1 micra tal como ha mostrado Español *et al.* recientemente [44] en su trabajo sobre la microestructura de los CPC y la adsorción de albúmina. Así la variación de la relación L/P de 0,35ml/g a una de 0,65ml/g en CPC obtenidos a partir de α -TCP permite obtener porosidades de 35-40 % a 45-50 %. El tamaño de la interconexión de la porosidad pasa de ser principalmente inferior a los 100nm a estar situada entre los 500nm y 1 μ m. El incremento de la relación L/P tiene un efecto directo sobre la separación entre aglomerados cristalinos, se obtiene una estructura menos compacta, más abierta aumentando la superficie disponible para la adsorción de proteínas.

Por lo tanto, en el diseño de la microestructura de los CPC para su utilización en sustratos para Ingeniería de Tejidos, la liberación de fármacos o adsorción de proteínas es necesario tener en cuenta dos factores. Uno de ellos es la superficie específica realmente disponible para la adsorción, que debe ser establecida a través de considerar el tamaño de la molécula a adsor-

ber o liberar y el tamaño de poro [2, 44]. El otro factor es la disposición de un tamaño de poro adecuado en toda la muestra que permita una adsorción sin restricciones en toda la muestra. En el caso de los CPC, el aumento de los espacios entre cristales de apatita permiten el aumento de la superficie específica efectiva mientras que el aumento de los espacios entre agregados cristalinos permite una mayor capacidad de penetración. Estos dos factores pueden ser controlado a través de la correcta selección del tamaño de partícula de la fase sólida, la relación L/P y de aditivos que modifiquen la cinética reacción.

3.5.4. Influencia del Tamaño de partícula en la fuerza de adhesión de las proteínas. Desorción con EDTA y SDS

Los resultados de la Figura 3.9 de desorción de albúmina con SDS y EDTA obtenidos mediante geles poliacrilamida muestran resultados dispares. La desorción de albúmina con EDTA muestra bandas más intensas para el TP Fino que para las muestras de TP Grueso. Se puede afirmar que había más albúmina adsorbida en las muestras de TP Fino, resultado en concordancia con los obtenidos a partir del análisis del sobrenadante (Figura 3.8). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de la desorción con SDS muestran bandas más oscuras para las muestras de TP Grueso que para las muestras de TP Fino, indicando una menor cantidad de proteína. Este resultado está en discordancia con los resultados obtenidos a partir del sobrenadante.

En el apartado 3.3.2.2 se ha comentado que el EDTA forma complejos con los iones Ca^{+2} . Este hecho hace reducir drásticamente la presencia de Calcio en el medio, favoreciendo la disolución del calcio superficial y al mismo tiempo desplaza las proteínas en superficie, solubilizándolas. En el caso del SDS el tipo de interacción entre las proteínas y la superficie es más complejo, con interacciones electrostáticas entre la superficie y el tensioactivo, y de carácter electrostático e hidrófobo entre las proteínas adsorbidas y el tensioactivo. En el segundo caso la eficacia del SDS dependerá tanto de la superficie como de la posible conformación que haya adquirido la proteína después de su adsorción. Se ha mostrado que la capacidad del SDS disminuye con el tiempo que una proteína lleva adsorbida al mostrarse al desarrollarse una mayor interacción entre la superficie y la proteína. Este es un factor que no afecta en nuestros experimentos, al haber sido ambos tipos de muestras tratados iguales. La eficacia del SDS ha mostrado depender de la interacción entre la proteína adsorbida y la superficie indicando diferencias en la fuerza de adsorción de una proteína respecto a distintas superficies [29].

Las diferencias en los mecanismos de interacción del EDTA y del SDS con las superficies y las proteínas, nos permite evaluar diferencias en la interacción de las proteínas con las microestructuras de los CPC aquí estudiados. Los experimentos realizados con proteína marcada con FITC (apartado 3.4.2), nos permite una mejor evaluación de la capacidad de desorción del

SDS en ambos sustratos de apatita deficiente en calcio. Los resultados obtenidos a partir del sobrenadante para la absorción de albúmina, fibronectina y lisozima muestra una mayor adsorción en los sustratos de CPC a partir del TP Fino, sin embargo la desorción con SDS tanto en los resultados obtenidos con geles de poliacrilamida como en los experimentos con proteína fluorescente muestra una mayor capacidad de desorción del SDS en las muestras de TP Grueso que en las muestras de TP Fino.

Existen por lo tanto diferencias en la forma que la albúmina y la fibronectina ven a las agujas y a las placas de CDHA obtenidas en los CPC. Los trabajos de Roach muestra que la albúmina sufre cambios conformacionales en función de la curvatura de la superficie donde esté adherida [17]. Para partículas con un radio superior a las 30nm sobre esferas de silica muestra mayores cambios en la conformación de la albúmina, perdiendo parte de su estructura secundaria. Por debajo de este tamaño la conformación de la proteína se veía menos alterada. Sin embargo, su estudio no cubre radios superiores a los 100nm. Otra proteína como la lisozima también sufre mayores cambios en su estructura con radios mayores, perdiendo al mismo tiempo su capacidad enzimática [10]. En el caso del fibrinógeno (proteína no estudiada aquí), existe sin embargo, una mayor pérdida de estructura secundaria con radios pequeños que con radios grandes [17].

El diámetro de las agujas de las muestras de TP Fino es inferior a los 100nm, tal como se observa en la Figura 3.16. Este diámetro estaría dentro del rango comentado en los estudios anteriores. La diferencia en el tamaño y morfología de los cristales de CDHA, agujas o placas, influenciará de diferente forma la conformación de las proteínas adheridas sobre ellas. Las proteínas verán las placas como una superficie plana, mientras que las proteínas si podrán verse influenciadas por la curvatura de las agujas de CDHA, mostrando por lo tanto diferencias en la conformación una vez absorbidas. Serían necesarios estudios de espectroscopía IR para confirmar las hipótesis aquí comentadas, pero estos estudios quedan más allá del alcance de la presente tesis.

El estudio de desorción con SDS a partir del medio completo (ver Figura 3.11) muestra una mayor cantidad de proteína desorbida en las muestras de TP Fino que en las muestras de TP Grueso en los diferentes tiempos estudiados. En el medio completo existe una gran diversidad de proteínas. Cabe esperar que debido a las diferencias en la microestructura mencionadas anteriormente se adhieran preferentemente tipos diferentes de proteínas sobre cada sustrato y la formación de multicapas de proteínas [46]. Los resultados de este estudio no permite evaluar diferencias en la fuerza de adhesión de las proteínas como en los estudios de adsorción a partir de monoproteínas, pero sí muestra la complejidad existente. Es por lo tanto necesario abordar desde diferentes frentes los estudios de adsorción de proteínas para poder obtener una mejor visión de los diferentes fenómenos que pueden tener lugar.



Figura 3.16: Imagen de las agujas obtenidas de TP Fino vistas por TEM.

3.6. Conclusiones

Los sustratos de apatita deficiente en calcio obtenidos a partir del TP Fino muestran una mayor adsorción de albúmina, fibronectina y lisozima en comparación con las muestras de TP Grueso tal como reflejan los resultados obtenidos a partir del sobrenadante y la desorción con EDTA. Este hecho concuerda con la mayor superficie específica de los sustratos de TP Fino.

La adsorción de proteínas se limitó principalmente a la superficie externa de las muestras. La penetración de proteína en el interior del material fue escasa, a pesar de que la porosidad presente en ambos tipo de muestras fue en torno al 40 %. Esto puede ser debido a que el tamaño de poro de los sustratos es del mismo orden de magnitud que el tamaño de las proteínas, y por tanto es demasiado pequeño para permitir la difusión de las proteínas hacia el interior de los sustratos.

La utilización de distintos agentes de desorción ha puesto de relieve diferencias en la adhesión de las tres proteínas analizadas, atribuibles a diferencias en los mecanismos de adhesión en ambos sustratos. La diferente morfología y tamaño de los cristales apunta a una influencia de la topografía en la adhesión que puede inducir cambios conformacionales, aunque sería necesario realizar más estudios para dilucidar los mecanismos exactos que intervienen en las diferencias observadas.

Referencias

- [1] K.Nakanishi, T. Sakiyama, and K. Imamura. On the adsorption of protein on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91:233–244, 2001.
- [2] M. Colilla and M. Manzano M. Vallet-Regí. Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 4:403–414, 2008.
- [3] I.Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54:631–651, 2002.
- [4] R. Akid, H. Wang, T. J. Smith, D. Greenfield, and J. C. Earthman. Biological functionalization of a sol-gel coating for the mitigation of microbial-induced corrosion. *Advanced Functional Materials*, 18:203–211, 2007.
- [5] P. Kingshott and H.J. Griesser. Surfaces that resist bioadhesion. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 4:403–412, 1999.
- [6] B.D.Ratner, A.S.Hoffman, F.J.Schoen, and J.E.Lemons. *Biomaterials Science:An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 1996.
- [7] Bengt Kasemo. Biological surface science. *Surface Science*, 500(1-3):656–677, 2002.
- [8] B.D. Ratner and S.J. Bryant. Biomaterials:where we have been and where we are going. *Annu. Rev. Biomed. Eng*, 6:41–75, 2004.
- [9] H. Matsumura, K. Kawasaki and N. Okumura, M. Kambara, and W.Norde. Characterization of the surface of protein-adsorbed dental material by wetting and streaming potential measurements. *Colloids and SurfacesB: Biointerfaces*, 32:312–334, 2003.
- [10] M. Lundqvist, I. Sethson, and B. Jonsson. Protein adsorption onto silica nanoparticles:conformational changes depend on the particles curvature and the protein stability. *Langmuir*, 20:10639–10647, 2004.
- [11] P.Roach, D. Farrar, and C.C. Perry. Interpretation of protein adsorption: Surface induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127:8168–8173, 2005.
- [12] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. Garcia. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(2):247–259, 2003.

- [13] Thomas A. Horbett. The role of adsorbed proteins in animal cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(1-3):225–240, 1994.
- [14] L. Vroman. Finding seconds count after contact with blood (and that is all i did). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 62:1–4, 2008.
- [15] B. Kasemo and J. Gold. Implant surfaces and interface processes. *Adv. Dent. Res.*, 13:8–20, 1999.
- [16] K.E. Michael, V.N. Vernekar, B.G. Keselowsky, J.C. Meredith, R.A. Latour, and A.J. García. Adsorption-induced conformational changes in fibronectin due to interactions with well-defined surface chemistries. *Langmuir*, 19:8033–8040, 2003.
- [17] P.Roach, D. Farrar, and C.C. Perry. Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 128:3939–3945, 2006.
- [18] G. Altankov, F. Grinnell, and T. Groth. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30:385–391, 1996.
- [19] R. Tzoneva, T. Groth, G. Altankov, , and D. Paul. Remodeling of fibrinogen by endothelial cells in dependence on fibronectin matrix assembly. effect of substratum wettability. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 13:1235–1244, 2002.
- [20] A.A. Vertegel, R.W. Siegel, and J.S. Dordick. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 20:6800–6807, 2004.
- [21] F. A. Denis, P. Hanarp, D. S. Sutherland, J. Gold, C. Mustin, P. G. Rouxhet, and Y. F. Dufrene. Protein adsorption on model surfaces with controlled nanotopography and chemistry. *Langmuir*, 18(3):819–828, 2002.
- [22] A. Kondo and H. Fukuda. Effects of adsorption conditions on kinetics of protein adsorption and conformational changes at ultrafine silica particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 198:34–41, 1998.
- [23] Y. Tie, C. Calonder, and P.R.Van Tassel. Protein adsorption: Kinetics and history dependence. *Journal of colloid and interface science*, 268(1):1–11, 2003.
- [24] Y. Takami, S. Yamane, K. Makinouchi, G. Otsuka, J. Glueck, R. Benkowski, and Y.ose. Protein adsorption onto ceramic surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 40(1):24–30, 1998.

-
- [25] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):475–483, 2000.
- [26] A. Rosengren, E. Pavlovic, S. Oscarsson, A. Krajewski, A. Ravaglioli, and A. Piancastelli. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials*, 23(4):1237–1247, 2002.
- [27] A. Rosengren, S. Oscarsson, M. Mazzocchi, A. Krajewski, and A. Ravaglioli. Protein adsorption onto two bioactive glass-ceramics. *Biomaterials*, 24(1):147–155, 2003.
- [28] R. D. Tilton, E. Blomberg, and P.M. Claesson. Effect of anionic surfactant on interactions between lysozyme layers adsorbed on mica. *Langmuir*, 39:2102–2108, 1993.
- [29] R. J. Rapoza and T. A. Horbett. The effects of concentration and adsorption time on the elutability of adsorbed proteins in surfactant solutions of varying structures and concentrations. *Journal of Colloid and Interface Science*, 136(2):480 – 493, 1990.
- [30] D. E. Otzen. Protein unfolding in detergents: Effect of micelle structure, ionic strength, ph, and temperature. *Biophysical Journal*, 83:2219–2230, 2002.
- [31] <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm>.
- [32] K. Kandori, S. Tsuyama, H. Tanaka, and T. Ishikawa. Protein adsorption characteristics of calcium hydroxyapatites modified with pyrophosphoric acids. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 58:98–104, 2007.
- [33] T. Kawasaki. Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *Journal of Chromatography*, 544:147–184, 1991.
- [34] K. Kandori, A. Fudo, and T. Ishikawa. Study on the particle texture dependence of protein adsorption by using synthetic micrometer-sized calcium hydroxyapatite particles. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 24:145–153, 2002.
- [35] C. L. Camire, S. J. Saint-Jean, C. Mochales, P.Nevsten, J. S. Wang, L. Lidgren, I. McCarthy, and M. P. Ginebra. Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted alpha-tricalcium phosphate cement. *J.Biomed.Mater.Res.B: Appl.Biomater.*, 76(2):424–431, 2006.
- [36] S. Jegou Saint-Jean, C.L. Camiré, P.Nevsten, S. Hansen, and M.P. Ginebra. Study of the reactivity and in vitro bioactivity os sr-substituted α -TCP. *Biomaterials*, 21:667–681.
-

- [37] K. Kandori, M. Saito, H. Saito, A. Yasukawa, and T. Ishikawa. Adsorption of protein on non-stoichiometric calcium-strontium hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 94:225–230, 1995.
- [38] G. Balasundaram, M. Sato, and T.J. Webster. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 27:2798–2805, 2006.
- [39] Y. Okabe, S. Kurihara, T. Yajima, Y. Seki, I. Nakamura, and I. Takano. Formation of super-hydrophilic surface of hydroxyapatite by ion implantation and plasma treatment. *Surface and Coatings Technology*, 196:303–306, 2005.
- [40] K. Kandori, T. Shimizu, A. Yasukawa, and T. Ishikawa. Adsorption of bovine serum albumin onto synthetic calcium hydroxyapatite: influence of particle texture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5:81–87, 1995.
- [41] B. Mueller, M. Zacharias, and K. Rezwan. Bovine serum albumin and lysozyme adsorption on calcium phosphate particles. *Advanced Engineering Materials*, 12:53–61, 2010.
- [42] K. Kawasaki, M. Kambara, H. Matsumura, and W. Norde. A comparison of the adsorption of saliva proteins and some typical proteins onto the surface of hydroxyapatite. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32:312–334, 2003.
- [43] T. Akazawa, M. Kobayashi, T. Kanno, and K. Kodaira. Characterization of albumin- and lysozyme-adsorption evaluated on two differently prepared apatites. *Journal of materials science*, 33:1927–31, 1998.
- [44] M. Espanol, R.A. Perez, E.B. Montufar, C. Marichal, A. Sacco, and M.P. Ginebra. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 5:2752–2762, 2009.
- [45] C. W. Suh, M.Y. Kim, J.B. Choo, J.K. Kim, H. K. Kim, and E. K. Lee. Analysis of protein adsorption characteristics to nano-pore silica particles by using confocal laser scanning microscopy. *Journal of Biotechnology*, 112:267–277, 2004.
- [46] K. Kandori, A. Fujiwara, M. Kukai, A. Yasikawa, and T. Ishikawa. Evaluation of the adsorption affinity of proteins to calcium hydroxyapatites by desorption and pre-adsorption methods. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11:313–320, 1998.

Capítulo 4

Estudio del Comportamiento Celular *in vitro*

4.1. Introducción

Como se ha descrito previamente en el Capítulo 1, los materiales basados en los fosfatos de calcio han sido y son sujeto de una extensa investigación para su uso como substitutos óseos. Poseen una alta biocompatibilidad, apenas provocan respuesta inflamatoria, formando una unión directa con el tejido óseo. Esta afinidad con el tejido óseo los hace materiales prometedores para su uso en la fabricación de andamios para la Ingeniería de Tejidos. En este contexto, se han dedicado esfuerzos considerables en los últimos años al desarrollo de andamios macroporosos para la regeneración del tejido óseo. Uno de los aspectos más interesantes es la obtención de andamios de hidroxiapatita obtenidos por precipitación a baja temperatura. La hidroxiapatita precipitada (PHA) es más reactiva comparación a la hidroxiapatita sinterizada y más parecida a la apatita biológica.

Un aspecto fundamental en el uso de estos andamios para la Ingeniería de Tejido óseo es la caracterización de las interacciones célula-material, y más concretamente, el desarrollo de nuevas estrategias hacia el diseño de sustratos con características específicas que permitan el control de la respuesta celular.

El papel crucial sobre el comportamiento celular de propiedades superficiales como la topografía, la composición superficial y la energía superficial han sido extensamente estudiadas por varios autores [1–8]. La topografía superficial puede ser el parámetro dominante en el caso de materiales bioinertes como el titanio o el poliestireno como puede observarse en la Figura 4.1. Sin embargo, en el caso de materiales bioactivos, factores como la composición química y el intercambio iónico con el medio pueden jugar un papel determinante. Los materiales bioactivos sufren transformaciones químicas *in vivo* y también cuando son sumergidos en medio de cultivo o en fluido biológico simulado (simulated body fluid, SBF), formándose una capa de apatita car-

bonatada mediante reacciones de precipitación-disolución [9, 10]. Esto hace que el problema sea más complejo, ya que a menudo es difícil separar como variables independientes los efectos estrictamente topográficos de los efectos debido al intercambio iónico.

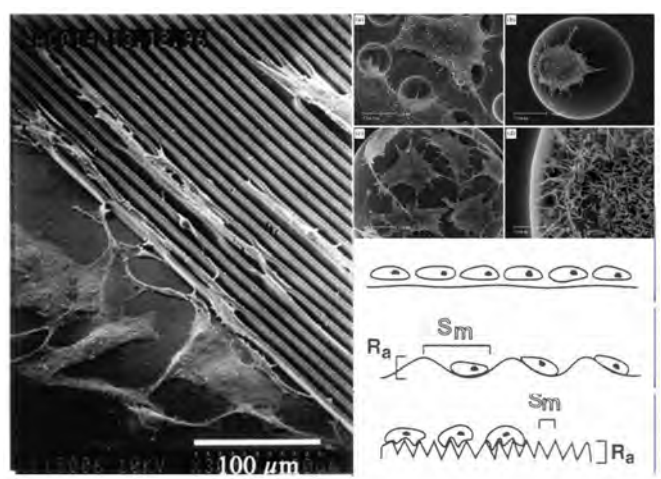


Figura 4.1: Influencia de la topografía en la adhesión celular. Imagen izquierda extraída de [11]. Imagen superior derecha extraída de [12]. Imagen inferior derecha extraída de [13].

Sin embargo, difícilmente se pueden simular *in vitro* las condiciones que se producen en el entorno de la remodelación y renovación ósea difícil que son el resultado de las acciones coordinadas de osteoblastos y osteoclastos, reguladas sistémicamente mediante hormonas y localmente por mediadores solubles e insolubles. A pesar de ello, los estudios *in vitro* son útiles para la observación y el análisis del comportamiento celular en condiciones controladas y con menos variables. Es por ello que el objetivo de este Capítulo es el análisis y estudio del efecto simultáneo de la topografía y del intercambio de iónico sobre el comportamiento de una línea celular osteoblástica cultivada sobre sustratos 2D de apatita deficiente en calcio.

4.1.1. Descripción de la línea celular osteoblástica: MG-63

En los estudios *in vitro* con células, se utilizan o emplean diferentes sistemas celulares: células osteoblásticas primarias obtenidas de diversas fuentes (incluyendo células mesenquimales), líneas celulares obtenidas y aisladas a partir de tumores (a menudo de osteosarcomas), líneas celulares no transformadas o cultivos celulares obtenidos a partir de la médula ósea.

Las líneas celulares estables obtenidas a partir de osteosarcomas, como son las células MG-63 y SaOS-2, ofrecen las ventajas de estabilidad y reproducibilidad. Sin embargo, su proliferación y diferenciación celular difieren de las células primarias.

Los cultivos con células primarias ofrecen un comportamiento más realista, aunque los resultados están sujetos a la variabilidad y las singularidades de la fuente individual. Uno de los desafíos es su extensión *in vitro* y el mantenimiento de su fenotipo. Los osteoblastos primarios se obtienen de diferentes animales (la rata, ratón, perro etc.) o de fuentes humanas.

En los estudios *in vitro* de esta Tesis, se ha utilizado la línea celular MG-63 (ATCC, CRL-1427). Es una línea de células conocida y empleada comúnmente en la literatura científica para estudiar las interacciones célula-biomaterial [14–17].

Su morfología es de tipo de fibroblástico. Es una línea hipotriploide obtenida a partir del osteosarcoma de un adolescente de 14 años. El número modal de cromosomas es 66, recurrente en el 44 % de las células, de dieciocho a diecinueve marcadores cromosómicos son comunes en todas las células [18, 19].

A pesar del hecho de que esta línea celular fuera aislada de un tumor, lo que implica que su proliferación es mucho más rápida en comparación con osteoblastos primarios, las células MG-63 poseen características comunes con las células osteoblásticas primarias. Esta línea celular ha sido bien caracterizada y muestra rasgos de osteoblastos inmaduros como la producción de colágeno Tipo I y III y una expresión basal baja de la actividad de la fosfatasa alcalina. La administración de vitamina 1,25-dihidroxivitamina D₃ aumenta la expresión de la fosfatasa alcalina (ALP) y la síntesis de osteocalcina e inhibe la proliferación [14, 15, 20, 21]. La expresión de subunidades de integrina α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , α_v y β_1 también ha sido demostrada en esta línea celular [21]. Sin embargo, los niveles de actividad de la fosfatasa alcalina expresados por las células MG-63 no son comparables a los niveles expresados por osteoblastos primarios, al ser estos inferiores [21].

En general, esta línea de celular al ser cultivada en superficies rugosas en comparación con superficies lisas muestra una mayor diferenciación, una disminución de la proliferación y una mayor producción de fosfatasa alcalina [14].

Las líneas celulares aisladas a partir de osteosarcomas humanos son usadas para la investigación de aspectos específicos del comportamiento celular a pesar de sus diferencias con los osteoblastos primario de humano. Sin embargo, dichas diferencias deben tenerse en cuenta al extrapolar los resultados.

4.1.2. Adhesión Celular

La adhesión celular se produce a través de la unión de receptores superficiales como las integrinas (proteínas de la membrana celular) con moléculas de la matriz extracelular [22]. En esta Tesis, los ensayos de adhesión celular fueron realizados a través del número de células adheridas, del estudio de la morfología celular y de la expresión de la vinculina y las fibras de actina.

El estudio de la expresión de moléculas de transducción, como pueden ser las integrinas, la quinasa de adhesión focal (FAK), la vinculina y los filamentos de actina, revela o aporta información sobre la progresión del ciclo celular, de la proliferación y la diferenciación [23–26]. La expresión de estas moléculas puede ser estimulada o inhibida a través de las propiedades superficiales, y por lo tanto influye en la proliferación y la diferenciación celular, aunque éstas también puede ser regulada a través de mitógenos solubles.

La vinculina es una proteína de membrana-citoesqueleto que interviene en las placas de adhesión focal, parece ser responsable de transmitir las señales de las integrinas que se encuentran en la superficie de la célula hacia los filamentos de actina del citoesqueleto.

La actina es un componente estructural de los microfilamentos. Los filamentos de actina se unen a las integrinas a través de la talina, la α -actinina y la vinculina. La unión de estos microfilamentos produce fibras de tensión. La actina participa en muchas funciones celulares importantes como la movilidad celular, la división celular o citocinesis, contribuye a procesos como el transporte intracelular de vesículas y orgánulos, en la contracción muscular, en la migración celular, la señalización celular, el establecimiento y mantenimiento de uniones celulares y en la propia forma de la célula. El estudio de estas dos moléculas aporta información sobre los procesos celulares. Una expresión pobre o un desarrollo deficiente del citoesqueleto de actina indica probablemente una mala o baja adhesión celular y posiblemente una posterior muerte celular.

4.1.3. Proliferación celular

El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan y regulan la proliferación y la diferenciación de las células sobre los fosfatos de calcio podría permitir aumentar el ciclo celular sobre esta superficie. Dicha información podría conducir a la producción de biomateriales capaces de reparar defectos óseos rápidamente, lo cual es uno de los objetivos principales del presente trabajo.

Se estimó la proliferación celular a través del número de células a diferentes tiempos, aportando información sobre la interacción del sustrato de apatita deficiente en calcio con las células.

4.1.4. Diferenciación celular

En el laboratorio, cuando se evalúan biomateriales, la osteogénesis se estudia a través de la expresión de enzimas y de proteínas características de la formación ósea. Algunas de estas moléculas han sido identificadas como marcadores de la diferenciación celular [27], como son la fosfatasa alcalina, la osteocalcina, la osteopontina, la producción de matriz extracelular o de nódulos de mineralización.

La fosfatasa alcalina (ALP) es un conocido marcador inicial de la osteogénesis, que alcanza su punto máximo justo antes de que comience la mineralización de la matriz. La función de la fosfatasa alcalina es la de hidrolizar el fósforo orgánico liberando fósforo inorgánico para la formación de apatita en el hueso. La presencia de esta enzima es indispensable para la mineralización ósea. Su secreción o actividad indican el inicio de la formación de hueso o el principio de un estado más diferenciado *in vitro* [27].

La secreción de osteocalcina (Oc) en el medio es una señal que indica un fenotipo osteoblástico más maduro debido a su expresión tardía. Se cree que tiene la capacidad de quelar los iones de calcio para formar los minerales óseos y juega un papel importante en la formación-resorción ósea. Es la más abundante de las proteínas no colaginosas en el hueso. Es una proteína pequeña, también conocida como proteína *Bone-Gla* debido a que contiene 3 residuos γ -carboxiglutámicos (Gla). Su expresión está relacionada específicamente con los osteoblastos, odontoblastos y los condrocitos hipertróficos, y es incorporada a la matriz mineralizada, aunque también puede encontrarse en el torrente sanguíneo. Su presencia en el torrente sanguíneo se relaciona con una alta actividad en la mineralización como la producida durante la adolescencia o durante una fractura ósea. También es un buen marcador de la eficacia de ciertos fármacos contra la osteoporosis, aunque su función exacta es desconocida [28].

La matriz extracelular (ECM) es considerada como un mediador local insoluble que juega un papel importante en la regulación de las funciones celulares. La información contenida en la matriz extracelular es conducida a la célula a través de las integrinas. El colágeno de tipo I es el componente más abundante de la matriz extracelular en el hueso y la fibronectina está presente alrededor de los osteoblastos durante la osteogénesis [21]. La determinación de la producción de ECM es un modo de caracterizar el estado de la diferenciación celular.

La administración de algunas moléculas como el ácido ascórbico, la dexametasona, la vitamina D₃ [27, 29–32] al medio de cultivo y la presencia de algunos iones, como Ca y P [33, 34], puede inducir a las células a entrar en un estado de mayor diferenciación. El ácido ascórbico induce a los osteoblastos a la producción de colágeno de tipo I, que forma parte de la matriz extracelular. Su potencial de diferenciación ha sido demostrado en diferentes líneas celulares osteogénicas. Sin embargo, algunas células osteoprogenitoras aceleran su estado de diferenciación en combinación con la administración de otras moléculas como la dexametasona que es un glucocorticoide sintético. La administración de vitamina D₃ aumenta la síntesis de colágeno de tipo I y por lo tanto de la matriz extracelular. Esto produce también un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina. La presencia de las ciertas concentraciones de Ca y P ha sido relacionada con un aumento de la mineralización de la matriz extracelular, aunque se ha demostrado que por encima de ciertas concentraciones puede inducir a las células a entrar en

apoptosis [35, 36].

4.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es el estudio *in vitro* de las interacciones celulares de dos sustratos de apatita deficiente en calcio con diferentes microestructuras y topografías. Específicamente se estudia el efecto mutuo de la topografía y el intercambio iónico en su influencia sobre la adhesión, la proliferación y la diferenciación de una línea celular osteoblástica.

Para ello, se estudia la respuesta de células MG-63 cultivadas sobre dos sustratos de hidroxiapatita deficiente en calcio con composición idéntica, pero rasgos de micro/nanoestructurales diferentes. Tal como se ha mostrado en el Capítulo ??, puede obtenerse estas diferencias micro y nano estructurales mediante el control de la distribución de tamaño de partícula del polvo de partida.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Cultivos celulares en contacto directo con los sustratos

Se cultivaron las células MG-63 en frascos de 75cm²(Nunc) a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂. El medio de cultivo fue *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Gibco 11960-069) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen, 15140), 1% de piruvato sódico (Invitrogen, 11360-039) y 1% de L-glutamina (Invitrogen, 25030). Se cambió el medio de cultivo tres veces por semana.

Para el subcultivo de las células, se lavó las células dos veces con 10ml de tampón fosfato salino (PBS). Se separaron las células de la superficie de los frascos mediante la adición de 5ml de Tripsina-EDTA (Gibco, 12605-028) durante 5min a 37°C. La tripsina es una enzima proteolítica que degrada las proteínas que las células usan para su adhesión a las superficies. Una vez que se separaron las células, se añadieron 5ml de medio completo para neutralizar la acción de la tripsina. Después, se centrifugaron las células a 1000 revoluciones por minuto durante 5 minutos. Se desechó el medio restante y se añadió medio fresco para resuspender nuevamente las células. Para el conteo de las células se utilizó un hematocitómetro.

Se esterilizaron mediante radiación γ (25 kGrays) los sustratos de apatita deficiente en calcio obtenidos a partir de TP Grueso y TP Fino. Se colocaron los discos de 15mm de diámetro en una placa de cultivo de 24 pocillos (Nunc) y se incubaron en medio de cultivo completo 24h previas a entrar en contacto con las células. Después de la 24h de incubación, se sembraron 20000 células/disco en 1ml de medio de cultivo completo. Como control positivo se usó el poliestireno para cultivo celular de las propias placas de cultivo.

4.3.2. Adhesión celular

Se evaluó la adhesión celular a las 6, 12 y 24h de incubación. Las muestras se lavaron con tampón fosfato salino (PBS, Gibco) para eliminar las células no adheridas. A continuación, se añadieron 500 μ l de tripsina-EDTA a 37°C para despegar las células de los sustratos de CPC y de las placas de poliestireno. Se contaron las células mediante el uso de un hematocitómetro.

4.3.3. Proliferación celular

Se evaluó la proliferación celular a los 3, 7, y 14 días de cultivo. Se determinó el número de células mediante el uso de WST-1(Ref.1644807; Roche, Suiza). Se lavaron las muestras con PBS y se añadió medio de cultivo sin rojo fenol a los pocillos. Se añadieron 10 μ l de reactivo WST-1 cada 100 μ l de medio cultivo. Después de 1 h de incubación, 100 μ l de medio fue recogido

y colocado en una placa de 96 pocillos. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm en un lector para microplacas.

El principio en que basa el ensayo WST-1 es la degradación de las sales de tetrazolio en formazán por parte de enzimas en células viables. Un aumento en el número de células viables en una muestra causará un aumento de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial y por lo tanto de la cantidad de formazan obtenida. El ensayo WST-1 es un ensayo colorimétrico donde la cantidad de formazan se determina mediante el uso de un espectrofotómetro (véase Figura 4.2). La cantidad de formazan se puede correlacionar por lo tanto con el número de células metabólicamente activas de una muestra y ser así usado para evaluar la proliferación celular.

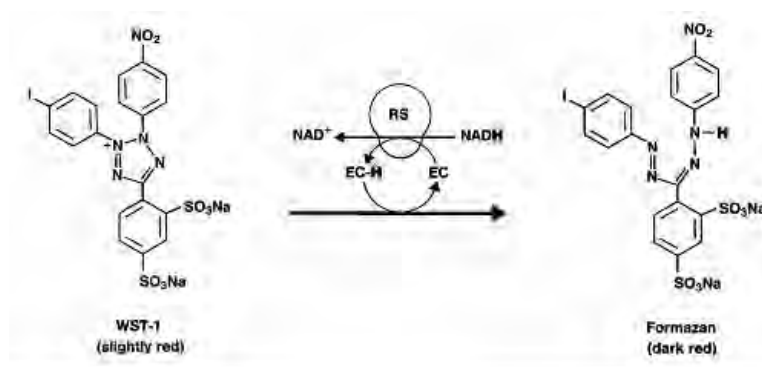


Figura 4.2: Degradación de la sal de tetrazolio WST-1 en formazán. (EC =reactivo receptor-electrón RS =sistema reductasa-succinato-tetrazolio mitocondrial)

4.3.4. Diferenciación celular: Actividad de la fosfatasa alcalina y cuantificación de la secreción de osteocalcina.

Se usaron dos marcadores osteogénicos diferentes para evaluar la diferenciación celular en los estudios celulares en contacto directo con los sustrato de apatita deficiente en calcio: la actividad de la fosfatasa alcalina (y la cantidad de osteocalcina secretada.

Se cultivaron las células en contacto directo con las muestras durante 14 días en las condiciones descritas anteriormente. Después de 14 días, se sustituyó el medio de cultivo por medio con 0.1% de albúmina bovina y 10^{-8} M de dexametasona, y $5\mu\text{g}$ de vitamina C como factores de diferenciación. Los factores de diferenciación fueron añadidos cada 24h para estimular la diferenciación de las células [37–39]. Después de tres días, se recogió el medio de cultivo y se congeló a -80°C para la determinación de la osteocalcina. Posteriormente, se lavaron las células dos veces con PBS, y se añadieron $500\mu\text{l}$ de tripsina dos veces para separar las células de los sustratos. Se recogieron ambos sobrenadantes y se centrifugaron a 1000r.p.m. durante 5min. Se lisaron las células añadiendo $100\mu\text{l}$ de M-Per(Pierce) para liberar la fos-

fosfatasa alcalina (ALP) al sobrenadante, ya que la ALP se encuentra unido a la membrana citoplásmica.

a) Actividad de la fosfatasa alcalina

Se midió la actividad de la fosfatasa alcalina mediante el kit 104 de Sigma. Básicamente el equipo mide la capacidad de la ALP de transformar el p-nitrofenilfosfato en p-nitrofenol, un compuesto muy cromogénico que puede ser medido espectrofotométricamente a 405nm.

Se añadieron 50 μ l del lisado celular, 50 μ l de solución tampón alcalina (5mM el cloruro de magnesio y 0.5M 2-amino-2-metil-1-1-propanol) y 100 μ l de solución sustrato (5mM p-nitrophenylphosphate) a una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 1h a 37°C. Después del tiempo de incubación, se añadió 50 μ l de hidróxido de sodio 0.3M a cada pocillo para parar la reacción. Se midió la cantidad de p-nitrofenol obtenido por comparación con una curva patrón previamente preparada y medida en las mismas condiciones.

La actividad ALP fue calculada como la cantidad de p-nitrophenol obtenido durante el tiempo de incubación, en este caso 1h. Se normalizó la actividad de la ALP por el número de células a 14 días, ya que la supresión del suero del medio de cultivo inhibe la proliferación celular.

b) Osteocalcina

La osteocalcina es un marcador tardío de la diferenciación osteoblástica. Se determinó su cantidad en el medio de cultivo usando un inmunoensayo ELISA de Metra (DPC Dipesa, Barcelona, España). El principio del ensayo es una reacción competitiva contra un anticuerpo IgG anti-osteocalcina de ratón entre la osteocalcina bovina purificada que recubre los pocillos y la osteocalcina presente en el medio de cultivo.

Se añadieron 25 μ l de las muestras previamente descongeladas a los pocillos recubiertos con osteocalcina bovina purificada junto con 125 μ l de la solución de anticuerpo anti-osteocalcina. El anticuerpo reacciona bien con la osteocalcina del pocillo bien con la osteocalcina presente en el medio de cultivo. La reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiró la solución y se lavaron los pocillos 3 veces con PBS. Posteriormente, se añadió 150 μ l a los pocillos de una solución que contiene una enzima o anticuerpo IgG conjugado a la fosfatasa alcalina y se mantuvo durante 1h a temperatura ambiente.

Este conjugado sólo es capaz de reaccionar con la osteocalcina libre que resta en los pocillos y que no ha reaccionado con el primer anticuerpo antiosteocalcina. Después del tiempo de reacción, se lavaron las tiras nuevamente tres veces con PBS y se añadió a los pocillos 150 μ l de sustrato p-nitrofenilfosfato, dejándolo reaccionar 35min a temperatura ambiente. El sustrato reacciona con el conjugado de fosfatasa alcalina de manera similar a la reacción descrita en el apartado anterior obteniéndose p-nitrofenol después

del tiempo de reacción. La cantidad de p-nitrofenol obtenido es inversamente proporcional a la cantidad de osteocalcina presente en el medio de cultivo. Finalmente, se leyó la densidad óptica de los pocillos a 450 nm en un lector de microplacas. Los resultados de osteocalcina fueron normalizados por el número de células a 14 días.

4.3.5. Morfología Celular

4.3.5.1. Adhesión celular: Marcaje con FDA

Se estudió la morfología celular durante los ensayos de adhesión mediante microscopía fluorescente. Se marcaron las células con diacetato de fluoresceína (FDA; Sigma, F7378), añadiendo $55\mu\text{l}/\text{ml}$ al medio de cultivo de una solución stock de $5\text{mg}/\text{ml}$. Se dejó en contacto con las células la solución de FDA durante 5, se extrajo el medio y se añadió PBS a las muestras para su observación por el microscopio.

4.3.5.2. Protocolo general para ensayos de inmunofluorescencia para observación por microscopía confocal láser.

Las células pueden ser marcadas o teñidas para observar diferentes partes de las mismas y poder obtener información sobre como se adhieren sobre un sustrato, observar la presencia de ciertas proteínas intra- ó extracelulares. Esto se realiza mediante técnicas marcaje celular inmunofluorescente. Las técnicas de marcaje celular para ensayos de inmunofluorescencia emplean generalmente dos anticuerpos diferentes: un anticuerpo primario, usado para unirse al antígeno de interés (vinculina, actina, colágeno, fibronectina etc. ...) y posteriormente, un anticuerpo secundario ("indirecto") unido a una molécula fluorescente que es capaz de unirse o reconocer el anticuerpo primario.

Esta sección describe un protocolo básico usado para la preparación de muestras para ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Más adelante, se detallan las soluciones usadas en el protocolo.

El primer paso es la fijación de las células mediante el empleo de paraformaldehído. Este reactivo se une y entrecruza con los radicales amino libres de las proteínas celulares formando puentes intermoleculares, conservando la arquitectura celular y subcelular. Después de la fijación, es necesario a veces realizar un paso de permeabilización para permitir la entrada de los anticuerpos a las estructuras intracelulares de interés. Para ello, se utilizan disolventes orgánicos o detergentes. Después del paso de permeabilización, se realiza una reacción de bloqueo mediante la adición de una solución de albúmina. La albúmina se adsorberá sobre las superficies libres evitando una adsorción no específica de los anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios. Después, viene el paso de reacción del anticuerpo primario con las células y por último

el marcaje fluorescente mediante la solución de anticuerpo secundario.

a) Soluciones empleadas

- *Solución PBS-Gly*: 0,15g Glicina + 100ml PBS 10mM.
- *Solución de Fijación* (3 % Paraformaldehido): 760 μ l de 16 % Paraformaldehido + 240 μ l de 1M saccarosa + 3ml de PBS.
- *Solución de Permeabilización*: 25 μ l de Triton-X100 (Sigma, T8787) + 50 ml de PBS-Gly. Triton-X100 es un detergente que rompe la membrana celular sin dañar las interacciones proteína-proteína.
- *Solución de Bloqueo*: 1 % de albúmina bovina (BSA) en PBS-Gly.
- *Solución de anticuerpos*: se prepararon añadiendo la cantidad de anticuerpos requeridos a la solución de bloqueo (Ver las concentraciones exactas en las secciones correspondientes más adelante).

b) Fijación Celular

- Se retiró el medio de cultivo de la placa de cultivo.
- Se lavaron las muestras dos veces con PBS.
- Después de eliminar el PBS, se añadió la *Solución de Fijación* a temperatura ambiente.
- Después de 10min, se retiró la *Solución de Fijación* y se lavaron nuevamente las muestras dos veces con PBS.
- El proceso se puede parar en este punto. Para ello, es necesario mantener las muestras a 4°C en PBS. En este punto, se aconseja añadir 0,02 % en peso de ázida sódica para evitar contaminaciones y sellar la placa de cultivo con parafilm para evitar evaporaciones. En estas condiciones, se pueden mantener las muestras en el frigorífico durante unos días.

c) Inmunomarcaje de las muestras

- Se lavan primeramente las muestras en la *Solución PBS-Gly* dos veces durante 5min para neutralizar los grupos de paraformaldehido que pudieran quedar libres.
- Se introducen las muestras durante 10min en la *Solución de Permeabilización*.
- Se lavan de nuevo las muestras dos veces en la *Solución PBS-Gly* durante 5 minutos.

- Posteriormente se retira la *Solución PBS-Gly* y se añade la *Solución de Bloqueo* durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Se incuban entonces las muestras en la Solución con el anticuerpo primario durante 1 hora a 37°C en oscuridad. Las concentraciones para cada anticuerpo son detalladas más adelante en la sección correspondiente.
- Se lava nuevamente dos veces las muestras en la *Solución PBS-Gly* durante 5min.
- Se retira la *Solución PBS-Gly* y se incuban las muestras en la solución con el anticuerpo secundario durante 1h a 37°C en oscuridad.
- Se retira la solución de anticuerpo secundario y se lavan las muestras dos veces con la *Solución de PBS-Gly* durante 5min.
- Finalmente se deja secar las muestras y se montan en un portaobjetos. Se añade Mowiol y se cubre con un cubreobjetos. El Mowiol es un agente antidecaimiento (anti-fade agent) usado en inmunofluorescencia.

4.3.5.3. Marcaje de la vinculina y de la actina

Las diferencias en la morfología celular se evaluaron mediante el estudio de estructuras subcelulares por microscopía confocal láser mediante el marcaje de la vinculina y del citoesqueleto de actina por sondas fluorescentes según el protocolo descrito anteriormente.

Las células fueron sembradas en una concentración de 20000 células/muestra y se dejaron proliferar durante 2 y 5 días. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Leica SP2 usando el modo de reflexión para adquisición de la estructura del material y en varios modos fluorescentes para ver los filamentos de actina, la presencia de vinculina y los núcleos de la célula.

Los anticuerpos y las concentraciones usadas fueron:

- Solución de anticuerpo primario: Anticuerpo monoclonal de ratón antivinculina 1:400 (Sigma, V9131) y Faloidina-TRITC 1:2000 (Sigma, P1951). La faloidina se une a los filamentos de actina.
- Solución de anticuerpo secundario: Anticuerpo policlonal de cabra antiratón conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, A11029) y Hoescht 1:1000 (Sigma, B1155). Hoestch se une al DNA marcando el núcleo celular.

4.3.5.4. Marcaje de la fibronectina

Se sembraron 50000 células/muestra en una placa de 24 pocillos. La producción de la matriz extracelular se estudió después de dejar proliferar

las células durante 5 días mediante el marcaje fluorescente de la matriz de fibronectina. Se decidió este número de células para llegar rápidamente a confluencia en las muestras y no tener que esperar 15 días. Se cambió el medio de cultivo en las muestras cada 2 días, como se realizó de forma general en todos los estudios *in vitro*. Se repitió el experimento dos veces. La morfología de la matriz extracelular de fibronectina se estudió mediante un microscopio confocal SP2 de Leica.

Los anticuerpos y concentraciones usados aparecen listados a continuación:

- Solución de anticuerpo primario: Anticuerpo policlonal de conejo anti-fibronectina 1:100 (Sigma F3648 Sigma)
- Solución de anticuerpo secundario: anticuerpo secundario policlonal de cabra anticonejo IgG conjugado con Alexa Fluor-488 1:1000 (Molecular Probes, A11008)

4.3.6. Cuantificación de la producción inicial de matriz extracelular.

Se realizó un estudio semicuantitativo de la producción temprana de matriz extracelular. Se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo celular que las descritas en el apartado anterior. En este experimento, se estudiaron dos proteínas de la matriz extracelular: el colágeno y la fibronectina. Se realizó el mismo protocolo para el marcaje inmunofluorescente que se ha descrito anteriormente. Sin embargo en este caso, las muestras no fueron analizadas por microscopía confocal láser. Se añadió un paso más a este protocolo para poder desenganchar los anticuerpos unidos a las proteínas de estudio. Esto fue realizado mediante la inmersión de las muestras en 0,5ml de una solución de 0,2N de NaOH durante 2h. Después de este tiempo, se recogió el sobrenadante y se transfirió a una cubeta de cuarzo (1 cm de ancho) para poder medir la intensidad de la fluorescencia en un espectrofotómetro. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de anticuerpo que se ha unido a la proteína objeto de estudio y por lo tanto a la cantidad de proteína presente en la muestra.

- Solución de anticuerpo primaria: Anticuerpo policlonal de conejo anti-fibronectina 1:100 (Sigma F3648 Sigma) y anticuerpo monoclonal de ratón anticólageno I 1:100 (Sigma C 2456).
- Solución de anticuerpo secundaria: Anticuerpo policlonal de cabra anticonejo IgG conjugado a Alexa Fluor-488 1:1000 (Molecular Probes, A11008) y anticuerpo policlonal de cabra antiratón IgG conjugado a Alexa Fluor-546 1:1000 (Molecular Probes, A11003).

Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 488/10 nm y 530/10 nm respectivamente para Alexa-488. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 550/10 nm y 570/10nm respectivamente para Alexa-546. También se midió la adsorción no específica de los anticuerpos secundarios en muestras a las que no se añadió la solución de anticuerpo primario como control.

4.3.7. Microscopía electrónica de barrido

Se observaron muestras después de 2, 5 y 15 días de cultivo en un microscopio electrónico de barrido de alta resolución Strata BD235(FEI). Se prepararon las muestras mediante fijación de las células en glutaraldehído, postfijación en tetraóxido de osmio y deshidratación en soluciones de alcohol. Finalmente se secaron las muestras mediante punto crítico. Para su observación, se recubrieron las muestras con una fina capa de oro para asegurar una buena conductividad.

4.3.8. Cultivos celulares con extractos de CPC y con medios de cultivo con concentraciones bajas de Ca^{2+}

Se hicieron estudios de proliferación y diferenciación con extractos preparados mediante inmersión de las muestras de TP Grueso y Fino en medio de cultivo, para poder determinar la influencia del intercambio iónico entre las muestras de CPC y el medio de cultivo en el comportamiento celular.

4.3.8.1. Preparación de los extractos

La preparación de los extractos se hizo simulando las condiciones de cultivo *in vitro*. Los sustratos de apatita se sumergieron en 1 ml de *Dubbelco's Modified Eagle's Medium* suplementado con un 10 % Suero Fetal Bovino, 1 % penicilina/estreptomicina, 1 % L-glutamina y 1 % piruvato sódico. El medio fue recogido y renovado cada 2-3 días imitando el protocolo usado en los cultivos celulares. Los extractos se añadieron entonces a células cultivadas en una placa de cultivo de poliestireno para cultivo celular (TCPS). Los extractos se filtraron con un filtro de 22 μm Millipore) antes de ser añadido a las células para eliminar cualquier residuo procedente de los cementos y para asegurar la esterilización durante el proceso de obtención de los mismos. En la Figura 4.3, puede verse un esquema con la preparación de los extractos y del cultivo celular realizado con los extractos.

4.3.8.2. Proliferación y diferenciación celular.

El objetivo de este experimento es analizar el efecto de la concentración de calcio en las células mediante la variación de la concentración de calcio



Figura 4.3: Esquema de la preparación de los extractos y del cultivo celular realizado con los extractos.

presente en el medio de cultivo y en comparación de los extractos procedentes de los sustrato de apatita de TP Fino y TP Grueso.

Los medios con concentraciones bajas de Ca^{2+} fueron 0, 0,4 , 0,8 y 1,7 mmol/l. Estos medios fueron preparados mezclando en diferentes proporciones DMEM y DMEM libre de Calcio (Gibco, 21068-028). La concentración de 1,7 mmol/l es la concentración habitual en el DMEM y fue usada como medio de control.

Se sembraron 10000 células/pocillo en una placa de 48 pocillos y se dejaron proliferar. Se añadieron $300\mu\text{l}$ a cada pocillo de los extractos recogidos, y se renovó el medio cada 2-3 días siguiendo el protocolo de cultivo seguido en los experimentos descritos anteriormente.

La proliferación celular se determinó mediante el test WST-1 y la actividad de la fosfatasa alcalina mediante el kit de diagnóstico de Sigma. Los puntos de control fueron los mismos que en los cultivos celulares en contacto directo con la muestra descritos en los apartados 4.3.3 y 4.3.4.

Se midió la concentración de calcio y fósforo en el medio mediante ICP-OES y el pH antes y después de la renovación del medio de cultivo en los puntos de estudio.

La técnica de ICP-OES (Induced coupled plasma-optical emission spectrometry) se basa en la vaporización, disociación e ionización de los diferentes elementos químicos presentes en una solución en el seno de un plasma. Los iones generados durante este proceso son excitados, emitiendo posteriormente una radiación electromagnética con una longitud de onda determinada. La intensidad de la emisión es proporcional a la concentración del elemento a

estudiar presente en la disolución. Esta técnica permite medir niveles de trazas y ultratrazas. El medio cultivo recogido para ser analizado en ICP-OES fue disuelto en una relación 1:50 en 1% de HNO_3 (100 μl en 4,900ml).

4.3.9. Apoptosis

El número de células apoptóticas se determinó mediante el estudio de la morfología celular. Se realizó un estudio preliminar para familiarizarse con los protocolos de marcaje y la morfología de las células apoptóticas. Para ello, se añadió etanol a los pozos de control para desencadenar el proceso de apoptosis en las células. Las células se cultivaron para estos experimentos en poliestireno para cultivo celular (TCPS) y se añadió 10 mmol/l. Se añadió naranja de acridina para marcar las células. El naranja de acridina se intercala en el ADN causando una derivación hacia el verde en el espectro de emisión, por lo tanto haciendo que el ADN aparezca en verde. El naranja de acridina también se une al ARN, resultando en un marcaje en rojo del mismo, causando por lo tanto una fluorescencia rojo-anaranjada bajo el microscopio de fluorescencia. El DAPI se usó para marcar las células necróticas, permitiendo la distinción de células no viables pero que no son apoptóticas. En la Figura 4.4, se observa la morfología de células apoptóticas en comparación con la morfología de células viables.

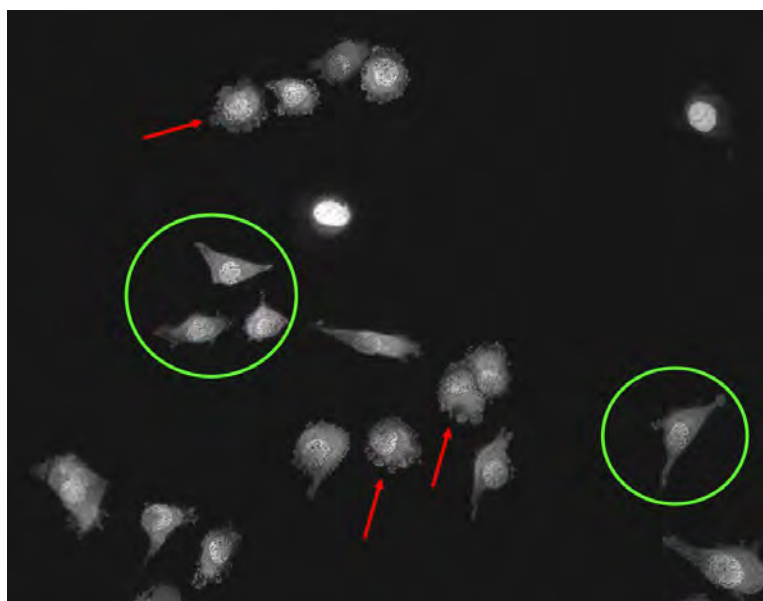


Figura 4.4: Células apoptóticas inducidas mediante la adición de etanol al pozo de cultivo. La flecha roja señala una célula apoptótica donde se observan en la periferia de la membrana celular los cuerpos apoptóticos característicos de la morfología de las células apoptóticas. En el círculo verde se señala una célula viable.

Se determinó el número de células apoptóticas tanto en contacto con

los sustratos de apatita deficiente en calcio cómo cultivados con los extractos a las 24h y a los 7 días. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos. Se sembraron 20000 células por pocillo en 1ml de medio, en las mismas condiciones descritas anteriormente. Las muestras de CPC tanto para el cultivo de contacto directo con las células como para los extractos fueron precondicionadas dejándolas en contacto durante 24h con el medio de cultivo, de forma similar a los experimentos descritos en el apartado 4.3.3. Cómo control se usaron células cultivadas en TCPS con DMEM.

Para la observación de las células apópticas, las muestras fueron lavadas 2 veces con PBS. Se añadió posteriormente 1ml de PBS y 40 μ l de una solución stock de naranja de acridina (100 μ g/ml) y DAPI (300nM). Se dejó en contacto a las células con esta solución por un periodo de 5 min y se retiró la solución de marcaje. Se añadió PBS fresco al pocillo de observación. Las muestras se observaron en un microscopio de fluorescencia. Se repitió el experimento 2 veces. El procesamiento de las imágenes y el conteo de células apoptóticas se realizó mediante la ayuda del software ImageJ.

4.4. Resultados

4.4.1. Adhesión de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

En la Figura 4.5, se muestran los resultados de la adhesión celular en contacto directo con las muestras de CPC. La adhesión de las células MG-63 fue mayor sobre la superficie de poliestireno para cultivo celular (TCPS) que sobre las muestras de TP Grueso y TP Fino, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente entra los sustratos de apatita deficiente en calcio obtenidos a partir del TP Grueso y del TP Fino, siendo este resultado repetitivo en los diferentes experimentos realizados.

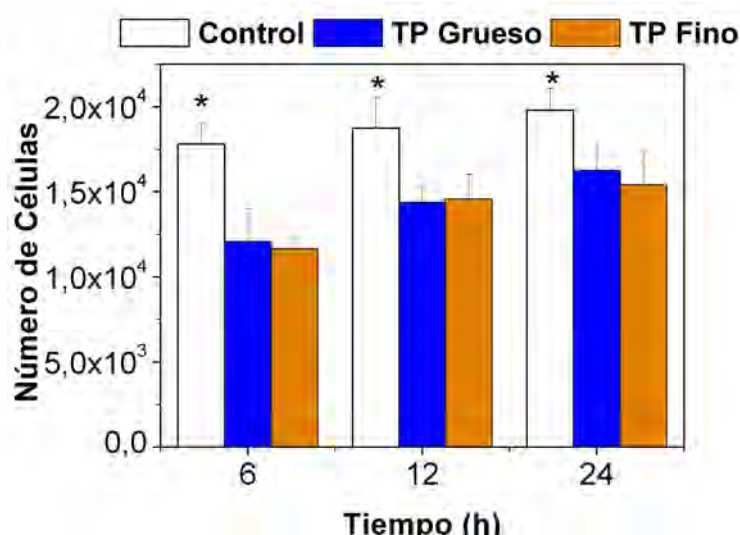


Figura 4.5: Adhesión celular después de 6, 12, and 24 h de cultivo de células MG-63 medido después de tripsinizar las células y contarlas en los experimentos de contacto directo con las superficies de poliestireno para cultivo celular (Control), TP Grueso y TP Fino. Los resultados mostrados son la media \pm la desviación estándar ($n=3$). El asterisco muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las muestras del Control y los sustratos obtenidos a partir de TP Grueso y TP Fino.

4.4.2. Proliferación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

Las diferencias en el número de células presentes en las muestras en los diferentes tiempos de control se muestran en la Figura 4.6. Los resultados se obtuvieron mediante el kit de WST. Después de tres días, las diferencias entre ambos sustratos (Grueso y Fino) y el poliestireno para cultivo celular (usado como control) eran pequeñas. A partir del séptimo día, el número de células incrementó notablemente en las muestras de TCPS y TP Grueso.

Sin embargo, el número de células en las muestras de TP Fino permaneció cercano al nivel obtenido a partir de tres días.

A los catorce días, el número de células presente aumentó en todas las muestras. El poliestireno para cultivo celular usado como control mostró la proliferación más alta seguida de las muestras de TP Grueso. El sustrato de TP Fino, mostró el menor número de células de todas las muestras. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La proliferación celular se midió también mediante tripsinización y conteo en un hematocitómetro. Los resultados obtenidos estuvieron en concordancia con los resultados mostrados en la Figura 4.6.

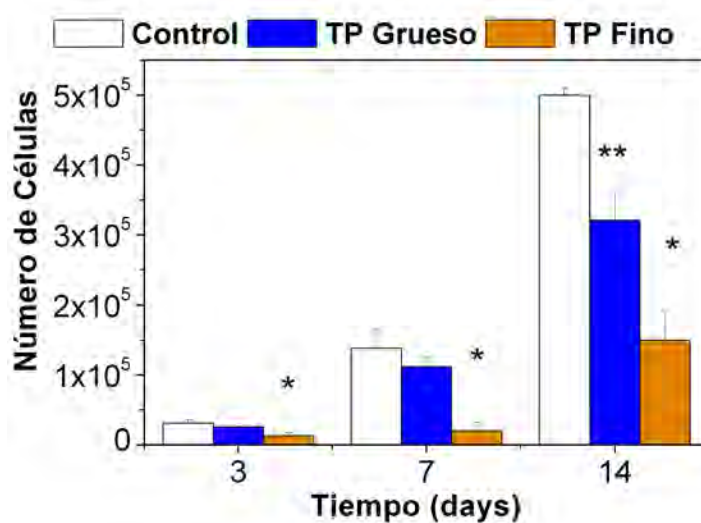


Figura 4.6: Proliferación celular en contacto directo con las muestras a los 3, 7, y 14 días medidos con WST. Todos los resultados mostrados son el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control y las muestras de CPC. El doble asterisco (**) indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre el control y las muestras de CPC.

4.4.3. Diferenciación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

Los resultados de los estudios de diferenciación se muestran resumidos en la Figura 4.7. Los estudios mostraron una actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) en los lisados celulares de las muestras de TP Fino 2,5 veces mayores que los valores obtenidos para las muestras de TP Grueso. Los valores obtenidos para las muestras de TP Grueso fueron similares a los obtenidos en TCPS.

La osteocalcina secretada al medio de cultivo siguió la misma tendencia cuando se comparan entre ellos los sustratos de TP Fino y Grueso. Sin

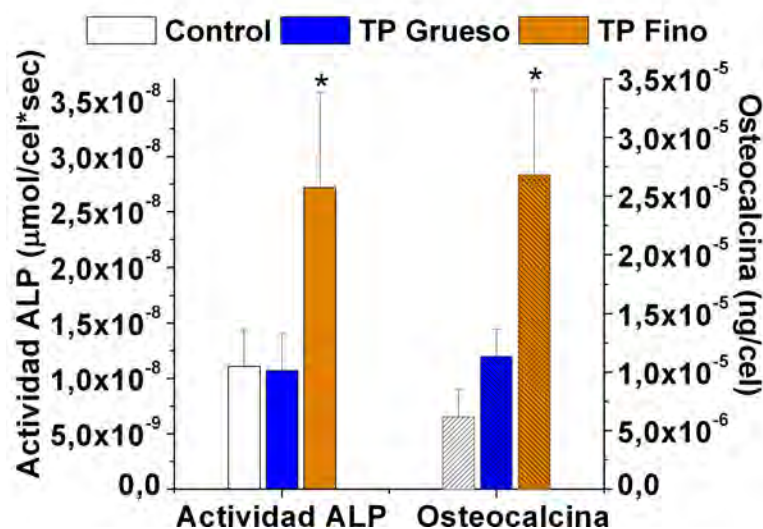


Figura 4.7: Actividad de la fosfatasa alcalina y de la producción de osteocalcina obtenidos después de 17 días de cultivo en contacto directo con las muestras de poliestireno para cultivo celular (usado como control), TP Grueso y TP Fino. Los resultados fueron normalizados con el número de células presente en las muestras a los 14 días de cultivo. El asterisco (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de TP Fino y las muestras de TP Grueso y el control.

embargo, el poliestireno para cultivo celular muestra la mitad de osteocalcina que la muestra de TP Grueso tal como se muestra en la Figura 4.7.

4.4.4. Morfología celular

4.4.4.1. Adhesión celular: tinción con FDA

Las Figuras 4.8 y 4.9 muestran la morfología representativa de las células después 6h y 24h de adhesión respectivamente observada por microscopía óptica después marcar las células con FDA. En la Figura 4.8, se muestra como algunas células comienzan a extenderse, sin embargo la mayor parte de las células todavía presentan una forma redondeada. En este punto, no se observaron diferencias en la morfología que presentaban las células entre ambos sustratos. Después 24h, las células presentaban una morfología más alargada, aunque todavía había muchas células con una morfología redondeada. En este punto de observación, se observó un mayor número de células con una morfología extendida en las muestras de TP Grueso que en las de TP Fino, aunque no se observaron diferencias en el número de células presentes en las muestras a las 24 horas.

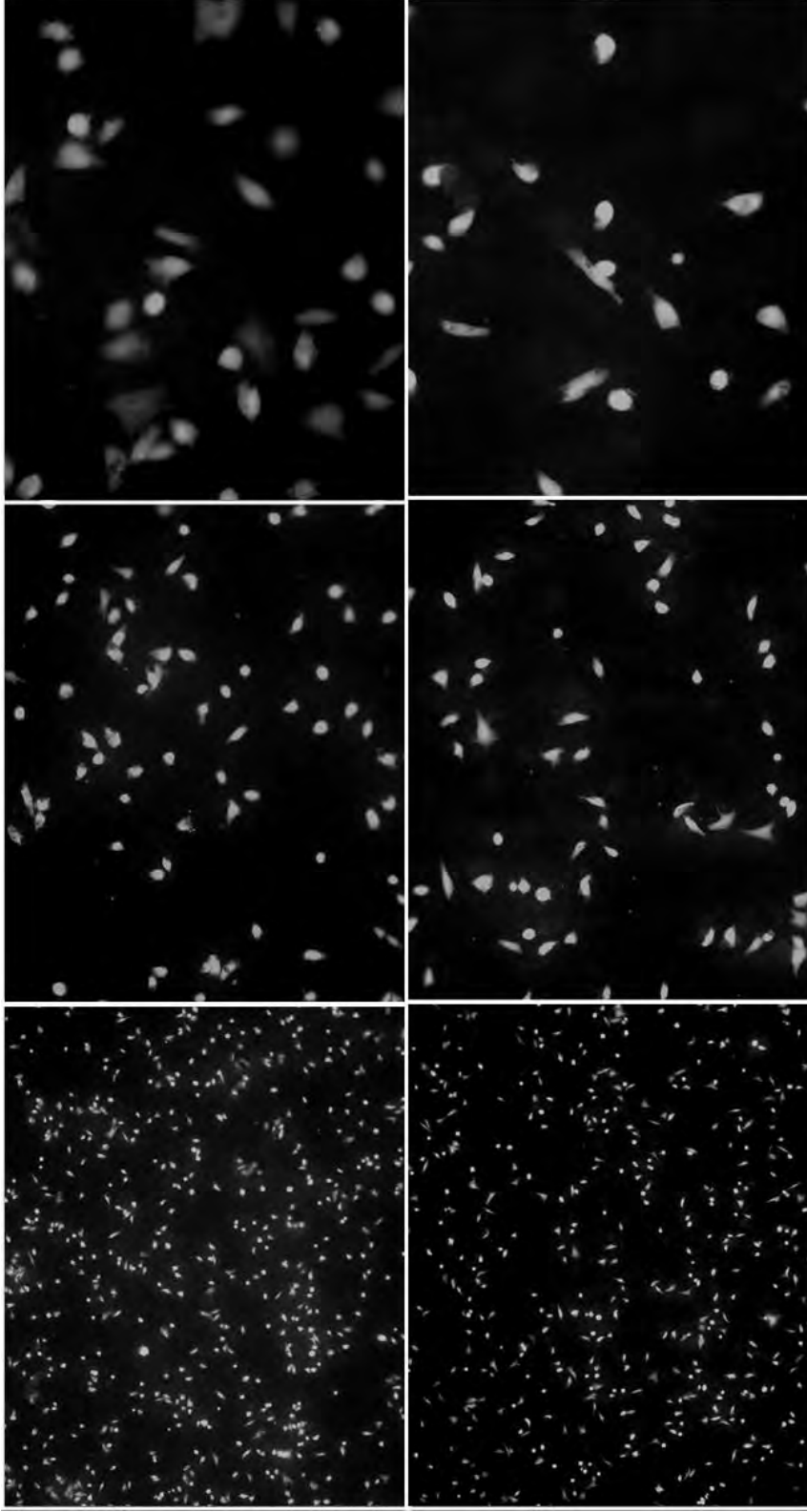


Figura 4.8: Marcaje con FDA de células MG-63 después de 6h de cultivo. Arriba: muestras de TP Grueso. Abajo: muestras de TP Fino. De izquierda a derecha: 4x, 10x and 20x aumentos.

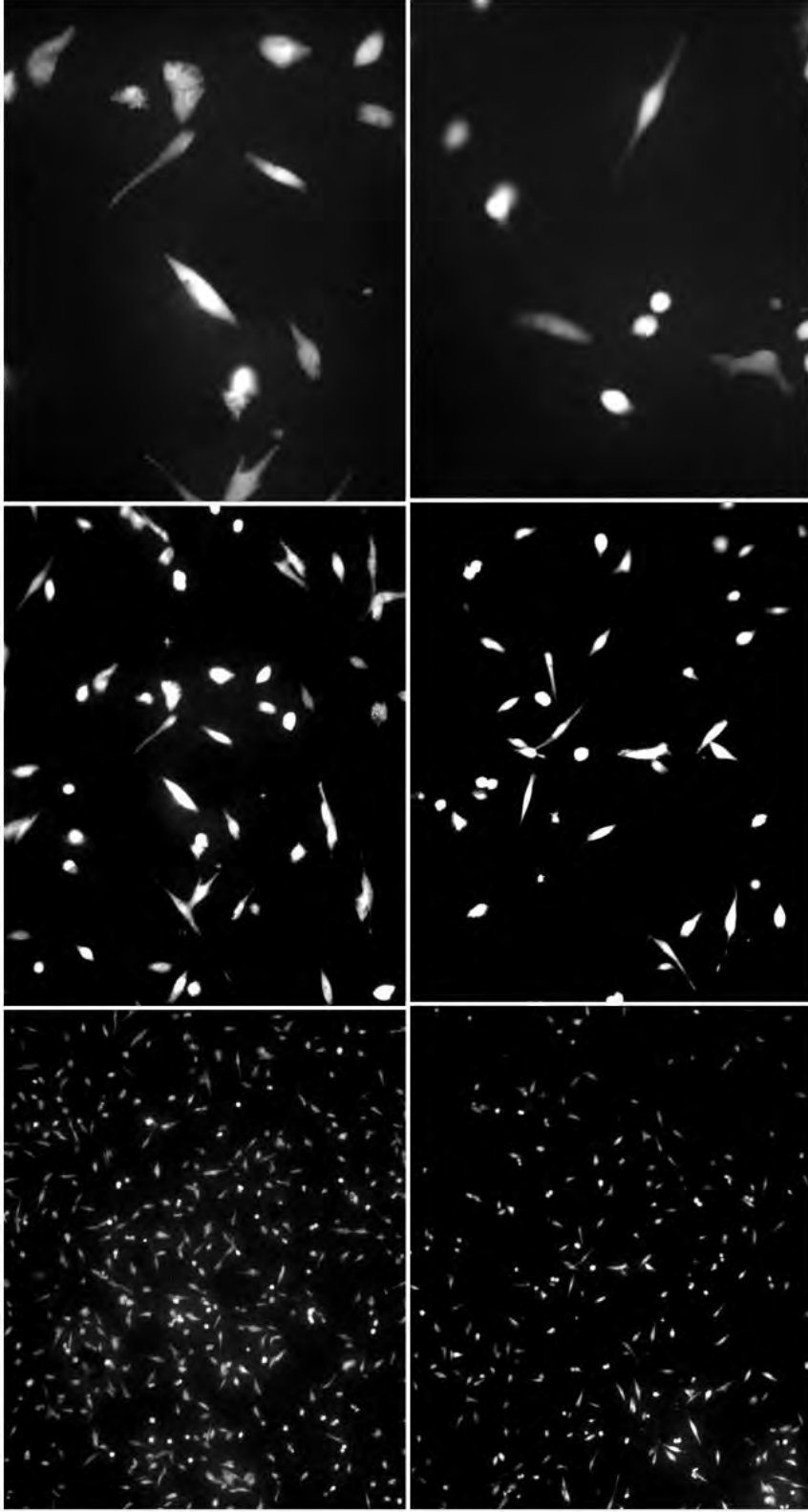


Figura 4.9: Marcaje con FDA de células MG-63 después de 24h de cultivo. Arriba: muestras de TP Grueso. Abajo: muestras de TP Fino. De izquierda a derecha: 4x, 10x and 20x aumentos.

4.4.4.2. Microscopía electrónica de barrido

Los estudios morfológicos realizados mediante microscopía electrónica de barrido (HRSEM) mostraron que las células cultivadas sobre el sustrato Grueso presentaban una morfología alargada después de 2 días de cultivo, tal como se observa en la 4.10. En contraste, con las muestras de TP Fino donde se observaron células más expandidas junto con células con una morfología alargada similar a las encontradas en las muestras de TP Grueso. Las imágenes b) y c) de la Figura 4.10 son representativas de las morfologías celulares encontradas en ambos sustratos. En la imagen con mayores aumentos, las células sobre el sustrato Fino mostraron una mayor actividad dorsal que sobre el sustrato Grueso, al igual que un número mayor de filopodios. En algunas células, se observaron un gran número de pliegues y protuberancias y la presencia de algunas fibras asociadas a la matriz extracelular.

Se decidió observar las células a los dos días de adhesión ya que las observaciones realizadas con microscopía óptica y marcaje con FDA mostraron que una gran número de células poseía todavía una morfología redondeada a las 24h.

En la Figura4.11, se observa la morfología que presentan las células después de 5 días de cultivo. Se observa, ya a los 5 días, la mayor la proliferación celular en las muestras de TP Grueso en comparación con las muestras de TP Fino, como se puede apreciar en las imágenes a) y b) de la Figura 4.11. Se observaron las mismas tendencias en la morfología celular a los 5 días que a los 2 días. Las células en el sustrato Grueso muestran una morfología generalmente más alargada. Se puede ver con claridad un mayor número de filopodios y de actividad dorsal en las células cultivadas sobre el sustrato Fino, así como una mayor producción de matriz extracelular.

La morfología de las células después de 15 días de cultivo puede verse en la Figura 4.12. Las células formaron una capa muy densa y poblada en el sustrato Grueso. Las células han crecido formando multicapas en algunas áreas. La morfología de las células era muy alargada y las células mostraron una disposición muy paralela unas respecto de las otras.

La observación de las muestras de sustrato Fino mostró el menor número de células, en concordancia con los resultados obtenidos en los estudios de proliferación presentados en la sección 4.4.2. Las células en el sustrato Fino no cubrían toda la superficie disponible como era el caso en el sustrato Grueso. En las muestras de TP Fino, las células formaban también una capa densa y poblada, aunque se evidenciaron diferencias en la morfología de las células respecto de las observaciones realizadas en las muestras de TP Grueso. Las células estaban más extendidas y no presentaban una morfología tan alargada. Su disposición no era ni tan paralela ni alineada como en el sustrato Grueso. Las observaciones también mostraron una mayor cantidad de matriz extracelular producida en las muestras de TP Fino, aunque probablemente se perdió parte de la matriz extracelular durante el proceso de

fijación y deshidratación, ya que se observaron numerosas células rotas. Los procesos de preparación para muestras de SEM pueden ser a veces agresivos con la capa celular.

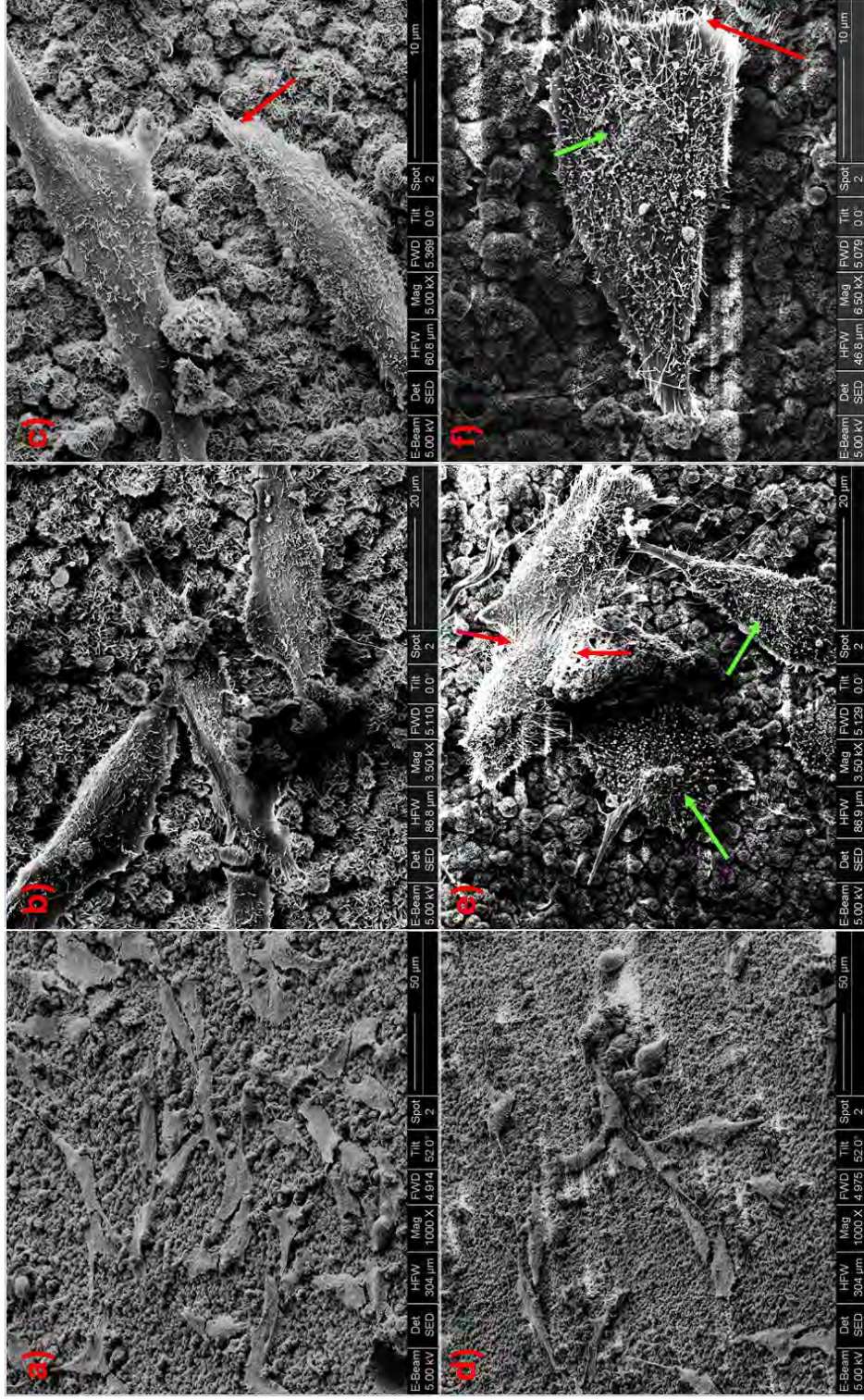


Figura 4.10: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 2 días de cultivo. Arriba: Muestras de TP Grueso. Abajo: Muestras de TP Fino. La flecha roja señala los filopodios de la células. La flecha verde señala la actividad dorsal mostrada por las células.

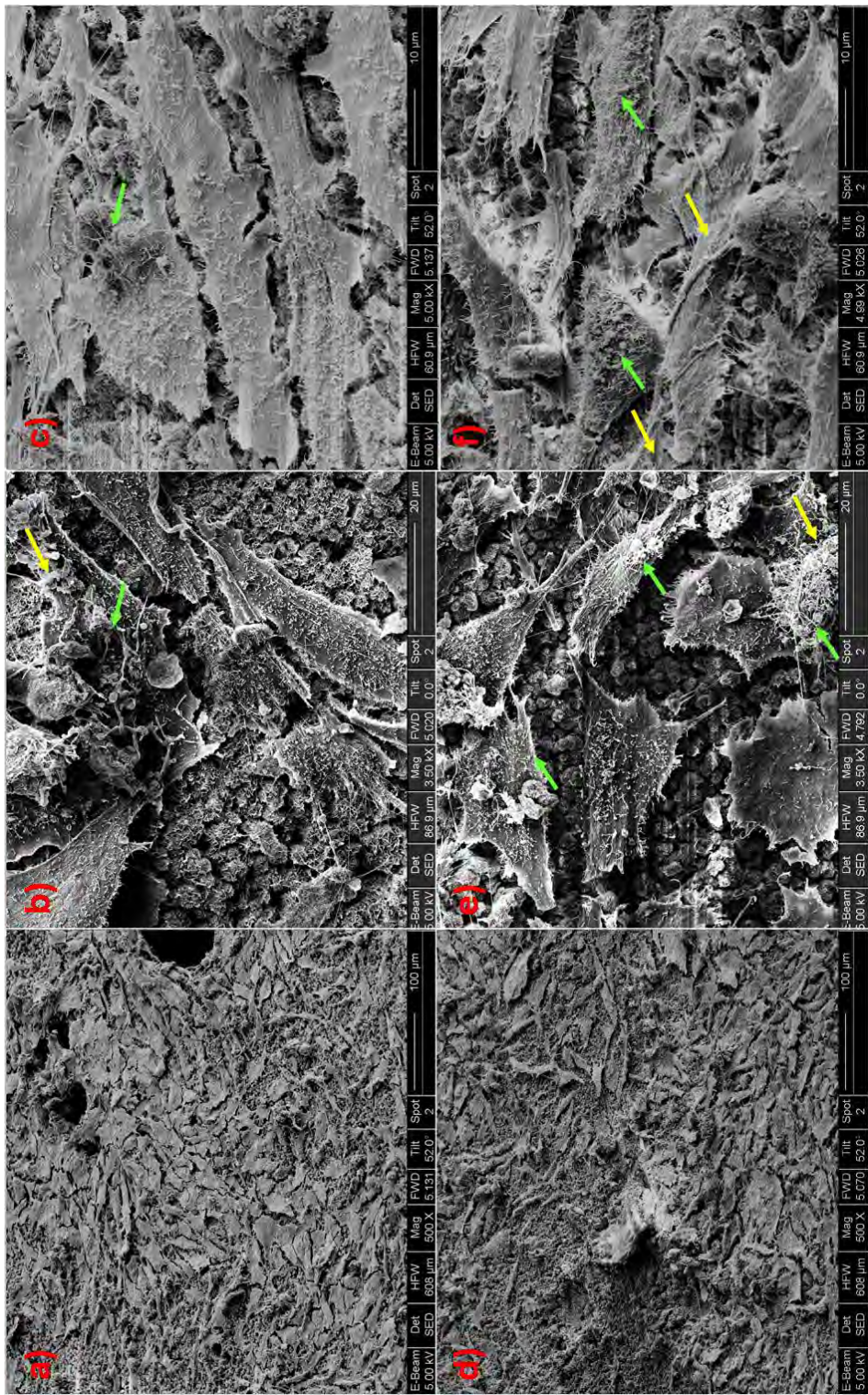


Figura 4.11: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 5 días de cultivo. Arriba: Muestras de TP Grueso. Abajo: Muestras de TP Fino. La flecha verde señala la actividad dorsal de la célula. La flecha amarilla muestra la matriz extracelular.

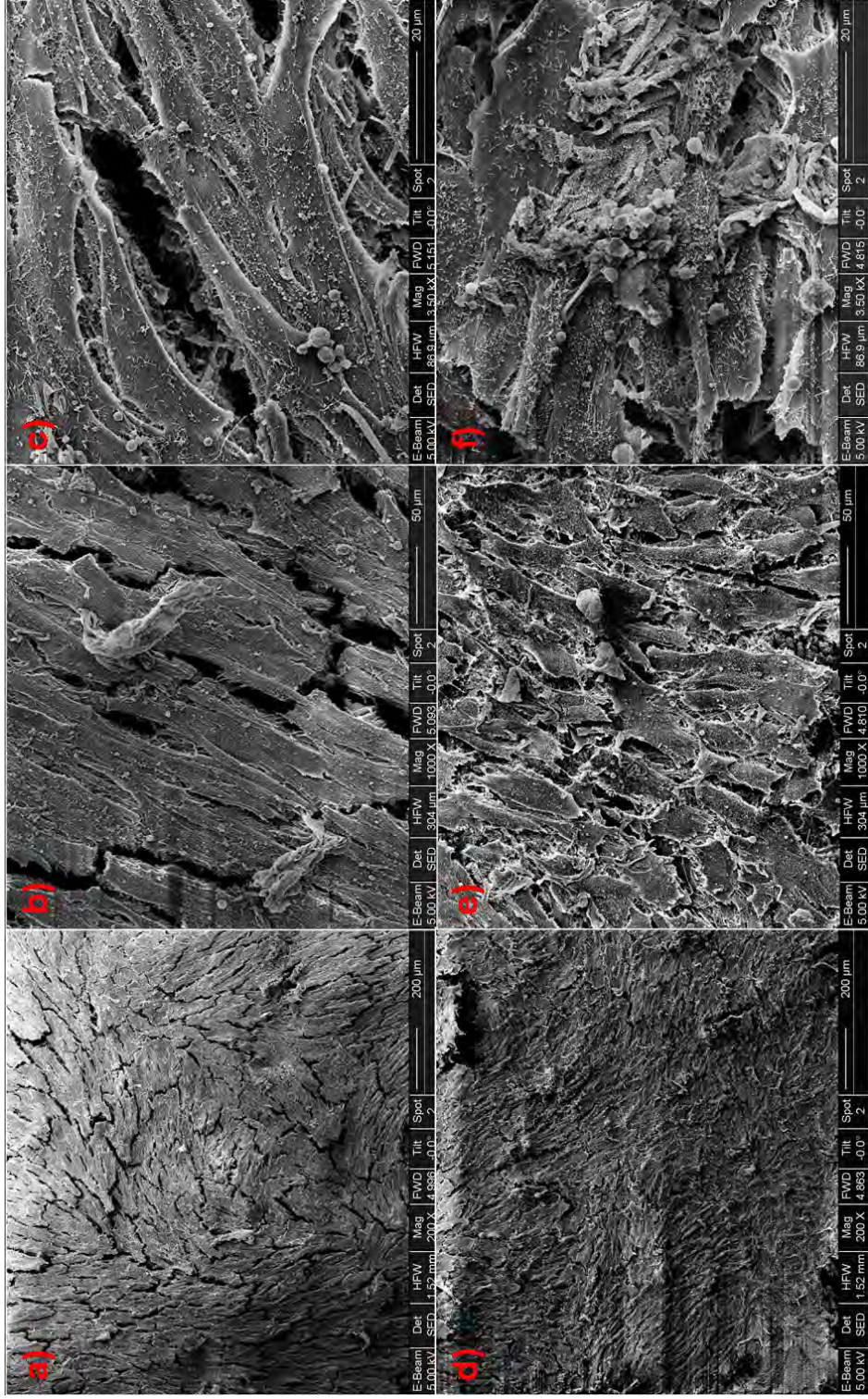


Figura 4.12: Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de células MG-63 después de 15 días de cultivo. Arriba: Muestras de TP Grueso. Abajo: Muestras de TP Fino.

4.4.4.3. Microscopía confocal láser.

Las Figuras 4.13, 4.14 y 4.15 muestran la vinculina y el citoesqueleto de actina después de 2 y 5 días de cultivo. Como control y para poder realizar comparaciones, se cultivaron también células sobre un cubreobjetos.

Después de 2 días de cultivo (ver Figura 4.13), se pueden ver claramente las adhesiones focales en las células cultivadas sobre un cubreobjetos, usado como control. También se observó vinculina alrededor del núcleo y muy ligeramente en toda la superficie de las células. El citoesqueleto de actina estaba presente principalmente en la periferia de la membrana celular y también en forma de fibrillas en el interior de las células.

En el caso de las células cultivadas sobre sustratos CPC, fue difícil observar adhesiones focales similares a las observadas en el control después de la reconstrucción vertical de las imágenes. En este caso, el marcaje de vinculina se produjo por toda la célula. El citoesqueleto de actina se observó principalmente en la periferia de la membrana celular para ambos sustratos. A veces, se observó también la formación de fibrillas de actina similares a las observadas en las células cultivadas en el control. La morfología de las células después de 5 días de cultivo en los sustratos de CPC fue similar a la encontrada después de 2 días de cultivo. En las observaciones realizadas en microscopía confocal también se evidenció la mayor proliferación de las células en las muestras de TP Grueso de forma similar a lo observado por microscopía electrónica de barrido.

Las diferencias entre las morfologías de las células del control y de los sustratos CPC son debidas principalmente a las diferentes topografías de los sustratos, no sólo la altura de los defectos sino también su morfología. El cubreobjetos de cristal usado como control presenta una superficie muy lisa en comparación con los sustratos CPC donde los aglomerados hemiesféricos se superponen unos a otros formando una superficie rugosa tal como se ha descrito en el Capítulo 2. En la Figura 4.15, se observa como la vinculina y la actina forman estructuras semiesféricas, similares a los aglomerados cristalinos de apatita que presentan las muestras de CPC.

En las Figuras 4.16 y 4.17 se muestran diferentes cortes de las imágenes de microscopía confocal donde se combinan y superponen la vinculina y la actina junto a imágenes de reflexión de los sustratos de apatita. En ellas, es posible ver como la vinculina y la actina se forma y rodea siguiendo la morfología de los aglomerados de cristales de apatita así como de los poros presentes en la superficie de los CPC. Las flechas blancas muestran la formación de un aglomerado de apatita a través de los diferentes cortes, se observa el marcaje de vinculina y actina en la periferia de los aglomerados. La presencia de poros tal como se ha comentado también produce una fuerte presencia de vinculina y actina como se deduce por la intensidad del marcaje recogida a través de las diferentes imágenes.

La proyección vertical y combinación de las imágenes de los diferen-

tes cortes mostrados en las Figuras 4.13, 4.14 y 4.15 produce el efecto de un marcaje no específico de la vinculina y de la actina. El análisis de los diferentes cortes muestra claramente cómo las células MG-63 adaptan sus subestructuras a la topografía.

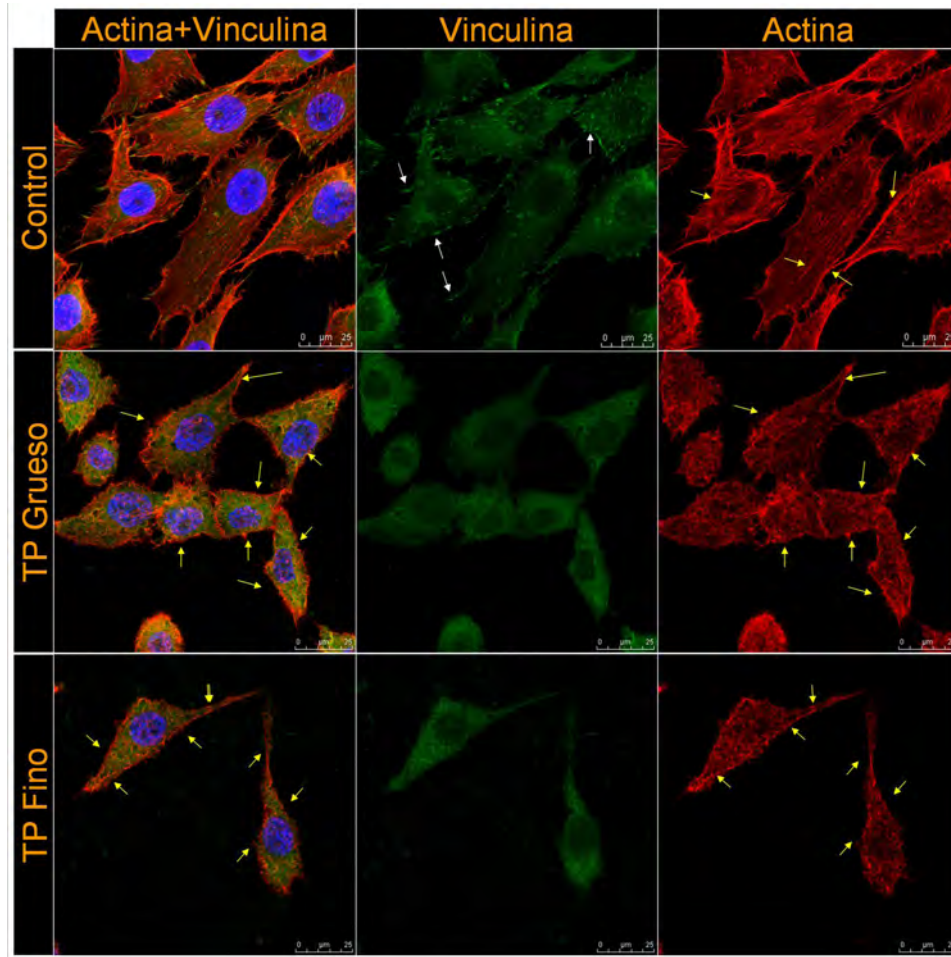


Figura 4.13: Imágenes de microscopía confocal láser: Marcaje de la vinculina y de la actina después de 2 días de cultivo. Arriba: Control de cristal. Centro: Muestras de TP Grueso. Abajo: Muestra de TP Fino. Izquierda: Superposición de la vinculina y de la actina. Centro: Vinculina. Derecha: Actina. Las flechas blancas señalan la presencia de adhesiones focales. Las flechas amarillas señalan las fibras de actina. Nótese la fuerte presencia de actina en la periferia de la célula para ambos tipo de CPC. No se observó una clara presencia de adhesiones focales para ambos sustratos de CPC, a pesar de que si se observa un marcaje no específico de vinculina en las células.

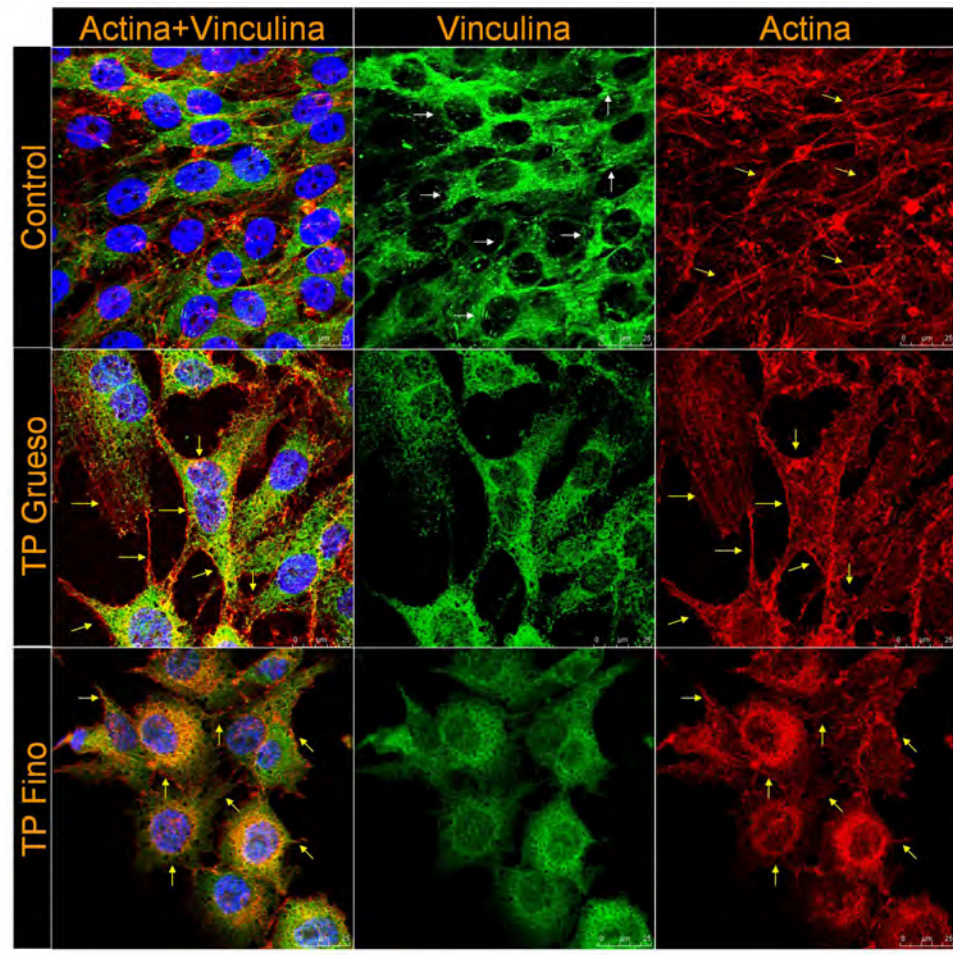


Figura 4.14: Imágenes de microscopía confocal láser: Marcaje de la vinculina y de la actina después de 5 días de cultivo. Arriba: Control de cristal. Centro: Muestras de TP Grueso. Abajo: Muestra de TP Fino. Izquierda: Superposición de la vinculina y de la actina. Centro: Vinculina. Derecha: Actina. Las flechas amarillas señalan las fibras de actina. Nótese la fuerte presencia de actina en la periferia de la célula para ambos tipo de CPC. No se observó una clara presencia de adhesiones focales para ambos sustratos de CPC, a pesar de que si se observa un marcaje no específico de vinculina en las células.

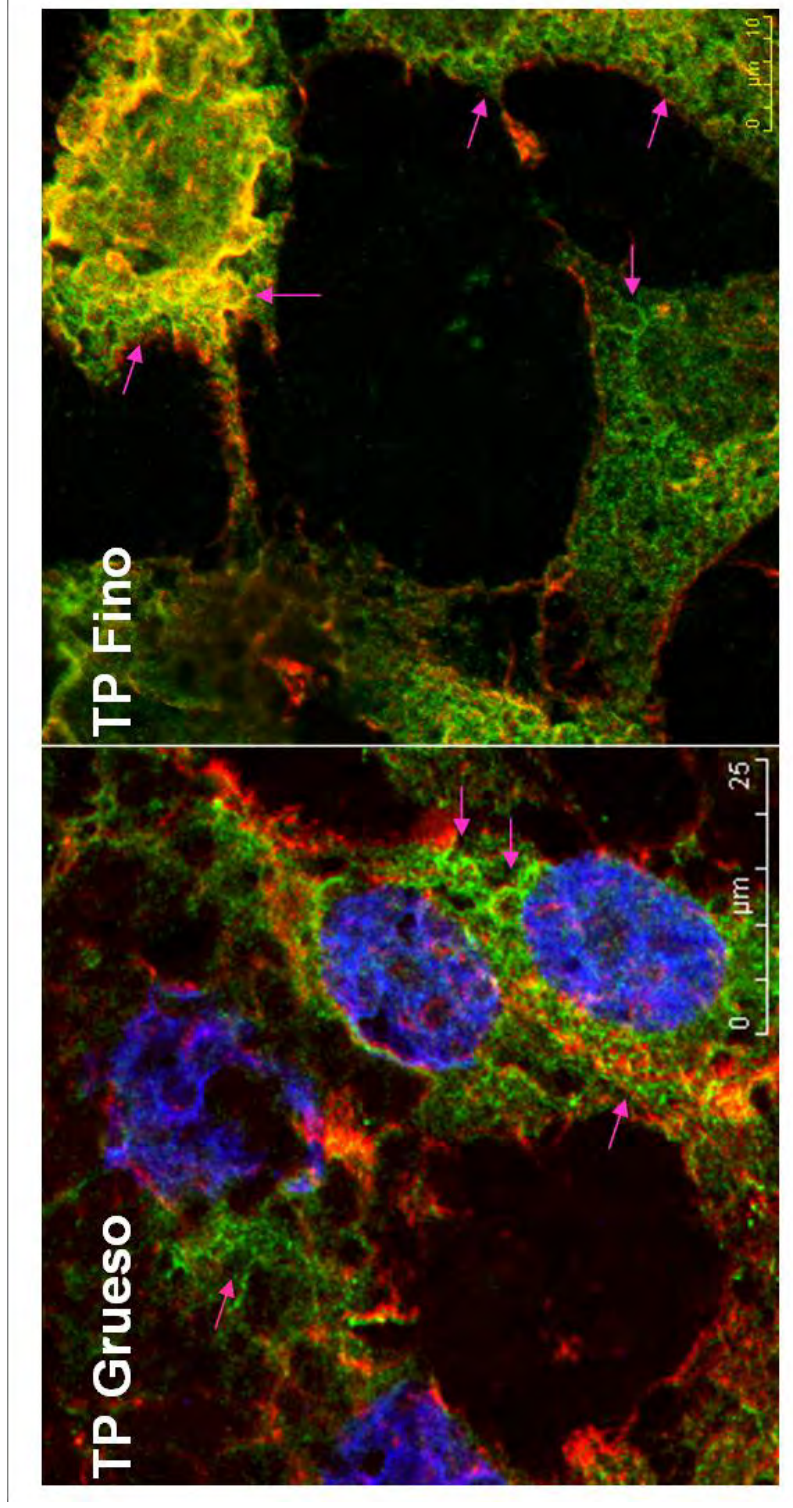


Figura 4.15: Imágenes de microscopía confocal láser: marcaje de vinculina en verde y de actina en rojo en células MG-63 después de 5 días de cultivo. Imagen izquierda: TP Grueso. Imagen derecha: TP Fino. La flecha rosa señala la presencia de vinculina y actina alrededor de un aglomerado hemisférico de cristales de apatita, mostrando la adaptación de la célula a la topografía de las muestras de CPC.

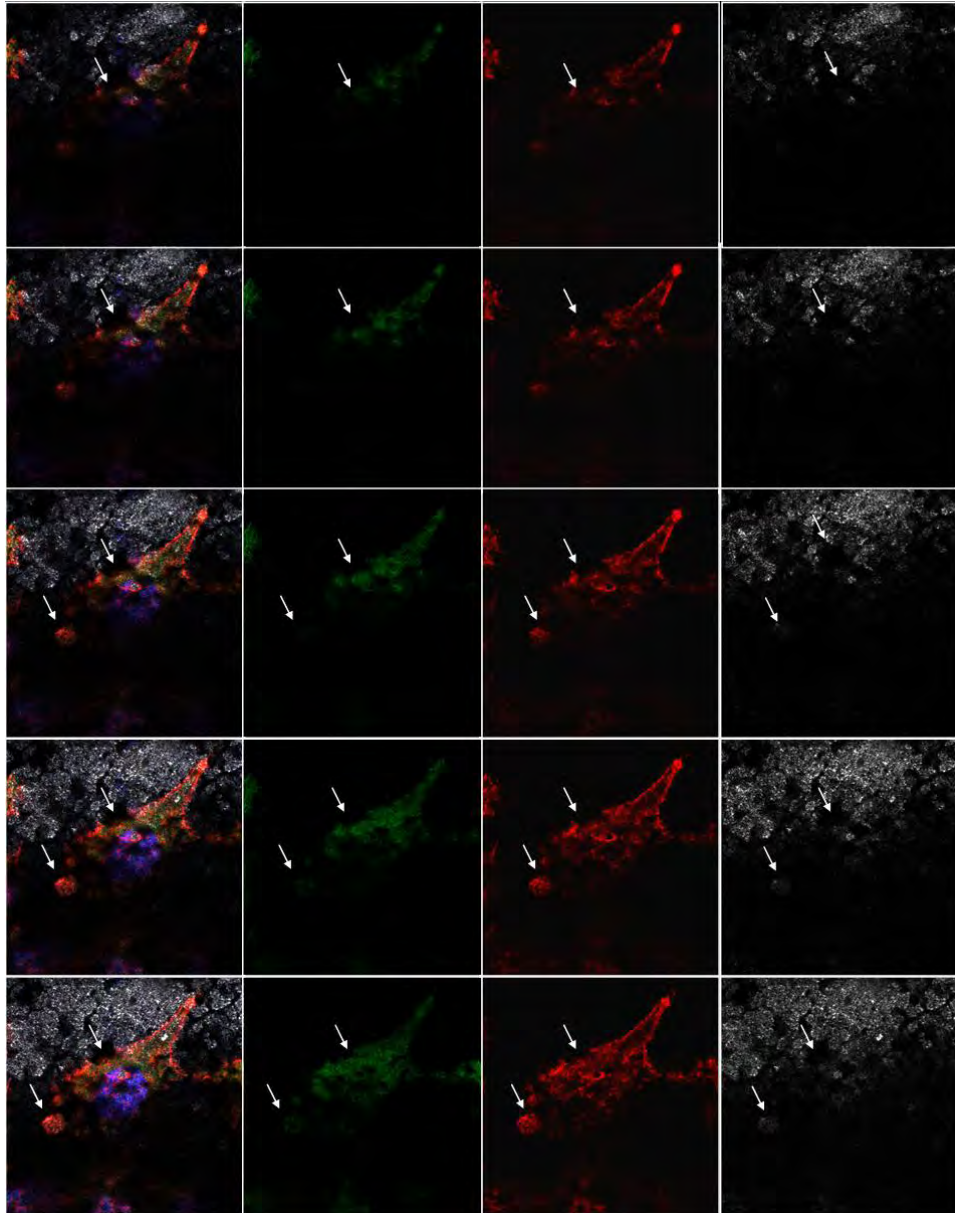


Figura 4.16: Células MG-63 después de 5 días de cultivo sobre una muestra de TP Grueso. Descomposición en altura mostrando la adaptación de las estructuras celulares a la topografía del CPC. La flecha blanca señala un aglomerado de cristales de apatita o un poro a través de los diferentes cortes. De izquierda a derecha: Superposición de las imágenes, vinculina, actina e imagen tomada por reflexión en el microscopio confocal del sustrato de TP Grueso.

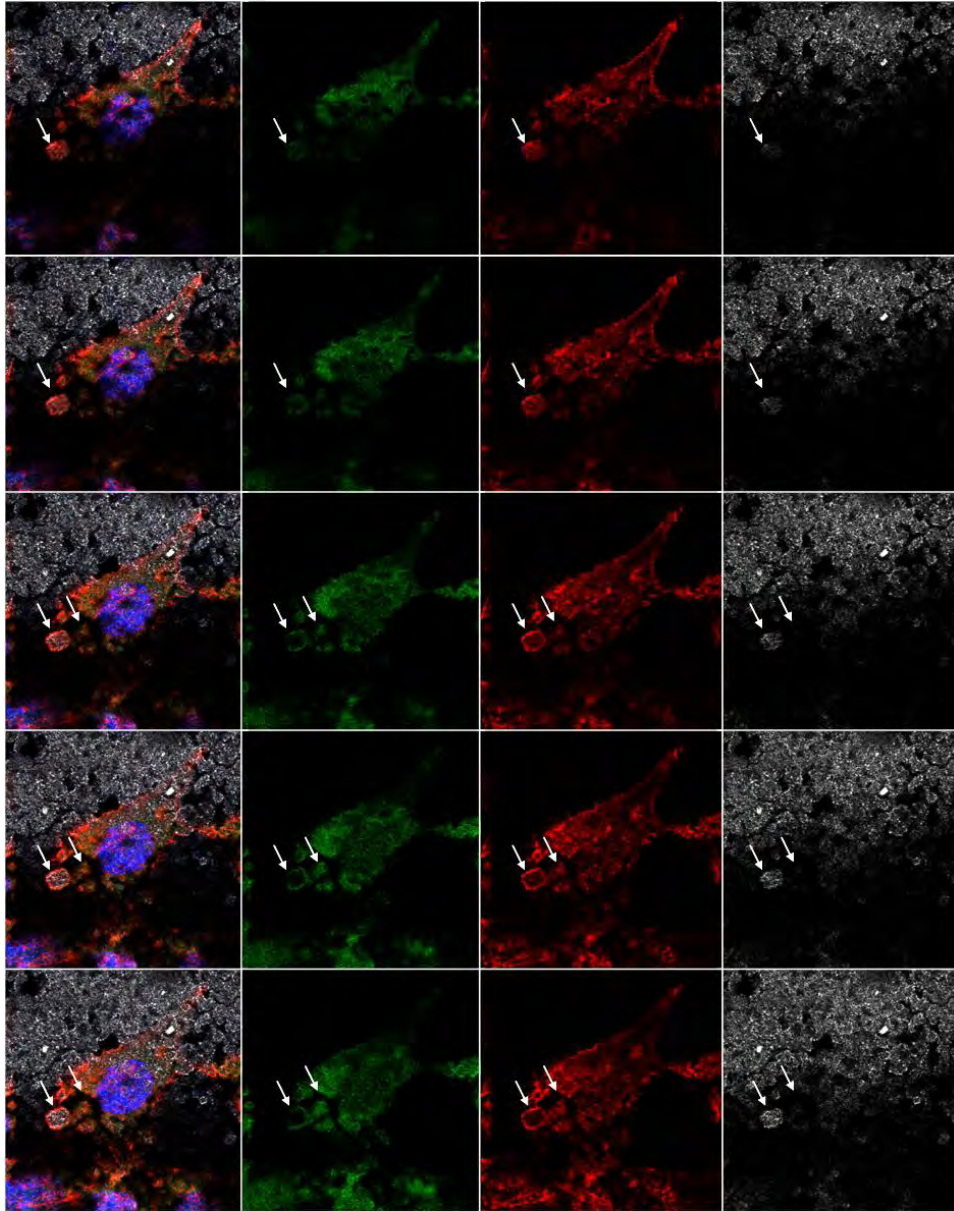


Figura 4.17: Células MG-63 después de 5 días de cultivo sobre una muestra de TP Grueso. Descomposición en altura mostrando la adaptación de las estructuras celulares a la topografía del CPC. La flecha blanca señala un aglomerado de cristales de apatita o un poro a través de los diferentes cortes. De izquierda a derecha: Superposición de las imágenes, vinculina, actina e imagen tomada por reflexión en el microscopio confocal del sustrato de TP Grueso.

4.4.5. Matriz Extracelular

Otro estudio realizado para entender el comportamiento de las células MG-63 sobre ambos sustratos CPC fue la visualización de la matriz extracelular producida por las células mediante microscopía confocal láser para completar y confirmar las observaciones realizadas por SEM. En este caso, el número de células inicial fue aumentado a 50000 células/muestra para acelerar el estado de confluencia.

Se observó que las células en la muestra de TP Fino producían una red de fibrillas de fibronectina más densa y gruesa como se muestra en la Figura 4.18. Aunque se sembró un mayor número inicial de células en este experimento, se reprodujo el mismo patrón de proliferación que en los otros cultivos celulares. Las células en el sustrato Fino produjeron una mayor cantidad de matriz extracelular a pesar de su menor número.

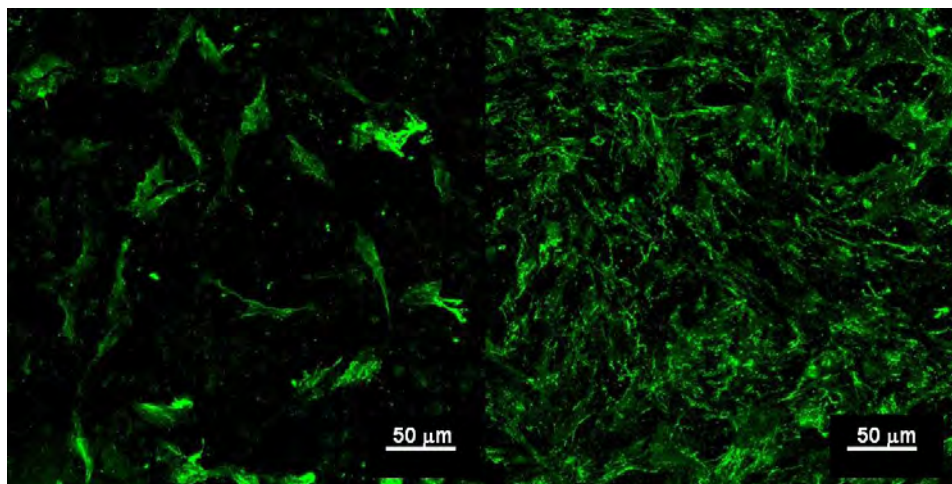


Figura 4.18: Marcaje de la fibronectina presente en la matriz extracelular después de 5 días de cultivo. Imagen Izquierda: TP Grueso. Imagen derecha: TP Fino.

Estas observaciones se confirmaron al realizar el experimento de cuantificación de la fibronectina y el colágeno descrito en la sección 4.3.6. Los resultados se muestran en la Figura 4.19. La fluorescencia medida indica una alta unión de los anticuerpos secundarios. Aunque la proporción de anticuerpos unido a la proteína objeto de estudio no se determinó, se puede decir que la fluorescencia fue proporcional a la cantidad de proteína presente en ambos sustratos de CPC. Entonces los resultados obtenidos confirman las observaciones de microscopía confocal láser. Por lo general, un aumento en la producción de la matriz extracelular implica un estado más avanzado de la diferenciación celular.

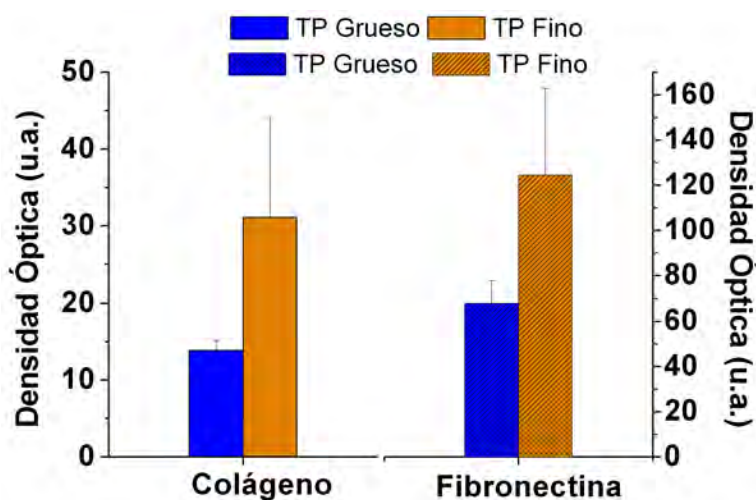


Figura 4.19: Cuantificación de la matriz extracelular producida por las células después de 5 días de cultivo en muestras de CPC. La densidad celular inicial fue de 50000 células/pocillo. El marcaje se realizó con diferentes anticuerpos que fueron posteriormente desenganchados con 0,2N NaOH.

4.4.6. Intercambio iónico entre los sustratos de CPC y el medio de cultivo en presencia de células

La Figura 4.20 muestra la evolución de $[Ca^{2+}]$ en el medio de cultivo en contacto con los sustratos CPC durante 96h. En este caso, no se realizó ningún cambio de medio. Hubo una alta adsorción de Ca por parte de ambos sustratos. La concentración de Ca disminuyó bruscamente durante las diez primeras horas. Esta adsorción fue más rápida y pronunciada en el caso de las muestras de TP Fino que en las muestras de TP Grueso, en concordancia con la mayor superficie específica que presentan las mismas. Este hecho favoreció el intercambio iónico, dando lugar a una disminución de la concentración de calcio del medio de cultivo. De hecho, la concentración de calcio fue cercana a 0,1mM para el sustrato Fino y a 0,2mM para el sustrato Grueso en comparación con los 1,7mM del medio de cultivo estándar completo.

La evolución de la concentración de Ca y P en el medio de cultivo a tiempos más largos de estudio se muestra en las Figuras 4.21 y 4.22. Las Figuras muestran la evolución de ambos iones en presencia y en ausencia de células. En este experimento, el medio de cultivo completo se cambió en los diferentes puntos de estudio siguiendo la sistemática de trabajo estándar realizada durante un cultivo celular. Se midió la concentración de ambos iones antes de retirar el medio de cultivo y de que este fuera renovado. Se observa la misma tendencia en ambos sustratos a partir del tercer día de inmersión en adelante. Hay una adsorción continua de calcio y una liberación de fosfato al medio de cultivo cada vez que se renueva el medio de cultivo.

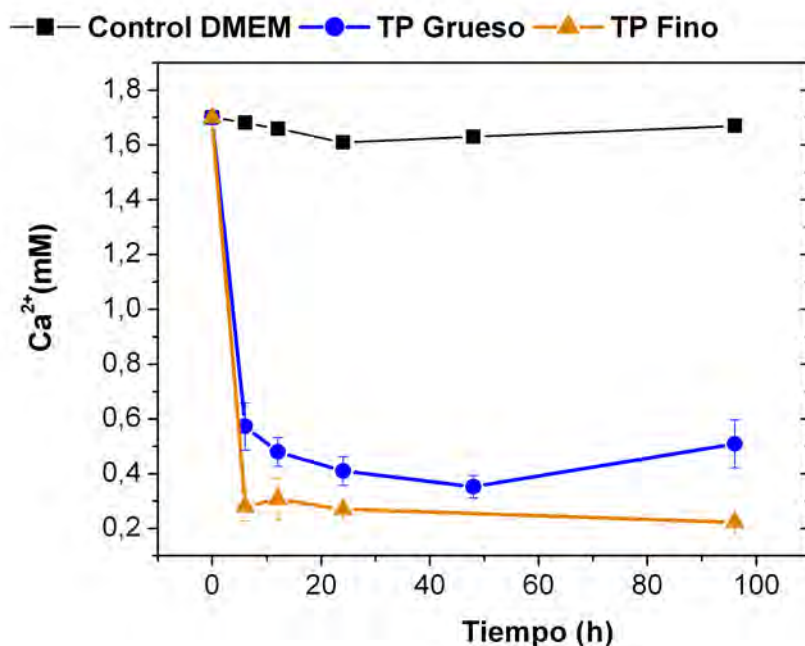


Figura 4.20: Evolución de la concentración de calcio en el medio de cultivo después de estar en contacto 96h con los sustratos. No se realizó ningún cambio de cultivo durante este periodo

La adsorción y la liberación fueron más pronunciadas en el sustrato Fino que para el sustrato Grueso. La concentración de P en el medio de cultivo para el sustrato Fino estuvo alrededor de 3mM y para el sustrato Grueso en torno a 2,5mM tras una semana de estar en contacto las muestras con el medio de cultivo.

La evolución en la concentración de Ca y de P en el medio de cultivo completo en presencia de células siguió la misma tendencia, una gran disminución de Ca y un gran aumento de concentración P en el medio. Sin embargo, después de sólo 7 días de cultivo, las diferencias en las concentraciones de ambos iones en presencia de células comenzaron a ser estadísticamente significativas en el caso del sustrato Grueso en comparación con las concentraciones de Ca y P de las muestras de TP Grueso sin células. Para el sustrato Fino, estas diferencias, en las concentraciones iónicas entre las muestras con o sin células, eran estadísticamente significativas a tiempos de cultivos más largos entre 11 y 14 días. Las células cultivadas en TCPS, grupo de control, mostraron un pequeño aumento de Ca de 1,7 a 1,8Mm después de una semana de cultivo y el nivel de P aumentó de 1,0 a 1,25 Mm después de más que una semana de cultivo.

Se observó una acidificación del medio cultivo, más pronunciada para las muestras de TP Fino que para las muestras de TP Grueso en las mues-

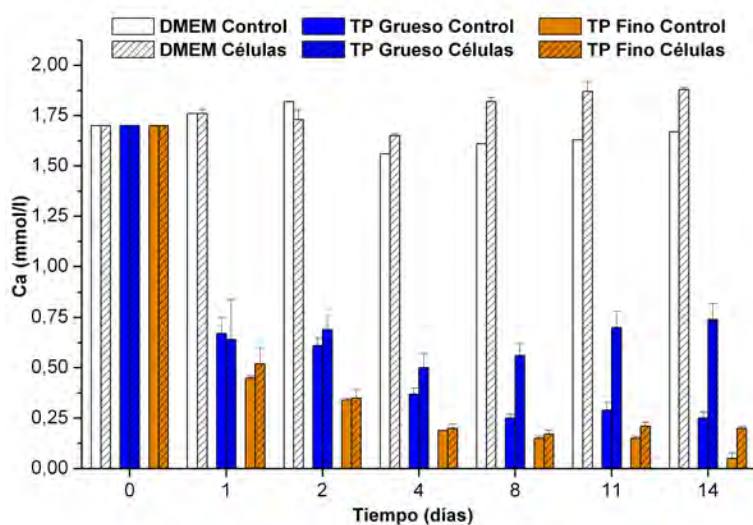


Figura 4.21: Evolución de la concentración de calcio en el medio de cultivo en las muestras de TP Grueso y TP Fino con o sin células durante el periodo de estudio. La concentración de calcio se midió antes de la renovación del medio de cultivo después de estar en contacto con las muestras.

tras sin contacto con las células. Los valores de pH fueron de 6.8 para los sustratos Finos y 7.0 para los sustratos Gruesos debidos a la liberación de fosfato al medio. En presencia de células, también se produjo una acidificación del medio de cultivo, pero en este caso fue menor, mostrando cierta acción tamponadora del medio producida por la presencia de las células. No se muestran los resultados debido a la dificultad de mantener un pH estable debido a la influencia del tampón de CO_2 presente en el medio de cultivo.

4.4.7. Proliferación y diferenciación en los cultivos celulares realizados con extractos

La Figura 4.23 muestra la tendencia o patrón de proliferación de las células MG-63 cultivadas con los extractos de CPC Gruesos y Finos y con medios de cultivo con concentraciones de calcio que disminuyen de 1.4mM (medio de cultivo estándar completo) a 0mM.

En general, la respuesta en la proliferación con los extractos de CPC fue similar a la obtenida en los cultivos en contacto directo con las muestras. El número de células fue casi el mismo a 1 y 3 días en contacto con los extractos Gruesos y Finos, y no hubo diferencias con el control (medio de cultivo estándar completo (1.4mM Ca^{2+}), así como con los medios de cultivo con concentraciones menores de Ca^{2+} .

Sin embargo a día 7, la proliferación de las células cultivadas con los extractos de CPC Fino fue menor en comparación con los otros grupos de estudio. Esta disminución era comparativamente más pronunciada a 14 días.

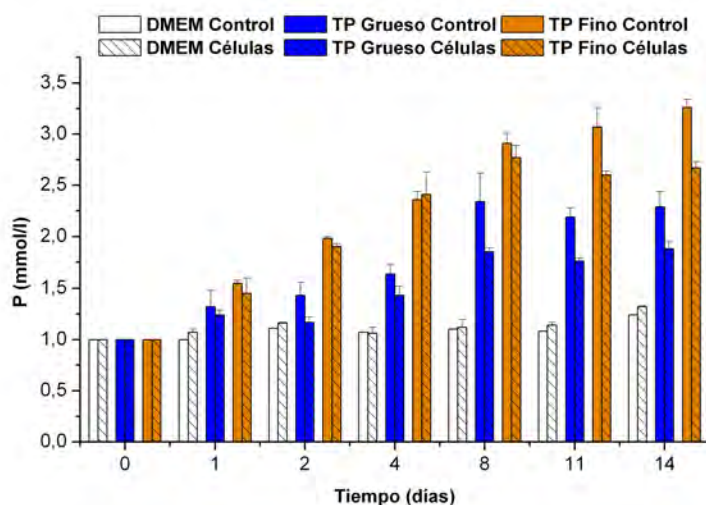


Figura 4.22: Evolución de la concentración de fosfato en el medio de cultivo en las muestras de TP Grueso y TP Fino con o sin células durante el periodo de estudio. La concentración de fosfato se midió antes de la renovación del medio de cultivo después de estar en contacto con las muestras.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación de las células en contacto con medios de cultivo con concentraciones menores de Ca^{2+} y el medio de cultivo control, excepto para las células cultivadas con un 0 % de Ca^{2+} en el medio de cultivo, donde el número de células disminuyó, aunque en menor grado que con los extractos de TP Fino.

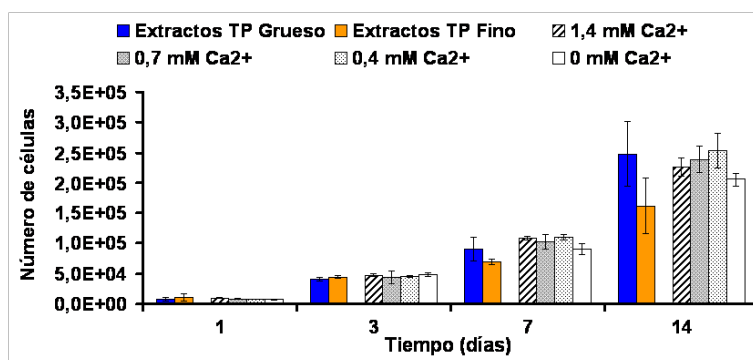


Figura 4.23: Proliferación de células MG-63 cultivada con extractos de CPC y en medios de cultivo con diferentes concentraciones de Ca^{2+} en placa de cultivo de 48 pocillos.

La actividad de la fosfatasa alcalina disminuye cuando la concentración de calcio en el medio desciende por debajo de 0,7mM, tal como se muestra en la Figura 4.24. Los valores de la actividad de la fosfatasa alcalina de las células cultivadas con los extractos de CPC fueron más bajos que los obtenidos en el medio de cultivo control.

nidos para el medio de cultivo estándar utilizado como control. Los valores obtenidos no difieren significativamente cuando las células son cultivadas con los extractos de procedentes de las muestras de TP Fino o TP Grueso. En este caso, no se observó un aumento de la fosfatasa alcalina con los extractos de TP Fino, contrariamente a lo que si se observó cuando las células fueron cultivadas en contacto directo con las muestras de TP Fino.

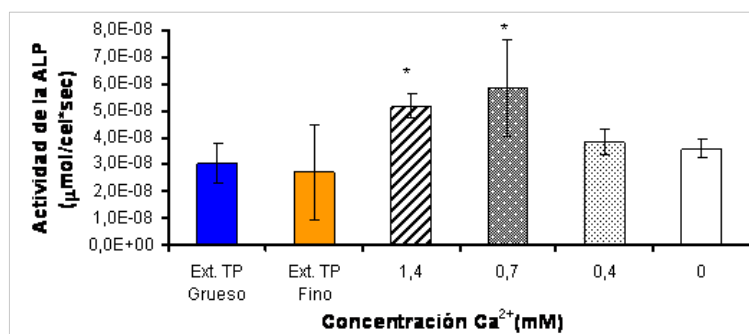


Figura 4.24: Actividad de la fosfatasa alcalina de células MG-63 cultivadas con extractos de TP Grueso y TP Fino y con medios con concentraciones decrecientes de Ca²⁺ después de 17 días de cultivo. El asterisco (*) indica valores con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) de los obtenidos para los extractos de TP Fino, TP Grueso y de los medios de cultivo conteniendo 0,4 y 0 mM de [Ca²⁺].

La Figura 4.25 muestra las concentraciones de Ca²⁺ en los medios de cultivo antes de ser renovados a diferentes días durante el procedimiento estándar de cultivo. El primer punto muestra niveles más elevados debido a que en el procedimiento de sembrado se utilizó 100 μ l de medio estándar y 200 μ l del medio correspondiente, por lo tanto hay un nivel más elevado de calcio. Se observa que no hubo variaciones en el nivel de calcio debido a una influencia de las células durante los diferentes días de control.

4.4.8. Apoptosis

A pesar de las diferencias en la concentración iónica entre los extractos y el medio de cultivo estándar no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células apoptóticas a las 24h. Tampoco hay diferencias en el número de células apoptóticas entre los grupos de TP Grueso y TP Fino tanto para las células cultivadas con los extractos como para las células en contacto directo con las muestras de CPC. Sin embargo, la adhesión celular sí fue mayor en las muestras cultivadas con los extractos y con superficie de cultivo TCPS que sobre los sustratos de apatita deficiente en calcio.

La Figura 4.26 es una imagen representativa del número de células presentes en las muestras de estudio después de 7 días de cultivo tomada por microscopía óptica de fluorescencia. Se observa la menor proliferación

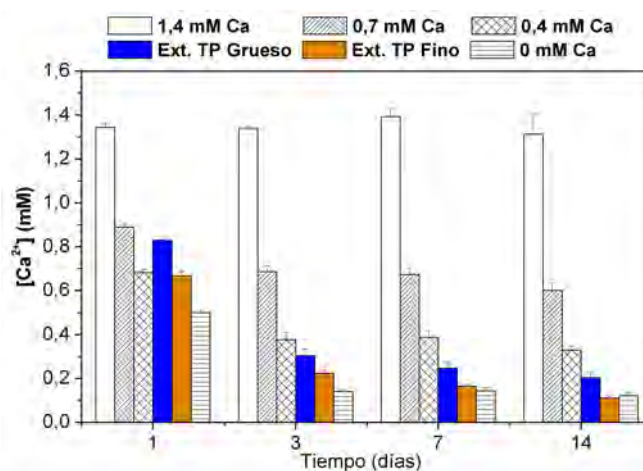


Figura 4.25: Concentración de calcio en el medio de cultivo después de estar en contacto con las células durante el estudio con los extractos de CPC.

de las células cultivadas con los extractos de TP Fino en comparación con las células cultivadas con los extractos de TP Grueso y el control (estos resultados fueron confirmados mediante el test de WST, datos no mostrados) en concordancia con los resultados obtenidos previamente. Sin embargo, la menor proliferación fue todavía mucho más evidente cuando las células fueron cultivadas en contacto directo con los sustratos de CPC, especialmente en el sustrato Fino (véase Figura 4.6).

Se estudió la apoptosis celular para determinar si las diferencias observadas en la proliferación celular eran debidas a una muerte celular. El porcentaje de células apoptóticas a las 24h fue mayor cuando éstas fueron cultivadas en los sustratos de apatita que cuando fueron cultivadas con los extractos, pero en ambos casos no hubo diferencias entre TP Fino o TP Grueso (ver Figura 4.27). Al cabo de 7 días, el número de células apoptóticas era ligeramente mayor cuando las células se cultivaron en el sustrato Fino en comparación con el resto de grupos estudiados. Sin embargo, la menor proliferación observada en el TP Fino no puede ser atribuida a la muerte celular debido al bajo porcentaje de células apoptóticas encontrado.

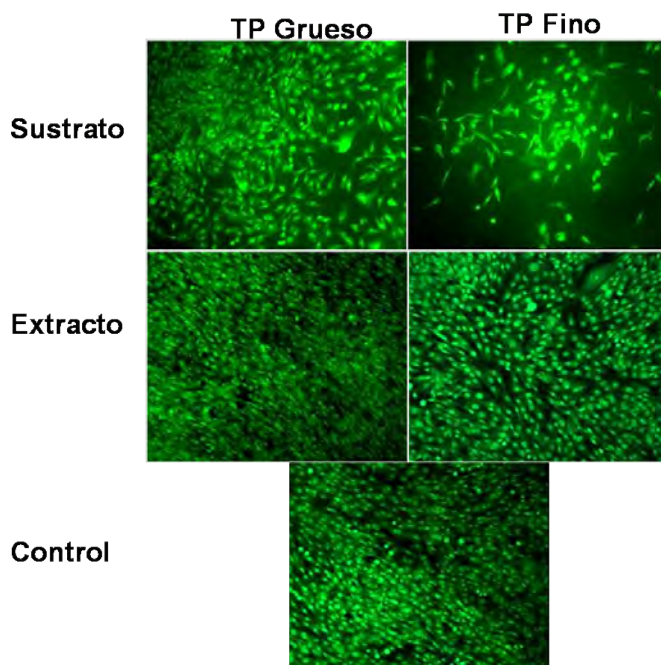


Figura 4.26: Proliferación después de 7 días de las células MG-63 en contacto directo con los sustratos procedentes de CPC o con sus extractos en TCPS, también se puede ver el control de TCPS y medio de cultivo estándar. No se pueden distinguir células apoptóticas en estas imágenes a tan bajos aumentos.

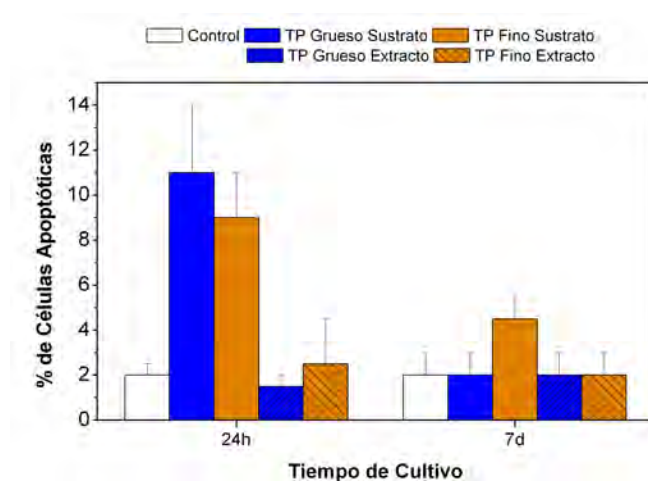


Figura 4.27: % Porcentaje de células apoptóticas encontrados en los diferentes tiempos de estudio.

4.5. Discusión

En el Capítulo 2, se vio que el tamaño de partícula del polvo inicial permite controlar y variar la microestructura de los CPC, a una escala micro- y nanométrica. El control de la microestructura permite el diseño de "scaffolds" andamios para la Ingeniería de Tejidos con propiedades físico-químicas y biológicas específicas. De hecho, los resultados obtenidos muestran que sustratos con una composición química idéntica pero con diferencias en su micro/nanoestructura provocan respuestas en el comportamiento celular muy diferentes, particularmente en la proliferación y diferenciación de los osteoblastos.

Las diferencias en la microestructura afecta a su vez a propiedades como la topografía, cristalinidad, morfología de los cristales, superficie específica entre otras propiedades. La topografía superficial de ambos sustratos es una estructura compleja, compuesta de aglomerados semiesféricos con micro o nanocristales tal como se ha visto en el Capítulo 2.

Los resultados mostraron que con el CPC con un tamaño inicial de partícula más pequeño se obtuvo una estructura mucho más fina que en el CPC con tamaño de partícula más grande (el sustrato Fino y el sustrato Grueso respectivamente), con aglomerados más pequeños y precipitados cristalinos de HA más pequeños y de morfología acicular. Esto implica una mayor superficie específica, una rugosidad menor, una cristalinidad menor en términos de dominios de difracción, una mayor adsorción de proteínas y diferencias en la fuerza de adhesión de las proteínas. Todos estos factores tienen gran influencia en la respuesta biológica tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.5.1. Adhesión de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

La adhesión celular fue inferior en ambos sustratos de apatita en comparación con la superficie de poliestireno para cultivo celular (TCPS) usada como control (ver Figura 4.6). Este resultado es coincidente con estudios anteriores sobre cerámicas de apatita y CPC [7, 40–48].

Sin embargo, no se observaron diferencias en la adhesión celular entre ambos sustratos en los puntos de estudio. Este resultado coincide con los resultados obtenidos por Yuasa *et al.* [40] donde se comparaba la adhesión celular en diferentes apatitas sinterizadas y CPCs. No observaron diferencias en la adhesión celular a pesar de las diferencias topográficas. Ogata *et al.* tampoco encontraron diferencias en la adhesión celular en sustratos de apatita con diferencias en su química [46]. En cambio, Deligianni *et al.* sí observaron una mayor adhesión celular en sustratos de apatita cuando la rugosidad aumentaba (R_a entre 0.73 y 4.68 μm) [7]. En contraposición, Webster *et al.* encontró una mayor adhesión celular en muestras de apatita nanocristalina sinterizada en comparación con apatita microcristalina, su-

giriendo una posible influencia en el tamaño de cristal de la apatita en la adhesión de osteoblastos [49, 50].

4.5.2. Proliferación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

Diferencias estadísticamente significativas en la proliferación aparecieron entre los dos sustratos de CPC a tiempos de cultivo largos, principalmente a partir del séptimo día. Esto hecho sugiere que los osteoblastos tienden a parar su proliferación en los sustratos Finos y comienzan a diferenciarse en osteoblastos maduros, a pesar de poseer ambos sustratos la misma química superficial.

Se observó durante los experimentos de cultivo celular una mayor dificultad a la hora de despegar las células de los sustratos Finos usando tripsina/EDTA. En el sustrato Fino, fue necesario un segundo ciclo de tripsinización a día 7 para poder despegar las células, mientras que las células cultivadas en el sustrato Grueso fueron despegadas mucho más fácilmente. Este hecho sugiere una mayor interacción de los osteoblastos con el sustrato Fino. Cuando las células se adhieren con fuerza a una superficie, su movilidad y proliferación se ve limitada, hecho que los empuja a diferenciarse [51].

Después de sembrar las células sobre un sustrato, la adhesión celular a la superficie es modulada por interacciones fisicoquímicas, donde interviene el calcio y el magnesio y también la adsorción de vitronectina en la superficie procedente del suero [25]. En etapas posteriores, sin embargo, la adhesión celular se relaciona sobretodo con la producción de la matriz extracelular y su organización. Ya que no se encontraron diferencias en el número de células adheridas a tiempos cortos, las diferencias encontradas en la fuerza de adhesión y la proliferación a partir del día 7 se atribuyeron a una mayor formación de la matriz extracelular sobre el sustrato Fino. Esta hipótesis fue corroborada por las observaciones de SEM (ver sección 4.4.4.2) y los experimentos de visualización de la matriz extracelular (sección 4.4.5). En ambas observaciones, se observó una mayor cantidad de matriz extracelular en el CPC Fino que en el CPC Grueso.

4.5.3. Diferenciación de los cultivos celulares en contacto directo con las muestras

La mayor cantidad de matriz extracelular observada en el sustrato Fino sugiere que las células MG-63 entraron antes en un estado de diferenciación. Esta observación se correlaciona bien con los valores más altos de los marcadores osteoblásticos (Actividad de la ALP y secreción de la osteocalcina) encontrados en el sustrato Fino. Los resultados que se muestran en la Figura 4.7 sugieren que la diferenciación celular se ve incrementada en el sustrato Fino en comparación con el control como con el sustrato Grueso.

Tanto la actividad de la ALP como los niveles de osteocalcina encontrados en el sustrato Fino fueron aproximadamente 2,5 veces más altos que los encontrados en el sustrato Grueso. Estos resultados son particularmente interesantes si se considera que la composición química de ambos sustratos es la misma, y sólo difiere la microestructura. Aunque más análisis en diferentes puntos proporcionaría una imagen más completa del ciclo de celular en ambos sustratos de CPC.

Sin embargo, no se puede atribuir este comportamiento celular solamente a un efecto topográfico, probablemente también se deba a una influencia indirecta del intercambio iónico (concentración de calcio y fósforo) y el pH. Se observó en ambos sustratos cada vez que se renovó el medio de cultivo una elevada adsorción de Ca^{2+} y una alta liberación (de PO_4)³⁻ de y al medio respectivamente. Además, el intercambio iónico fue más rápido y pronunciado en el sustrato Fino, en concordancia con su mayor superficie específica cosa que favorece a su vez el intercambio iónico. La concentración de Ca^{2+} medida después estar en contacto con el medio de cultivo durante 3 días fue cercana a 0,1mM para el sustrato Fino y a 0,2mM para el sustrato Grueso, comparado con los 1,4mM del medio de cultivo estándar completo. La concentración de fósforo en el medio fue cercana a 3,0mM en las muestras de TP Fino y a 2,3mM para las muestras de TP Grueso en comparación con el medio de cultivo estándar que tiene 1,0mM en ausencia de células.

Es por lo tanto interesante mencionar que la inmersión de estos materiales ricos en calcio en el medio de cultivo completo no implicó una liberación de Ca^{2+} por disolución, sino más bien al contrario una disminución del mismo del medio de cultivo. Dicha adsorción de Ca^{2+} también ha sido observado por otros autores en materiales apatíticos [52, 53] y está relacionada con el carácter bioactivo del material. Esto es lo opuesto que cabría esperar que pase en agua destilada, ya que el sustrato Fino es menos cristalino y por lo tanto más soluble que el sustrato Grueso.

Las concentraciones de Ca y P en el medio de cultivo en presencia de células fueron similares a tiempos cortos a las de las muestras sin células. Sin embargo, a medida que las células proliferaron las concentraciones de Ca y P comenzaron a ser diferentes a las de las muestras sin células. Se ha de advertir que estas diferencias pasaron en puntos de tiempo diferentes para las muestras de TP Fino y TP Grueso. Hay dos explicaciones posibles de este hecho. Las células, después de cierto tiempo, alcanzan un número donde son capaces de proteger o controlar los niveles iónicos. Otra posible explicación es que la capa de células era lo suficientemente grande o gruesa de tal forma que actuaba como barrera e impedía de alguna forma la difusión y por lo tanto el intercambio de la superficie del sustrato con el medio. Sin embargo, la adsorción de calcio y la liberación de fósforo al medio ocurrió cada vez que el medio fue renovado. Cabe mencionar que las células fueron sólo cultivadas en la superficie superior de los sustratos y el intercambio iónico todavía se podría producir con las superficies lateral e inferior.

Esto es un hecho relevante para los estudios *in vitro* de materiales bioactivos: cualquier interpretación de los resultados en términos de un efecto hipotético de Ca^{2+} y de $(\text{PO}_4)^{3-}$ en la solución debería ser examinados con cuidado ya que la liberación o adsorción de Ca^{2+} y de $(\text{PO}_4)^{3-}$ por el material no puede ser previsto a priori ya que dependerá del equilibrio entre la solubilidad del material y su fuerza bioactiva.

Los resultados de proliferación coinciden con los obtenidos por Hempel *et al.* [54], aunque ellos encontraron una disminución en la diferenciación de células osteocalvianas de rata cultivadas sobre sustratos de Biocement D. Esto no fue el caso para el sustrato Fino donde se obtuvo una mayor diferenciación que en el sustrato Grueso donde se obtuvieron niveles similares al control. Ellos atribuyeron este efecto a una combinación de un alto intercambio iónico y a la morfología de la muestra. También observaron que las células cultivadas con extractos mejoraron su proliferación en comparación con el medio de control, aunque la diferenciación no aumentó en la misma proporción. Por el contrario Oreffo *et al.* encontraron una disminución en la proliferación y un aumento de la diferenciación de células de médula ósea humana cultivadas en diferentes sustratos de CPC (Biocement D, Biocement F, Biocement H). Estos sustratos fueron dos sustratos de apatita deficiente en calcio y un sustrato de apatita carbonatada. Sin embargo en sus trabajos, no mencionan específicamente ni la morfología de los cristales de los sustratos de CPC ni el intercambio iónico [42, 43]. Zhao mostró que la morfología de los cristales de HA influye en la proliferación celular y en la morfología celular a pesar de que sus sustratos tenían valores de R_a similares entre ellos ($0.35\mu\text{m}$) [55]. Okumura *et al.* encontraron que la que la hidroxiapatita promueve la adhesión y la expansión de células de osteosarcoma SaoS-2, causando antes la osteogénesis sobre superficies de hidroxiapatita en comparación con el titanio, el cristal o el poliestireno [56]. Hott *et al.* obtuvo también una disminución en la proliferación sobre HA después de 8 días de cultivo cuando células trabeculares humanas comenzaron a diferenciarse [48].

4.5.4. Morfología celular

La morfología de las células fue muy redondeada durante las primeras horas de adhesión, aunque algunas células comenzaran a extenderse. Después de 24h, la mayor parte de las células presentaban una morfología más alargada. Esto tiene correlación con las observaciones hechas por Chou *et al.* [57]. Después de 24h de cultivo, observaron una disminución en la capacidad de células MC3T3-E1 para adquirir una morfología extendida sobre diferentes sustratos biomiméticos de apatita en comparación con la morfología presente en TCPS usado como control. La morfología de sus cristales de apatita en forma de placas es similar a la que presenta el sustrato Grueso de este trabajo. Las células desarrollaron una morfología poco extendida con presencia de numerosas extensiones de celulares con un citoesqueleto de ac-

tina con filamentos no muy bien definidos. Las células entraron antes en un estado de diferenciación relacionando este hecho con la morfología que adquieren las células sobre los sustratos de apatita. Sin embargo, no descartan que el intercambio iónico pueda tener cierta influencia en la diferenciación combinándose con el efecto de la morfología de los cristales apatita. Lee *et al.* también observaron una menor extensión celular y una morfología más alargada con numerosos filopodios en células osteoblásticas MC3T3-E1 después de 24h de cultivo en capas de hidroxiapatita precipitada en comparación con TCPS [58]. Sin embargo, establecer comparaciones con las observaciones realizadas en esta tesis es complicado al ser las imágenes de microscopía confocal de su trabajo poco definidas o claras, aunque aparentemente hubo un marcaje de la actina a través de toda la membrana celular.

En nuestras observaciones, las células MG-63 células mostraron también un marcaje no específico tanto de la actina y la vinculina en comparación con las células cultivadas sobre un cubreobjetos utilizado como control. Una observación más detallada reveló que las células eran capaces de adaptarse a la microestructura subyacente de aglomerados de apatita y poros. Se observó una fuerte tinción de la actina en la periferia de la membrana celular. No hubo claras diferencias en la expresión de actina o vinculina entre ambos sustratos de CPC, a pesar de las diferencias encontradas en la producción de la matriz extracelular y los resultados de los experimentos de diferenciación. Sin embargo, sí se observó una actividad dorsal más pronunciada por SEM y también un mayor número de filopodios en las células cultivadas en el sustrato Fino a día 5. A día 15, también se observaron claras diferencias en la organización y la morfología de las células entre el sustrato Grueso y el sustrato de Fino correlacionándose estas observaciones con los estudios de proliferación y diferenciación.

La influencia de superficies regulares micro y nanoestructuradas (surcos y crestas) en la morfología celular y en la expresión de actina y vinculina está bien documentada [11, 59, 60]. Hart *et al.* demostraron que osteoblastos cultivados sobre policarbonato con diferentes nanotopografías se extendieron menos pero en cambio desarrollaron un mayor número de filopodios mostrando también una clara interacción de las células con las estructuras nano. No se observaron adhesiones focales tan bien definidas en comparación con las observadas sobre sustratos lisos, mostrando también fibras de actina más corticales y una morfología estrellada [61]. Dalby *et al.* mostraron un aumento de los marcadores de celulares cuando las células óseas fueron cultivadas en superficies de polimetilmetacrilato con nanoestructuras irregulares, sin orden aparente en frente a superficies con nanoestructuras con una disposición regular u ordenada, mostrando así la influencia de las superficies con defectos topográficos irregulares y sin orden en las células [3]. Estas dos trabajos muestran la influencia de los defectos de tamaño nano irregulares y sin orden en el comportamiento de las células. Los defectos topográficos tanto de los sustratos Fino y Grueso pueden calificarse como irregulares y sin orden,

presentando defectos de orden nano y micrométrico.

4.5.5. Proliferación y diferenciación en los cultivos celulares realizados con extractos

Los cultivos celulares con los extractos nos permitió analizar separadamente el efecto estrictamente topográfico del debido al intercambio iónico. Esta separación entre topografía e intercambio iónico ha sido abordado en estudios anteriores sobre todo para el caso de vidrios bioactivos [9]. En algunos de estos estudios sobre vidrios bioactivos, las células fueron separadas físicamente de las superficies de bioactivas, mediante la colocación de insertos en los pocillos de cultivo que permiten el flujo de fluido en el interior del pocillo, permitiendo por lo tanto efectos de disolución-precipitación, pero excluyendo los efectos topográficos [62, 63]. Se concluyó que tanto los efectos topográficos como los efectos debidos a los fenómenos de disolución-precipitación desempeñaron un papel en el efecto de osteogénico de los vidrios bioactivos. Sin embargo, el comportamiento fisicoquímico de los vidrios bioactivos es muy diferente al de los cemento aquí estudiados, ya que se encontraron elevados niveles de calcio y de silicio en el medio de cultivo.

Los resultados en términos de proliferación celular con los extractos reprodujeron el patrón obtenido en las pruebas realizadas con los dos sustratos en contacto directo con las células. Se observó una disminución sustancial en la proliferación de las células a partir del día 7 cuando estas fueron cultivadas con los extractos de TP Fino con respecto a las muestras de los extractos de TP Grueso, y esta diferencia se mantuvo hasta el día 14 de cultivo (ver la Figura 4.23).

Una explicación posible de este comportamiento podría ser el bajo nivel de Ca^{2+} en el medio de cultivo completo (ver la Figura 4.20). Los cultivos celulares con concentraciones decrecientes de Ca^{2+} en el medio de cultivo se realizaron para verificar esta hipótesis. Las concentraciones bajas de Ca^{2+} pero por encima de 0.4mM Ca^{2+} , no causaron ninguna disminución en la proliferación. Esto está en concordancia con otros estudios que revelaron que las concentraciones de calcio por debajo de valores fisiológicos no afectan considerablemente la proliferación celular [64]. En nuestro caso, una reducción de la proliferación a día 7 y 14 se observó sólo cuando se usó un medio sin calcio. Sin embargo, sorprendentemente, la proliferación en los extractos de sustrato Grueso ($0,2\text{mM Ca}^{2+}$ aprox.) fue similar a la proliferación del medio de cultivo estándar ($1,4\text{mM}$) y la de los medios de cultivo con concentraciones de Ca^{2+} por encima de $0,4\text{mM}$. Además, la proliferación con los extractos de TP Fino ($0,1\text{mM}$ aprox.) fue aún inferior que la observada para el medio de cultivo sin Ca^{2+} .

Se ha de tener en cuenta que hay otros iones presentes en los extractos que pueden afectar el comportamiento celular, como los fosfatos. Se ha mostrado que éstos afectan a la proliferación y sobre todo a la diferenciación. De

hecho, en nuestro caso, la concentración de fosfato en el medio de cultivo fue más alta para los extractos de TP Fino que para los de TP Grueso, debido a su mayor superficie específica. Algunos autores han demostrado que las concentraciones de fosfato, entre 2 y 4mM, afectan la proliferación y sobre todo la diferenciación [46, 63, 65, 66]. Kanatani *et al.* encontraron que la proliferación de células osteoblásticas (MCAP4E3-E1) puede ser estimulada mediante el incremento en la concentración de fosfato inorgánica extracelular [66]. Ogata *et al.* mostraron que mediante el incremento de la solubilidad de una HA sinterizada al transformar parcialmente la HA en TetCP, por lo tanto aumentando su solubilidad aumentó la proliferación y también la diferenciación de células MC3T3-E1 cultivadas con extractos, probablemente debido a la liberación de Ca y P del TetCP al medio de cultivo [46].

Este incremento de la concentración de fosfato podría ser entonces una posible explicación del incremento en la diferenciación en los estudios de contacto directo con el sustrato Fino (ver Figura 4.7). Sin embargo, el aumento de la diferenciación debería ser también observado en los experimentos realizados con los extractos, lo cual no fue el caso. De hecho, la actividad de la fosfatasa alcalina fue inferior en ambos sustratos de CPC en comparación con el control. Adicionalmente y probablemente relacionado con el aumento de fosfato, se observó una disminución del pH en los extractos, más pronunciado en el caso del sustrato Fino que en el sustrato Grueso. La influencia del pH en el comportamiento celular es un hecho bien documentado. Por ejemplo, un pH ácido, como se ha relatado, causa una disminución tanto en la proliferación como en la formación de la matriz extracelular [47], mientras que un pH de alcalino afecta desfavorablemente a la actividad celular, impidiendo la expresión de fenotipo osteogénico [67].

Los valores de actividad en la ALP en los extractos de CPC fueron considerablemente inferiores a los observados para el medio de cultivo estándar. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los extractos de TP Fino y los extractos de TP Grueso. Los cultivos celulares con medios bajos en Ca^{2+} mostraron que concentraciones de Ca^{2+} por debajo de 0.4mM redujeron la actividad de la ALP, de acuerdo con estudios publicados anteriormente que atribuyen un aumento en la diferenciación con un aumento en la concentración de Ca^{2+} en el medio de cultivo [34, 68]. Por otro lado, la mayor concentración de fosfato en los extractos no produjo una actividad más alta de la ALP. En este sentido, los resultados obtenidos contrastan con lo observado en los experimentos en contacto directo, donde la actividad de la ALP incrementó en el sustrato Fino. Por lo tanto, el aumento en la diferenciación celular observada para el sustrato Fino en el contacto directo no se puede explicar en términos de la concentración iónica en el medio de cultivo, y debe ser por lo tanto atribuida a un efecto topográfico del sustrato.

El drástico cambio en la proliferación entre el sustrato Fino y su extracto no puede ser explicado exclusivamente en términos del cambio iónico.

La Figura 4.28 es una comparación del comportamiento de proliferación entre cultivos en contacto directo y no-directo entre ambos sustratos y respecto al control de TCPS usado en cada experimento. El intercambio iónico en el sustrato Fino produce una disminución en la proliferación en los cultivos con extractos pero este parámetro no explica la aguda disminución observada en los cultivos de contacto directo. Esto sugiere que la topografía de la microestructura subyacente juega un papel importante. Esta interacción con la microestructura también pudo ser vista en el sustrato Grueso, pero en menor grado. Debido a la falta de inducción a la apoptosis por un alto contenido de fosfato, esto tampoco pudo explicar la disminución en la proliferación (mirar la Figura 4.27), aunque la apoptosis inducida por fosfato depende a su vez de una interacción con la concentración de calcio extracelular [36].

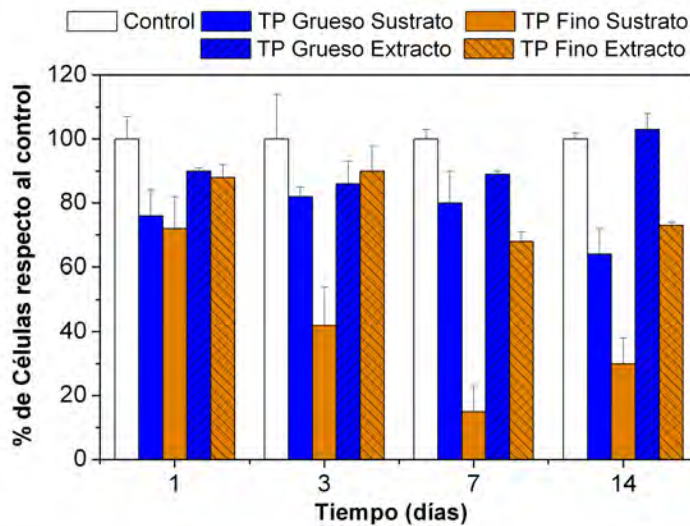


Figura 4.28: Comparación de la adhesión y proliferación entre los experimentos en contacto directo y con los extractos respecto al control interno de cada experimento.

De hecho en nuestro estudio, las diferencias en las micro/nanoestructura de la superficie debe afectar a diferentes mecanismos que influyen la respuesta celular. Por un lado, se sabe que la adsorción de proteína se ve afectada por la superficie específica y por defectos superficiales a un nivel nano, como ha estudiado extensivamente Webster *et al.* en cerámicas nanocristalinas [49, 69] y se ha visto en el Capítulo 3 de esta tesis. La mayor superficie del sustrato Fino proporciona más sitios para la adsorción de factores procedentes del suero. La concentración de estas moléculas en la superficie puede incrementar la expresión del fenotipo osteoblástico y la producción de cantidades significativas de proteínas óseas. Por otro lado, el enriquecimiento de la superficie en Ca^{2+} , o del microentorno en el contacto cercano con la superficie, mayor en el caso del sustrato Fino, también puede afectar la expresión del fenotipo osteoblástico de las células y la formación de nódulos

de calcio, como han sugerido varios autores [63, 67, 70] en sinergia con la liberación de iones de fosfatos al medio. Además, la precipitación de la capa de apatita biológica que se produce en los materiales bioactivos como se supone a partir de la adsorción de Ca^{2+} podría acompañarse por la coprecipitación de proteínas relevantes, que pueden provocar a las células a entrar en diferenciación [71].

4.6. Conclusiones

En los estudios *in vitro* con materiales bioactivos, no es posible separar los efectos de la topografía superficial de los efectos del intercambio iónico con el medio de cultivo en el comportamiento celular. Las diferencias en la micro/nanoestructura de los cristales de apatita de los sustratos de este trabajo resulta en diferencias topográficas, diferentes superficies específicas y a su vez en diferencias en el intercambio iónico en la interfase célula-biomaterial.

Los experimentos *in vitro* con las células osteoblásticas MG-63 han mostrado la fuerte influencia de la microestructura de la apatita deficiente en calcio en la actividad celular. Los sustratos de TP Fino inducen una disminución de la proliferación celular y un aumento de la diferenciación celular demostrado por la mayor actividad de la fosfatasa alcalina, la secreción de osteocalcina y una mayor producción de matriz extracelular.

Los cultivos celulares realizados con los extractos obtenidos a partir de los sustratos mostraron la influencia del intercambio iónico en la proliferación celular. Sin embargo, no se observó un aumento de la diferenciación celular. El incremento de la diferenciación celular del TP Fino fue relacionado con los defectos topográficos en la escala nano- y micrométrica en sinergia con el intercambio iónico.

Ni la topografía ni el intercambio iónico mostraron inducir un aumento de la apoptosis celular en los diferentes puntos de tiempo estudiados.

Referencias

- [1] B. D. Boyan, S. Lossdorfer, L. Wang, G. Zhao, C. H. Lohmann, D. L. Cochran, and Z. Schwartz. Osteoblasts generate an osteogenic micro-environment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur. Cell Mater.*, 6:22–27, 2003.
- [2] C. Aparicio, F. J. Gil, J. A. Planell, and E. Engel. Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(12):1105–1111, 2002.
- [3] M.J.Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M.O. Riehle, P. Herzyk, C.D.W. Wilkinson, and R.O.C. Oreffo. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*, 2007.
- [4] T. J. Webster and J. U. Ejiiofor. Increased osteoblast adhesion on nanophase metals: "ti. 2004.
- [5] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. Garcia. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(2):247–259, 2003.
- [6] G. Altankov, F. Grinnell, and T. Groth. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30:385–391, 1996.
- [7] D. D. Deligianni, N.D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1):87–96, 2001.
- [8] D. Campoccia, C. R. Arciola, M. Cervellati, M. C. Maltarello, and L. Montanaro. In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrata with different roughness. *Biomaterials*, 24(4):587–596, 2003.
- [9] P. Ducheyne and Q. Qiu. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 20(23-24):2287–2303, 1999.
- [10] F. Barrère, C.A. van Blitterswijk, and K. de Groot. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *International Journal of Nanomedicine*, 3:317–332, 2006.

- [11] R. Tzoneva, T. Groth, G. Altankov, , and D. Paul. Remodeling of fibrinogen by endothelial cells in dependence on fibronectin matrix assembly. effect of substratum wettability. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 13:1235–1244, 2002.
- [12] O. Zinger, K. Anselme, A. Denzer, P. Habersetzer, M. Wieland, J. Jeanfils, P. Hardouin, and D. Landolt. Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials*, 25(14):2695–2711, 2004.
- [13] B.D. Boyan and Z. Schwartz. *Bone engineering*. Em Squared Inc, 2000.
- [14] M. Bächle and R.J. Kohal. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation and differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG-63 cells. *Clinical Oral Implant Research*, 15:683–692, 2004.
- [15] B. D. Boyan, Z. Schwartz, L. F. Bonewald, and L. D. Swain. Localization of 1,25-(OH)₂D₃-responsive alkaline phosphatase in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8, MG-63, and MC3T3) and growth cartilage cells in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 264(20):11879–11886, 1989.
- [16] J.Lincks, B.D. Boyan, C.R. Blanchard, C.H. Lohmann, Y. Liu, D.L. Cochran, D.d. Dean, and Z. Schwartz. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials*, 19:2219–2232, 1998.
- [17] F.S. M. Ismail, R. Rohanizadeh, S. Atwa, R.S. Mason, A.J. Ruys, P.J. Martin, and A. Bendavid. The influence of surface chemistry and topography on the contract guidance os MG-63 osteoblast cells. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine*, 18:705–714, 2007.
- [18] <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numsearch/numresults.cfm?atccnum=crl-1427>.
- [19] <http://www.biotech.ist.unige.it/cldb/c13462.html>.
- [20] R. T. Franceschi, W. M. James, and G. Zerlauth. 1- α ,25-dihydroxyvitamin d₃ specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *Journal of cellular physiology*, 123(3):401–409, 1985.
- [21] J. Clover and M. Gowen. Are MG-63 and HOS TE85 human osteosarcoma cell lines representative models of the osteoblastic phenotype. *Bone*, 15:585–591, 1994.
- [22] K. Anselme. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21:667–681, 2000.
-

- [23] B.G. Keselowsky, L. Wang, Z. Schwartz, A.J. Garcia, and B.D. Boyan. Integrin α_5 controls osteoblastic proliferation and differentiation responses to titanium substrates presenting different roughness characteristics in a roughness independent manner. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80:700–710, 2006.
- [24] N.D. Gallant, K.E. Michael, and A.J. Garcia. Cell adhesion strengthening: Contributions of adhesive area and integrin binding and focal adhesion assembly. *Molecular Biology of the Cell*, 16:4329–4340, 2005.
- [25] K. Anselme, M. Biggerelle, B.Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Iost, and P. Hardouin. Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49:155–166, 2000.
- [26] M. Rouahi, E. Champion, P. Hardouin, and K. Anselme. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials*, 27:2829–2844, 2006.
- [27] J.B. Lian and G.S. Stein. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 3:269–305, 1992.
- [28] T.A. Owen, M. Aronow, V. Shalhoub, L.M. Barone, L. Wilming, and M. S Tassinari et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular-matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 143:420–430, 1990.
- [29] Z. Schwartz, B.F. Bell, L. Wang, G. Zhao, R. Olivares-Navarrete, and B.D. Boyan. β_1 integrins mediate substrate dependent effects of $1-\alpha$ and $25(\text{oh})_2\text{d}_3$ on osteoblasts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103:606–609, 2007.
- [30] S.J. Peter, C.R. Liang, D.J. Kim, M.S. Widmer, and A.G. Mikos. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone and β -glycerophosphate and an l-ascorbic acid. *Journal of cellular biochemistry*, 71:55–62, 1998.
- [31] G.S. Stein and J.B. Lian. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14:424–442, 1993.
- [32] R. T. Franceschi, P.R. Romano, and K. Park. Regulation of type i collagen synthesis by $1,25$ -dihydroxyvitamin- D_3 in human osteosarcoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:18938–18945, 1988.

-
- [33] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, and J. Tanaka. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability and proliferation and differentiation in monolayer and 3d culture. *Biomaterials*, 26(23):4847–4855, 2005.
- [34] Y.L.Chang, C.M. Stanford, and J.C. Keller. Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: implications for hydroxyapatite (ha)-enhanced bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52:270–278, 2000.
- [35] Z. Meleti, I.M. Shapiro, and C.S. Adams. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblasts-like cells in culture. *Bone*, 27:359–366, 2000.
- [36] C.S. Adams, K. Mansfield, R.L. Perlot, and I.M. Shapiro. Matrix regulation of skeletal apoptosis. *Journal Biological Chemistry*, 276:20316–20322, 2001.
- [37] R.T. Franceschi and J. Young. Regulation of alkaline phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin d3 and ascorbic acid in bone-derived cells. *Journal of Mineral Research*, 11:1157–1167, 1990.
- [38] D. Lajeunesse, G.M. Kiebzak, C. Frondoza, and B. Sacktor. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Mineralisation*, 14:237–250, 1991.
- [39] A.Mahonen and A. Jukkola and L. Risteli and J. Risteli and P.H. Mäenpää. Type i procollagen synthesis is regulated by steroids and related hormones in human osteosarcoma cells. *J Cell Biochem*, 68:151–163, 1998.
- [40] T. Yuasa, Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, Y. Momota, S. Tatehara, and M. Nagayama. Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Biomaterials*, 25(7-8):1159–1166, 2004.
- [41] C.Knabe, F.C.M. Driessens, J.A.Planell, R.Gildenahaar, G.Berger, D.Reif, R.Fitzner, R.J.Radlanski, and U.Gross. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *Journal of Biomedical Material Research*, 52:498–508, 2000.
- [42] R.O.C. Oreffo, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, and J.T. Triffitt. Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 19:1845–1854, 1998.
- [43] R.O.C. Oreffo, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, and J.T. Triffitt. Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells. *Tissue Engineering*, 4:293–303, 1998.
-

- [44] D.P.Link, J. van den Dolder, J.G.C. Wolke, and J.A. Jansen. The cytocompatibility and early osteogenic characteristics of an injectable calcium phosphate cement. *Tissue Engineering*, 13:493–500, 2007.
- [45] C.Knabe, G. Berger, R. Gildenhaar, J. Meyer, C.R.Howlett, B. Markovic, and H. Zreiqat. Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone related genes and proteins *in vitro*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 69:145–154, 2004.
- [46] K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara, S. Ebisu, Y.Kinomoto, T.Nakano, and Y. Umakoshi. Comparison of osteoblast responses to hydroxiapatite and hydroxiapatite/soluble calcium phosphate composites. *Journal of Biomedical Materials Research:Part A*, 72:123–135, 2005.
- [47] F. Chai and N. Blanchemain, A. Lefevre, and H. F. Hildebrand. In vitro studies on the influence of precultural conditioning method on osteoblast reactions of a new type of injectable calcium cement material. *J.Biomed.Mater.Res.B Appl.Biomater.*, 77(1):104–113, 2006.
- [48] M.Hott, B.Noel, D. Bernache-Assolant, C. Rey, and P.J. Marie. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37:508–516, 1997.
- [49] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(3):475–483, 2000.
- [50] G. Balasundarm, M. Sato, and T.J. Webster. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote asoteblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 27:2798–2805, 2006.
- [51] E. V. Leonova, K. E. Pennington, P. H. Krebsbach, and D. H. Kohn. Substrate mineralization stimulates focal adhesion contact redistribution and cell motility of bone marrow stromal cells. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 79(2):263–270, 2006.
- [52] C. Knabe, R. Gildenhaar, G. Berger, W. Ostapowicz, R. Fitzner, R.J. Radlar, and U. Gross. Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 18:1339–1347, 1997.
- [53] T. Suzuki, T. Yamamoto, M. Toriyama, K.Nishizawa, Y. Yokogawa, M. R. Mucalo, Y. Kawamoto, F.Nagata, and T. Kameyama. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and

- the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(4):507–517, 1997.
- [54] U.Hempel, A. Reinstorf, M.Poppe, U. Fischer, M. Gelinsky, W. Pompe, and K.W. Wenzel. Proliferation and differentiation of osteoblasts on biocement d modified with collagen type i and citric acid. *Journal of Biomedical Material Research Part B:Applied Biomaterials*, 71:130–143, 2004.
- [55] Y. Zhao, Y. Zhang, F.Ning, D. Guo, and Z. Xu. Synthesis and cellular biocompatibility of two kinds of hap with different nanocrystal morphology. *Journal of Biomedical Materials Research:Part B*, 83:121–126, 2007.
- [56] A. Okumura, M. Goto, T. Goto, M. Yoshinari, S. Masuko, T. Katsuki, and T. Tanaka. Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (SaOS-2). *Biomaterials*, 22(16):2263–2271, 2001.
- [57] Y. F. Chou, W. Huang, J. C. Dunn, T. A. Miller, and B. M. Wu. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials*, 26(3):285–295, 2005.
- [58] Y. J. Lee, J. S. Ko, and H. M. Kim. The role of cell signaling defects on the proliferation of osteoblasts on the calcium phosphate apatite thin film. *Biomaterials*, 27(20):3738–3744, 2006.
- [59] A.Curtis and C. Wilkinson. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18:1573–1583, 1997.
- [60] J. Yand, Y. Thing, J. Lai, H. Liu, H. Fang, and W. Tsai. Quantitative analysis of osteoblast-like cells (mg-63) morpholgy on nanogrooved substrata with vairous groove and ridge dimensions. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 2008.
- [61] A.Hart andN. Gadegaard, C.D.W. Wilkinson, R.O.C Oreffo, and M.J.Dalby. Osteoprogenitor response to low-adhesion nanotopographies originally fabricated by electron beam litography. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18:1211–1218, 2007.
- [62] S. Radin, G. Reilly, G. Bhargava, P.S. Leboy, and P. Ducheyne. Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 73:21–29, 2003.
- [63] J.Yao, S. Radin, G. Reilly, P.S. Leboy, and P. Ducheyne. Solution-mediated effect of bioactive glass in poly(lactic-co-glycolic acid)-bioactive glass composites on osteogenesis of marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 75:794–801, 2005.

- [64] E. Eklou-Kalonji, I. Denis, M. Lieberherr, and A. Pointillart. Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro. *Cell and tissue research*, 292(1):163–171, 1998.
- [65] G.R. Beck. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90:234–243, 2003.
- [66] M.Kanatani, T. Sugimoto, J.Kano, and K. Chihara. Igf-i mediates the stimulatory effect of high phosphate concentration on osteoblastic cell proliferation. *Journal of Cell Physiology*, 190:306–312, 2002.
- [67] El Ghannam, P. Ducheyne, and I. M. Shapiro. Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix. *Biomaterials*, 18(4):295–303, 1997.
- [68] H. Matsuoka, H. Akiyama, Y. Okada, H. Ito, C. Shigeno, J. Konishi, T. Kokubo, and T.Nakamura. In vitro analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatiteand wollastonite-containing glass-ceramic: released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ros 17/2.8 cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47:176–188, 1999.
- [69] G. Balasundaram, M. Sato, and T.J. Webster. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 27:2798–2805, 2006.
- [70] P. Habibovic, H. Yuan, C. van der Valk, Gert Meijer, C.van Blitterswijk, and K. De Groot. 3d microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26(17):3565–3575, 2005.
- [71] J.D. de Bruijn, J.S. Flach, K. de Groot, C.A. van Blitterswijk, and J.E. Davier. Analysis of the bony interface with various types of hydroxyapatite in vitro. *Cells Materials*, 3:115, 1993.

Capítulo 5

Desarrollo y caracterización de un cemento macroporoso

5.1. Introducción

5.1.1. Interés de los materiales macroporosos en medicina regenerativa ósea.

Los materiales macroporosos poseen gran interés en medicina regenerativa ósea bien en su aplicación directa como implantes bien en su utilización como andamios para la Ingeniería de Tejidos.

La macroporosidad en los implantes óseos sirve de guía para el desarrollo del crecimiento del tejido óseo en su interior al permitir la colonización, migración, crecimiento y diferenciación celular. En paralelo se espera que los biomateriales de nueva generación se vayan degradando progresivamente en paralelo con el crecimiento del tejido óseo. Los productos de degradación bien son sustancias que estimulan el crecimiento del tejido al ser aprovechado por las células o bien son fácilmente excretados o metabolizados por el organismo.

Las necesidades en el diseño de un implante macroporoso son altas y complejas e incluyen su composición, arquitectura, propiedades mecánicas estructurales, propiedades superficiales adecuadas, velocidad de degradación y la variación de todas ellas con el tiempo [1].

El tamaño mínimo de poro para el desarrollo del tejido óseo es de 100 micras, siendo 150 micras el tamaño mínimo para la formación de osteonas [2]. Aunque está establecido que el tamaño óptimo de la porosidad está entre los 200-400 μm para permitir la invasión celular y la vascularización del implante [3-5].

Un material macroporoso para Ingeniería de Tejidos es utilizado como andamio o soporte espacial para guiar el crecimiento *in vitro* de células del propio paciente que deben dar lugar al tejido manteniendo una estructura determinada.

Para el uso de materiales macroporoso en aplicaciones clínicas, los procesos de fabricación deben ser reproducibles y con costes razonables de producción.

En la Introducción se ha comentado, uno de los principales factores por los que los cementos de fosfato de calcio son utilizados como materiales para la regeneración ósea es su alta biocompatibilidad debido a la similitud del producto de fraguado con la fase mineral del hueso. Este es un aspecto compartido por los fosfatos de calcio en general. Sin embargo, los cementos de fosfato de calcio presentan una mayor velocidad de reabsorción que los obtenidos a altas temperaturas debido a la menor cristalinidad y su mayor superficie específica [6].

Uno de los aspectos a mejorar en los CPC, cuya fase final es apatita, es que pueden estar presentes en el organismo varios años antes de ser resorbidos completamente, llegando en algunos casos a un estado estacionario [7, 8]. En este sentido, lo que en un principio es beneficioso para el paciente, es decir una rápida recuperación inicial debida al rápido crecimiento óseo, puede convertirse en un problema relativo. La presencia de elementos extraños en el interior del hueso modifica en cierta parte su capacidad de remodelación y readaptación a las cargas mecánicas impidiendo por lo tanto una recuperación total a medio plazo.

El principal problema para mejorar la reabsorción del cemento y favorecer el periodo de incorporación radica en la microestructura del propio cemento. Los CPC son materiales altamente porosos (entre 40 y un 50 %), sin embargo, dicha porosidad no tiene el tamaño suficiente, 5 micras, para permitir que las células invadan el seno del cemento. De esta forma, los CPC apatíticos son reabsorbidos por etapas a partir de su superficie de contacto con el hueso. Sin embargo, no es suficiente únicamente un tamaño de porosidad que permita el paso de las células sino que la porosidad ha de tener un tamaño adecuado tal como se ha comentado anteriormente para permitir el desarrollo del tejido óseo.

La inclusión de macroporosidad en los cementos de fosfato de calcio mejoraría su reabsorción una vez presente en el organismo sin embargo, la introducción de macroporosidad en los CPC debido a sus especiales características es de difícil aplicación [6, 9].

5.1.2. Técnicas de Fabricación de Cerámicos Macroporosos

Existen muchas técnicas para la fabricación de cerámicos macroporosos, entendiendo como sólidos macroporosos aquellos que tienen poros por encima de los 50 nm según la nomenclatura de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Sin embargo, en este apartado sólo comentaremos las técnicas de fabricación de cerámicos porosos aplicados en el campo de los implantes óseos, que generalmente comprende macroporos con tamaños superiores a 1 μm , siendo 50-75 μm el tamaño mínimo a partir

del cual se observa el crecimiento de tejido óseo en su interior [10–12]. No obstante, se considera que el tamaño ideal para el crecimiento óseo está entre 200 y 400 μm .

A continuación se describen las técnicas de fabricación de cerámicos macroporosos de uso habitual en la industria, en su aplicación para la obtención de sustratos porosos para implantes o para su aplicación en Ingeniería de Tejidos.

- *Sinterización Parcial*: Una de las técnicas más sencillas para la fabricación de cerámicos porosos es el sinterizado parcial de polvos parcialmente compactados o la sinterización de mezclas de polvos en los cuales se producen reacciones en estado sólido que conllevan la formación de poros. Este tipo de técnicas produce porosidades generalmente inferiores a un 60 % en volumen [13, 14].
- *Replicación de sustratos sintéticos*: Consiste en usar como soporte una esponja polimérica para la fabricación de un sólido macroporoso. Es un proceso relativamente simple y flexible que permite el control del tamaño de poro y de la porosidad total al existir una gran variedad de soportes posibles.

En este proceso, una esponja polimérica es sumergida en una barbotina cerámica hasta que los poros son rellenados por la barbotina. Una vez realizado este proceso se pasa por una serie rodillos para eliminar el exceso de material cerámico hasta conseguir que una fina capa de partículas recubra las paredes de la esponja. Posteriormente el cerámico es sinterizado, eliminándose la esponja polimérica durante el proceso. Cualquier material cerámico que pueda ser dispersado en una solución puede ser usado en este proceso, mediante una adecuada selección de aditivos tales como dispersantes, ligantes y plastificantes.

Se pueden obtener estructuras porosas interconectadas con un tamaño mínimo de poros de 200 μm hasta 3 mm y porosidades totales entre el 40 % y el 95 % [15, 16]. Sin embargo, una de las desventajas de esta técnica reside en el hecho de que las paredes del material cerámico son huecas en el interior debido a la eliminación del sustrato polimérico, lo que conlleva una disminución importante de las propiedades mecánicas.

- *Replicación de sustratos naturales*: Método similar al anterior pero consiste en aprovechar estructuras naturales de ciertos corales y ciertas maderas que por su morfología serían difíciles de conseguir mediante medios sintéticos.

En este caso existen diversos métodos que consiguen aprovechar la estructura original, como métodos a la cera perdida [17], reacciones químicas para transformar los corales de aragonita (CaCO_3) a apatita [18] o la transformación de la madera en una estructura de carbono y

su posterior infiltración con gases y líquidos o técnicas de sol-gel para obtener fosfatos [19] o carburo de silicio [20].

El rango de porosidad obtenido con estas técnicas está entre el 25 y el 90 %, con un tamaño de poro entre 10-300 μm . Una de las ventajas de este método es una estructura porosa orientada y anisotrópica. Una de las desventajas son los distintos pasos a realizar en condiciones de temperatura y atmósfera especiales que pueden encarecer el producto.

- *La utilización de partículas sólidas orgánicas o inorgánicas*: estas partículas al ser eliminadas crean la estructura porosa dentro del material. La fracción, tamaño, forma y distribución de la porosidad son determinadas por la cantidad y el tamaño de las partículas utilizadas. En este caso, los cuerpos verdes se pueden obtener mediante técnicas habitualmente usadas para la fabricación de materiales cerámicos como pueden ser la compresión uniaxial o el colado de barbotinas en moldes.

Existen diferentes métodos para la eliminación de las partículas porogénicas y obtener la estructura porosa. Una de estas formas es la volatilización de las partículas porogénicas. Los ciclos térmicos aplicados son lentos, favoreciendo una eliminación completa y progresiva para evitar la formación de residuos durante la combustión y la aparición de grietas en la estructura [21, 22]. La eliminación de las partículas también se puede producir por disolución de las mismas, ejemplos de materiales utilizados en este sentido son granos de sal común [23], NaHCO_3 y Na_2HPO_4 o cristales de azúcar [24], que al ser disueltos en agua revelan la estructura porosa.

- *Emulsión de una fase líquida inmiscible*: se basa en la emulsión y estabilización de un líquido relativamente volátil e inmiscible en una fase acuosa. La posterior eliminación de las fases líquidas mediante sublimación o durante el sinterizado produce la estructura porosa.

Las ventajas de este método son el control y la facilidad de incorporación del líquido inmiscible mediante la agitación o la simple mezcla, el control del tamaño del poro pudiendo llegar a ser muy pequeño en ciertos casos y las condiciones relativamente fáciles de eliminación [25].

- *Sublimación de una fase líquida o freeze drying*: consiste en la congelación controlada de la barbotina lo cual produce una separación de fases entre el polvo del material cerámico y la fase acuosa. El control de las condiciones de congelación de la temperatura de la fase líquida obtiene como consecuencia estructuras porosas de tipo dendríticas y altamente orientadas después de la sublimación de los cristales del líquido congelado [26].

- *Solid Free Form Fabrication*: se basa en los métodos de fabricación asistidos por ordenador de prototipado rápido usados habitualmente en polímeros. Mediante la impresión sucesiva de capas 2D, se consigue

construir un sólido 3D controlando el tamaño final del implante y la geometría e interconexión de la porosidad.

Se pueden hacer dos distinciones de esta técnica: la fabricación directa del cerámico final listo para el sinterizado, mediante el uso de barbotinas en condiciones especiales [27]; la obtención primeramente de un negativo de la estructura final que posteriormente será infiltrado con una barbotina. Esto conlleva la eliminación del molde durante el proceso de sinterizado. Realmente, este último caso es una variación de la técnica de la replicación de un sustrato pero con un control total sobre el diseño del implante [28, 29].

- *Espumado de una solución*: la generación de la espuma pueden ser mediante medios mecánicos como el batido, mediante la incorporación de una corriente de aire directamente en la solución o debida a la descomposición de uno de los componentes de la barbotina produciendo gas durante el proceso. Un ejemplo de este último caso serían la descomposición de H_2O_2 a 60°C [30, 31] o el uso de partículas de NaH_2CO_3 que al ser mezclada con una solución ácida se descompone liberando CO_2 [32].

Es necesario el uso de agentes surfactantes o espumantes para estabilizar la espuma. La porosidad es controlada por la cantidad de aire incorporado a la suspensión y el tamaño de poro es controlado mediante la estabilidad de la espuma antes que el fraguado o la estabilización de la barbotina se produzca. La estabilización final de la estructura obtenida se puede conseguir mediante la adición de monómeros a la barbotina y su posterior polimerización [33–35], mediante la desnaturalización de las proteínas usadas como agentes espumantes con temperatura [36] o a través de reacciones sol-gel usadas por ejemplo en la fabricación de biovidrios porosos [37, 38].

5.1.3. Técnicas de fabricación de cementos macroporosos para aplicaciones biomédicas

La mayoría de estas técnicas son de difícil aplicación en la obtención de un cemento macroporoso preparado *in situ* en un quirófano por la necesidad de incluir un paso adicional para eliminar agentes porogénicos o debido al uso de agentes tóxicos. Sin embargo, algunas de estas técnicas sí que pueden ser usadas para la obtención de sustratos porosos de apatita pre-fraguados a baja temperatura dando como resultado apatitas más parecidas a las biológicas que las obtenidas a altas temperaturas. Entre estos casos, podemos citar el espumado mediante la descomposición de H_2O_2 que es un proceso en el cual es necesaria la descomposición previa del agua oxigenada a 60°C para obtener el cuerpo verde poroso previamente al fraguado [39], o el lavado y eliminación de un agente emulsionante después del fraguado [25]. En algunos casos es

necesario sin embargo el fraguado del cemento en condiciones especiales por su baja cohesión, lo que impediría su implantación en forma de pasta al correr el riesgo de la disgregación del cemento en el momento de ser implantado [32, 40].

Entre los distintos ejemplos de cementos macroporosos que podrían ser usados en forma de pasta, directamente después de su preparación, estarían los trabajos de Takagi et al [24] que usan diferentes cristales de compuestos no tóxicos y altamente solubles como la sacarosa [24] y el manitol [41, 42]. Una variación de esta técnica serían los trabajos de Xu et al [42–44] y Jansen *et al.* [45, 46] con el uso de polímeros solubles como el ácido poliláctico, el quitosano o el ácido poliglicólico. En este caso, la lenta disolución de estas fibras, haría que en una primera instancia éstas harían de refuerzo y una vez disueltas dejarían una porosidad interconectada. Esta última técnica puede ser combinada con la adición de partículas altamente solubles lo cual se obtendría la macroporosidad en dos etapas [42].

Otra de las posibilidades de obtener cementos de fosfato de calcio macroporosos consiste en el espumado directo de la pasta del cemento con el uso de surfactantes o agentes espumantes que fueran biocompatibles. La macroporosidad se obtendría al mezclarse una espuma formada con la pasta del cemento o directamente al espumar una pasta de cemento bastante líquida. En ambos casos, la espuma formada ha de ser capaz de soportar la presencia de partículas en su seno y ser lo suficientemente resistente y elástica para que resista el proceso de mezclado, manipulación e implantación *in vivo*. La espuma también ha de tener la estabilidad suficiente hasta que el cemento haya fraguado lo suficiente para presentar cierta resistencia mecánica. Esta última forma para obtener los cementos macroporosos es la desarrollada y estudiada en este capítulo. A continuación se hará una breve descripción del proceso de formación de una espuma.

5.1.4. Proceso de formación de una espuma

Una espuma es una dispersión coloidal de un gas en una fase líquida continua. Las espumas son sistemas termodinámicamente inestables debido a la alta energía que representa el área interfacial entre ambas fases. Para la formación de una espuma es necesaria la presencia de un agente surfactante o de un agente espumante, ya que no es posible la formación de una espuma a partir de una fase líquida pura [47]. Se pueden distinguir tres etapas en la vida de una espuma: la formación, la maduración y la ruptura.

Existen tres maneras de formar una espuma, la primera de ellas consiste en pasar una corriente de gas directamente a través de un líquido. En la segunda un gas previamente disuelto en un líquido se libera por medio de un cambio físico (un cambio de presión o temperatura). En el tercer caso, un aparato mecánico permite introducir burbujas del gas en el seno del líquido, generalmente por acción violenta o burbujeo. Las burbujas forma-

das representan un aumento del área interfacial gas-líquido y las moléculas de surfactante presentes en el líquido se adsorben sobre la superficie de las burbujas. Debido a la diferencia de densidad entre ambas fases las burbujas ascienden hacia la superficie. Las burbujas se amontonan tal como ilustra la Figura 5.1, se deforman para poder acomodarse unas con otras hasta formar capas densas. Las estructuras que forman son de tipo panel de abeja, donde las celdas están separadas por finas películas de líquido sometidas a esfuerzos de estiramiento. En este momento, es preciso que no se rompan las películas formadas, y es aquí donde interviene el surfactante o el agente espumante al estabilizar la espuma.

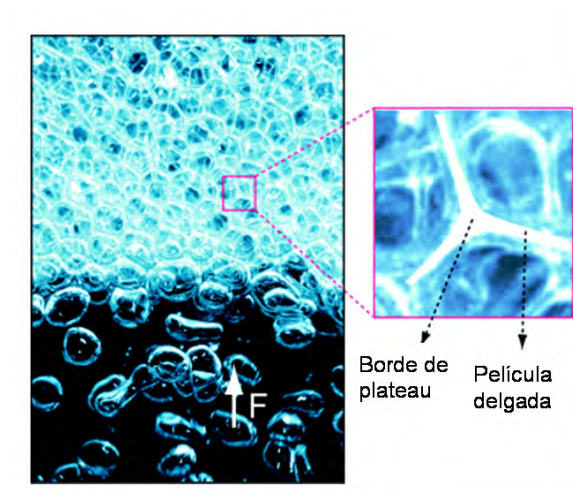


Figura 5.1: Formación de una espuma. El borde de plateau y película delgada formada entre burbujas [17]

Al acercarse las burbujas a menudo se aplastan, la película que se forma entre ellas está expuesta entonces a un esfuerzo de estiramiento en el que el área superficial gas-líquido aumenta rápidamente. La concentración de surfactante adsorbido tiende a disminuir en la zona estirada donde la película es más delgada que en las zonas vecinas. En consecuencia, la tensión superficial aumenta y se produce un gradiente de tensión superficial que genera un movimiento superficial del surfactante hacia la parte delgada de la película restaurando la uniformidad en el grosor de la misma y evitando que esta se rompa. Este mecanismo se conoce como efecto Gibbs-Marangoni y le confiere cierta elasticidad a la película estirada entre dos burbujas, permitiendo así la formación de la espuma.

Una vez la espumada formada, ésta sufre un proceso de degradación más o menos lento en el que intervienen diversos factores: la segregación, el drenaje gravitacional, la succión capilar y la difusión gaseosa intra-burbujas.

-La *segregación gravitacional* es producida por el principio de Arquímedes, donde las burbujas de mayor tamaño son empujadas con mayor fuerza

produciéndose así una reorganización de las mismas hacia las capas superiores, este fenómeno ocurre principalmente en los instantes iniciales de formación de la espuma.

-El *drenaje gravitacional* del líquido se produce durante toda la vida de la espuma, siendo especialmente importante en la espuma húmeda.

-La *succión capilar* se produce cuando la proporción de líquido en el seno de la espuma es inferior al 10 %. Es debida a la diferencia de curvatura entre los bordes de Plateau y la parte plana de las películas. La presión en el interior de las burbujas es homogénea por lo que la presión sobre el líquido en las partes planas es superior que en las partes más curvadas de los bordes de Plateau, produciéndose un gradiente de presión que desplaza el líquido del centro de las películas hacia los bordes. Éste es después drenado debido a la gravedad hacia la parte inferior de la espuma. En este momento, se produce la coalescencia de burbujas debido a que las películas de líquido entre burbujas adyacentes no son lo suficientemente estables para mantenerlas separadas. La consecuencia es el aumento medio de las burbujas o su ruptura.

-La *difusión gaseosa* es el cuarto mecanismo y se conoce como la *maduración de Ostwald*. Cuando las burbujas son poliédricas, las películas entre burbujas se comportan como películas planas de poco espesor, pero a causa de la ley de Laplace (ecuación 5.1) la presión es mayor en las burbujas pequeñas que en las grandes. Existiendo así un gradiente de presión entre las películas que conlleva la *difusión gaseosa* de una a otra. Esto hace que las burbujas pequeñas se desinflen lentamente en las grandes, aumentando estas su tamaño poco a poco.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{r} \quad (5.1)$$

Los mecanismos descritos anteriormente conllevan el adelgazamiento de las películas, hasta su ruptura y el colapso de la espuma. Existen diversos mecanismos para reducir tanto el drenaje como la difusión y aumentar la estabilidad de la espuma; por ejemplo, se puede incrementar la viscosidad del líquido, aumentar la elasticidad de la película o introducir barreras físicas que disminuyan la difusión. La estabilidad de las películas finas depende de interacciones atractivas y repulsivas entre burbujas. Las fuerzas de Van der Waals tienden a atraer entre sí a las burbujas, siendo las principales responsables de la coalescencia. Ésta puede evitarse en parte al aumentar las fuerzas repulsivas entre películas mediante interacciones de tipo electrostáticas o estéricas. Para esto se adicionan a los sistemas otros surfactantes, proteínas, polímeros, agentes gelificantes, electrolitos, partículas pequeñas, etc.

La selección de agentes espumantes y/o surfactantes que se pueden utilizar para la fabricación de cerámicos macroporosos es muy amplia. Sin embargo, para la fabricación de Cementos Macroporosos, estos surfactantes habrán de ser eliminados en el interior del organismo por lo que las fuentes de

búsqueda se limitan principalmente a la industria farmacéutica para poder aprovechar el uso de surfactantes ya aprobados para uso parenteral o buscar surfactantes de origen natural que puedan ser degradados fácilmente en el organismo. De ahí surge la idea de aprovechar las propiedades espumantes de ciertos tipos de polisacáridos (alginatos), fosfolípidos (lecitinas) y de proteínas como el albumen usados habitualmente en la industria alimentaria.

5.1.5. Proteínas como agentes espumantes

En la industria alimentaria, el uso y la caracterización de las propiedades emulsionantes y espumantes de los surfactantes en la confección de alimentos, tal como helados, salsas, margarina, mantequilla, pasteles y cremas, así como de licores es fundamental. Dentro del campo de los surfactantes usados en la industria alimentaria podemos distinguir dos grupos [48]:

- Los de bajo peso molecular: lípidos, fosfolípidos (lecitina), mono y diglicéridos, monoestearato de sorbitan, polisorbatos (Tweens), ésteres de sacarosa entre otros.
- Los de alto peso molecular: tales como las proteínas y gomas.

Las proteínas para poder ser usadas como agentes espumantes deben ser capaces de actuar a bajas concentraciones y en las condiciones del medio. El proceso de formación de una espuma por un conjunto de proteínas se lleva a cabo en tres etapas:

1. La adsorción rápida en la interfase líquido-aire, reduciendo así la tensión superficial.
2. La producción de rápidos cambios conformacionales, que orienten los grupos polares o hidrófilos hacia la fase acuosa y los grupos apolares o hidrófobos hacia la fase gaseosa (Figura 5.2).
3. La formación de un film viscoelástico y resistente via interacciones intermoleculares de tipo electrostático, hidrófobo, puentes de hidrógeno y enlaces covalentes (a través de enlaces de disulfuro) [49].

La formación de una espuma es un proceso dinámico y competitivo tal como se ha descrito antes. Suele ser necesaria una mezcla heterogénea de proteínas para conseguir los resultados buscados, donde algunas proteínas tienen la capacidad de ser rápidamente absorbidas en la interfase favoreciendo la formación de la espuma, mientras que otras contribuyen a la formación y estabilización del film viscoelástico mediante una rápida desnaturalización parcial o total [50].

La espumabilidad de una proteína o de un conjunto de proteínas depende fuertemente del medio en el que se encuentren. El pH, la temperatura,

la fuerza iónica del medio, la interacción con otros aditivos entre otros factores, afectan a la espumabilidad. Por ejemplo en la región cercana al punto isoelectrico de una proteína, la carga total es cero y las fuerzas electrostáticas entre moléculas son mínimas. Esto favorece los enlaces intermoleculares de tipo no electrostáticos, aumentando por lo tanto la estabilidad de la espuma [51].

En la elaboración de alimentos es normal la adición de sólidos o pastas a una espuma previamente formada, mostrando las espumas una alta elasticidad y resistencia mecánica durante el proceso de mezcla. Estos dos factores además del hecho de tratarse de agentes espumantes de origen natural convierten al conjunto de proteínas de la industria alimentaria, en buenos candidatos para su uso en la elaboración de cementos de fosfato de calcio macroporosos. Estudios previos mostraron la viabilidad del uso del uso del albumen como agente espumante [52, 53].

5.1.5.1. Agente espumante: Albumen

El albumen es el conjunto de proteínas presentes en la clara de huevo y es un agente espumante ampliamente usado en la industria alimentaria para la elaboración de numerosos productos. Una de sus principales características es el hecho que presenta una alta espumabilidad, llegando a aumentar de volumen hasta 6-8 veces. Presenta también una alta resistencia y estabilidad a la adición de numerosos productos en el seno de la espuma lo cual lo convierte en un agente espumante idóneo para su uso en la elaboración de cementos macroporosos.

Las propiedades tan especiales del albumen son debidas al conjunto de proteínas que lo forman y que se detallan en la Tabla 5.1, donde se da a su vez una pequeña explicación del cual es su papel en la formación y estabilidad de la espuma.

Por orden de importancia las proteínas funcionales durante el espumado son las globulinas, la ovoalbúmina, la conalbúmina, la lisosoma, el ovomucoide y ovomucina [50]. Aunque los mecanismos moleculares del espumado del albumen no han sido esclarecidos, si es posible establecer algunas comparaciones con las proteínas individuales.

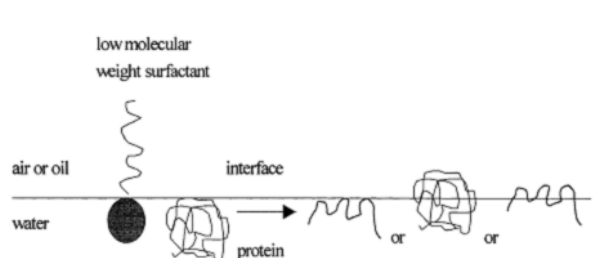


Figura 5.2: Conformaciones de las proteínas en la interfase

Tabla 5.1: Composición del Albumen [54]

Proteínas	Contenido	Propiedades
Ovalbúmina	54 %	Proteína hidrofóbica cuya desnaturalización y coagulación en la interfase es, presumiblemente, un factor importante en la formación de la espuma de albumen
Conalbúmina	13 %	Poco susceptible a la desnaturalización en la interfase
Ovomucoide	11 %	Buen agente espumante, estabiliza la espuma en las primeras etapas de agitación
Ovomucina	1,5 %	Incrementa la viscosidad de la película y facilita su formación, favoreciendo la estabilidad, interacciona con la lisosoma y globulinas a pH neutros, favoreciendo la espumabilidad
Globulinas (G ₂ y G ₃)	8 %	Reducen la tensión superficial incrementando la espumabilidad del albumen, aunque su papel exacto no está establecido
Lisosoma	3,5 %	Su interacción con otras proteínas afecta la espumabilidad
Otras	9 %	

Las propiedades espumantes del albumen pueden verse modificadas por diversos aditivos o factores:

- Temperatura: alcanza su mayor capacidad de incorporar aire a temperatura ambiente.
- Viscosidad: disminuye la espumabilidad pero aumenta la estabilidad.
- pH: valores próximos al punto isoeléctrico de la ovoalbúmina ($\approx 4,8$) mejoran la estabilidad de la espuma. En la industria alimentaria el ácido cítrico es ampliamente utilizado para ajustar el pH del albumen.
- Uso de aditivos: en la industria alimentaria se añaden muchos aditivos al albumen para la elaboración de alimentos. algunos tienen un efecto positivo (azúcar) o negativos (sal, lípidos) sobre la espumabilidad y estabilidad del albumen.

5.1.6. Cementos de fosfato de calcio macroporosos con albumen como agente espumante

El uso del albumen como agente espumante en la elaboración de cementos de fosfato de calcio macroporosos ha sido objeto de estudio en trabajos anteriores [53, 55]. En ellos, se estudió la influencia de distintos parámetros en la formulación como cantidad de agente espumante, el uso de un agente acelerante y la influencia del tamaño de partícula.

Un aumento de la cantidad de espuma de albumen producía un aumento de la macroporosidad, el uso de agentes acelerantes de la reacción

como el Na_2HPO_4 , de carácter básico, afecta a la estabilidad de la espuma de albumen y por tanto a la macroporosidad. La disminución del tamaño de partícula del polvo inicial de cemento disminuía ligeramente la macroporosidad. Sin embargo, uno de los resultados no obtenidos por los trabajos anteriores era un cemento macroporoso con cohesión inicial.

5.2. Objetivos

El objetivo general del presente capítulo es el desarrollo de un CPC macroporoso e inyectable a partir de la adición de un agente espumante de base proteica, el albumen, a la fase líquida del cemento. El cemento desarrollado debe presentar una alta cohesión para poder ser inyectado en el lugar de implantación directamente después de su preparación. Para ello se propone la incorporación de un agente de cohesión como el alginato de sodio en la formulación del cemento. De forma específica en este capítulo se plantea: a) El estudio de distintas variables, como la relación líquido/polvo, la cantidad de agente espumante, el tamaño de partícula del polvo inicial y el agente de cohesión sobre la macroporosidad, la cohesión, la inyectabilidad y la resistencia a la compresión del cemento espumado. b) El estudio de la influencia de los distintos componentes usados en la formulación sobre la cinética de la reacción de fraguado de los CPC macroporosos.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Materiales

5.3.1.1. Cemento H

En esta parte, se siguió utilizando la misma composición de Cemento H usada a lo largo de toda la Tesis según el procedimiento descrito en el Capítulo 2. El cemento está compuesto por un 98 % en peso de Fosfato Tricálcico α (α -TCP) y un 2 % en peso de Hidroxiapatita Precipitada (PHA) utilizada como semilla. A modo de recordatorio se describen aquí los protocolos de molienda usados.

-Tamaño de Partícula *Grueso*(TP Grueso): Protocolo de molienda 8:30:30.

-Tamaño de Partícula *Fino*(TP Fino): Protocolo de molienda 9:180:180.

5.3.1.2. Fase Líquida

Se utilizaron dos soluciones diferentes como fase líquida de los cementos en esta parte de la tesis. La composición de las mismas se detalla a continuación:

- **Solución ACC:** 1 % de Na_2HPO_4 (Merck 1065860 500) en agua destilada.
- **Solución ALG:** 1 % de Na_2HPO_4 (Merck 1065860 500) y 1 % de Alginato de Sodio (Panreac 373059) en agua destilada.

El Na_2HPO_4 se utiliza en los cementos de fosfato de calcio como agente acelerante de la reacción de fraguado. La adición de este producto a la fase líquida tiene como consecuencia la disminución del tiempo de fraguado debido al efecto del ion común [56, 57].

El alginato de sodio es un polisacárido de origen natural compuesto por el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G), su fórmula química se representa en la Figura 5.3. [58]. Es usado tanto en la industria farmacéutica como en la industria alimentaria. Los geles de alginato están siendo investigados para su aplicación en Ingeniería de Tejidos como transporte o “carrier” de células en aplicaciones para cartílago [59]. En los CPC, se usa como agente de cohesión mejorando el comportamiento de los cementos frente a la penetración de líquidos, evitando su disgregación [60, 61].

5.3.1.3. Agente Espumante: Solución de Albumen

El agente espumante utilizado fue una solución de albumen tal como se ha comentado previamente en la introducción. El albumen utilizado fue clara de huevo deshidratada de uso comercial para la elaboración de alimentos (Igreca, Francia).

La solución se prepara disolviendo el polvo de albumen deshidratado en agua destilada en una relación 1:7 (g/ml), según las propias indicaciones del fabricante, con cuidado de no formar espuma. La solución tiene así un 12,5% en peso de albumen que es la concentración natural de la clara de huevo. Para una completa hidratación de las proteínas, la solución se guardó un mínimo de 6h en frío, siendo aconsejable su preparación un día antes.

La solución de albumen fue preparada cada 5 días, para evitar la desnaturalización de las proteínas debido a los ciclos de calentamiento y enfriamiento y también para evitar el crecimiento de bacterias.

5.3.1.4. Preparación de los Cementos Microporosos o no Espumados

La Tabla 5.2 muestra la formulación de los cementos *microporosos* o *no espumados* estudiados. El objetivo fue determinar sus propiedades y la influencia de distintas variables en su formulación y poder establecer a su vez comparaciones con los cementos macroporosos o espumados.

Tabla 5.2: Formulación de los cementos *convencionales* o *no espumados*.

Código	Tamaño Partícula	ALG	L/P (g/ml)
F-ACC-35	Fino	No	0,35
F-ALG-35	Fino	Sí	0,35
F-ACC-40	Fino	No	0,40
F-ALG-40	Fino	Sí	0,40
G-ACC-35	Grueso	No	0,35
G-ALG-35	Grueso	Sí	0,40
G-ACC-40	Grueso	No	0,40
G-ALG-40	Grueso	Sí	0,40

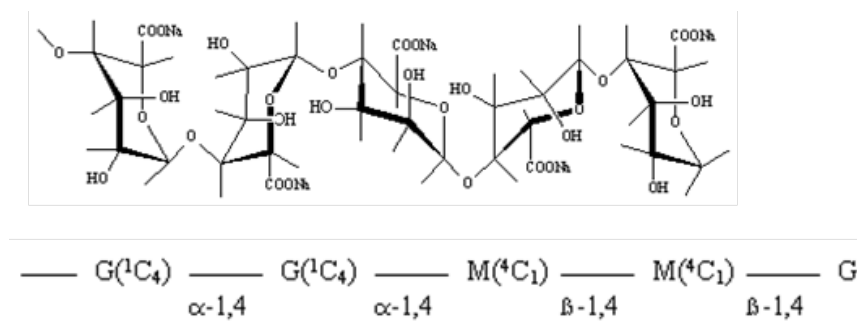


Figura 5.3: Molécula de Alginato de Sodio

5.3.1.5. Preparación de los Cementos Espumados o Macroporosos

El proceso de preparación de los cementos espumados o macroporosos se representa esquemáticamente en la Figura 5.4. Consta de tres fases: el espumado de la solución de albumen, la mezcla del polvo de cemento con la fase líquida correspondiente y por último la mezcla de la espuma de albumen con la pasta del cemento.

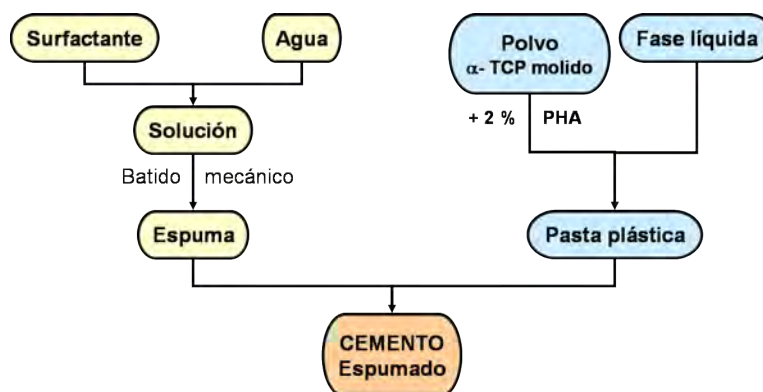


Figura 5.4: Esquema de la fabricación de un cemento espumado o macroporoso.

a) Espumado del albumen

La solución de albumen se espumó con una batidora doméstica (Bapi-Taurus 300) junto con la herramienta para batir. Se espumaron siempre 4ml de solución de albumen a temperatura ambiente en un mortero de vidrio de $\varnothing=12\text{cm}$ durante un tiempo máximo de 2 min, hasta obtener aproximadamente siempre el mismo volumen de espuma. La espuma fue siempre usada durante los 5 min. posteriores a su preparación.

b) Mezcla del cemento

Se mezcló el polvo de Cemento H con la fase líquida hasta conseguir una pasta homogénea de forma similar a la preparación de un cemento convencional.

c) Mezcla de la espuma con el cemento

El siguiente paso consistió en la mezcla cuidadosa de la pasta obtenida con la espuma de albumen mediante el uso de una espátula hasta obtener una espuma uniforme.

Se rellenaron con cuidado los moldes de teflón, tratando de no romper la porosidad de las muestras por una manipulación excesiva de la pasta. Junto a este factor se tuvo también en cuenta la influencia del fraguado y por lo tanto la pérdida de flexibilidad de la espuma. Es por ello que se prepararon lotes no demasiado grandes para evitar variaciones entre la primera y la última muestra preparada. Se estableció como criterio y referencia la cantidad de 2ml de fase líquida, variando en consecuencia las cantidades de polvo de cemento y agente espumante.

5.3.1.6. Diseño experimental

El método para el desarrollo del cemento macroporoso fue un diseño experimental 2^4 que permite evaluar de forma directa diversas variables y la posible interacción entre ellas. Una de las dificultades radica en las variables a seleccionar tengan una relevancia posterior y los niveles de estudio de las mismas. En este caso las diversas variables fueron:

-**La relación líquido/polvo (L/P)**: es un factor ampliamente estudiado en los cementos de fosfato de calcio no macroporosos [62, 63]. Se escogieron dos niveles: 0,35 ml/g y 0,40 ml/g; de los cuales se conocía su influencia sobre la viscosidad de la mezcla, la inyectabilidad, la cohesión, el tiempo de fraguado y la microporosidad en los CPC no macroporosos.

- **La cantidad de espuma de albumen**: había sido estudiada previamente en trabajos anteriores [53, 55], dando como resultado que una mayor cantidad de espuma aumenta de forma directa la macroporosidad. Por ello se decidió fijarlos a los niveles de aquellos estudios: 7 % en peso y 10 % en peso. Un aumento de la cantidad de albumen puede tener influencia en la cinética de la reacción. Además, algunas proteínas como la albúmina puede alterar la velocidad de disolución del α -TCPy precipitación de PHA [64]. Este es un aspecto estudiado en esta parte de la tesis por sus implicaciones para el fraguado *in vivo*.

-**El tamaño de partícula (TP)**: ha sido objeto de trabajos en los cementos microporosos [56]. Su influencia en la viscosidad, en la evolución de la reacción de fraguado, en la resistencia mecánica y en la microporosidad es conocida. En este capítulo será objeto de estudio desde el punto de vista de su influencia en la obtención de macroporosidad. La influencia de la microestructura final ha sido objeto de estudio extensivo en el comportamiento celular en los capítulos anteriores de esta tesis. Los tamaños de partícula escogidos fueron: Tamaño de Partícula Grueso (TP Grueso) y Tamaño de Partícula Fino (TP Fino), la distribución del tamaño de partícula para ambos polvos iniciales ha sido caracterizada en el Capítulo 2, pueden verse los resultados en la sección 2.4.1.1.

-**El alginato de sodio en la fase líquida (ALG)**: la utilización de un agente de cohesión evita la desintegración del cemento al entrar en contacto con los fluidos biológicos en las primeras fases de la reacción de fraguado. El papel de un agente de cohesión ha de ser: evitar la descohesión del cemento en el líquido, no inhibir la reacción de fraguado, no reducir la trabajabilidad de la pasta, no reducir la propiedades mecánicas del cemento, ser altamente biocompatible y su reabsorción ha de ser relativamente rápida. La adición de un 1 % en peso a la fase líquida ha demostrado ser suficiente para reducir el tiempo de cohesión y no afectar de manera significativa a las propiedades del cemento [60, 61]. Se ha añadido aquí la misma proporción con el objetivo de evaluar su eficacia en el caso de los CPC macroporosos.

- La cantidad de albumen espumado (**BH**): 7 ó 10 % en peso.

- La relación líquido/polvo (**L/P**): 0,35 ó 0,40 ml/g.
- El tamaño de partícula del polvo inicial (**TP**): Tamaño de Partícula Grueso o Tamaño de Partícula Fino.
- El uso del Alginato de Sodio como agente de cohesión en la fase líquida (**Sol**): Solución ACC o Solución ALG.

La Tabla 5.3 recoge la formulación de los cementos espumados, el código asignado y los niveles fijados de las distintas variables.

Tabla 5.3: Formulación de los cementos espumados o macroporosos.

Ensayo n ^o	Código	TP	Sol	L/P	BH	Variable	-	+
1	F-ACC-35-BH-	-	-	-	-	TP	Fino	Grueso
2	F-ALG-35-BH-	-	+	-	-			
3	F-ACC-35-BH+	-	-	-	+	Sol	ACC	ALG
4	F-ALG-35-BH+	-	+	-	+	L/P(ml/g)	0,35	0,40
5	F-ACC-40-BH-	-	-	+	-	BH(w %)	7	10
6	F-ALG-40-BH-	-	+	+	-			
7	F-ACC-40-BH+	-	-	+	+			
8	F-ALG-40-BH+	-	+	+	+			
9	G-ACC-35-BH-	+	-	-	-			
10	G-ALG-35-BH-	+	+	-	-			
11	G-ACC-35-BH+	+	-	-	+			
12	G-ALG-35-BH+	+	+	-	+			
13	G-ACC-40-BH-	+	-	+	-			
14	G-ALG-40-BH-	+	+	+	-			
15	G-ACC-40-BH+	+	-	+	+			
16	G-ALG-40-BH+	+	+	+	+			

5.3.2. Métodos de Caracterización

El tamaño de las muestras preparadas para su caracterización fue de $\varnothing=6$ mm y $h=12$ mm a lo largo de esta parte de la tesis. En caso contrario se especifica de forma precisa en la sección correspondiente.

5.3.2.1. Tiempo de cohesión

Una de las propiedades más importantes que han de tener los CPC es la capacidad de fraguar en presencia de sangre y fluidos fisiológicos. Han de ser capaces de resistir la penetración de dichos líquidos sin desintegrarse, o bien directamente después de preparación o en un tiempo razonablemente corto para poder ser utilizados en condiciones clínicas.

El tiempo de cohesión es el tiempo que debe transcurrir desde que se empiezan a mezclar los distintos componentes del cemento hasta que la pasta final pueda ser sumergida totalmente sin que se desintegre.

El ensayo de cohesión se lleva a cabo con probetas de $\varnothing=10$ mm y $h=5$ mm. Inmediatamente después de mezclar el polvo de cemento con el líquido, se sumerge la primera probeta en solución de Ringers a 37°C . Posteriormente se van introduciendo el resto de probetas a distintos intervalos de tiempo. Se observa la integridad de las probetas mediante inspección visual. La primera probeta que conserva la integridad nos define por lo tanto el tiempo de cohesión.

5.3.2.2. Picnometría de helio: medida de la densidad real o esquelética

La densidad real de las muestras se midió mediante picnometría de helio (Micromeritics). El sistema consta esquemáticamente de tres válvulas, dos cámaras de volumen conocido (una cámara donde está la muestra y una cámara de expansión) y de transductores de presión tal como muestra la Figura 5.5. El conjunto está dentro de un mismo bloque para evitar variaciones de temperatura.

El modo de funcionamiento de este equipo se explica brevemente a continuación. El helio es introducido a una presión inicial de 19 psi en la cámara donde se encuentra la muestra. Se deja equilibrar y se mide la presión. La válvula que comunica ambas cámaras se abre expandiéndose el helio por ambas cámaras. Una vez conseguido nuevamente la condición de equilibrio se vuelve a medir la presión. Por último, se abre la tercera válvula y el gas es evacuado hasta llegar a la presión atmosférica [65]. Es necesario hacer una purga previa para eliminar los gases atmosféricos y los restos de humedad.

El volumen de la muestra viene determinado por la siguiente ecuación, derivada de la ecuación de gas ideal, que relaciona las presiones antes y después de la expansión con los volúmenes de ambas cámaras.

$$P_1(V_c - V_x) = P_2(V_c - V_x + V_{exp}) \quad (5.2)$$

- P_1 es la presión inicial en la cámara de la muestra
- P_2 es la presión en ambas cámaras después de la expansión
- V_c es el volumen de la cámara donde está la muestra
- V_{exp} es el volumen de la cámara de expansión
- V_x es el volumen de la muestra a medir

Los volúmenes V_c y V_{exp} han sido previamente calibrados por lo que aislando para V_x obtenemos

$$V_x = V_c - \frac{V_{exp}}{1 - \frac{P_1}{P_2}} \quad (5.3)$$

La densidad de la muestra viene dada por la relación

$$\rho = \frac{m}{V_x} \quad (5.4)$$

donde m es el peso en seco de la muestra después de finalizar la medida del volumen.

El método de medición utilizado fue el siguiente: mantenimiento de las muestras a 75°C durante 24h para eliminar la humedad; introducción de las muestras en la cámara y espera de 10 min para equilibrar la temperatura; 20 purgas para eliminar los restos de humedad y los gases atmosféricos. El volumen de cada muestra fue medido un total de 5 veces, obteniéndose variaciones en el volumen inferiores a 0,005 cm³ (variación considerada óptima por el fabricante del aparato). Se utilizaron tres muestras con un peso total entre 1 y 1,5g debido a las diferentes porosidades.

5.3.2.3. Determinación de la porosidad

Para la determinación de la porosidad se usaron dos métodos distintos: la inmersión en mercurio basado en el principio de Arquímedes y la porosimetría de mercurio

a) Determinación de la porosidad por inmersión en mercurio

Este método propuesto por Takagi *et al.* [24] es un método indirecto basado en el principio de Arquímedes. El cálculo de la densidad aparente se

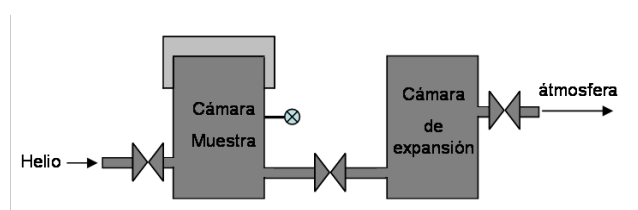


Figura 5.5: Esquema de un picnómetro de helio.

realiza mediante la inmersión de las muestras en mercurio. Se midieron tres muestras por serie. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Se pesa la muestra en seco en una balanza obteniéndose $m_{muestra}$.
- Se sumerge la probeta en mercurio, y se registra el peso de mercurio desplazado obteniéndose m_{Hg} (3 medidas por muestra).
- El volumen del mercurio desplazado se obtiene mediante la ecuación 5.5.

$$V_{Hg} = \frac{m_{Hg}}{d_{Hg}} \quad (5.5)$$

- El volumen de mercurio desplazado corresponde al volumen de la muestra:

$$V_{Hg} = V_{muestra} \quad (5.6)$$

- La densidad aparente de la muestra es:

$$d_{ap} = \frac{m_{muestra}}{V_{muestra}} \quad (5.7)$$

- La porosidad de la muestra es entonces

$$P = \left(1 - \frac{d_{ap}}{d_{picno}}\right) \cdot 100\% \quad (5.8)$$

d_{ap} es la densidad aparente de la muestra.

d_{picno} es la densidad del cemento obtenida mediante picnometría de helio.

La porosidad de un CPC convencional es microporosa y es debida a la microestructura de cristales de apatita entrecruzados. En un CPC espumado, la porosidad se puede dividir en dos términos: microporosidad y macroporosidad. La macroporosidad es debida a la adición del agente porogénico. En el método descrito por Takagi *et al.* la macroporosidad de un cemento espumado puede cuantificarse y separarse de la microporosidad [24]. Para ello, toma como premisa que un CPC convencional y un CPC espumado tienen la misma microestructura de cristales de apatita entrecruzados. Por lo que si aplicamos la ecuación 5.9 donde se ha sustituido la densidad de la apatita por la densidad de un CPC convencional obtendremos la porosidad debida al agente espumante.

$$P_{macro} = \left(1 - \frac{d_{CPCespumado}}{d_{CPCconvencional}}\right) \cdot 100\% \quad (5.9)$$

$d_{CPCespumado}$ es la densidad aparente de un CPC espumado.

$d_{CPCconvencional}$ es la densidad aparente de un CPC convencional preparado con la misma relación de L/P, tamaño de partícula y fase líquida pero sin agente porogénico.

La microporosidad del material poroso viene entonces dada por la relación:

$$P_{micro} = P_{macro} - P_{total} \quad (5.10)$$

b) Porosimetría de intrusión de mercurio

Para la determinación de la porosidad por intrusión de mercurio se utilizó un porosímetro Micromeritics Autopore IV 9500. El rango de interconexión de la porosidad que este equipo puede medir está entre 350 y 0,003 μm . El funcionamiento básico del porosímetro de mercurio se basa en la baja mojabilidad del mercurio sobre la mayoría de sustancias y está explicado en el Capítulo 2 sección 2.3.7.

5.3.2.4. Inyectabilidad

Los ensayos de inyectabilidad fueron realizados según el método descrito por Khairoun *et al.* [63]. Se colocó la masa de cemento recién preparada en una jeringuilla de 5 ml con una salida en boquilla de 2 mm de diámetro. La masa de cemento es extruida a una velocidad constante de 15 mm/min hasta que se alcanza una fuerza máxima de 100 N, que es la fuerza máxima aproximada que puede realizar una persona presionando la jeringuilla. Los ensayos fueron realizados en una máquina universal de ensayos (MTS Bionix 858 Test System). La inyectabilidad se define como:

$$\% \text{Inyectabilidad} = \frac{\text{Masa de cemento inyectada}}{\text{Masa total de cemento}} \cdot 100 \% \quad (5.11)$$

5.3.2.5. Caracterización de la cinética de reacción por Difracción de Rayos-X

La evolución de la reacción y la influencia de los diferentes aditivos usados en el fraguado del cemento se llevó a cabo mediante Difracción de Rayos-X.

La evolución de la reacción de fraguado se estudió a las 2h, 8h, 24h y 4 días. Se extrajeron las muestras de los moldes e inmediatamente fueron ensayadas en compresión para evaluar la evolución de las propiedades mecánicas, según las condiciones descritas en 5.3.2.6. Se templaron a continuación las muestras en acetona para extraer el agua y así poder parar la evolución de la reacción. Las muestras estuvieron en acetona un total de 2 h bajo agitación, cambiando la acetona al cabo de 1h.

Se molieron las muestras a mano en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino y homogéneo para poder realizar el ensayo de Difracción de Rayos X

Para la identificación de las fases y la indexación de los picos se utilizaron las fichas cristalográficas del *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). Para el α -TCP se utilizó la ficha JCPDS-9-348, para el β -TCP la JCPDS-9-169 y para la hidroxiapatita la JCPDS-9-432.

La cuantificación de las fases se realizó mediante la aplicación del método del estándar externo [62], el fundamento teórico del cual se explica a continuación.

a) Fundamento Teórico del análisis cuantitativo por medio de difracción de Rayos X en una muestra polifásica.

La intensidad I obtenida cuando una muestra es sometida a un análisis de difracción de Rayos X viene dada por la expresión siguiente:

$$I = \left(\frac{I_0 A \lambda^3}{32 \pi r} \right) \left[\left(\frac{\mu_0}{4 \pi} \right) \frac{e^4}{m_2} \right] \left(\frac{1}{v^2} \right) \left[|F^2| p \left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cos \theta} \right) \right] \left(\frac{\exp(-2M)}{2\mu} \right) \quad (5.12)$$

Donde:

- I es la intensidad integrada por unidad de longitud de una línea de difracción
- I_0 es la intensidad del haz incidente
- A es el área de la sección del haz incidente
- λ es la longitud de onda del haz incidente
- r es el radio del círculo del difractómetro
- μ_0 es la permeabilidad del vacío
- e es la carga del electrón
- v es el volumen de la celda unidad
- F es el factor de estructura
- p es el factor de multiplicidad
- $\left(\frac{1 + \cos^2 2\theta}{\sin^2 \theta \cos \theta} \right)$ es el factor de Lorentz-polarización
- θ es el ángulo de Bragg
- $\exp(-2M)$ es el factor de temperatura
- $(1/2\mu)$ es el factor de absorción
- μ es el coeficiente lineal de absorción de la muestra

En el caso de tener una muestra con varias fases, es posible reescribir la ecuación 5.12 para un pico correspondiente a la fase j, como:

$$I_j = \frac{K c_j}{\mu_m} \quad (5.13)$$

- c_j es la fracción de volumen de la fase j , para tener en cuenta la disminución de la intensidad difractada debida a que no todo el volumen de muestra presente contribuye a la intensidad del pico I_j
- μ_m es el coeficiente lineal de absorción de la mezcla
- K es una constante derivada de la ecuación 5.12,

El valor de K es desconocido al depender de I_0 . Sin embargo, en una muestra bifásica, si se mide la relación I_j con la misma línea en una fase pura, se eliminará K , pudiéndose deducir la concentración de la fase j a partir de esta relación. Este método de cuantificación de fases se conoce como el *método del estándar externo*.

El coeficiente de absorción de la mezcla μ_m , que aparece en 5.13 no es independiente de la concentración de las distintas fases que hay en la mezcla. Si se define el coeficiente de absorción másico como

$$M = \frac{\mu}{\rho} \quad (5.14)$$

siendo μ el coeficiente de absorción lineal y ρ la densidad del elemento en cuestión. Este coeficiente es una constante del material, independiente de su estado (sólido, líquido o gas) y depende de la longitud de onda de la radiación incidente. Sus valores están tabulados para los diferentes elementos químicos. En el caso de un compuesto químico, el coeficiente de absorción másico es la media ponderada de los coeficientes másicos de sus elementos constituyentes tal como muestra la formula:

$$\frac{\mu}{\rho} = w_a \frac{\mu_a}{\rho_a} + w_b \frac{\mu_b}{\rho_b} + w_c \frac{\mu_c}{\rho_c} + \dots + w_n \frac{\mu_n}{\rho_n} \quad (5.15)$$

En nuestro caso el coeficiente de absorción másico del α -TCP es 86.43 cm²/g y del CDHA es 84,97 cm²/g [62].

En el caso de una muestra formada por dos fases 1 y 2, es posible escribir el coeficiente de absorción de la mezcla μ_m/ρ_m como:

$$\frac{\mu_m}{\rho_m} = w_1 \frac{\mu_1}{\rho_1} + w_2 \frac{\mu_2}{\rho_2} \quad (5.16)$$

donde w es la fracción de peso de la fase correspondiente y ρ su densidad.

Si se tiene una unidad de volumen de la mezcla, su peso será ρ_m y el peso de fase 1 que contiene será por lo tanto w_1/ρ_m . El volumen de la fase 1 será entonces,

$$\frac{w_1 \rho_m}{\rho_1} = c_1 \quad (5.17)$$

y análogamente para c_2 . Por lo tanto, es posible reescribir la ecuación 5.16 de la forma siguiente:

$$\mu_m = c_1 \mu_1 + c_2 \mu_2 \quad (5.18)$$

Para una mezcla de dos fases

$$c_1 + c_2 = 1 \quad (5.19)$$

y

$$c_1 = 1 - c_2 \quad (5.20)$$

Por tanto,

$$\mu_m = c_1(\mu_1 - \mu_2) + \mu_2 \quad (5.21)$$

Sustituyendo 5.21 en 5.13:

$$I_1 = \frac{Kc_1}{c_1(\mu_1 - \mu_2) + \mu_2} \quad (5.22)$$

que relaciona la intensidad de una línea de una fase con la fracción de volumen de esta fase y los coeficientes de absorción de las dos fases presentes en la muestra.

Si se considera una unidad de masa, en vez de una unidad de volumen, se puede reescribir la ecuación 5.22, teniendo en cuenta que el volumen de fase 1 en una unidad de masa es w_1/ρ_1 , y la concentración c_1 será

$$c_1 = \frac{\frac{w_1}{\rho_1}}{\frac{w_1}{\rho_1} + \frac{w_2}{\rho_2}} \quad (5.23)$$

Como $w_1 + w_2 = 1$, es posible sustituir w_2 por $1 - w_1$, obteniendo

$$c_1 = \frac{\frac{w_1}{\rho_1}}{w_1 \left(\frac{1}{\rho_1} - \frac{1}{\rho_2} \right) + \frac{1}{\rho_2}} \quad (5.24)$$

Sustituyendo la ecuación 5.24 en la ecuación 5.22 se obtiene:

$$I_1 = \frac{K \frac{w_1}{\rho_1}}{w_1 \left(\frac{\mu_1}{\rho_1} - \frac{\mu_2}{\rho_2} \right) + \frac{\mu_2}{\rho_2}} \quad (5.25)$$

Si se parte de una muestra de fase 1 pura, $w_1 = 1$, el valor de la intensidad $I_{1,0}$ será

$$I_{1,0} = \frac{K \frac{1}{\rho_1}}{\frac{\mu_1}{\rho_1}} = \frac{K}{\rho_1} \quad (5.26)$$

Por lo que la relación entre I_1 y $I_{1,0}$ dará:

$$\frac{I_1}{I_{1,0}} = \frac{w_1 \frac{\mu_1}{\rho_1}}{w_1 \left(\frac{\mu_1}{\rho_1} - \frac{\mu_2}{\rho_2} \right) + \frac{\mu_2}{\rho_2}} \quad (5.27)$$

Teniendo en cuenta que el cociente μ/ρ , es el coeficiente de absorción másico definido anteriormente como M , la expresión 5.27 queda:

$$\frac{I_1}{I_{1,0}} = \frac{w_1 M_1}{w_1 (M_1 - M_2) + M_2} \quad (5.28)$$

que permite el análisis cuantitativo de una mezcla de dos fases si son conocidos los coeficientes de absorción de cada fase y se mide en idénticas condiciones una muestra de fase 1 pura. En caso contrario, se podría hacer una curva de calibración con mezclas conocidas de las dos fases.

La intensidad de una línea de difracción de una fase depende no sólo de la fracción en peso de esta fase presente en la mezcla, sino también del coeficiente de absorción que tiene la otra fase contenida en la mezcla. De la expresión anterior también se deduce que, en general la variación de la relación de intensidades $I_1/I_{1,0}$ no es lineal con respecto w_1 .

Reordenando convenientemente la ecuación 5.28 podemos obtener directamente el peso de fase 1 que hay en una muestra bifásica:

$$w_1 = \frac{I_1 M_2}{M_1 I_{1,0} - I_1 (M_1 - M_2)} \quad (5.29)$$

En el caso de la presente tesis, tendríamos

- w_1 la fracción en peso que resta en la muestra.
- I_1 la intensidad integrada del pico h, k, l estudiado de α -TCP en la muestra del estudio cinético.
- $I_{1,0}$ la intensidad integrada del pico h, k, l en la muestra de α -TCP del polvo inicial usado en el ensayo.
- M_1 el coeficiente de absorción Másico de α -TCP = 86,43 cm²/g.
- M_2 el coeficiente de absorción Másico de CDHA = 84,97 cm²/g.

En este estudio se tomó la media w_1 de diferentes picos aislados de α -TCP para cuantificar la cantidad de α -TCP remanente en el cemento durante los diferentes tiempos del estudio cinético. Los diferentes picos escogidos pueden verse en la Tabla 5.4

b) Cálculo de porcentaje de reacción.

El porcentaje de reacción R_t en un tiempo t del estudio cinético se puede aproximar a partir de las fracciones en peso de las fases que forman la muestra, tal como muestra la ecuación

$$R_t(\%) = \frac{(w_0 - w_\infty) - (w_t - w_\infty)}{w_0 - w_\infty} \cdot 100 \quad (5.30)$$

donde

- w_0 es la fracción en peso de la fase estudiada en el polvo inicial
- w_t es la fracción en peso de la misma fase en un tiempo t

Tabla 5.4: Picos de α -TCP (JCPDS:23-359) para la cuantificación de la cinética de reacción

Código	2θ (°)(teórico)	d(teórico)	hkl	I/I ₀ (teórico)
a1	12.10	7.308	$\bar{1}31,0\bar{3}1$	39
a2	14.02	6.309	$\bar{2}01$	15
a3	15.16	5.836	$\bar{1}32$	11
a4	22.20	4.012	201	24
a5	24.10	3.689	$161,\bar{3}31$	33
a6	30.74	2.909	$034,\bar{4}34$	100

- w_∞ es la fracción en peso de dicha fase una vez la reacción ha concluido, y a partir de la cual ya no se observan variaciones en la intensidad de los distintos picos.

5.3.2.6. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas a compresión fueron determinadas en dos máquinas distintas en función de la resistencia mecánica de las muestras ensayadas. Para muestras que soportaban una carga superior a los 100 N, se utilizó una máquina universal de ensayos MTS Bionix 858 Test System con una célula de carga de 2,5 kN y la velocidad de los ensayos fue de 1 mm/min. Para el resto de las muestras se utilizó una máquina universal de ensayos MTS-Adamel-Lhomargy equipada con una célula de carga de 100 N en las mismas condiciones de velocidad.

El tamaño de las probetas fue de $\varnothing = 6$ mm y $h = 12$ mm. Las muestras se ensayaron inmediatamente después de sacarlas de la solución Ringers. Para los distintos ensayos mecánicos se usaron un mínimo de 5 muestras para la determinación de la resistencia a la compresión.

5.3.2.7. Análisis Estadístico de los datos

Para el análisis estadístico del diseño de experimentos y el análisis de varianzas mediante el método ANOVA se utilizó el software MINITAB 14.0.

5.4. Resultados

5.4.1. Tiempos de cohesión y Tiempos de Fraguado

a) Cementos Microporosos o No Espumados

Todos los CPC microporosos presentaron cohesión inmediatamente después de su preparación al ser sumergidos en Solución de Ringers a 37°C.

El tiempo final de fraguado de los cementos preparados con la Solución ACC fue de entre 15 y 25 min en función de la relación L/P.

Los cementos preparados con la Solución ALG presentaban un tiempo de fraguado superior a los 25 min. A partir de este tiempo se observó que la huella dejada por las agujas de Gillmore no evolucionaba, debido a la formación de una capa hidratada posiblemente a causa del alginato de sodio presente en estas formulaciones.

b) Cementos Macroporosos o Espumados

Uno de los principales resultados obtenidos fue la diferencia en los tiempos de cohesión entre las muestras preparadas con la Solución ACC y la Solución ALG.

Todos los CPC macroporosos preparados con la Solución ALG presentaban cohesión inmediatamente después de su preparación, mientras que únicamente presentaban cohesión al cabo de 15 min dos formulaciones preparadas con la Solución ACC (G-ACC-35-BH- y F-ACC-35-BH-). Estas dos formulaciones corresponden a los cementos espumados con menor porosidad total (ver resultados más adelante). Los cementos espumados cuya macroporosidad era más elevada, no presentaron cohesión hasta después de 30min, caso de las formulaciones preparadas con una mayor cantidad de albumen y/o una relación líquido polvo de 0,40 ml/g.

No se midieron los tiempos de fraguado de los cementos espumados mediante las agujas de Gillmore debido a la poca resistencia mecánica de algunas formulaciones y también al ser estos superiores a 40 min.

5.4.2. Microestructura de los CPC

La microestructura de los CPC obtenidos, tanto de los microporosos como de los macroporosos, depende del tamaño de partícula usado en la formulación de los mismos. La microestructura no difiere de la observada en el Capítulo 2. No se observó ninguna influencia en la morfología ni en el tamaño de los cristales de apatita debida al uso del alginato de sodio ni del agente porogénico. Un ejemplo se puede ver en la Figura 5.6. Las diferencias son debidas a las distintas velocidades de disolución de las partículas de α -TCP [66]. Los cristales de apatita en el caso del Tamaño de Partícula Grueso (TP Grueso) muestran una morfología de placas entrecruzadas de algunas micras de longitud. Los cristales de apatita de las formulaciones preparadas con el Tamaño de Partícula Fino (TP Fino) tienen un tamaño menor y una morfología en forma de aguja.

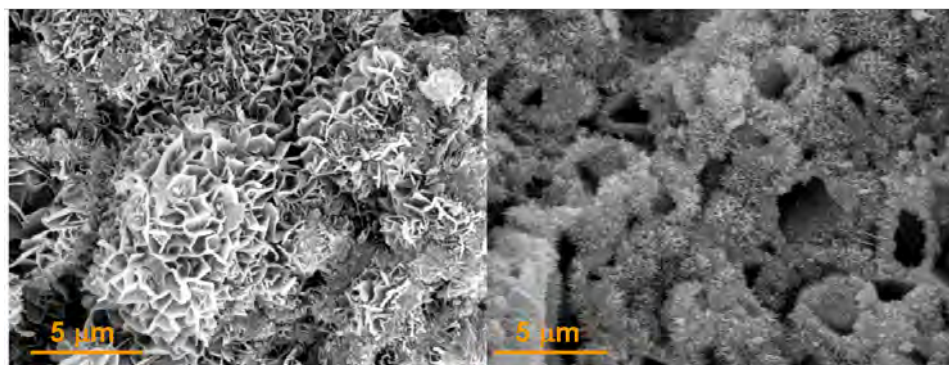


Figura 5.6: Microestructura de los cementos después del fraguado. Izquierda: Tamaño de Partícula Grueso (G-ALG-35-BH-). Derecha: Tamaño de Partícula Fino (F-ALG-40-BH+).

5.4.3. Porosidad

a) Cementos Microporosos o No Espumados

En la Tabla 5.5 se pueden ver los valores de la densidad esquelética obtenida mediante picnometría de helio, la densidad aparente obtenida por inmersión en mercurio y porosidad de los CPC microporosos.

Tabla 5.5: Densidad esquelética, densidad aparente y porosidad de los cementos microporosos. Desviación estándar entre paréntesis. Desviación estándar de la densidad esquelética $<0,005 \text{ g/cm}^3$, ver sección 5.3.2.2.

Código	$d_{esq.}(\text{g/cm}^3)$	$d_{ap}(\text{g/cm}^3)$	$P_{total}(\%)$
F-ACC-35	2,803(0,005)	1,560(0,001)	44,45(0,01)
F-ALG-35	2,779 (0,005)	1,536(0,002)	45,06(0,06)
F-ACC-40	2,803(0,005)	1,457(0,016)	46,81(0,76)
F-ALG-40	2,764(0,005)	1,434(0,009)	48,86(0,19)
G-ACC-35	2,743(0,005)	1,624(0,080)	41,14(2,88)
G-ALG-35	2,822(0,005)	1,530(0,080)	46,76(1,98)
G-ACC-40	2,756(0,005)	1,503(0,015)	46,82(1,85)
G-ALG-40	2,741(0,005)	1,433(0,012)	48,21(0,53)

La densidad esquelética de las muestras obtenida por picnometría de helio está entre 2,7 y 2,8 g/cm^3 , valor por debajo del valor teórico de la hidroxiapatita, 3,156 g/cm^3 [67]. Este valor fue ligeramente superior para los CPC en cuya formulación se utilizó el TP Fino.

El cálculo de la Porosidad Total se realizó con la media de todos los valores de la densidad real de las muestras preparadas con TP Grueso y TP Fino, tanto de los cementos no espumados como de los cementos espumados. Así, se ha tomado un valor para el TP Grueso de $2,760 \pm 0,024 \text{ g/cm}^3$ y para el TP Fino de $2,802 \pm 0,017 \text{ g/cm}^3$.

La porosidad de los CPC microporosos está situada entre el 41 % y el 48 %. Esta porosidad es la microporosidad debida a la separación entre los cristales de apatita y a los espacios que dejan algunas partículas de α -TCP después de la reacción de fraguado.

b) Cementos Macroporosos o Espumados

En la Tabla 5.6 se recogen los resultados de la densidad esquelética medida por picnometría de helio, densidad aparente medida por inmersión en mercurio, la porosidad total y la macroporosidad de los cementos espumados. Se puede observar un incremento en la macroporosidad de los cementos entre un 8 % y un 35 %.

Tabla 5.6: Densidad esquelética, densidad aparente y porosidad de los cementos espumados. Resultados experimentales del diseño factorial 2^4 . Desviación estándar entre paréntesis. Desviación estándar de la densidad esquelética $<0,005 \text{ g/cm}^3$, ver sección 5.3.2.2.

Código	$d_{esq.}(\text{g/cm}^3)$	$d_{ap}(\text{g/cm}^3)$	$P_{total}(\%)$	$P_{macro}(\%)$	$P_{micro}(\%)$
F-ACC-35-BH-	2,812(0,005)	1,347(0,089)	51,68(2,77)	13,02(4,99)	38,66(2,21)
F-ALG-35-BH-	2,814(0,005)	1,392(0,024)	50,22(0,59)	9,43(1,19)	40,81(0,59)
F-ACC-35-BH+	2,814(0,005)	1,237(0,105)	55,96(2,68)	20,73(4,83)	35,23(2,14)
F-ALG-35-BH+	2,789(0,005)	1,282(0,060)	54,17(1,53)	16,58(2,87)	37,59(1,35)
F-ACC-40-BH-	2,818(0,005)	1,214(0,175)	56,77(4,40)	16,76(7,61)	40,01(3,20)
F-ALG-40-BH-	2,817(0,005)	1,188(0,104)	57,51(2,64)	17,12(9,41)	40,39(3,05)
F-ACC-40-BH+	2,802(0,005)	0,944(0,104)	66,39(2,63)	35,26(4,37)	31,13(1,74)
F-ALG-40-BH+	2,813(0,005)	1,039(0,094)	62,86(2,38)	27,55(5,12)	35,30(2,74)
G-ACC-35-BH-	2,787(0,005)	1,321(0,035)	52,11(0,89)	18,36(5,52)	33,75(4,62)
G-ALG-35-BH-	2,769(0,005)	1,403(0,100)	49,30(2,44)	8,28(4,34)	41,02(1,83)
G-ACC-35-BH+	2,746(0,005)	1,245(0,050)	54,88(1,27)	23,05(5,94)	31,83(4,66)
G-ALG-35-BH+	2,752(0,005)	1,318(0,015)	52,39(0,50)	13,86(0,98)	38,53(0,48)
G-ACC-40-BH-	2,757(0,005)	1,155(0,001)	58,14(0,04)	23,17(0,70)	34,97(0,73)
G-ALG-40-BH-	2,741(0,005)	1,141(0,093)	58,79(2,29)	20,37(5,25)	38,42(2,96)
G-ACC+40-BH+	2,764(0,005)	0,911(0,092)	64,77(0,15)	35,33(0,92)	29,44(0,77)
G-ALG+40-BH+	2,743(0,005)	1,066(0,042)	61,50(1,00)	25,63(2,69)	35,87(1,69)

En la Figura 5.7 y la Figura 5.8 se representan gráficamente los datos obtenidos de la Porosidad Total y de la Macroporosidad durante el diseño experimental 2^4 que aparecen en la Tabla 5.6.

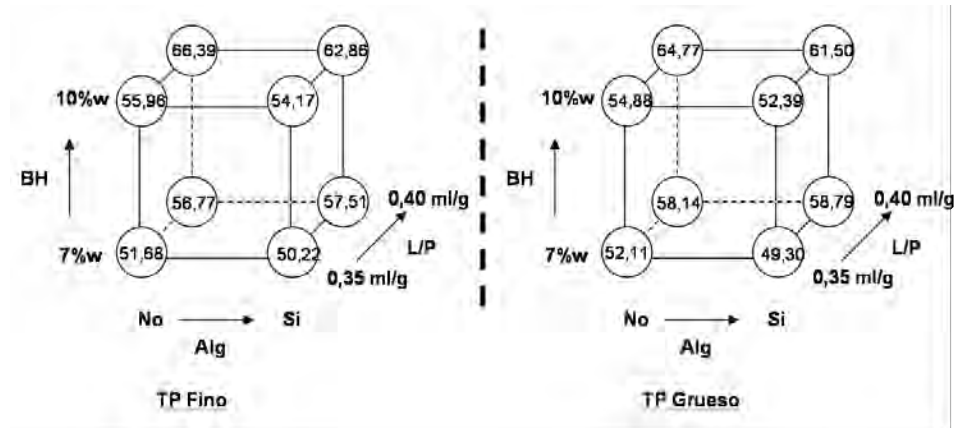


Figura 5.7: Representación geométrica de los resultados de la Porosidad Total (%) obtenidos en el diseño factorial 2^4 .

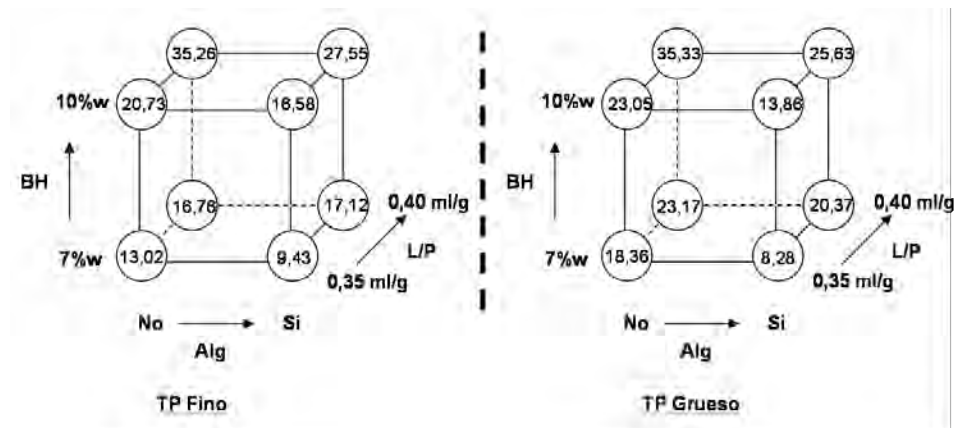


Figura 5.8: Representación geométrica de los resultados de la Macroporosidad obtenidos en el diseño factorial 2^4 .

Los resultados de los Efectos Principales y de las interacciones se recogen en la Tabla 5.7. La desviación estándar que aparece asociada a los coeficientes de las distintas variables es el resultado del conjunto de 2 experimentos independientes.

En el caso de la Porosidad total, los únicos efectos estadísticamente significativos son los efectos principales L/P y BH.

En el análisis de la Macroporosidad, se puede observar que los efectos L/P, BH siguen siendo significativos. El efecto principal ALG ahora es significativo, teniendo una influencia negativa.

Tabla 5.7: Efectos Principales para la Porosidad Total y para la Macroporosidad.

1	Porosidad Total		Macroporosidad	
	Efectos estimados ±desviación típica	p	Efectos Estimados ±desviación típica	p
Constante	56,712±0,528	0,000	20,77±1,109	0,000
Efectos principales				
ALG	-0,873±0,528	0,118	-2,932±1,109	0,018
BH	2,400±0,528	0,000	4,471±1,109	0,001
L/P	4,127±0,528	0,000	4,871±1,109	0,000
TP	-0,23±0,528	0,669	0,727±1,109	0,521
Interacción de dos factores				
ALG*BH	-0,513±0,528	0,346	-0,912±1,109	0,423
ALG*L/P	0,194±0,528	0,715	0,450±1,109	0,690
ALG*TP	-0,118±0,528	0,826	-1,040±1,109	0,36
BH*L/P	0,638±0,528	0,245	1,324±1,109	0,250
BH*TP	-0,499±0,528	0,358	-1,009±1,109	0,377
L/P*TP	0,188±0,528	0,726	0,249±1,109	0,825
Interacción de tres factores				
ALG*BH*L/P	-0,510±0,528	0,348	-0,957±1,109	0,401
ALG*BH*TP	0,062±0,528	0,908	0,161±1,109	0,887
ALG*L/P*TP	0,138±0,528	0,798	0,396±1,109	0,726
BH*L/P*TP	-0,203±0,528	0,705	-0,430±1,109	0,703
Interacción de cuatro factores				
ALG*BH*L/P*TP	-0,019±0,528	0,971	-0,016±1,109	0,989

5.4.4. Morfología de la Macroporosidad

Las superficies de fractura de los cementos revelaron de forma general poros de morfología esférica con tamaños entre las 50 y las 300 μm , observándose ocasionalmente poros de mayor tamaño.

En las formulaciones con menor L/P y BH (G-ACC-35-BH-, G-ACC-35-BH-, G-ALG-35-BH- y F-ALG-35-BH-), se pudieron observar poros aislados, alargados y deformados, ver Figura 5.9 a) y c).

El aumento de agente espumante produce un aumento de la macroporosidad y al mismo tiempo de la esfericidad de los poros obtenidos. Sin embargo, se pudo observar que la distribución de macroporosidad era heterogénea con colonias de macroporos aisladas unas de otras dentro del cemento. Este hecho se produce al introducir trozos de espuma de albúmen en el interior de la pasta del cemento sin conseguir una distribución homogénea (ver Figura 5.9 b) y d)).

El aumento de la relación líquido-polvo, tal como se puede observar en la Figura 5.10 favorece una distribución homogénea de la espuma de albúmen en el seno del cemento, y por lo tanto de la macroporosidad. Se pudo observar

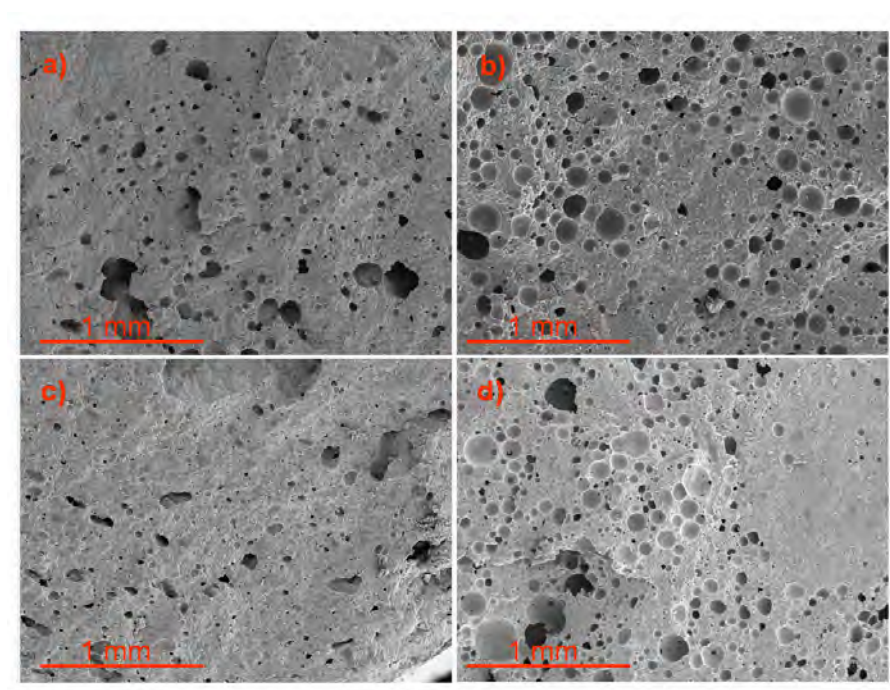


Figura 5.9: Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Visualización de la influencia de la cantidad agente espumante .a)G-ALG-35-BH-, b)G-ALG-35-BH+, c)F-ALG-35-BH-, d)F-ALG-35-BH+.

una distribución heterogénea del tamaño de poros, con algunos poros de tamaño superior a las $300\mu\text{m}$.

En la Figura 5.11 se puede observar el efecto del uso de alginato de sodio en la preparación de los cementos. Los CPC en cuya formulación se incluye alginato de sodio, los poros son comparativamente más pequeños que su homónimo sin alginato de sodio.

Sin embargo como se ha mencionado anteriormente, únicamente los cementos con presencia de alginato de sodio en la fase líquida producen cementos que son capaces de ser sumergidos en agua directamente después de su preparación. Esto es importante desde el punto de vista clínico, ya que significa que los cementos pueden ser inyectados inmediatamente sin ser necesario un tiempo de espera. Esto, como se verá más adelante, es de vital importancia para la conservación de la macroporosidad. Después de estos resultados preliminares únicamente se siguió trabajando con los cementos macroporosos con alginato de sodio.

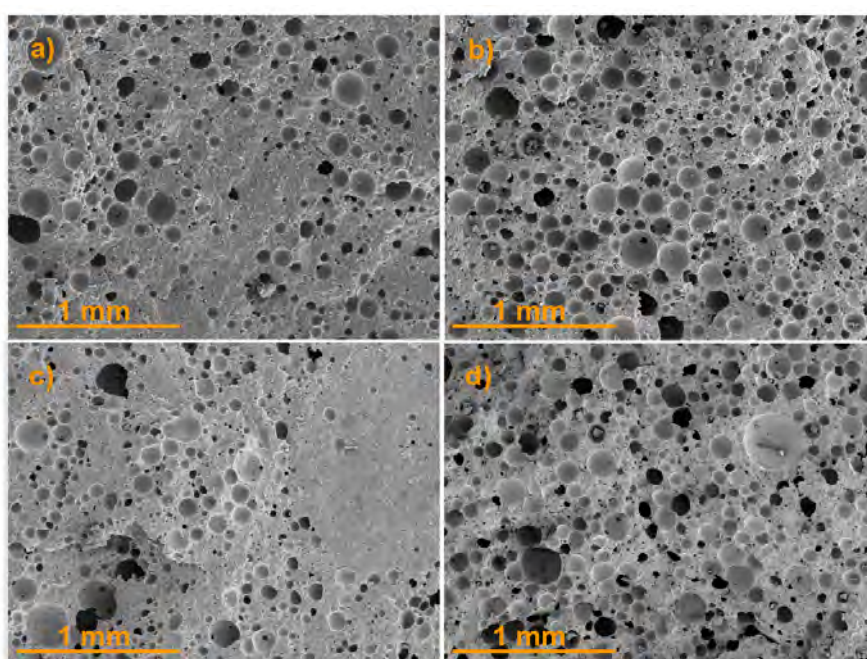


Figura 5.10: Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Influencia de la relación L/P. a)G-ALG-35-BH+, b)G-ALG-40-BH+, c)F-ALG-35-BH+, d)F-ALG-40-BH+.

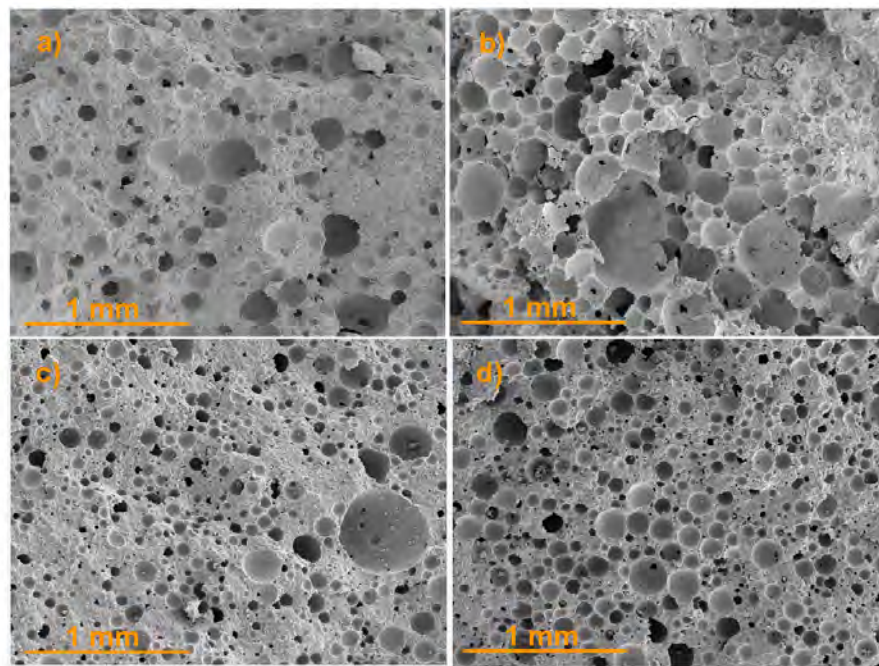


Figura 5.11: Morfología de los Cementos Macroporosos, superficie de fractura observada por SEM. Influencia de la Solución d ALG. a)G-ACC-40-BH-, b)G-ACC-40-BH+,c)G-ALG-40-BH-,d)G-ALG-40-BH+.

5.4.5. Análisis mediante Porosimetría de Intrusión de Mercurio

En la Tabla 5.8 se comparan los valores de porosimetría de mercurio con los valores obtenidos por inmersión en mercurio para los CPC macroporosos con alginato de sodio. También aparecen los valores de la porosidad interconectada por encima y por debajo de las $5\mu\text{m}$. En la Figura 5.12 y en la Figura 5.13 se representa la distribución de la interconexión para algunas muestras.

Los valores de las densidades aparentes obtenidos por ambas técnicas son similares. Sin embargo, la porosimetría de intrusión de mercurio nos permite también obtener el valor de la porosidad abierta o interconectada ($P_{abierta}$). Se puede observar que existe una diferencia de un 5-6 % de media entre la porosidad total y la porosidad abierta. Una de las limitaciones de la técnica de la porosimetría de intrusión de mercurio es que no puede caracterizar los poros inferiores a 3nm ni tampoco la porosidad cerrada, dando como resultado la porosidad abierta o interconectada.

Tabla 5.8: Valores de porosidad obtenidos por inmersión en mercurio y por porosimetría de intrusión de mercurio. Valor de la porosidad total en porosimetría de intrusión de mercurio calculado a partir de la densidad aparente obtenida directamente de la medida. El valor de $P_{abierta}$ es un dato obtenido directamente de la medida.

Muestra	Inmersión Mercurio		Porosimetría de intrusión de Mercurio				
	$d_{ap}(\text{g}/\text{cm}^3)$	$P_{total}(\%)$	$d_{ap}(\text{g}/\text{cm}^3)$	$P_{total}(\%)$	$P_{abierta}(\%)$	$P_{250-5\mu\text{m}}(\%)$	$P_{5-0,003\mu\text{m}}(\%)$
G-ALG-35	1,530	45,06	1,549	43,86	38,96	1,40	37,56
F-ALG-35	1,536	46,76	1,528	45,58	38,59	2,73	35,86
G-ALG-40	1,433	48,21	1,457	47,19	42,29	1,71	40,58
F-ALG-40	1,434	48,86	1,433	48,97	42,32	2,28	39,85
G-ALG-35-BH+	1,318	53,39	1,318	52,23	47,44	6,03	41,45
F-ALG-35-BH+	1,282	54,17	1,322	52,92	46,40	6,49	39,91
G-ALG-40-BH+	1,066	61,50	1,095	60,31	56,35	11,47	44,88
F-ALG-40-BH+	1,039	62,86	1,198	57,34	51,94	10,53	40,91

El hecho de aumentar la macroporosidad de las muestras induce un aumento de la interconexión de los poros en el rango $5-250\mu\text{m}$, pasando del 1 al 2 % para los cementos no espumados a valores del 6 % para las muestras espumadas con relación $L/P=0,35\text{ml/g}$ (G-ALG-35-BH+ y F-ALG-35-BH+) hasta valores del 10-12 % para las muestras con una mayor relación líquido-polvo (G-ALG-40-BH+ y F-ALG-40-BH+). A pesar de la relativa alta macroporosidad obtenida (ver Figura 5.9), la porosidad se encuentra principalmente interconectada en el rango inferior a $5\mu\text{m}$.

En la Figura 5.12 se puede observar la distribución de la interconexión de la porosidad. En la gráfica se representan dos CPC microporosos con una $L/P=0,40\text{ml/g}$ y son comparados con dos CPC espumados macroporosos con la misma relación L/P . Se puede observar que los CPC microporosos tienen principalmente la porosidad interconectada en el rango inferior a los 100nm

que correspondería al espacio entre los cristales de apatita. Cabe destacar que las muestras con TP Fino el máximo está centrado en los 30nm mientras que las muestras con TP Grueso el máximo está centrado en un rango inferior hacia los 10nm. Los CPC espumados presentan una distribución bimodal correspondiente a la separación de la porosidad en menor o mayor a $5\mu\text{m}$. Estas muestras siguen presentando un máximo importante centrado en el rango inferior a los 100nm. Sin embargo, existe una mayor interconexión en el rango $0,1-5\mu\text{m}$, más importante para el caso de los CPC espumados con TP Grueso. La interconexión de la macroporosidad presenta un máximo hacia las $30\mu\text{m}$ con una pequeña contribución en el rango de las $100-200\mu\text{m}$.

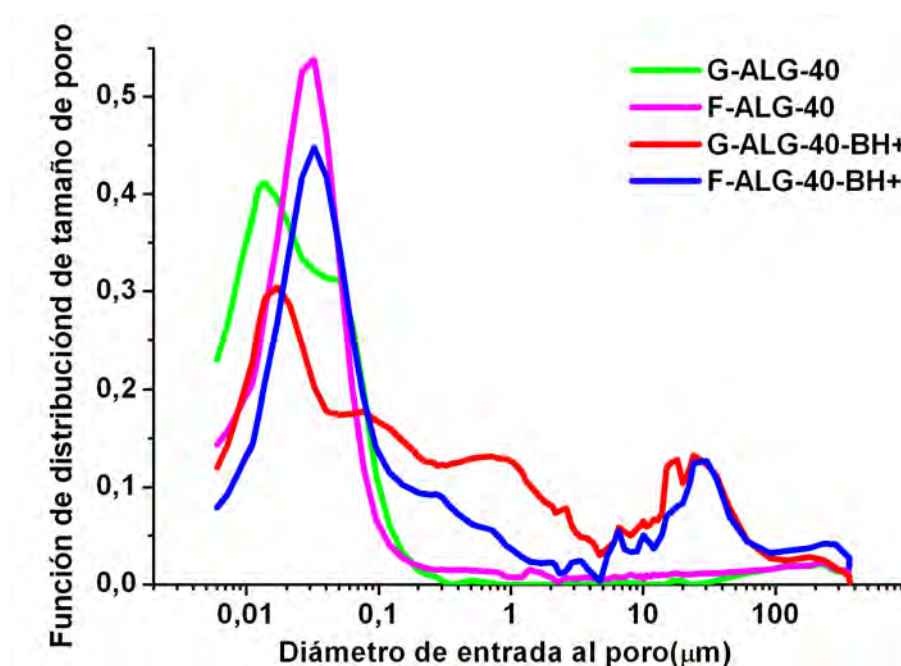


Figura 5.12: Función de distribución de tamaño de poro vs. Diámetro de entrada al poro. Comparativa entre cementos microporosos y cementos macroporosos.

En la Figura 5.13 se representa la influencia de la relación L/P de 0,35 a 0,40ml/g. El aumento de la relación L/P implica un aumento de la interconexión de los poros en el rango $0,1-5\mu\text{m}$ y también un aumento de la interconexión de la macroporosidad de tamaño superior a $5\mu\text{m}$.

5.4.6. Inyectabilidad

Se analizó la inyectabilidad de los CPC espumados más macroporosos con alginato de sodio en su composición. Se comparó también con la inyectabilidad de las formulaciones sin albumen. En la Tabla 5.9 se muestra los valores del tanto por ciento de cemento inyectado. Se puede observar que

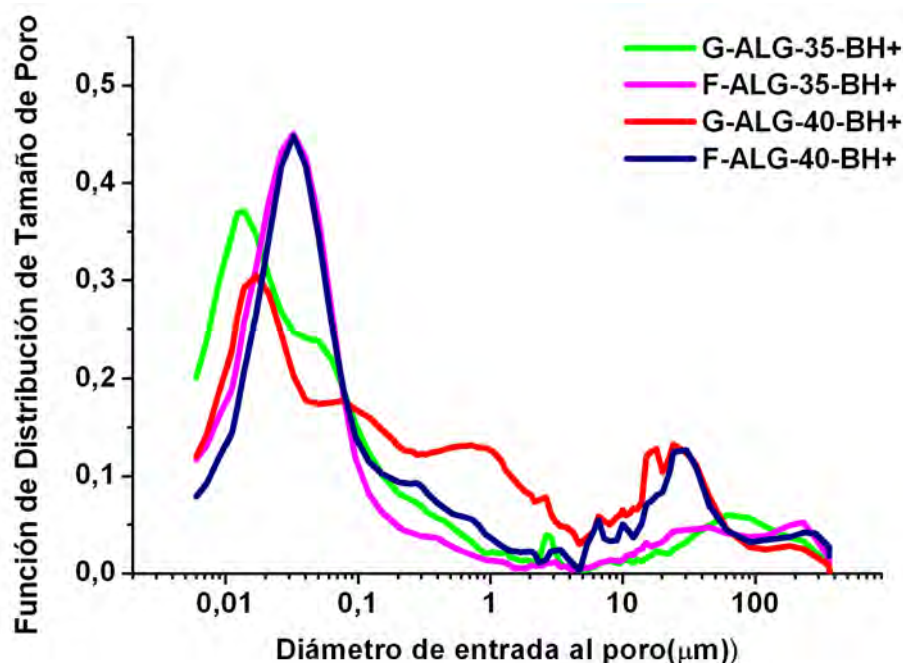


Figura 5.13: Función de distribución de tamaño de poro vs. Diámetro de entrada al poro. Comparativa de la influencia de la relación L/P en la interconexión de la porosidad.

los CPC no macroporosos presentaron una inyectabilidad inferior al 50 %, siendo inferior para los CPC con TP Fino debido a la mayor viscosidad de la muestra. Los CPC espumados presentaron un valor alto de la inyectabilidad. El hecho de añadir la espuma de albumen provocó que fueran más fluidos y pudieran ser extruídos casi totalmente.

Tabla 5.9: Inyectabilidad a los 5min.

Referencia	Inyectabilidad (%)	Muestra	Inyectabilidad (%)
G-ALG-40	44,92(0,70)	G-ALG-40-BH+	83,33(3,32)
F-ALG-40	35,70(2,66)	F-ALG-40-BH+	85,34(2,63)

Los valores de la porosidad obtenidos después de la inyectabilidad fueron muy similares a los de las muestras no inyectadas, sin variaciones significativas entre las muestras. Tal como se muestra en la Tabla 5.10, el cemento macroporoso pudo ser inyectado al cabo de 5min sin perder la macroporosidad.

En la Figura 5.14 se hace la comparación de la morfología de la macroporosidad entre una muestra inyectada a los 5 min desde el inicio de su preparación y una muestra no inyectada. Se puede observar que hay una cierta deformación de los poros por el hecho de haber extruido la muestra. Tal como se ha comentado previamente, la macroporosidad se conserva du-

Tabla 5.10: Comparación de Porosidad entre las muestras inyectadas y las muestras no inyectadas

Muestra	$d_{ap}(\text{g}/\text{cm}^3)$	$P_{Total} (\%)$	$P_{macro} (\%)$
G-ALG-40-BH+ <i>iny</i>	1,095(0,032)	60,01(0,02)	24,25(2,24)
G-ALG-40-BH+	1,066(0,042)	61,50(1,00)	25,63(2,69)
F-ALG-40-BH+ <i>iny</i>	1,048(0,020)	62,70(0,02)	27,42(3,84)
F-ALG-40-BH+	1,039(0,094)	62,86(2,38)	27,55(5,12)

rante la extrusión, sin embargo un factor crítico en este caso es el tiempo en el cual se inyecta la muestra. La Figura 5.14c) es una imagen de una muestra inyectada a los 10 min de su preparación. La muestra pudo ser extruida casi en su totalidad, de forma similar a una muestra inyectada a los 5min. Sin embargo, la pasta del cemento ha empezado a perder la elasticidad que permitía su extrusión, debido a que el cemento comienza a fraguar y posiblemente la espuma de albumen haya perdido también su elasticidad inicial. Al ejercer presión durante el proceso de extrusión la espuma de CPC se colapsa, perdiéndose gran parte de la macroporosidad.

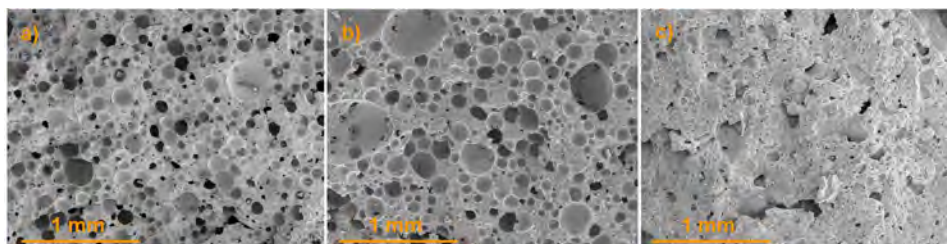


Figura 5.14: Muestras inyectadas a diferentes tiempos. a) F-ALG-40-BH+, b) F-ALG-40-BH+ inyectada 5 min, c) F-ALG-40-BH+ inyectada 10min

5.4.7. Estudio de la cinética de la reacción de fraguado.

Se estudió la evolución de la reacción de fraguado de dos CPC sin espumar (F-ACC-40, F-ALG-40) y de dos CPC espumados (F-ACC-40-BH+, F-ALG-40-BH+). El objetivo era ver la influencia de los aditivos usados en la cinética de la reacción de fraguado.

En la Figura 5.15 se representan los difractogramas correspondientes a la transformación del α -TCP en CDHA para la formulación F-ALG-40-BH+. Se puede ver como al cabo de 24 horas, casi todo el α -TCP ha reaccionado, transformándose en CDHA.

En la Figura 5.16 se muestra la evolución de la reacción de fraguado con el tiempo para las distintas formulaciones. Los porcentajes de reacción se calcularon a partir del método del estándar externo explicado en la sección

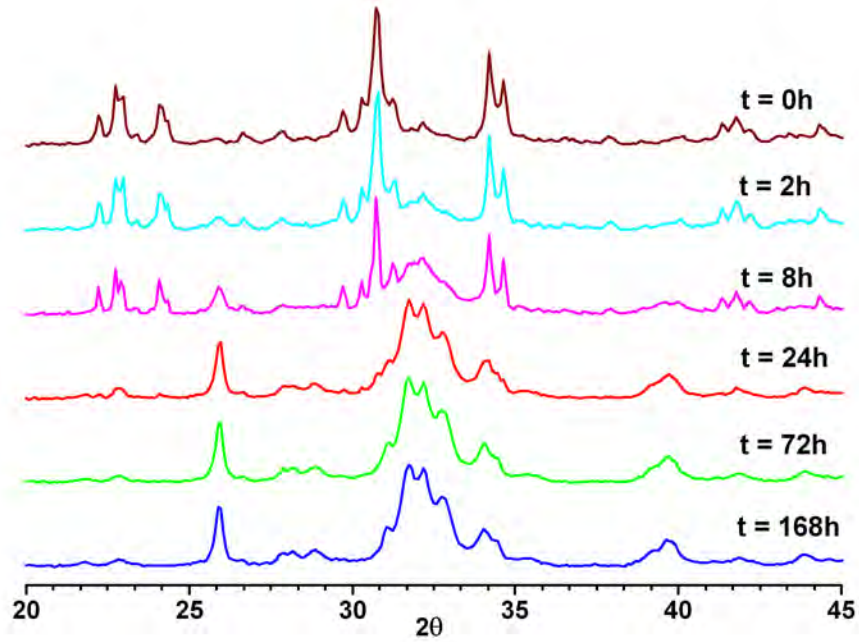


Figura 5.15: Difractogramas de F-ALG-40-BH+ a distintos tiempos de reacción

5.3.2.5. Las curvas de la figura corresponden a un ajuste de los distintos porcentajes a una expresión tipo descrito en la ecuación 5.31.

$$R(\%) = (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \cdot 100 \quad (5.31)$$

Los valores de transformación del α -TCP en CDHA al cabo de 24h, fueron para el cemento F-ACC-40 del 95 % y para el resto de los cementos entre el 85 y el 90 %. Se observó un ligero retraso en la reacción de fraguado debido a la presencia de alginato de sodio y de albumen en las muestras. Los valores de τ obtenidos muestran este hecho tal como se puede ver en la Tabla 5.11. Este valor equivale al tiempo en el cual el 63 % de la reacción ha tenido lugar.

Tabla 5.11: Valores de τ calculados según la ecuación 5.31 para un 95 % de confianza

Muestra	τ (h)
F-ACC-40	10,65 ± 0,87
F-ALG-40	13,23 ± 0,97
F-ACC-40-BH+	14,51 ± 1,12
F-ALG-40-BH+	14,11 ± 1,18

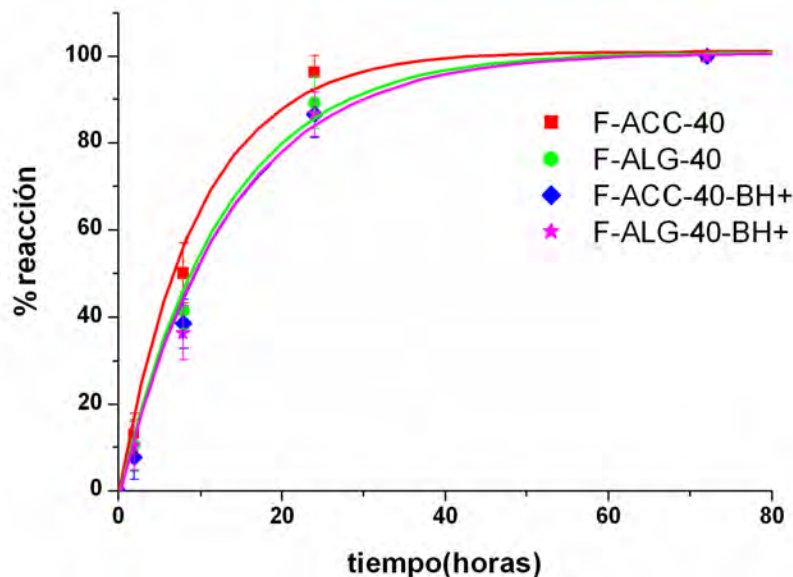


Figura 5.16: Porcentaje de reacción en función del tiempo de reacción.

En la Figura 5.17 se puede comparar la evolución de la transformación del α -TCP en CDHA en un CPC microporoso sin alginato y en un CPC macroporoso con alginato en su formulación. No se observaron diferencias significativas en el fraguado para ambos casos. A las 2h, ya se observó la red de cristales de apatita de tamaño muy pequeño sobre las partículas sin transformar de α -TCP. A las 8h, los cristales de apatita habían alcanzado un mayor tamaño, formando ya casi la red de cristales entrecruzados, aunque todavía quedaban partículas sin transformar de α -TCP en ambos casos. A las 24h, la transformación de las partículas de α -TCP en apatita se puede decir que era completa, no se observándose partículas sin transformar. Los cristales de apatita no ocupaban completamente el espacio que ocupaban las partículas de α -TCP.

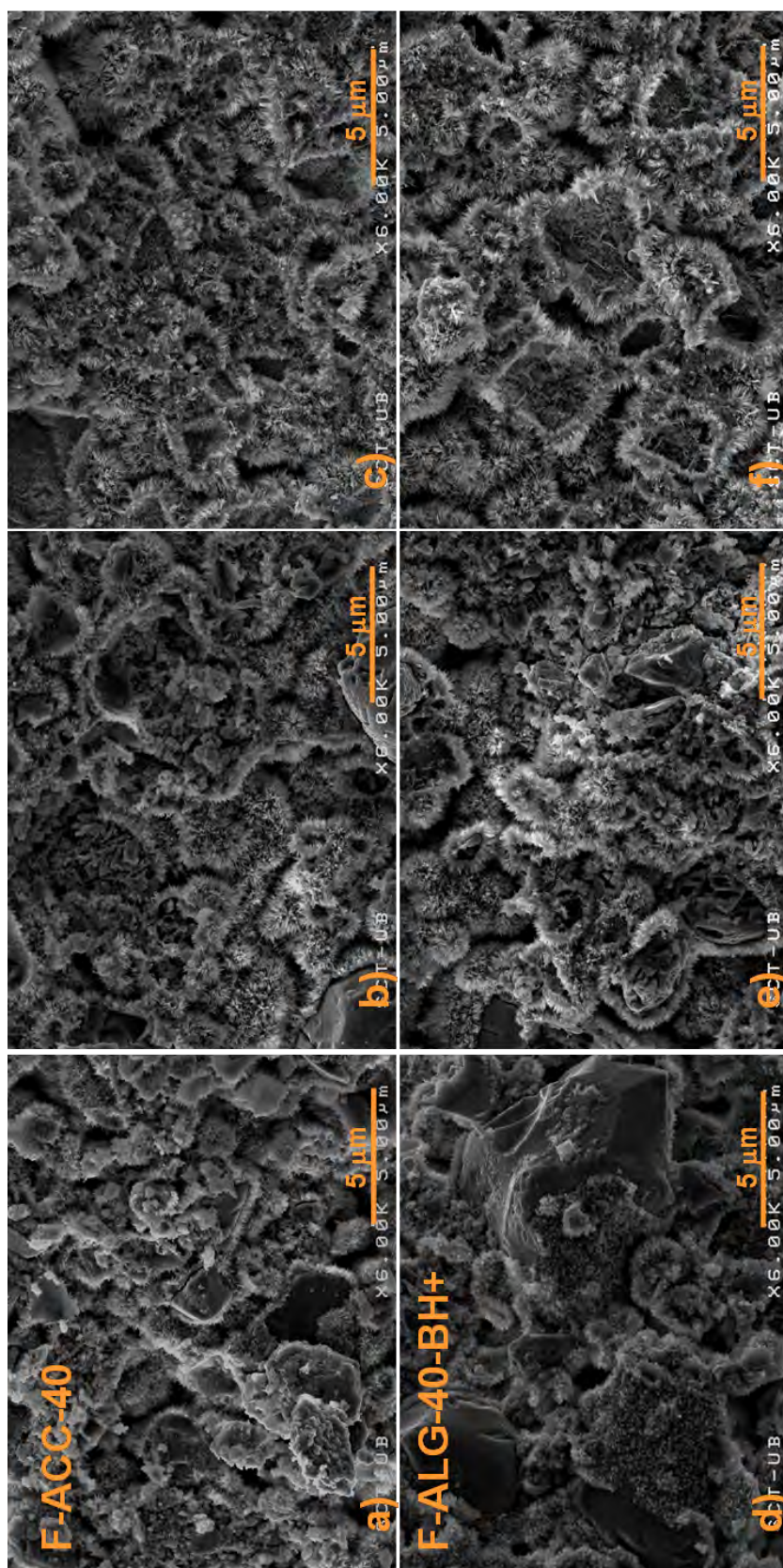


Figura 5.17: Microestructura observada por SEM de las muestras F-ACC-40 y F-ALG-40-BH+ a distintos tiempo de fraguado: 2h (a y d), 8h (b y e) y 24h (c y f)

5.4.8. Resistencia a la Compresión

En la Tabla 5.12 se recogen los resultados de la resistencia a la compresión. Se han incluido los valores de la macroporosidad para ver su influencia en la resistencia a la compresión. De forma general, ésta disminuye con el aumento de la porosidad pasando de 17 MPa para un valor de la P_{total} de 51,60 % a 1,11 MPa para un valor de P_{total} de 64,77 %.

Tabla 5.12: Resultados de la resistencia a la compresión del diseño factorial 2^4 . Valor resultado de ensayar 5 muestras (Desviación estándar entre paréntesis).

Código	P_{total} (%)	C(MPa)	Código	P_{total} (%)	C(MPa)
F-ACC-35-BH-	51,68(2,77)	17,20(3,49)	G-ACC-35-BH-	52,11(0,89)	9,88(0,39)
F-ALG-35-BH-	50,22(0,59)	13,76(2,42)	G-ALG-35-BH-	49,30(2,44)	13,90(3,82)
F-ACC-35-BH+	55,96(2,68)	8,48(1,68)	G-ACC-35-BH+	54,88(1,27)	2,55(1,52)
F-ALG-35-BH+	54,17(1,53)	5,50(0,69)	G-ALG-35-BH+	52,39(0,50)	7,07(1,83)
F-ACC-40-BH-	56,77(4,40)	2,61(0,84)	G-ACC-40-BH-	58,14(0,04)	2,59(1,19)
F-ALG-40-BH-	57,51(2,64)	8,60(2,06)	G-ALG-40-BH-	58,79(2,29)	6,06(1,03)
F-ACC-40-BH+	66,39(2,63)	3,09(0,65)	G-ACC-40-BH+	64,77(0,15)	1,11(0,19)
F-ALG-40-BH+	62,86(2,38)	3,64(1,24)	G-ALG-40-BH+	61,50(1,00)	1,52(0,51)

En la Figura 5.18 se representan gráficamente los resultados obtenidos para la resistencia a la compresión que se recogen en la Tabla 5.12.

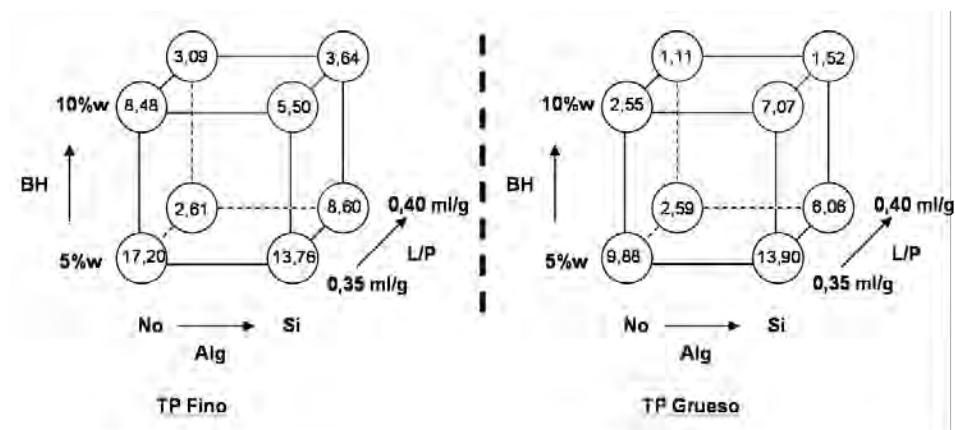


Figura 5.18: Representación geométrica de los resultados de la Resistencia a la compresión. Valor resultado de ensayar 5 muestras.

En el análisis del modelo de la resistencia a la compresión, no se disponía de réplicas o experimentos independientes, por lo que no es posible establecer de forma directa la desviación típica de los factores. Se hizo una estimación a partir de las interacciones de tres y cuatro factores, partiendo de la hipótesis de que las contribuciones de estas al modelo total son despreciables. Estas interacciones de orden superior miden diferencias debidas

principalmente al error experimental, y proporcionan un conjunto de referencia para el resto de factores. Así, la desviación se ha calculado mediante la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los efectos de dichas interacciones dividido por el grado de libertad, que es 5 en este caso. La desviación así calculada nos da una medida de cuáles son los efectos principales y las interacciones de dos factores distinguibles del ruido.

Tabla 5.13: Efectos Principales para la Resistencia a la Compresión

Término	Efectos estimados \pm desviación típica
Constante	6,723 \pm 0,580
Efectos principales	
ALG	0,784 \pm 0,580
BH	-2,602\pm0,580
L/P	-3,070\pm0,580
TP	-1,138 \pm 0,580
Interacción de dos factores	
ALG*BH	-0,471 \pm 0,580
ALG*L/P	0,519 \pm 0,580
ALG*TP	0,769 \pm 0,580
BH*L/P	1,290 \pm 0,580
BH*TP	0,080 \pm 0,580
L/P*TP	0,305 \pm 0,580
Interacción de tres factores	
ALG*BH*L/P	-0,591 \pm 0,580
ALG*BH*TP	0,151 \pm 0,580
ALG*L/P*TP	-1,101 \pm 0,580
BH*L/P*TP	-0,272 \pm 0,580
Interacción de cuatro factores	
ALG*BH*L/P*TP	-0,146 \pm 0,580

Los efectos principales son como en los caso anteriores son L/P y BH. La contribución de estos dos factores en las propiedades mecánicas como era de esperar son negativos al aumentar ambos la macroporosidad de los cementos, reduciendo por consiguiente la resistencia a la compresión.

5.5. Discusión

En este capítulo se ha caracterizado y desarrollado un CPC macroporoso cuyo principal componente es el α -TCP. Se ha aplicado un enfoque biomimético al utilizar las buenas propiedades emulsionantes y espumantes de las proteínas del albumen, agente surfactante natural. Además la espuma de albumen presenta una gran resistencia y flexibilidad necesaria durante el proceso de mezcla con el cemento. Otro factor importante es el gran desarrollo industrial y tecnológico en la obtención de albumen deshidratado

La fabricación de cementos macroporosos con la ayuda de surfactantes o espumantes puede preverse de tres formas distintas. La mezcla de la pasta del cemento con una cierta cantidad de espuma, como ha sido el caso de este trabajo. Otro posible método hubiera sido mezclar el polvo del cemento directamente con la espuma. Sin embargo, las pruebas realizadas mostraban que gran parte de la espuma era destruida durante el proceso de mezcla. El último método posible hubiera sido la mezcla directa del polvo del cemento con una fase líquida que incluyera la solución de proteínas y proceder al espumado directo de la mezcla. Una de las limitaciones en este último caso era encontrar una batidora de pequeñas dimensiones con suficiente potencia para espumar pequeñas cantidades de una solución muy viscosa, ya que el factor limitante en ese caso es la cantidad de cemento disponible. Con el método escogido, el albumen pudo ser espumado con la ayuda de una batidora de tipo doméstico. El uso de una batidora a escala de laboratorio que pueda ser usada directamente con la pasta de cemento esta siendo actualmente investigado en otros trabajos y con otro tipo de surfactantes.

5.5.1. Cohesión

El estudio de la cohesión reveló que mientras todos los CPC microporosos poseían cohesión, sólo los CPC macroporosos preparados con alginato de sodio presentaban cohesión inmediatamente después de su preparación.

En este punto se habría de hacer la distinción entre los cementos macroporosos que pueden ser utilizados como cerámicas macroporosas prefra-guadas implantar o para Ingeniería de Tejidos *in vitro*, y los cementos cuyo uso final vaya a ser su utilización clínica como relleno óseo *in vivo*.

En el primer caso, no es necesario que los cementos presenten cohesión inmediatamente ya que no es necesario sumergirlos en agua inmediatamente después de ser preparados. En cambio, si los cementos son desarrollados para ser implantados o inyectados en estado pastoso, han de presentar cohesión. En este caso, es de vital importancia que tengan cohesión para evitar la aparición de respuestas inflamatorias debido a la migración de partículas de cemento del lugar de implantación [68].

5.5.2. Porosidad

La Porosidad Total obtenida en los CPC macroporosos se sitúa entre el 50 y el 70 %, lo que equivale a que la macroporosidad introducida en los mismos varía entre el 10 % y el 35 %. La morfología de los poros obtenidos fue esférica con tamaños comprendidos entre $50\mu\text{m}$ y $300\mu\text{m}$. El método presentado demuestra que la pasta de CPC macroporosa obtenida es resistente a la manipulación. La porosidad se conserva durante el llenado de los moldes, dónde se ejerce presión para llenarlos correctamente. La porosidad también resiste el proceso de extrusión durante la inyección del cemento.

Los dos factores más determinantes a la hora de obtener cementos macroporosos han sido la relación líquido-polvo y la cantidad de espuma de albumen.

El aumento de la relación L/P implica una menor viscosidad de la pasta de cemento. Esto por si mismo, no implica un aumento de la macroporosidad en el cemento, sino la facilidad con la que el cemento será incorporado a la espuma, formando una fina capa entre las burbujas de albumen. Una relación L/P mayor tiene también un efecto importante en el tamaño de la microporosidad al aumentar el espacio entre los cristales de apatita, favoreciendo el aumento de la porosidad en el rango $0,1-5\mu\text{m}$, tal como se ha podido observar en los análisis por porosimetría de mercurio (ver Tabla 5.5 y Figura 5.13).

Los factores que aumentan la viscosidad, como el uso de Alginato de Sodio o el TP fino, tienen un impacto mucho menor en la disminución de la macroporosidad.

El análisis de la influencia de las diversas variables ha mostrado que no existe un efecto de sinergia entre la relación L/P y la cantidad de espuma de albumen, por lo que un aumento de una o de ambas variables produce un aumento de la macroporosidad por separado en rangos cercanos a los estudiados.

El aumento de la cantidad de albumen proporciona por un lado un mayor volumen de espuma que puede ser mezclada con la pasta del CPC durante el proceso de mezcla. Al mismo tiempo, la espuma que se colapsa debido al proceso de mezcla aumenta ligeramente la cantidad de líquido, disminuyendo al mismo tiempo la viscosidad de la pasta.

En el caso de los cementos menos macroporosos (las series G-ACC-35-BH-, F-ACC-35-BH-, G-ALG-35-BH- y F-ALG-35-BH-) se observaron muchos poros aislados en el interior del cemento, tal como se muestra en la Figura 5.9. Esto es indicativo que las burbujas de albumen quedan atrapadas en el interior del cemento, resistiendo el proceso de mezcla, mostrando también la flexibilidad y resistencia de la pasta de la espuma de albumen. Se pueden observar en la Figura 5.9, zonas con una concentración superior de macroporos al aumentar la cantidad de agente de albumen, obteniéndose una distribución heterogénea de la macroporosidad. Esta distribución hete-

rogénea de la macroporosidad no es deseable, ya que implicaría zonas con distinta velocidad de reabsorción *in vivo*.

Tal como se ha comentado más arriba, a medida que aumenta la relación L/P aumenta la fluidez de la pasta, facilitando que ésta pueda ser incorporada fácilmente entre las burbujas de albumen consiguiéndose al final que las paredes entre poros sean relativamente estrechas, tal como se muestra en la Figura 5.19. En esta imagen, se observa la capa de cemento entre poros contiguos y también en los bordes de plateau, mostrando la penetración del cemento en la estructura de la espuma, rellenando finamente el espacio entre burbujas.

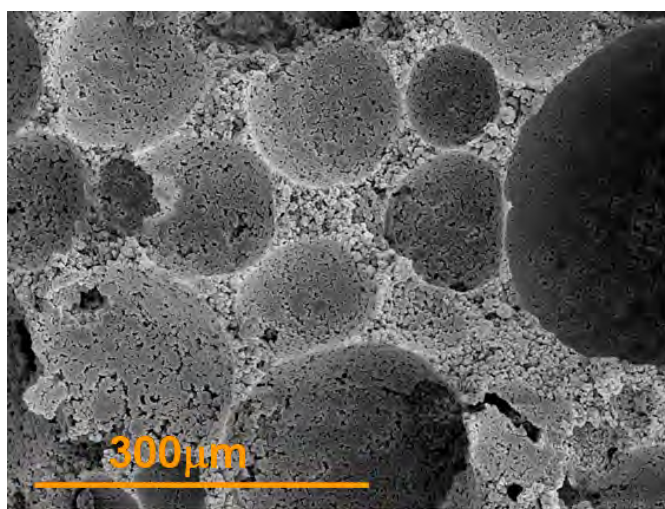


Figura 5.19: Separación entre poros de la serie G-ACC-40-BH+

La macroporosidad teórica viene dada en este caso por la cantidad de espuma, medida aquí en función del tanto por ciento en peso en relación al polvo del cemento. Así, a mayor porcentaje de espuma de albumen, mayor macroporosidad.

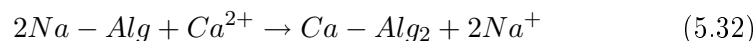
El aumento de la cantidad de albumen tiene el techo teórico de necesitar cierta cantidad de cemento entre las burbujas de tal forma que las partículas de α -TCP estén lo suficientemente cercanas para poder formar una red de cristales de CDHA entrecruzada, haciendo posible el fraguado del cemento, estabilizando la espuma e impidiendo el colapso de la misma. Al mismo tiempo, el aumento de la relación líquido/polvo tiene como techo teórico el punto donde la viscosidad de la pasta de cemento fuera lo bastante fluida para poder introducirse entre las burbujas de albumen casi sin esfuerzo. Sin embargo si la pasta fuera demasiado líquida el cemento no podría fraguar.

El uso de alginato de sodio ha demostrado ser contraproducente para la obtención de la macroporosidad, al producir una disminución de la misma, del 5 % de media. Sin embargo, los valores de la porosidad total no difieren

de las muestras sin alginato de sodio, lo que implicaría que el alginato de sodio aumenta la microporosidad. No obstante, no se observaron diferencias significativas en las observaciones realizadas por SEM (Figura 5.17).

La disminución de la macroporosidad es debida al aumento de la viscosidad en la pasta del cemento que dificulta el proceso de mezcla con la espuma de albumen. El aumento de viscosidad conlleva también una disminución del drenaje gravitacional en los estadios iniciales del fraguado, impidiendo que las burbujas de albumen puedan coalescer, reduciéndose así el tamaño de la macroporosidad, tal como se observa en la Fig.5.11. El uso de polisacáridos tiende también a estabilizar las espumas al adsorberse en la interfase y aumentar la repulsión estérica.

Por último, el alginato de sodio puede formar un gel insoluble en presencia de iones de calcio [60], suministrados durante la disolución del α -TCP, según la ecuación 5.32. Es difícil establecer la contribución de los distintos mecanismos mencionados en la disminución. Aunque un mayor tamaño de poros es deseable, ya que favorece la invasión por parte del organismo *in vivo*, al introducir la macroporosidad en los cementos se reduce considerablemente su capacidad para resistir la penetración del agua en las fases iniciales de fraguado. Es por ello que, a pesar que el alginato de sodio pueda tener un cierto efecto negativo, el aumento de cohesión hace que este tipo de cemento pueda ser usado como pasta directamente *in vivo*.



5.5.3. Morfología de la porosidad

Los poros obtenidos son de morfología esférica con un tamaño entre $50\mu\text{m}$ y $300\mu\text{m}$. A pesar que no hay un consenso general sobre el tamaño óptimo para el desarrollo de tejido óseo, se considera el rango de las $100\text{-}400\mu\text{m}$ como el más indicado [3, 69–71]. Hulbert *et al.* obtuvieron crecimiento óseo en implantes de alúmina con un tamaño poro de $75\mu\text{m}$ [11], mientras que Itäla *et al.* mostraron que el tamaño mínimo de poro para que se produzca crecimiento óseo es de $50\mu\text{m}$ para el caso de placas finas de titanio (espesor $<1\text{mm}$) [12]. Por lo tanto, se estima que el tamaño de porosidad obtenido es suficiente para que se produzca el crecimiento óseo en su interior.

Sin embargo, el factor más importante es la interconexión de la porosidad y el tamaño de la misma. En las muestras analizadas, el grado de interconexión de la macroporosidad ha sido relativamente bajo, con un 10 % sobre el 59 % entre las $5\mu\text{m}$ y las $100\mu\text{m}$ con un pico central en el entorno de las $30\mu\text{m}$. Un posible motivo de la obtención de un valor tan bajo es que la superficie de las muestras analizadas no es macroporosa. Esto es posiblemente un efecto de la forma de fabricación de las muestras. Sin embargo, el interior muestra una macroporosidad más interconectada (Figura 5.19). El resultado reflejado en la porosimetría de mercurio sería el camino que se

encontraría el líquido al penetrar. El flujo de mercurio hacia el interior de la muestra se produce desde la superficie si dos poros están interconectados por una ventana mayor que la porosidad de su alrededor, esta interconexión se reflejará como de un tamaño menor. La medición de la interconectividad por porosimetría de mercurio puede mostrar un tamaño menor de la interconexión que otros métodos de medición. Por ejemplo el análisis de imagen de muestras escaneadas por μ CT analiza la interconexión de forma global y no el flujo entre poros desde la superficie de la muestra. Este tipo de análisis ha mostrado en estudios que los valores de interconexión son mayores que los encontrados por porosimetría de mercurio [72].

Sin embargo, los resultados aquí obtenidos muestran que las muestras poseen un nivel demasiado bajo de interconexión para poder ser usadas en Ingeniería de Tejidos *in vitro*, en un bioreactor, donde se requiere que la porosidad esté totalmente interconectada con un nivel de la tortuosidad bajo [73]. Aunque un mayor grado de interconexión sería deseable para favorecer una completa invasión de todo el implante *in vivo*, es previsible una mejor respuesta biológica debida a la presencia de la macroporosidad y al aumento de la actividad celular que se desarrollaría frente al de un cemento únicamente microporoso.

5.5.4. Inyectabilidad

Los resultados de inyectabilidad muestran la conservación de la macroporosidad después de que el cemento sea inyectado, sin pérdidas en los valores con respecto a los cementos no inyectados. Este resultado permitiría el uso de este tipo de CPC en técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas.

Uno de los factores importantes en este caso es el tiempo en el cual se inyecta el cemento. Tal como se observa en la Fig.5.14, a los 10 min la pasta espumada ha perdido su elasticidad, lo que se traduce en una destrucción de los macroporos. Se ha superado el tiempo el cual el cemento puede ser manipulado y los esfuerzos ejercidos durante la extrusión conllevan la pérdida de la estructura macroporosa.

En los cementos microporosos se observa que la inyectabilidad y la facilidad para moldear la pasta del cemento se ve reducida drásticamente después de su mezcla. Se define como *Dough Time* el tiempo a partir del cual se produce este descenso. Este tiempo es inferior al tiempo inicial de fraguado [74]. En los cementos microporosos, inyectar después de este tiempo conlleva el riesgo de no poder rellenar un defecto de cierto tamaño, teniéndose que volver a preparar otra vez cemento con las complicaciones que eso supone durante una operación. En el caso de los cementos macroporosos, el riesgo que se produce es la pérdida de gran parte de la macroestructura, aunque el cemento sigue siendo inyectable casi en su totalidad. Este aumento de la inyectabilidad es debido al descenso de la viscosidad de la espuma de cemento con respecto al cemento normal.

5.5.5. Estudio de la cinética de la reacción de fraguado

Uno de los efectos observados con la utilización del alginato de sodio es el hecho que se retrasa muy ligeramente la reacción de fraguado en los cementos de TP Fino (Figura 5.16 y Tabla 5.11). Es de suponer que también se producirá cierto retraso en la reacción de fraguado de los cementos de TP Grueso.

La observación por SEM a distintos tiempos de la reacción de fraguado se muestra en la Figura 5.17, donde se puede comparar la evolución de la transformación del α -TCP en CDHA. A las 24h, la transformación de las partículas de α -TCP en apatita se puede decir que es completa, no se observan partículas sin transformar, los cristales de apatita no son capaces de ocupar completamente el espacio que ocupaban las partículas de α -TCP. El pequeño retraso en la reacción de fraguado puede ser debido a la captura inicial de iones calcio por parte del alginato de sodio hasta la formación del gel reduciendo en los primeros estadios la concentración de saturación necesaria para la precipitación de la apatita. Al mismo tiempo este gel recubre las partículas de α -TCP dificultando la difusión de agua hacia las partículas de α -TCP. Sin embargo, se puede ver a las 2h la formación de cristales de apatita en ambos casos, por lo que ambos efectos sólo retrasan muy ligeramente la reacción de fraguado.

En el caso de cementos con una macroporosidad mayor que la obtenida aquí, la no estabilización de su estructura puede implicar un cierto colapso de la misma debido a la presión sanguínea (120 mmHg~16kPa) durante los instantes iniciales del fraguado. Este hecho se daría en cualquier tipo de cemento macroporoso, ya que si es introducido directamente después de fabricación la estructura sigue siendo muy poco estable y el mayor riesgo continua siendo la penetración del líquido entre las partículas, provocando su separación y por lo tanto la falta de cohesión de los cementos. En este segundo caso, la resistencia a la penetración de los líquidos por parte de los agentes de cohesión como el alginato de sodio es indispensable.

5.5.6. Resistencia a la compresión

La resistencia a la compresión de las muestras obtenidas varía entre 1,1MPa para un 65 % de Porosidad y 17MPa para un 51 % de Porosidad. El valor a la compresión para los CPC microporosos se sitúa entre los 25 y los 35 MPa. La adición de un 10 % de macroporosidad disminuye el valor a la compresión en un mínimo de 8MPa. A medida que va aumentando la macroporosidad esta disminución se hace mucho más drástica. Aunque es difícil hacer comparaciones entre los valores obtenidos por otros autores debido a la diferencia del tamaño de poro así como la geometría de la misma, los valores encontrados se sitúan en el mismo orden que el de otros autores. Así, del Real *et al.* obtienen valores de 1,2-1,6MPa para rangos de porosidad cercanos al 56 %, los valores para ese rango son superiores en nuestro caso a

5MPa [32]. Barralet *et al.* obtuvieron para valores de porosidad totales alrededor del 60 % unos 0,6MPa [40]. Xu *et al.* para un 30 % de macroporosidad un valor de 6.8 MPa [44].

El valor de la resistencia a la compresión del hueso trabecular está entre los 2-20 MPa [1, 75]. A pesar que los valores de resistencia a la compresión en los cementos de fosfato de calcio macroporosos desarrollados en este trabajo se encuentran en este rango, la mayor fragilidad de los mismos respecto al hueso trabecular hace que su uso esté indicado como relleno óseo en aplicaciones sin carga mecánica o en lugares donde la estabilidad mecánica del hueso esté asegurada por otros mecanismos.

5.6. Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron la viabilidad de obtener un cemento macroporoso mediante la mezcla de una pasta de cemento de fosfato de calcio con una espuma de albumen. Los valores de macroporosidad variaron entre el 10 y el 35 % en el rango estudiado para las distintas variables. La morfología de los poros era esférica con un tamaño entre $50\mu\text{m}$ y $300\mu\text{m}$, observándose también poros de mayor tamaño.

La macroporosidad obtenida dependió principalmente de la relación líquido-polvo, de la cantidad de agente espumante utilizado, así como de la adición de alginato de sodio a la fase líquida. No se observó ninguna variación estadísticamente significativa debida a los diferentes tamaños de partícula usados.

La adición de alginato de sodio a la fase líquida permitió obtener cementos macroporosos con cohesión inmediatamente después de su preparación, lo cual haría viable su uso clínico.

El uso de alginato de sodio retrasó ligeramente la reacción de fraguado en comparación con un cemento microporoso, sin efectos significativos sobre la viabilidad del mismo.

La inyectabilidad de las muestras fue excelente, conservándose la macroporosidad después del proceso de extrusión. Esto permitiría el uso de este tipo de cementos en operaciones de cirugía mínimamente invasivas. Sin embargo, un factor importante es el tiempo en el cual se inyecta el cemento.

La interconexión de las muestras fue baja para poder usar estos cementos como andamios para ingeniería de tejidos *in vitro*. Sin embargo, los valores de macroporosidad obtenidos hacen viable su uso *in vivo*.

Referencias

- [1] D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, C.X.F. Lam, K.C. Tan, and T.C. Lim. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1:245–260, 2007.
- [2] S.F. Hulbert, F.A. Young, R.S. Mathews, J.J. Klawitter, C.D. Talbert, and F.H. Stelling. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4:433–456, 1970.
- [3] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, and P. Hardouin. Porous ha ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(8):679–682, 2001.
- [4] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M.Neo, T. Kokubo, and T.Nakamura. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-ct based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 27:5892–5900, 2006.
- [5] M.Bohner and F. Baumgart. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials*, 25(17):3569–3582, 2004.
- [6] P. Ducheyne and Q. Qiu. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials*, 20(23-24):2287–2303, 1999.
- [7] E. P. Frankenburg, S. A. Goldstein, T. W. Bauer, S. A. Harris, and R. D. Poser. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, 80(8):1112–1124, 1998.
- [8] P. Kopylov. *Injectable Calcium Phosphate Bone Substitute In Distal Radial Fractures*. PhD thesis, Lund University Hospital, 2001.
- [9] G. Daculsi, O. Laboux, O. Malard, and P. Weiss. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 14(3):195–200, 2003.
- [10] S.F. Hulbert, J.J.Klawitter, F. A. Young, R. S. Mathews, C. D. Talbert, J. C. Morrison, J. C. Chapin, F. M. King, T. L. Bridges, and C.N. Wilson. Compatibility of bioceramics with physiological environment. *American Ceramic Society Bulletin*, 49(4):482, 1970.

-
- [11] S. F. Hulbert, S. F. Morrison, and J.J. Klawitter. Tissue responses to 3 ceramics of porous and nonporous structure. *American Ceramic Society Bulletin*, 50(9):790, 1971.
- [12] A.I. Itäla, H.O. Ylänen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, and H.T. Aro. Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, 58(6):679–683, 2001.
- [13] W. L. Gong, A. Abdelouas, and W. Lutze. Porous bioactive glass and glass-ceramics made by reaction sintering under pressure. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(3):320–327, 2001.
- [14] R. M. Pilliar, M. J. Filiaggi, J. D. Wells, M. D. Grynepas, and R. A. Kandel. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute applications: in vitro characterization. *Biomaterials*, 22(9):963–972, 2001.
- [15] P. Sepulveda. Gelcasting foams for porous ceramics. *American Ceramic Society Bulletin*, 76(10):61–65, 1997.
- [16] J. Tian and J. Tian. Preparation of porous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science*, 36(12):3061–3066, 2001.
- [17] A.R.Studart, U.T. Gonzenbach, E. Tervoort, and L.G.Gauckler. Processing routes to macroporous ceramics: a review. *Journal of the American Ceramic Society*, 86(6):1771–1789, 2006.
- [18] R. White, J. Weber, and E.J.White. *Science*, 176:922–924, 1972.
- [19] L.M. Rodríguez-Lorenzo and K. Gross. Calcium phosphate porous scaffolds from natural materials. *Key Engineering Materials*, 254-256:957–960, 2004.
- [20] P. Gonzalez, J.Serra, S.Liste, S.Chiussi, B.León, M Pérez-Amor, J. Martínez-Fernández, A.R. Arellano-López, and F.M. Varela-Feria. New biomorphic sic ceramics coated with bioactive glass for biomedical applications. *Biomaterials*, 24:4827–4832, 2003.
- [21] D. M. Liu. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 8(4):227–232, 1997.
- [22] O. Engin and A. C. Tas. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*, 19(13-14):2569–2572, 1999.
- [23] J. Vogel, P. Wange, and P. Hartmann. Phosphate glasses and glass-ceramics for medical applications. *Glastechnische Berichte-Glass Science and Technology*, 70(7):220–223, 1997.
-

- [24] S. Takagi and L. C. Chow. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 12(2):135–139, 2001.
- [25] M. Bohner, G.H. van Lenthe, S.Grunenfelder, W. Hirsiger, R.Evison, and R. Muller. Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials*, 26:6099–6105, 2005.
- [26] S. Deville, E. Saiz, and A.P. Tomsia. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27:5480–5489, 2006.
- [27] N.L. Porter, R.M. Pilliar, and M.D. Grypas. Fabrication of porous calcium polyphosphate implants by solid freeform fabrication: A study of processing parameters and in vitro degradation characteristics. *Journal of Biomedical Material Research*, 56:504–515, 2001.
- [28] T. M. G. Chu, J. W. Halloran, S. J. Hollister, and S. E. Feinberg. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(6):471–478, 2001.
- [29] E. Charriere, J. Lemaitre, and Ph Zysset. Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties. *Biomaterials*, 24(5):809–817, 2003.
- [30] H. Yuan, J.D. de Bruijn, X. Zhang, C. van Blitterswijk, and K.De Groot. Bone induction by porous glass ceramic made from bioglass(45S5). *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(3):270–276, 2001.
- [31] A. Almirall, G. Larrecq, J. A. Delgado, S. Martinez, J. A. Planell, and M. P. Ginebra. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials*, 25(17):3671–3680, 2004.
- [32] del Real, J. G. C. Wolke, M. Vallet-Regi, and J. A. Jansen. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 23(17):3673–3680, 2002.
- [33] P. Sepulveda, J.G. Binner, S.O. Rogero, O.Z. Higa, and J.C. Bressiani. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50(1):27–34, 2000.
- [34] P. Sepulveda, F.S. Ortega, M.D.M. Innocentini, and V.C. Pandolfelli. Properties of highly porous hydroxyapatite obtained by the gelcasting of foams. *Journal of the American Ceramic Society*, 83(12):3021–3024, 2000.

-
- [35] S. Padilla, J. Román, and M Vallet-Regí. Synthesis of porous hydroxyapatites by combination of gelcasting and foams burn out methods. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, pages 1193–1197, 2002.
- [36] C. Tuck and J. R. G. Evans. Porous ceramics prepared from aqueous foams. *Journal of Materials Science Letters*, 18(13):1003–1005, 1999.
- [37] P. Sepulveda, J. R. Jones, and L. L. Hench. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59(2):340–348, 2002.
- [38] J. R. Jones, L. M. Ehrenfried, and L. L. Hench. Optimising the strength of macroporous bioactive glass scaffolds. volume 254-256 of *Key Engineering Materials*, pages 981–984, 2004.
- [39] A. Almirall, G. Larrecq, J. A. Delgado, S. Martinez, M. P. Ginebra, and J. A. Planell. Fabrication of low temperature hydroxyapatite foams. *Bioceramics, Vol 16*, 254-2:1001–1004, 2004.
- [40] J. E. Barralet, L. Grover, T. Gaunt, A. J. Wright, and I. R. Gibson. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold. *Biomaterials*, 23(15):3063–3072, 2002.
- [41] H.H.K. Xu, J.B. Quinn, S. Takagi, L.C. Chow, and F.C. Eichmiller. Strong and macroporous calcium phosphate cement: effects of porosity and fiber reinforcement on mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57:457–466, 2001.
- [42] H.H. Xu, L.E. Carey, and C.G. Simon. Premixed macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18:1345–1353, 2007.
- [43] H. H. Xu and C. G. Simon Jr. Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: reinforcement and macropores and cell response. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 69(2):267–278, 2004.
- [44] Hockin H. K. Xu and Jr Simon. Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility. *Biomaterials*, 26(12):1337–1348, 2005.
- [45] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke, A.G. Mikos, and J.A. Jansen. Injectable plga microsphere/calcium phosphate cements: physical properties and degradation characteristics. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17:1057–1074, 2006.
-

- [46] D.P. Link, J. van Den Dolder, J.J. van Den Beucken, V.M. Cuijpers, J.G.C. Wolke, A. Mikos, and J.A. Jansen. Evaluation of the biocompatibility of calcium phosphate cement/plga microparticle composites. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87:760–769, 2008.
- [47] M. R. Porter. *Handbook of Surfactants*. Blackie Academic and Professional, second edition, 1994.
- [48] L.L. Schramm. *Emulsions, Foams and Suspensions*. 2005.
- [49] M. A. Bos and T. van Vliet. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(3):437–471, 2001.
- [50] Y.Mine. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science and Technology*, 6(7):225–232, 1995.
- [51] M. Hammershoj, A. Prins, and K.A. Qvist. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:859–868, 1999.
- [52] A. Almirall, J. A. Delgado, M. P. Ginebra, and J. A. Planell. Effect of albumen as protein-based foaming agent in a calcium phosphate bone cement. *Bioceramics, Vol 16*, 254-2:253–256, 2004.
- [53] A.Almirall. *Desarrollo y Caracterización de Cementos Óseos Macroporosos de Fosfato de Calcio*. PhD thesis, Instituto Superior Politécnico Jose Antonio Echevarría, La Habana, 2006.
- [54] J.F.Zayas. *Functionality of proteins in food*. Springer, 1997.
- [55] M.P. Ginebra, J.A. Delgado, A. Almirall, I. Harr, S. del Valle, and J.A. Planell. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(2):351–361, 2007.
- [56] M.P. Ginebra. *Calcium Phosphate Bone Cements. In Orthopaedic Bone Cements*. Woodhead Publishing, 2008.
- [57] S.V. Dorozhkin. Calcium orthophosphate cements for biomedical applications. *Journal of Materials Science*, 42:3028–3057, 2008.
- [58] Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, T. Toh, T.a Yuasa, M.Nagayama, and K. Suzuki. Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48(1):36–42, 1999.

-
- [59] J. Raghunath, H.J. Salacinski, K.M. Sales P.E. Butler, and A. M. Seifalian. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:503–509, 2005.
- [60] K. Ishikawa, Y. Miyamoto, M. Kon, M.Nagayama, and K. Asaoka. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials*, 16(7):527–532, 1995.
- [61] I. Khairoun, F. C. M. Driessens, M.G. Boltong, J.A. Planell, and R. Wenz. Addition of cohesion promoters to calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 20(4):393–398, 1999.
- [62] M.P. Ginebra. *Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en fosfato tricálcico-alfa para aplicaciones quirúrgicas*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya, 1996.
- [63] I. Khairoun, M.G. Boltong, F.C. Driessens, and J. A. Planell. Some factors controlling the injectability of calcium phosphate bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(8):425–428, 1998.
- [64] P.A.A.P. Marques, A.P. Serro, B.J. Saramago, A.C. Fernandes, M.C.F. Magalhaes, and R.N. Correia. Mineralisation of two phosphate ceramics in hbss: role of albumin. *Biomaterials*, 24(3):451–460, 2003.
- [65] P. A. Webb and C. Orr. *Analytical Methods in Fine Particle Technology*. 1997.
- [66] M.P. Ginebra, F.C. Driessens, and J.A. Planell. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*, 25(17):3453–3462, 2004.
- [67] J.C.Elliot. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier, first edition, 1994.
- [68] A.F. Lemos, J.D. Santos, and J.M.F. Ferreira. New method for the incorporation of soluble bioactive glasses to reinforce porous ha structures. volume 254-256 of *Key Engineering Materials*, pages 1033–1036, Porto and Portugal, 2004. Dept. of Ceramic Engineering and University of Aveiro and Campus de Santiago and 3810-193 Aveiro and Portugal, Trans Tech Publications Ltd.
- [69] R. Holmes and H. Hagler. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in maxillary augmentation - an histometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 16(5):199–205, 1988.
- [70] H. Yuan, K. Kurashina, J.D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, and X. Zhang. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20(19):1799–1806, 1999.
-

- [71] O. Gauthier, E. Goyenvalle, J. M. Bouler, J. Guicheux, P. Pilet, P. Weiss, and G. Daculsi. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(5):385–390, 2001.
- [72] J.R. Jones, G. Poologasundarampillai, R.C. Atwood, D. Bernard, and P.D. Lee. Non-destructive quantitative 3d analysis for the optimisation of tissue scaffolds. *Biomaterials*, 28(7):1404–1413, 2007.
- [73] T.S. Karande, J.L. Ong, and C.M. Agrawal. Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds design issues: Related to porosity and permeability and architecture and nutrient mixing. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(12):1728–1743, 2004.
- [74] S. Sarda, E. Fernandez, J. Llorens, S. Martinez, M. Nilsson, and J. A. Planell. Rheological properties of an apatitic bone cement during initial setting. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(10-12):905–909, 2001.
- [75] I. Proubasta, F.J. Gil, and J.A. Planell. *Fundamentos de biomecánica y biomateriales*. Ergorn, 1997.

Capítulo 6

Respuesta *In Vivo* de un cemento de fosfato de calcio macroporoso

6.1. Introducción

La prueba más relevante que se plantea siempre en el ámbito de los biomateriales es cual será la respuesta biológica en su uso clínico, si se comportarán de la forma prevista para la cual habían diseñados. Sin embargo, como un paso previo a los ensayos clínicos en humanos es necesario trabajar con modelos animales, que permitan evaluar la validez del nuevo producto y su comparación con productos ya existentes. A pesar de esto, la interpretación y extrapolación de los resultados obtenidos en animales no puede ir en ningún caso más allá de las limitaciones impuestas por el modelo animal escogido. Cualquier hallazgo deberá por lo tanto ser confrontado mediante estudios clínicos en humanos. Los modelos animales permiten sin embargo realizar screenings previos con más variables.

En cuanto a la elección del modelo animal, un aspecto a menudo considerado es la “cercanía evolutiva” del animal. Así, los resultados en primates tienden a ser considerados más relevantes que los obtenidos en ratas y éstos más que los obtenidos en embriones de pollo. Aunque esto no es necesariamente cierto. Las variaciones en las propiedades mecánicas de los huesos están más relacionadas con su función y su tamaño que con la “cercanía evolutiva” [1]. Es importante conocer y pensar en los diferentes niveles de organización: subcelular, celular, tejido, órgano, sistemas de órganos, todo el organismo y saber exactamente lo que se quiere evaluar para poder hacer un correcto diseño del experimento y elección del modelo animal más adecuado.

Cuando se implanta un biomaterial se han de evaluar tanto las interacciones a corto plazo entre el material y el tejido que lo rodea, particularmente la integración entre el implante y la interfaz con el huésped, como la respuesta

a largo plazo, abarcando aspectos como las prestaciones, la biodegradación y la posible citotoxicidad. El uso de materiales bioactivos hace todavía más complicado el análisis de los resultados.

La norma europea ISO-10993 sobre la evaluación biológica de los productos sanitarios proporciona una guía en la cual basarse para realizar los ensayos en animales. Sin embargo, la definición de un biomaterial es muy amplia. Algunos biomateriales son capaces de cumplir la función para la cual están diseñados en segundos y otros son implantados para durar toda la vida útil del paciente (¿10 años ó 70 años?). Por lo que, en este sentido, cabe preguntarse por ejemplo si el diseño de un experimento en animales con una duración de 6 meses es suficiente para obtener resultados relevantes sobre un implante o material destinado a permanecer en paciente toda su vida. Este tipo de cuestiones son las que también se han de tener en cuenta a la hora de diseñar un experimento con animales donde se quiere obtener la respuesta sobre la validación de un implante.

Otro aspecto a tener en cuenta en este sentido es si el modelo animal escogido es capaz de simular de forma razonable el caso en humanos, ya sea desde un punto de vista anatómico (lugar de implantación) o de la respuesta biológica. Por otra parte, los experimentos deben ser diseñados de forma que se minimice el número de animales, al mismo tiempo que se asegure que los resultados obtenidos sean estadísticamente relevantes [2].

En el Capítulo 1 de esta Tesis, se ha explicado el ámbito de aplicación de los Fosfatos de Calcio, especialmente de los Cementos de Fosfato de Calcio como materiales para la regeneración ósea. El hueso, tal como se ha comentado, es un material estructural auto-reparable, con la capacidad de adaptar su masa, forma y propiedades a cambios en los esfuerzos mecánicos y soportar la actividad física del día a día sin romperse. La estructura del hueso varía entre las diferentes especies y también durante las diferentes etapas de su desarrollo. En el hombre, el hueso remodelado consiste principalmente en hueso laminar. En animales con un crecimiento rápido como son perros y vacas, el hueso consiste principalmente en hueso fibroso. Los roedores, después de alcanzar la madurez, también poseen sistemas de Havers. El hueso de las ratas está compuesto principalmente por hueso laminar con fibras finas, posee remodelación trabecular pero no posee remodelación ósea intra-cortical [3].

Por todo ello, las diferencias en el fenotipo esquelético entre animales y hombres provocan variaciones en el crecimiento del tejido. Este aspecto se ha de tener en cuenta a la hora de escoger un modelo animal que sea apropiado junto al tipo de defecto, la edad del animal, el sitio anatómico, el tamaño de la lesión y el entorno micromecánico [4].

Los animales habituales en experimentación y recomendados por la norma ISO:10993-6 son ratas, ratones, cobayas, conejos, perros, ovejas, cabras y cerdos. El tipo de estudio a realizar determinará la especie animal a escoger. Por ejemplo, en los animales pequeños, debido a las limitacio-

nes de tamaño, sólo pueden evaluarse las propiedades estructurales de los huesos completos. En animales de mayor tamaño y en humanos, pueden evaluarse tanto las propiedades estructurales de huesos completos o sólo una parte de los mismos. En este sentido, la deformación de los huesos largos es relativamente constante entre especies, y los niveles de tensión durante la marcha dependen tanto del peso del animal como de las propiedades del tejido óseo [3]. Por ejemplo, diferentes estudios han revelado que el hueso en los perros posee un menor módulo pero una mayor deformación máxima en comparación con el hueso humano, y por lo tanto esto implica ciertas limitaciones si se quiere modelizar el comportamiento mecánico del tejido humano. Sin embargo, las deformaciones máximas y las velocidades de deformación entre diferentes especies son relativamente similares a pesar de las variaciones entre el tamaño y las funciones de los distintos huesos. El parámetro clave para determinar la masa y la morfología de los huesos no son los esfuerzos y deformaciones desarrolladas en actividades de máxima exigencia, sino las actividades repetitivas de menor magnitud y los esfuerzos de deformación más frecuentes. Estos son los dos factores más importantes, que tienen un papel en la arquitectura final de los huesos.

Todavía hoy, existe un gran desconocimiento del proceso de curación de los huesos a pesar de la gran cantidad de estudios realizados en animales. Debido a que en diferentes sitios anatómicos existen diferencias en los tejidos y en las cargas mecánicas no se puede asumir que el proceso de curación sea el mismo.

Otro aspecto importante durante el diseño de un experimento con animales es que la técnica quirúrgica escogida pueda ser aplicada en el modelo animal. Al mismo tiempo, el proceso de curación ha de replicar en la medida de lo posible el comportamiento humano. Así, muchos animales tienden a una curación espontánea incluso sin la necesidad de un injerto o un implante. Por lo tanto el modelo animal y el tipo de defecto aplicado no ha de tener una curación espontánea [3].

Si el objetivo del estudio o trabajo está encaminado hacia el estudio de las propiedades biomecánicas, los animales de mayor tamaño son los más adecuados. Sin embargo, estos animales son más caros tanto en su adquisición como en su manutención y requieren de un mayor espacio para su estabulación. A su vez, son más difíciles de operar y manipular. Si el estudio está enfocado a la obtención de una respuesta biológica, los animales de un menor tamaño son también válidos, con el consiguiente ahorro en el precio al mismo tiempo que su mayor velocidad de curación proporciona una gran cantidad de datos en los cuales basar los resultados obtenidos.

Los diferentes animales mencionados más arriba han sido usados para el estudio de factores de crecimiento, de implantes óseos y de los cambios macroscópicos/microscópicos después de su tratamiento. El conejo es uno de los modelos animales más pequeños que poseen huesos largos y una anatomía de la región lumbar similar a las de los humanos, y que también tiene sufi-

ciente cresta ilíaca para un autoinjerto, en el caso de que se quisiera utilizar como control. Las ratas y los ratones son los animales más usados en los laboratorios. Son animales con el coste más bajo, y no conllevan el impacto social de animales más grandes. Su corta esperanza de vida también facilita el estudio de los efectos del envejecimiento en el hueso y sus consecuencias en los implantes. Debido a la gran cantidad de estudios realizados en ellos, se conocen muchas propiedades de la velocidad de crecimiento del hueso y de la influencia de la dieta en el mismo. Sin embargo poseen otras desventajas biológicas como un limitado número de unidades celulares básicas en la remodelación ósea. Estudios largos así como la aplicación de diversas biopsias, o extracciones sanguíneas grandes también están limitadas en animales tan pequeños [3].

Existen en la literatura científica innumerables estudios *in vivo* sobre fosfatos de calcio y cerámicos para la regeneración de los huesos. Los diferentes estudios encontrados durante la realización de esta tesis no corresponden a una lista exhaustiva pero han ayudado a situar el estudio experimental en animales. En cuanto a los animales escogidos encontramos conejos [5–17], cabras [18–20], ovejas [21–24], perros [25–29] y ratas [17, 23, 30–34].

En algunos estudios, los fosfato de calcio no se han implantado en hueso sino ectópicamente en músculo. Estos estudios investigan las propiedades osteoinductivas de los fosfatos de calcio, miran las condiciones que los implantes han de reunir para poder inducir la diferenciación de células pluripotenciales en células óseas y obtener así la formación de tejido óseo en un entorno aislado del hueso como es el interior de los músculos [18, 20, 23, 28, 34]. A pesar de que este tipo de estudios son muy interesantes, se apartan del tipo de aplicación del cemento macroporoso fraguado *in vivo* ya que si no se implantara en un defecto óseo la macroporosidad se perdería debida a la acción muscular antes del fraguado del cemento.

En la literatura científica relacionada con la implantación de cementos macroporosos, se encuentran ejemplos de cementos prefraguados principalmente [5, 33, 35]. Estudios de cementos macroporosos inyectados *in vivo* pueden encontrarse en [36, 37]. La mayor parte de estudios de fosfatos de calcio *in vivo* son realizados con fosfatos obtenidos a alta temperatura en forma de partículas o implantes macroporosos [6, 7, 12–14, 16, 18, 20, 23, 25, 26, 28, 34].

De los estudios anteriores, la mayor parte de ellos son realizados en conejos. Como se ha comentado previamente la anatomía de los huesos largos de los conejos y la espina dorsal de los mismos guardan una gran similitud con la humana. Los huesos son relativamente delicados comparados con su masa muscular, de forma que su esqueleto representa sólo el 7-8 % de su peso, mientras que el músculo comprende más del 50 % del peso del cuerpo. Por ello, las fracturas, especialmente de tibia son un problema potencial. La región de interés en la mayoría de estudios es la porción distal del fémur [5–10, 12–16]. Éste posee una gran cantidad de irrigación sanguínea con abundante tejido óseo trabecular, lo que le da un gran poder osteogénico y

una buena respuesta a la osificación. Los conejos son animales relativamente pequeños y de fácil manejo y cuidado. Debido a las razones anteriormente mencionadas, numerosos estudios *in vivo* se realizan en conejos ya que son un modelo muy bueno para la evaluación de las propiedades biológicas si no se quieren evaluar las propiedades mecánicas de los implantes.

La normativa propone como lugar óptimo de colocación el fémur y la tibia del conejo. Las muestras de ensayo y los materiales de control deben implantarse en las mismas condiciones, sobre las mismas especies animales de igual sexo, edad y los lugares anatómicos correspondientes. El número y tamaño de los implantes varía en función del tamaño de la especie y la localización anatómica. Para los conejos según la normativa ISO-10993, los implantes deben ser cilíndricos con un diámetro no inferior a 2mm y 6mm de longitud. La mayoría de los estudios referenciados previamente practican un defecto óseo de 6mm de diámetro y de longitud variable. Este tipo de defecto en los conejos es un defecto crítico que no posee una capacidad de curación espontánea. Esto implica que la observación del proceso de curación es debido a los materiales implantados y no a los procesos de autocuración, tal como se ha comentado anteriormente.

Los períodos de ensayo se dividen en: estudios a corto plazo (menos de 12 semanas) y a largo plazo (más de 12 semanas), en función de la respuesta biológica esperada al final de estudio, la cual depende los materiales y del traumatismo quirúrgico. Según la normativa ISO-10993, los períodos mínimos de implantación requeridos para la observación en tejidos óseos suelen ser superiores a 12 semanas, llegando hasta las 104 semanas. Sin embargo, la respuesta biológica en el caso de los fosfatos de calcio en la mayoría de estudios en conejo recogidos en la literatura científica tienen un tiempo no superior a las 12 semanas pudiéndose observar ya en este periodo de tiempo una respuesta adecuada de los implantes.

6.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo es el estudio del comportamiento *in vivo* de un cemento de fosfato de calcio espumado en comparación con el mismo cemento sin espumar, en un modelo animal en fémur de conejo.

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Materiales

6.3.1.1. Cementos objeto del estudio

En esta parte de la tesis se procedió al estudio *in vivo* de dos cementos de fosfato de calcio. Los cementos estudiados fueron un cemento de fosfato de calcio microporoso y otro cemento de fosfato de calcio macroporoso.

Después del estudio del Capítulo 5 donde se optimizaron las diferentes variables para la obtención de un cemento macroporoso que pudiera ser usado bien como sustrato para ingeniería de tejidos o de una formulación que pudiera ser preparada *in situ* e inyectada, se escogieron dos formulaciones. Tal como se ha visto en el capítulo anterior, los cementos macroporosos que presentaban cohesión fueron aquellos que en la fase líquida contenían un 1 % de agente acelerante (Na_2HPO_4) y un 1 % de alginato de sodio. El hecho de que los cementos presenten cohesión, por un lado nos asegura que puedan ser implantados *in vivo* sin que se deshagan y puedan provocar una reacción inflamatoria [38], y al mismo tiempo nos asegura que se conserve la macroporosidad que proporciona el agente espumante. El tamaño de partícula escogido fue el tamaño fino, para favorecer una rápida reacción de fraguado y evitar un posible colapso de la estructura macroporosa.

Así el cemento microporoso implantado corresponde al código F-ALG-40 (Tamaño de Partícula Fino, Alginato de sodio en la fase líquida y relación líquido/polvo de 0.40ml/g) del Capítulo 5. Sin embargo, en el caso del cemento macroporoso se decidió aumentar la macroporosidad del implante mediante la adición de un 14 % en peso de albumen como agente espumante para poder aumentar la interconexión de los poros y favorecer por lo tanto una buena penetración del tejido óseo dentro del implante.

6.3.1.2. Esterilización de los materiales

Los cementos fueron todos preparados *in situ* en el quirófano bajo condiciones estériles. El polvo α -TCP fue esterilizado previamente mediante radiación γ a 25 kGrays. La fase acuosa compuesta de 1 % de (Na_2HPO_4) y 1 % de alginato de sodio fue preparada 24 h antes de la implantación bajo en campana de flujo laminar y filtrada previamente a su utilización a través de un filtro de $22\mu\text{m}$ (Millex GP Millipore).

El agente espumante o albumen fue preparado en las condiciones descritas en el Capítulo 5. La solución se preparó añadiendo el albumen deshidratado al agua destilada en una relación 1:7. Fue dejada 24h en la nevera para una completa hidratación del polvo. La esterilización de la solución se hizo como en el caso de la fase acuosa a través de un filtro de $22\mu\text{m}$ (Stericup-GP Millipore) con la ayuda de una bomba de vacío en condiciones de esterilidad bajo cabina de flujo laminar. Después del proceso de filtrado y esterilización las diferentes alícuotas preparadas fueron guardadas en

la nevera hasta su utilización. El proceso de esterilización eliminó parte del contenido en proteínas de la solución pasando del 14 % en peso al 8 % en peso determinado mediante un ensayo de BCA (ver Capítulo 3). A pesar de la pérdida en proteínas la solución resultante poseía una capacidad de espumado similar a la original lo que indica que en el filtrado se conservaron las proteínas espumantes del albumen.

La batidora fue limpiada dos veces con alcohol y recubierta con un paño estéril aislándola así de la zona de preparación de muestras para evitar una posible contaminación. Los elementos agitadores intercambiables usados fueron todos esterilizados mediante radiación γ a 25 kGrays. Estos elementos son los que realmente entran en contacto con la solución de albumen.

La balanza necesaria para poder pesar la cantidad de espuma de albumen necesaria para preparar correctamente el cemento macroporoso fue limpiada 2 veces antes de cada operación con alcohol y se separó el plato de pesado mediante un paño estéril considerándose así una zona limpia. En ningún momento los materiales utilizados para pesar estuvieron en contacto con una zona no limpia, evitando al máximo cualquier riesgo de infección.

El resto de elementos utilizados en la preparación de los cementos, como espátulas, vasos de precipitados, morteros, etc. fueron esterilizados en un autoclave disponible en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela en Lugo.

6.3.1.3. Caracterización de los cementos de fosfato de calcio implantados

Los materiales implantados *in vivo* fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de barrido y porosimetría de mercurio.

Los materiales empleados en la preparación de las muestras siguieron los mismos protocolos de esterilización que los utilizados en el estudio *in vivo* (ver sección 6.3.1.2).

Las muestras fueron preparados en las mismas condiciones que las utilizadas en quirófano. Los cementos fueron inyectados en moldes de teflón de 6mm de diámetro y 12 mm de altura. Los moldes fueron sumergidos inmediatamente en solución de Ringers a 37°C y mantenidos a esta temperatura durante 7 días. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron desmoldeadas y mantenidas a 37°C para su secado hasta su análisis.

6.3.1.3.1. Microscopía Electrónica de Barrido

La superficie de fractura de los cementos fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). El equipo utilizado fue un Jeol JSM-6400. Las muestras fueron recubiertas por una fina capa de oro para asegurar una buena conductividad.

6.3.1.3.2. Porosimetría de intrusión de mercurio

Para la determinación de la porosidad por intrusión de mercurio se utilizó un porosímetro Micromeritics Autopore IV 9500. El rango de interconexión de la porosidad que este equipo puede medir está entre 350 y 0,003 μm . En los análisis realizados, se utilizó para los cálculos una tensión superficial del mercurio de 485 dyne/cm y un ángulo de contacto de 130° y $\rho_{Hg} = 13,5335\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$. El rango de presiones varió entre 100 Pa a 200 MPa (0,015-30000 psia). El tiempo de equilibrado entre presiones fue de 30s. Se introdujeron un mínimo de 2 muestras en cada análisis. Se realizaron dos ensayos por tipo de muestra.

6.3.2. Animales

El estudio de la respuesta *in vivo* fue llevado a cabo en 36 conejas albinas adultas de la raza neozelandesa (*Oryctolagus cuniculus*). La media de edad de los animales fue de 8 meses y el peso medio alrededor de 5,5 kg. Se establecieron los siguientes grupos:

- Grupo I: Se implantó en 18 conejas el cemento microporoso en el cóndilo femoral distal de una pata y el cemento macroporoso en la otra pata.
- Grupo II: Se implantó en 18 conejas un biomaterial que no forma parte de este estudio en el cóndilo femoral distal de una pata y en el cóndilo de la otra pata se dejó el defecto cavitario practicado sin rellenar, considerándose éste como grupo de control.

6.3.2.1. Manejo de los animales

El estudio y manejo de los animales fue realizado de acuerdo a la Directiva de la Unión Europea para el Cuidado y Manejo de los Animales de Laboratorio y Experimentación recogidas bajo el código 86/609/CE.

6.3.2.2. Grupos de trabajo

Los tiempos de estudio fueron 1, 4 y 12 semanas tiempos a los que fueron sacrificados 6 animales de cada grupo anteriormente descrito. De este modo se obtuvieron 6 muestras de cada material y de cada tiempo de estudio.

6.3.3. Métodos

6.3.3.1. Realización de las operaciones

Las intervenciones de los animales fueron llevadas a cabo en el Hospital Clínico Veterinario Rof Codina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela en Lugo. Los doctores Fernando Muñoz y Antonio González realizaron las operaciones quirúrgicas asistidos de un equipo de veterinarios de la misma Facultad.

6.3.3.2. Protocolo Anestésico

Los conejos son animales que se estresan fácilmente, pudiendo producirse una parada respiratoria o cardíaca con la consiguiente muerte del animal. La recuperación de la anestesia es también lenta. El establecimiento de un adecuado protocolo anestésico y un especial cuidado y mantenimiento antes y después de la operación son importantes para evitar la muerte innecesaria de animales.

Los animales fueron mantenidos en ayuno de agua y comida durante un periodo de 12 horas previas a la operación para evitar vómitos durante el procedimiento quirúrgico. En la fase pre-anestesia se inyectó a los animales una combinación de medetomidina ($50\mu\text{g}/\text{kg}$ IM) y ketamina ($25\text{mg}/\text{kg}$ IM), que inducen pérdida de conocimiento, relajación muscular y analgesia. La inducción a la anestesia se realizó con isoflurano al 4 % mediante mascarilla a través de circuito anestésico semiabierto, el mantenimiento de este estado se llevó a cabo con isoflurano entre el 1,5 y el 3 %.

6.3.3.3. Técnica Quirúrgica

Tras la fase de pre-anestesia, se eliminó de la zona de incisión el pelo del animal mediante una esquiladora. Se desinfectó el área mediante alcohol y povidona yodada (Betadine). Se delimitó la zona de interés con un paño adhesivo fenestrado para evitar lesiones secundarias en la piel provocadas por las pinzas.

El abordaje quirúrgico de la porción distal del fémur se realizó primeramente mediante una incisión cutánea desde el tercio distal del fémur hasta la cresta tibial, y se seccionó el tejido subcutáneo hasta exponer la fascia lata. Se cortó la cápsula articular fibrosa y la fascia lata. Se separaron los músculos bíceps femoral y vasto lateral y tras esto se elevó mediante disección roma el músculo cuádriceps para exponer la porción distal del fémur [39].

El defecto cavitario se realizó mediante el uso de una fresa automática de odontología de 6mm de diámetro con irrigación. La velocidad de rotación del motor se mantuvo entre las 700 y las 1000 rpm para evitar un excesivo calentamiento de la zona que pudiera inducir necrosis. La irrigación de la zona para evitar el calentamiento fue externa e interna, la temperatura del suero no fue inferior a 20°C para evitar lisis celular por choque térmico. La profundidad del defecto fue de 8mm.

A continuación se inyectaron los cementos mediante el uso de una jeringuilla estéril de 5ml con un boquilla de 2mm de diámetro en la apertura hasta rebosamiento del cemento para asegurar un correcto llenado del defecto. En el caso de los controles se dejó el defecto cavitario vacío como control. Se escogió un tamaño del defecto de 6mm de diámetro ya que este tipo de defecto es crítico en conejos y no crece tejido óseo en su interior de forma espontánea [40], es decir no existe curación ósea.

Después de la eliminación del exceso de cemento inyectado, se procedió al cierre de la articulación con un material de sutura no reabsorbible. La razón es que el uso de materiales reabsorbibles puede producir en ocasiones efectos inflamatorios que pueden dificultar el análisis de posibles complicaciones debidas a los implantes. Los animales fueron mantenidos con oxígeno para una óptima recuperación de la anestesia.

En la Figura 6.1 se pueden observar diferentes fases de la operación e inyectado de un cemento en el defecto cavitario creado.

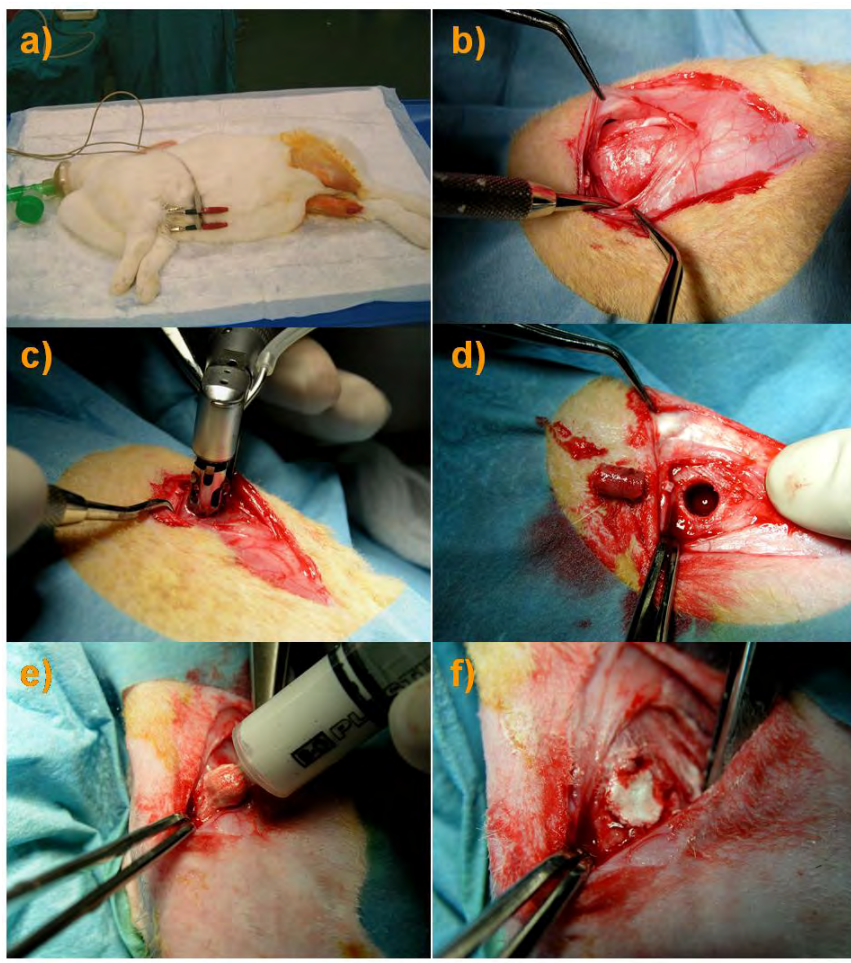


Figura 6.1: a) Imagen de una de las conejas tras la anestesia; b) Exposición del condilo femoral distal; c) Realización del defecto cavitario mediante la fresa de dentista; d) Imagen del defecto cavitario junto al trozo de hueso extraído; e) Inyección en exceso del cemento macroporoso en el defecto cavitario; f) Defecto cavitario después de haber sido rellenado y eliminado el exceso de cemento, después de esta fase se sutura la herida.

6.3.3.4. Evaluación postoperatoria, profilaxis y control

Una vez realizadas las operaciones, los animales fueron devueltos al estabulario. Se controló el consumo del agua y de la comida así como el de las heces. Se realizaron curas antisépticas en las heridas quirúrgicas observando el proceso de cicatrización y se inyectó enrofloxacina (15mg/kg) por vía subcutánea como terapia preventiva. No se observaron complicaciones derivadas de la operación en ningún animal, completando todos los individuos la fase experimental.

6.3.3.5. Protocolo de eutanasia

El sacrificio de los animales se realizó mediante inyección intravenosa de pentobarbital sódico a altas dosis. El procedimiento siguió los protocolos de manejo y sacrificio de animales.

6.3.3.6. Estudio radiológico

Se realizó un estudio radiológico de los fémures de los animales para evaluar los procesos de formación ósea así como de reabsorción. También se hizo una evaluación para ver si el material había migrado del sitio de implantación. El estudio fue realizado en la Unidad de Diagnóstico por Imagen del Hospital Clínico Veterinario Rof Codina. El equipo utilizado fue un generador trifásico Philips Super CP80, con una tensión máxima de 150kW y una intensidad máxima de 1000mA. El generador alimenta un tubo Philips SRO 33 100. La mesa de proyecciones es una mesa de telemando Philips Diagnost 90S con intensificador de imagen.

6.3.3.7. Preparación histológica de las muestras

El proceso de preparación de las muestras para histología pasa primero por la obtención de la muestra. Para ello se seccionó el tercio distal del femur con la ayuda de una sierra de autopsia.

Las muestras fueron procesadas siguiendo las técnicas de inclusión en metacrilato de Donath, realizando los siguientes pasos:

- Fijación: Los fragmentos óseos fueron introducidos en formol al 10 % durante 2 semanas
- Deshidratación: Se realizaron pases sucesivos bajo agitación continua en alcoholes de distinta concentración 70 %, 80 %, 96 % y dos pases al 100 %. Cada pase duró un tiempo total de tres días.
- Infiltración: Este paso consiste en incluir los fragmentos óseos en pases sucesivos de resina de glicometracrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) con un 1 % de peróxido de benzoino (BPO, Heraeus Kulzer GMBH, Werheim, Alemania) y alcohol. Las

concentraciones crecientes de resina fueron del 30 %, 50 %, 70 % y dos pases en resina pura. El último pase de resina se realizó en una cámara especial al vacío. La duración de cada pase como en el caso anterior fue de 3 días bajo agitación constante y en contenedores opacos para evitar la activación de la polimerización por acción de la luz.

- **Inclusión y polimerización:** Los fragmentos óseos fueron introducidos en moldes de polietileno rellenos con resina al 100 % bajo vacío. La polimerización se realizó en dos pasos. En el primero se utilizó una luz azul de baja intensidad durante 4 horas. Los moldes se mantuvieron por debajo de los 40°C para una completa polimerización de la resina en una cámara especial refrigerada (Exact 520-530, Exakt Apparatebau GmbH, Alemania). El segundo paso de polimerización se realiza con una luz azul de alta intensidad para poder polimerizar completamente el metacrilato incluido dentro de los tejidos. La duración de este paso es de 12 horas o más, dependiendo del grosor de las muestras. Después de estos dos pasos de polimerización permanecieron en la estufa a 37°C durante 24h más para terminar completamente el proceso de polimerización.
- **Conservación del paralelismo de los cortes a estudiar:** Después de la polimerización, se extrajo el bloque del molde de polietileno. Se realizó un corte de aproximación a la zona de interés con la ayuda de una sierra circular, a baja velocidad, e irrigando para evitar el sobrecalentamiento de la muestras. El bloque es adherido con una resina fotopolimerizable (Technovit 4000, Heraeus Kulzer GmbH, Werheim, Alemania) a una lámina acrílica con la ayuda de una prensa de precisión (equipada con una bomba de vacío y una lámpara para iniciar la polimerización) (Exakt 401-402, Exact Aparatebau GmbH, Werheim, Alemania). Este paso es necesario para garantizar el paralelismo de la superficie de corte con respecto al portaobjeto empleado.



Figura 6.2: Imágenes mostrando una muestra durante la preparación histológica. Izquierda: Imagen de bloque polimerizado después de extraer del molde y realizar corte de aproximación. Derecha: Bloque pegado a la lámina acrílica para asegurar paralelismo de los cortes histológicos.

- **Preparación de los cortes histológicos:** Una vez pegado el bloque se

pule la muestra por la superficie de interés con un papel abrasivo de carburo de silicio del número 1200. Tras este paso, la cara a estudiar se pega mediante una resina fotopolimerizable (Technovit 7210, Heraeus Kulzer GmbH, Werheim, Alemania) al portaobjetos definitivo con la ayuda de la prensa de fotopegado. Posteriormente mediante una sierra de banda (Exakt 400 System, Exakt Aparatebau GmbH, Hamburg, Alemania), se cortó una sección fina de 200 μm . Esta sección es pulida con papeles de carburo de silicio de números de 1200 y 4000 (Exakt-Micro Grinding System, Aparatebau GmbH, Hamburg, Alemania). Los cortes longitudinales finales son secciones longitudinales del cóndilo del fémur con un espesor aproximado de 70 μm .

- Tinción: Los cortes histológicos pertenecientes a cada uno de los animales fueron sometidos a la tinción de Tinción de Lévai-Lazkcó, según el procedimiento descrito a continuación:
 1. Sumergir la muestra en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % durante 5 minutos con movimiento constante.
 2. Lavar con agua corriente dos veces.
 3. Descalcificación de la superficie con ácido acético (CH_3COOH) durante 1 minuto.
 4. Lavar con agua corriente dos veces.
 5. Inmersión en la Solución A durante 20 minutos. La composición de la solución A es una parte de Azur II (Merck Art. No. 9211) al 1 % en agua destilada con una parte de Azul de metileno (Merck Art. No. 1283) al 1 % en agua destilada y dos partes de Na_2CO_3 al 1 % en agua destilada.
 6. Lavar con agua corriente dos veces.
 7. Sumergir en Pararosanilina (Sigma Art. No. 1528) al 1 % en agua destilada durante 5 segundos.
 8. Lavar con agua corriente y secado
- Finalmente se adhiere un cubreobjetos con adhesivo fotopolimerizable (Technovit 7210, Heraeus Kulzer GmbH, Werheim, Alemania) mediante presión (Exakt 401-402, Exact Aparatebau GmbH, Werheim, Alemania)

6.3.3.8. Análisis de la superficie de los implantes por Microscopía Electrónica de Barrido

Las muestras obtenidas para la observación histológica fueron observadas por Microscopía electrónica de Barrido. Esta técnica permite obtener

información estructural y analítica del hueso, de la interfaz entre los cementos y el hueso, así como observar los procesos de reabsorción del material. El equipo utilizado fue un LEO-435VP con Microanálisis (EDX Oxford 300) (Leica Microsystems, Cambridge, U.K.). Las preparaciones histológicas fueron recubiertas con una capa de oro para garantizar la conductividad.

Sin embargo, esta técnica no permite la observación de la reacción biológica alrededor del implante, como es la absorción celular (macrófagos, osteoblastos) así como la formación de osteoide al no ser un tejido calcificado, que si pueden ser observados por Microscopía Electrónica de Transmisión.

6.3.3.9. Análisis histomorfométrico

La histomorfometría ósea es el análisis histológico cuantitativo de los diferentes elementos que integran el tejido óseo. La cuantificación de la reabsorción del material así como de la formación de hueso se realizó mediante el análisis de las seis muestras obtenidas para cada uno de los grupos y tiempos de estudio mediante la tinción de Lévai Laczcó. Las imágenes fueron captadas mediante la ayuda de un microscopio óptico (Olympus CH30) equipado con una cámara digital (Olympus DP12). Las mediciones se realizaron directamente en pantalla con la ayuda de un software de visualización y medición (Olympus Micro Image 1.0 para Windows). Para poder realizar una valoración cuantitativa se definen una serie de parámetros histomorfométricos que han sido derivados de la nomenclatura del Comité de Nomenclatura Histomorfométrica tras la petición hecha por la Sociedad Americana para el Estudio del Hueso [38, 41]. A continuación se describen los diferentes parámetros histomorfométricos utilizados, y en las Figuras 6.3 y 6.4 se puede observar una descripción gráfica de los parámetros sobre imágenes aplicadas a implantes.

6.3.3.9.1. Parámetros histomorfométricos utilizados

- Área del implante (IA)(mm²): es la superficie del defecto óseo creado en la que se incluye el material, o permanece vacía como control.
- Volumen del tejido óseo (VTO)(%): representa la formación y reestructuración de las trabéculas óseas en la zona cercana al implante o al defecto creado en el caso del control. En este caso corresponde al hueso neoformado tanto en la zona cercana al implante como a la remodelación ósea que tiene lugar debido al trauma quirúrgico en las paredes del hueso receptor (0,5 mm alrededor de la sección del implante).
- Longitud total de osteoide (LTO): corresponde al borde de las trabéculas óseas que presentan frente de osteoide (hueso inmaduro no mineralizado) en el interior del defecto cavitario. Indica la cantidad de reborde trabecular en el cual se produce neoformación ósea. Se cuantifica en μm .

- Amplitud media de osteoide (AMO): es el grosor promedio de los distintos ribetes de osteoide que se encuentran presentes en el defecto óseo estudiado. Es un indicador indirecto de la actividad osteoblástica y se expresa en μm .
- Volumen de hueso neoformado (VHN)(%): representa el porcentaje de tejido óseo neoformado, en la sección ocupada por el implante. Se obtiene al multiplicar la longitud de osteoide por la amplitud de osteoide normalizada por el área del defecto cavitario creado.
- Porcentaje de Penetración del Tejido (PPT)(%): representa la profundidad de la penetración del tejido óseo en comparación con el radio del implante.
- Volumen de material no reabsorbido (VMNR)(%): es el porcentaje ocupado por los restos del material implantado sin reabsorber en los diferentes periodos estudiados.

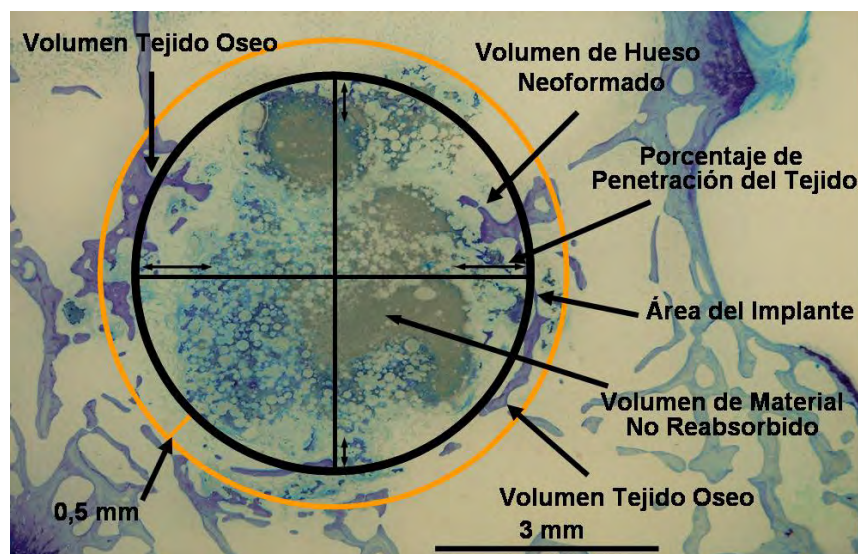


Figura 6.3: Imagen de microscopía óptica ilustrando distintos parámetros histomorfométricos.

6.3.3.10. Análisis histológico

El análisis histológico nos da una descripción sobre la respuesta del tejido óseo al implante. Se ha de detallar la posición del implante, la estructura ósea alrededor del implante, las respuestas adversas del tejido (caracterizado por la presencia de macrófagos, células inflamatorias, células gigantes e incluso tejido necrótico), la respuesta del tejido en la interfase y problemas relacionados con el implante en sí como fracturas o grietas. Es una imagen

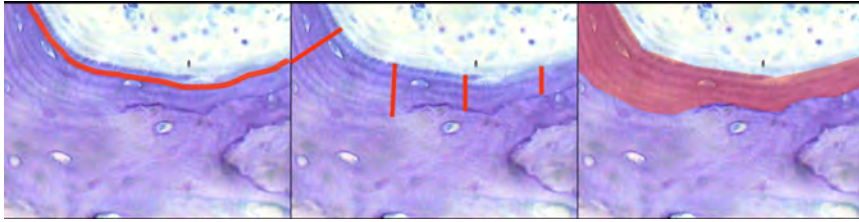


Figura 6.4: Imagen de microscopía óptica ilustrando los conceptos de longitud (Izquierda), amplitud (Centro) y área de (derecha) osteoide.

descriptiva de un momento del proceso biológico que está ocurriendo. El análisis histológico, como en el caso del análisis histomorfométrico, se realizó con cada uno de los 6 implantes de cada grupo y cada tiempo de estudio. El análisis histológico se realizó mediante el uso de microscopía óptica (Olympus CH30) acoplado a una cámara digital (Olympus DP12) , el aspecto macroscópico del implante se valoró con la ayuda de una lupa binocular (Olympus SZX9, óptica Olympus DFPLAPO 1x-2).

6.4. Resultados

6.4.1. Caracterización de los materiales implantados *in vitro*

La Figura 6.5 muestra dos imágenes de microscopía electrónica de barrido de los cementos tal como se obtienen en condiciones de laboratorio. Se pueden observar algunos macroporos dispersos en el cemento microporoso como consecuencia de algunas burbujas de aire atrapadas durante el proceso de mezcla. La imagen de la derecha muestra la alta macroporosidad del cemento con agente espumante.

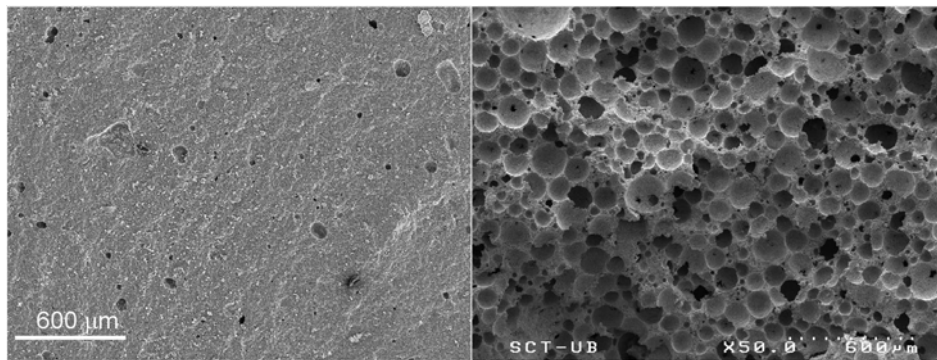


Figura 6.5: Imagen comparativa de la macroestructura de los cementos implantados. Izquierda: Cementos Microporoso. Imagen Derecha: Cemento Macroporoso

La Figura 6.6 muestra la distribución del tamaño de poro de los dos cementos implantados, mostrando como la porosidad en el caso del cemento microporoso está interconectada por debajo de los 100 nm mientras que la interconexión en el caso del cemento macroporoso muestra una distribución bimodal con un pico centrado principalmente en torno a las 40 μm , pero con interconexiones de mayor tamaño también correspondientes a la interconexión entre macroporos y un segundo pico centrado como en el caso del cemento microporoso por debajo de los 100nm correspondiente a la interconexión de poros entre los cristales de apatita.

6.4.2. Supervivencia de los animales

Uno de los resultados a tener en cuenta es la ausencia de complicaciones debidas a la cirugía. Un tamaño de 6mm de diámetro para el defecto cavitario es un defecto realmente grande para el tamaño de la porción distal del fémur. La cirugía en este caso debe ser realizada con sumo cuidado para emplazar el defecto en una zona bastante precisa y evitar posibles fracturas posteriores en las patas de los conejos. No murió ningún animal a lo largo del experimento, ni se observaron reacciones inflamatorias en las zonas de las cicatrices, tampoco se observaron fracturas en los animales.

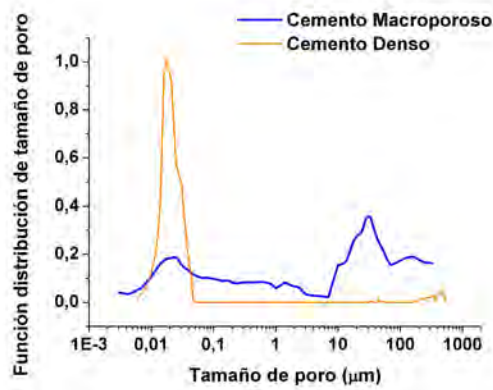


Figura 6.6: Porosimetría Comparativa de los Cementos Microporoso y Macroporoso implantados

6.4.3. Estudio radiológico

En la Figura 6.7 se muestran la evolución radiológica del control, del cemento microporoso y del cemento macroporoso en los distintos tiempos del estudio. Las imágenes corresponden a una vista latero-lateral de la parte distal del fémur.

Una de las primeras observaciones es la ausencia de fracturas o fisuras en ningún de los casos estudiados, a pesar del tamaño del defecto creado, tampoco la migración de los cementos fuera del sitio de implantación, ni procesos de osteolisis debido a los cementos.

En el caso del control, tal como se había comentado previamente, el defecto practicado es de tamaño crítico y no sufre ningún tipo de curación espontánea a lo largo del estudio como se aprecia en la radiografía a las 12 semanas. No se puede ver formación ósea en el interior del control aunque si cierta remodelación ósea en los bordes del defecto cavitario.

En el caso del cemento microporoso, se puede observar la mayor densidad del mismo con respecto al hueso circundante. El proceso de neoformación ósea empieza a las cuatro semanas y continua todavía a las 12 semanas. También existe cierta remodelación ósea al cabo de 12 semanas

En el caso del cemento macroporoso, se puede observar la menor densidad del material debida a la macroporosidad del cemento llegándose a confundir con el hueso que rodea al defecto cavitario. Se observan también ciertas zonas más densas en el centro del defecto cavitario. La formación ósea como en el caso del cemento microporoso empieza a las 4 semanas continuando a las 12 semanas. La remodelación ósea es mucho más pronunciada que en el caso del cemento microporoso.

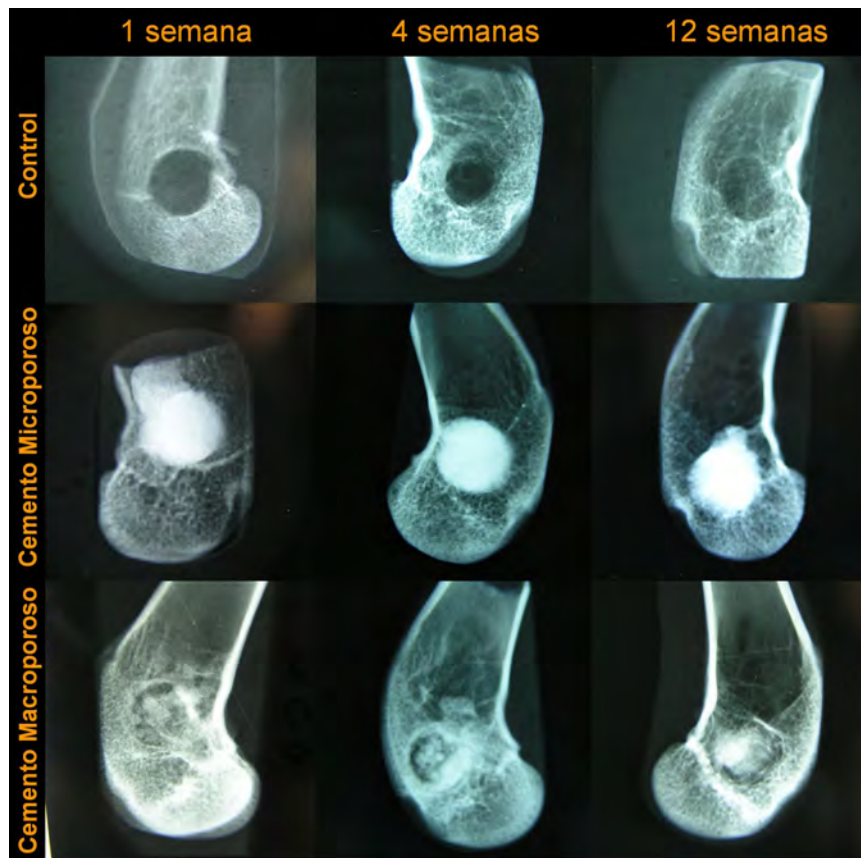


Figura 6.7: Evolución radiológica del Control, del Cemento Microporoso y del Cemento Macroporoso en los distintos puntos del estudio. Vistas latero-lateral de la parte distal del fémur

6.4.4. Estudio de microscopía electrónica de barrido

6.4.4.1. Control

La Fig.6.8 muestra la evolución del control a lo largo del estudio observado a través de microscopía electrónica de barrido.

Se puede apreciar en la imagen correspondiente a la primera semana el defecto cavitario creado. Aparecen pequeñas áreas trabeculares en el borde del defecto, correspondientes a una pequeña proporción de hueso nuevo.

Al cabo de 4 semanas se ha producido cierta remodelación ósea, como se ve en la zonas laterales de la imagen. En la parte superior e inferior ha crecido hueso inmaduro que se observa junto a la zona de formación del cartílago, una zona donde se produce una mayor actividad celular.

A las 12 semanas, no se observa la formación de hueso inmaduro, como a las 4 semanas. En este caso el defecto practicado estaba más alejado de la zona del cartílago. El defecto cavitario creado no se ha curado espontáneamente, el hueso que se observa alrededor del mismo parece hueso maduro, lo

que evidencia que el proceso de remodelación ósea ha finalizado.

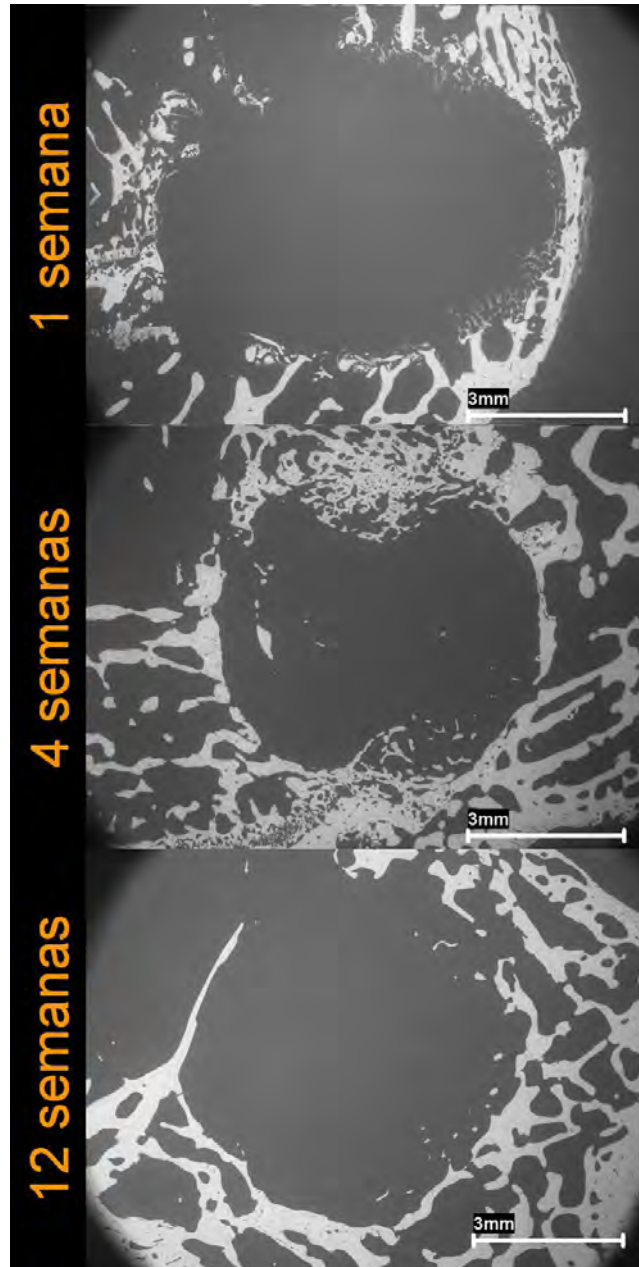


Figura 6.8: Imágenes de microscopía electrónica de barrido del control a los distintos tiempos del estudio

6.4.4.2. Cemento microporoso

En la Fig. 6.9 se muestran las imágenes de microscopía electrónica de barrido de la progresión del cemento microporoso.

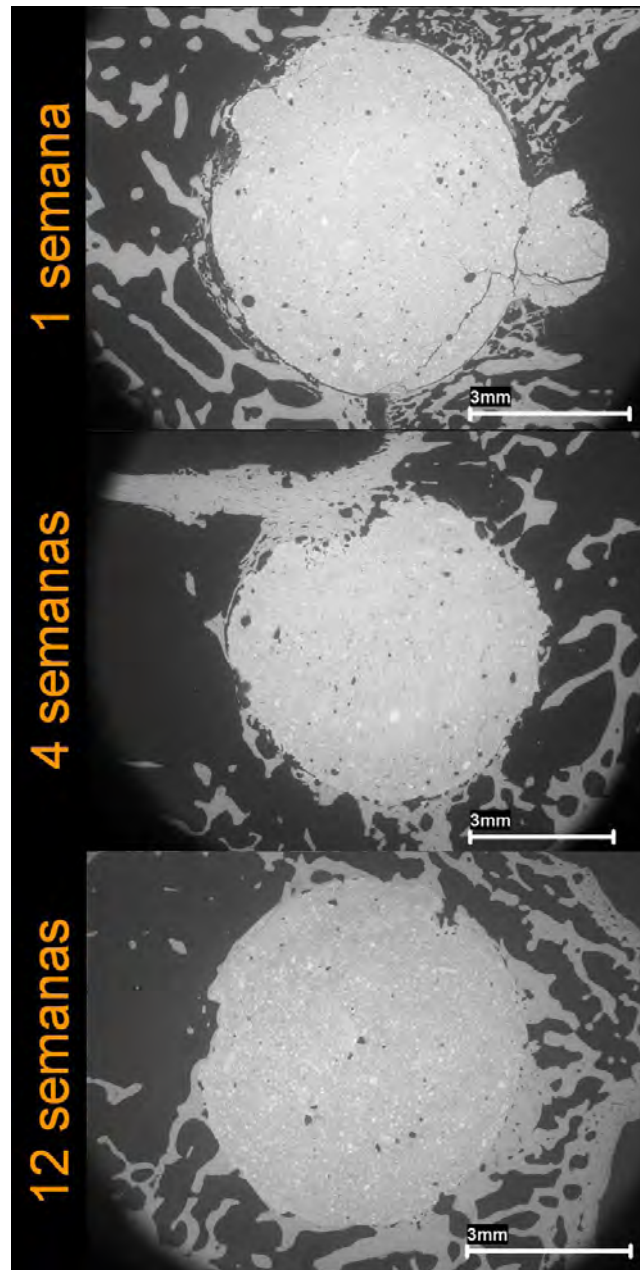


Figura 6.9: Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento microporoso a los distintos tiempos del estudio

A nivel cualitativo se puede observar que el cemento microporoso no ha sufrido una reabsorción importante durante el tiempo del estudio. El cemento

rellena el defecto cavitario en su totalidad. Se puede incluso observar en la primera imagen cómo rellena parte del espacio medular que ha sido perforado durante la operación.

Durante la primera semana se puede apreciar que existe una respuesta del hueso receptor en la zona de la interfase, principalmente a la izquierda de la imagen, donde se observa la aparición de hueso nuevo como respuesta al implante, mostrando el carácter osteogénico del mismo.

Según avanza el estudio, se observa que el hueso crece directamente sobre toda la superficie del implante, estableciéndose una unión directa con el mismo, tal como se observa a las 4 semanas, sin existir una zona de interfase.

A las doce semanas, se puede apreciar la unión directa entre el cemento y el hueso. La morfología del hueso es la de un hueso maduro, tal como se puede observar en la Fig.6.10, mostrando así la remodelación ósea que ha tenido lugar. Debido a la lenta reabsorción del cemento microporoso, no se puede apreciar unas 5 micras de espesor entre el hueso y el implante que corresponde a la formación de una capa de apatita sobre la superficie del cemento microporoso, como ocurre en materiales bioactivos [42–44].

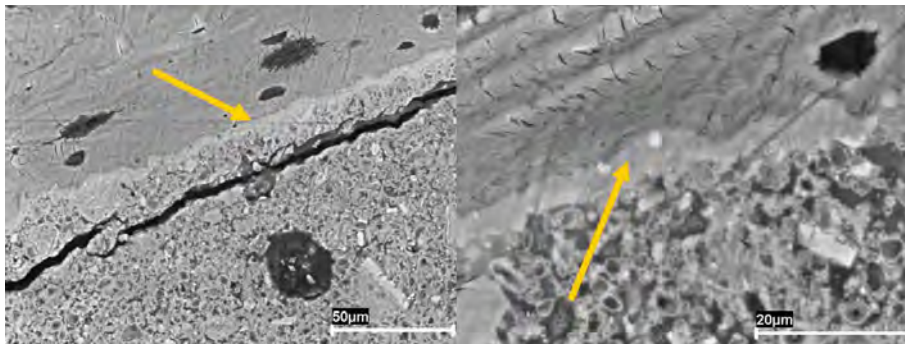


Figura 6.10: Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento microporoso a las 12 semanas. Imagen izquierda: Detalle de la zona de unión entre el implante y el hueso. Imagen derecha: ampliación de la zona de unión mostrando la capa de apatita formada en la superficie del cemento microporoso

6.4.4.3. Cemento macroporoso

La evolución del cemento macroporoso se puede observar en la Fig. 6.11. En la sección 6.4.3 se ha comentado que la menor densidad del cemento macroporoso observada por Rayos X era debida a la macroporosidad, hecho confirmado por las imágenes de microscopía.

En la primera imagen, se observa como el cemento macroporoso ocupa el defecto cavitario creado. Incluso fluye fuera de él, como se ha observado también para el cemento microporoso (ver Figura 6.9). El cemento conserva la porosidad después de ser inyectado e implantado, mostrando así la posibilidad del uso *in vivo* de cementos espumados. Existe también una rá-

pidia respuesta del tejido óseo que rodea al cemento, mostrando el carácter osteogénico.

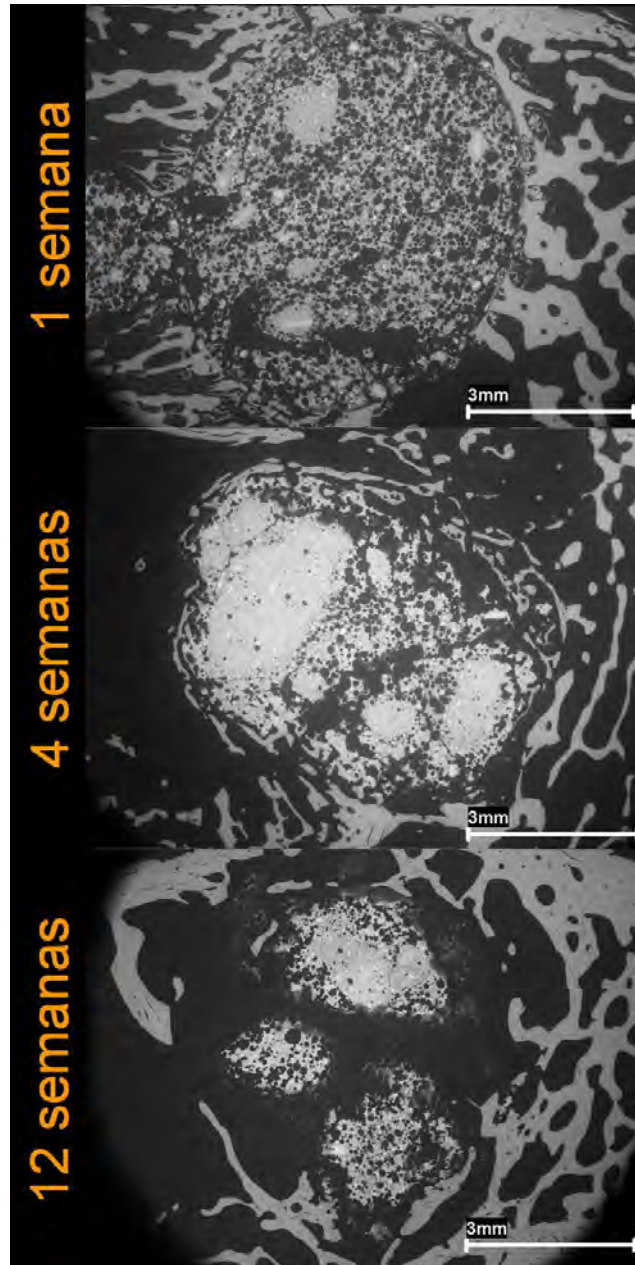


Figura 6.11: Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento macroporoso a los distintos tiempos del estudio

A las 4 semanas se observa una rápida reabsorción del implante y la formación de hueso nuevo inmaduro. En esta imagen se observan dos grandes zonas densas y una zona central más porosa, mostrando que ciertos implantes

presentaban una cierta heterogeneidad. La reabsorción del implante se ha producido de forma centrípeta. Se puede observar la penetración del tejido óseo en ciertas zonas donde el implante ha empezado a reabsorberse (zona inferior izquierda), habiendo una unión directa entre el implante y el hueso. También se pueden observar zonas donde existe una separación entre el tejido óseo y el implante (zona superior derecha).

La rápida reabsorción del implante es patente a las 12 semanas donde en este caso sólo se observan tres zonas del cemento, una de ellas correspondientes a una zona más densa, mostrando otra vez la heterogeneidad de ciertas partes. Esta imagen confirma el crecimiento centrípeta del hueso y al mismo tiempo que la velocidad de crecimiento del hueso es inferior a la de la reabsorción del implante. Sin embargo, en la zona de unión entre el cemento macroporoso y el hueso no se pudo observar una zona más clara entre ambas fases, existiendo una unión directa (Fig.6.12)

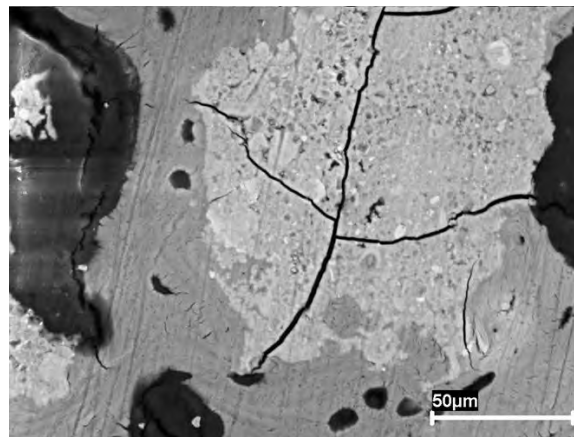


Figura 6.12: Imágenes de microscopía electrónica de barrido del cemento macroporoso a las 12 semanas mostrando la unión directa entre el cemento y el hueso

6.4.5. Resultados de Histomorfometría

En la Tabla 6.1 y en la Tabla 6.2 se recogen los resultados de las medidas histomorfométricas. Los datos han sido representados a continuación para obtener una mejor evaluación y comparación de los diferentes parámetros histomorfométricos.

Tabla 6.1: Resultados de Histomorfometría. Cuantificación de la osteogenesis del Control.

	Control		
Semana	1	4	12
AI(mm ²)	28,27±0,0	28,27±0,0	28,27±0,0
VTO(%)	9,39±0,92	11,65±0,75	14,37±0,59
LO(μm)	0	0	0
AO(μm)	0	0	0
VHN(%)	0	0	0
PPT(%)	0	0	0
VMNR(%)	0	0	0

Tabla 6.2: Resultados de Histomorfometría. Cuantificación de la osteogenesis y la reabsorción del cemento microporoso y del cemento macroporoso.

	.9 Cemento Microporoso		Cemento Macroporoso			
Semana	1	4	12	1	4	12
IA(mm ²)	28,27±0,0	28,27±0,0	28,27±0,0	28,27±0,0	28,27±0,0	28,27±0,0
VTO(%)	13,72±1,42	13,76±1,42	14,15±1,50	13,00±0,26	14,23±1,49	16,66±1,70
LO(μm)	0	7835±1276	11437±1097	0	9214±1135	12050±1352
AO(μm)	0	5,17±1,26	5,97±1,59	0	5,33±0,06	6,31±1,53
VHN(%)	0	0,14±0,09	0,18±0,06	0	0,17±0,05	0,27±0,06
PPT(%)	0	17,66±0,95	22,33±1,23	0	30,33±1,33	40,66±3,02
VRMN(%)	100	97,87±5,47	96,32±5,55	100	44,18±4,20	31,97±3,36

En la Figura 6.13 se puede observar la evolución del Volumen del Tejido Óseo (VTO) y del Volumen de Hueso Neoformado (VHN). El Volumen del Tejido Óseo representa la formación y reestructuración de las trabéculas óseas en la zona cercana al implante o al defecto creado en el caso del control. La actividad de esta zona es superior en el caso de los cementos al control desde la primera semana. La presencia de los cementos de fosfatos de calcio estimula la regeneración por encima de la curación espontánea del defecto. Al final del periodo de estudio los valores alcanzados son similares en todos

los casos sin observarse un aumento significativo del valor final, mostrando que al final del estudio ya se ha finalizado el proceso de remodelación ósea en esta zona.

El Volumen de Hueso Neoformado representa la formación de tejido óseo en el interior de la zona del implante. En el caso de control, este parámetro no evoluciona de acuerdo con lo observado anteriormente, permaneciendo constante durante el estudio. Para el caso de los cementos el valor al cabo de 4 semanas es superior para el cemento macroporoso sin observarse diferencias estadísticamente significativas, pero se produce un estancamiento en la cantidad de hueso neoformado para el caso del cemento microporoso a las 12 semanas con respecto al cemento macroporoso, donde las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas.

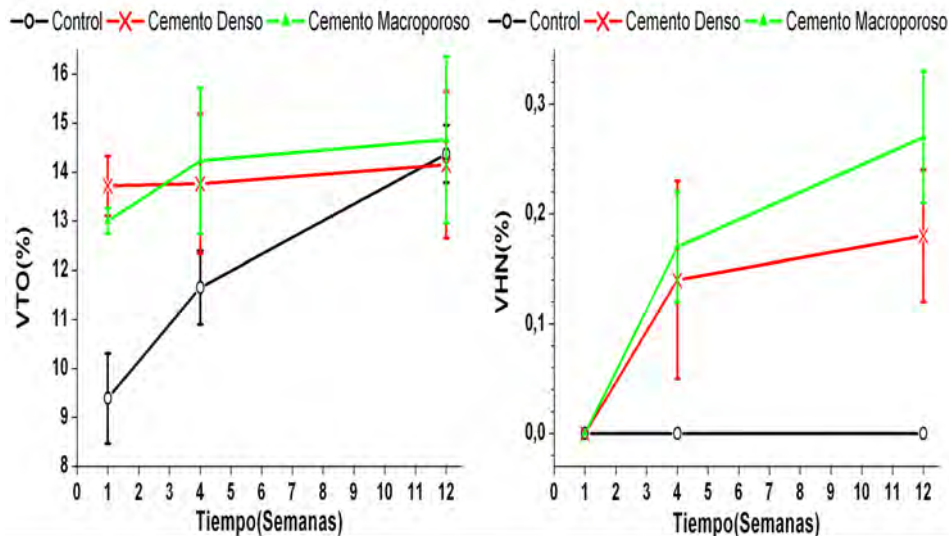


Figura 6.13: Evolución del Volumen de Tejido Óseo y del Volumen de Hueso Neoformado en el Control y los Cementos Microporoso y Macroporoso

La Figura 6.14 muestra la evolución de la Longitud Total de Osteoide (LTO) y de la Amplitud Media de Osteoide (AMO). Los valores obtenidos a lo largo del estudio para ambos cementos son muy similares, no habiendo diferencias estadísticamente significativas. En el caso del control no se produce una evolución de este parámetro a lo largo del estudio, mostrando de forma cuantitativa la ausencia de curación espontánea del defecto óseo.

La evolución del Porcentaje de Penetración del Tejido (PPT) sigue la tendencia observada en la evolución del Volumen de Hueso Neoformado (VHN). Las diferencias observadas entre el cemento macroporoso y el cemento microporoso son estadísticamente significativas. Ambos parámetros se ven influenciados en el caso del cemento macroporoso por un crecimiento en el interior del implante debido a la macroporosidad, así como a una mayor reabsorción del material tal como refleja el parámetro de Volumen

de Material no Reabsorbido (VMNR) en la Figura 6.15. La reabsorción del cemento macroporoso llega casi al 70 % después de 12 semanas mientras que el cemento microporoso experimenta una reabsorción inferior al 10 %. La lenta reabsorción implica la ausencia de un mayor crecimiento óseo al estar el defecto invadido todavía por el cemento microporoso.

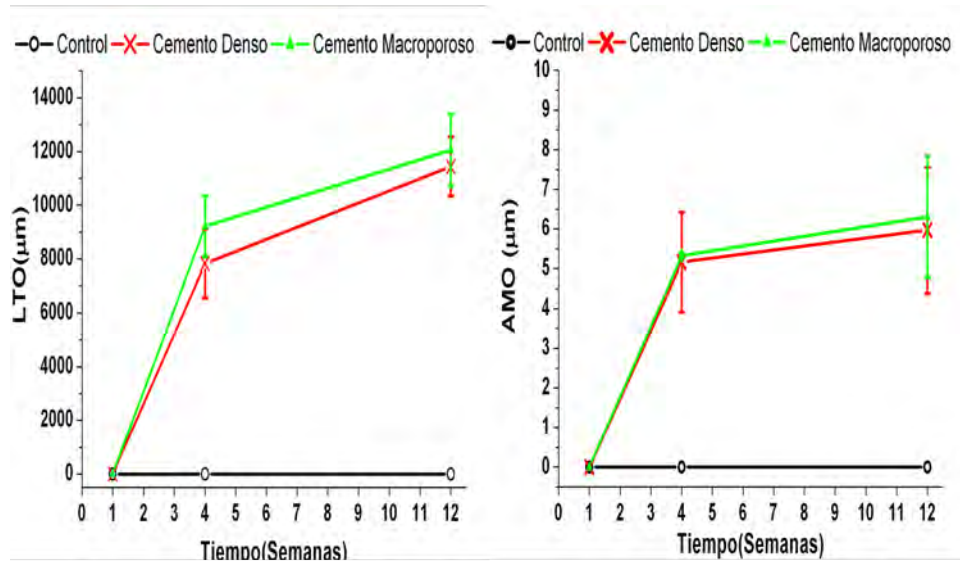


Figura 6.14: Evolución de la Longitud Total de Osteoide y de la Amplitud Media de Osteoide en los Cementos Microporoso y Macroporoso

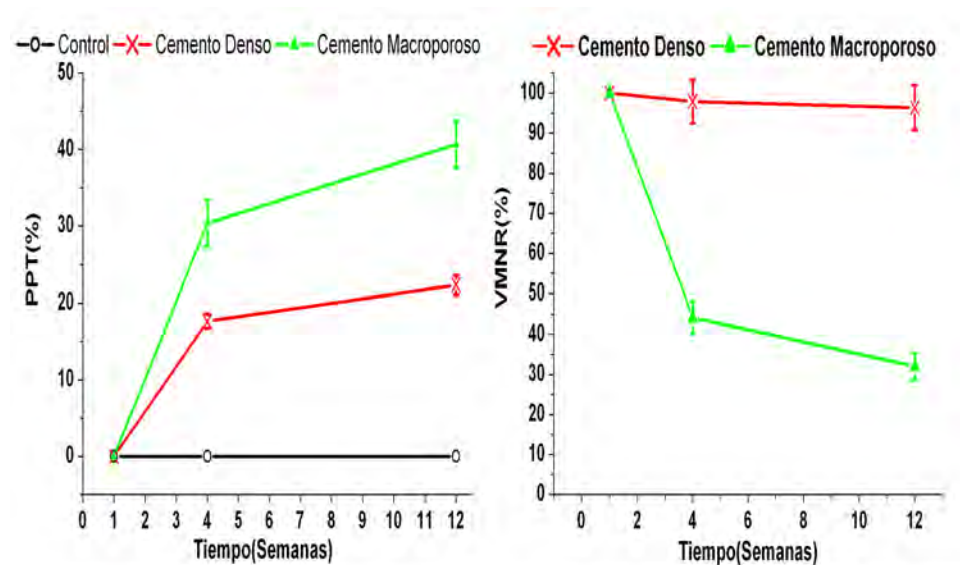


Figura 6.15: Evolución del Porcentaje de Penetración del Tejido y del Volumen de Material No Reabsorbido en los Cementos Microporoso y Macroporoso

6.4.6. Resultados de Histología

6.4.6.1. Control

El análisis macroscópico del control muestra la falta de curación espontánea en el interior del defecto cavitario a lo largo del estudio tal como se puede observar en la Figura 6.16. El círculo rojo representa de forma aproximada el área del defecto creado.

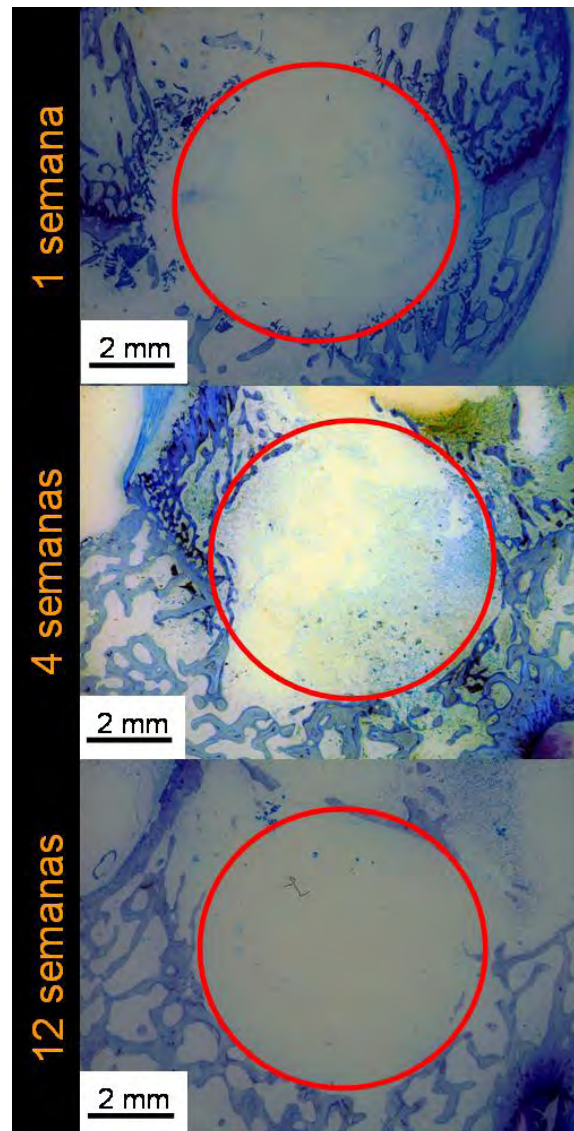


Figura 6.16: Evolución Macroscópica del Control. (Microscopía estereoscópica, tinción de Lévai-Lazckó).

En la primera semana se produce un proceso de reabsorción-remodelación ósea que sigue presente a las 4 semanas, con abundante actividad osteoblás-

tica y osteoclástica, tal como se puede observar en el borde del defecto por la aparición de hueso inmaduro caracterizado por trabéculas de un menor tamaño y una estructura más desordenada. El hueso inmaduro adquiere una coloración más intensa que el hueso receptor durante la tinción. A las 12 semanas, el proceso de remodelación ha finalizado, y ya no se observa tejido osteoide nuevo.

6.4.6.2. Cemento microporoso

La Figura 6.17 muestra la evolución macroscópica del cemento microporoso a lo largo del estudio. El cemento rellena el defecto cavitario durante el proceso de inyección, mostrando su maleabilidad y adaptación al defecto óseo.

Se observa la formación de hueso inmaduro a partir de la primera semana en la zona de interfase cercana al implante. A las cuatro y doce semanas se puede observar que el tejido óseo crece en contacto directo con la superficie del cemento. Se ha formado tejido óseo casi en la totalidad del implante, rodeándolo en la totalidad de su perímetro. La reabsorción del material es muy lenta, tal como ha sido observado en el estudio por microscopía electrónica de barrido y la cuantificación histomorfométrica. Este proceso lento de reabsorción implica que el hueso que se formará seguirá el proceso de reabsorción paulatinamente, sin embargo serían necesarios estudios a más largo plazo para evaluar si el proceso es continuo o sufre un estancamiento.

El estudio microscópico demostró la ausencia de reacción inflamatoria tras la implantación del cemento, signo de la alta biocompatibilidad del cemento. Sin embargo, es posible observar una clara zona de interfase entre el cemento microporoso y el tejido óseo que lo rodea tal como muestra la Figura 6.18. No hay crecimiento de hueso pero se empieza a observar cierta remodelación ósea en la imagen izquierda. En la imagen derecha se puede ver la separación entre el hueso y el cemento microporoso.

A las cuatro semanas se puede observar como el hueso crece en contacto directo sobre el cemento microporoso. En la Figura 6.19 se muestran dos ejemplos distintos. En la imagen de la izquierda se observa la formación de un vaso sanguíneo en la zona de interfase.

La Figura 6.20 muestra otra zona donde se observa la zona de degradación del cemento microporoso a las 4 semanas. Se pueden observar en la imagen osteoblastos activos en la superficie del hueso nuevo, la formación de un vaso sanguíneo y la presencia de macrófagos en la zona de degradación del cemento. La presencia de macrófagos sin embargo no está asociada a una respuesta inflamatoria.

La Figura 6.21 muestra a las 12 semanas la formación de numerosos vasos sanguíneos en la superficie del cemento microporoso, así como la progresión del tejido óseo neoformado y la presencia de abundante osteoide, que va penetrando en el cemento. Se puede observar una zona de degradación del

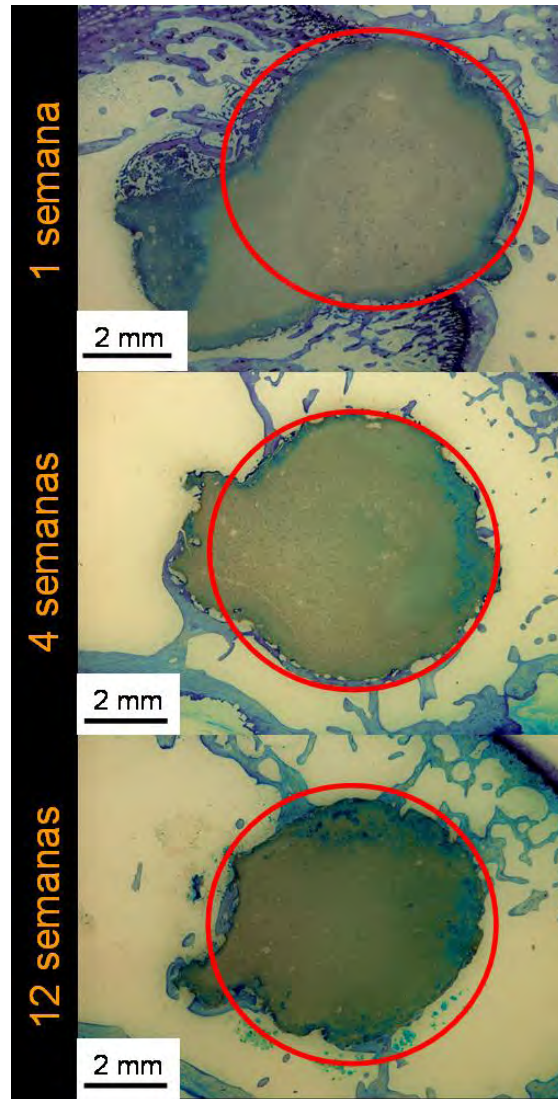


Figura 6.17: Evolución Macroscópica del cemento microporoso (Microscopía estereoscópica, tinción de Lévai-Lazckó).

cemento, pero sólo en superficie y no en el seno del cemento, evidenciando de esta forma el lento proceso de reabsorción tal como se ha podido constatar por histomorfometría.

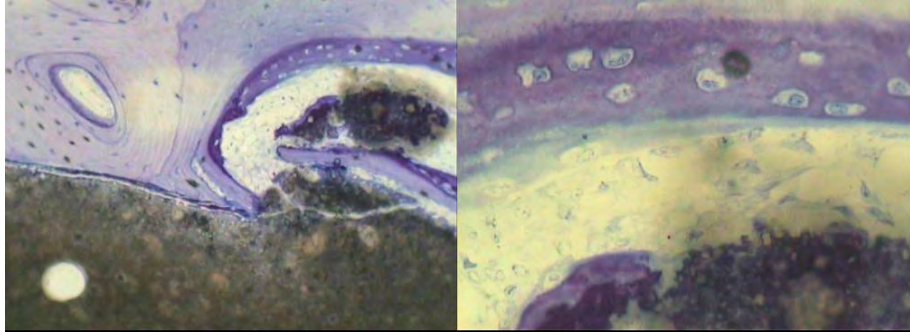


Figura 6.18: Imagen izquierda: Interfase entre el cemento microporoso y el hueso en la primera semana del estudio (Microscopía óptica 10x, tinción de Lévai-Lazckó). Imagen derecha: Aumento de la imagen anterior donde se puede apreciar la separación entre cemento y hueso (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).

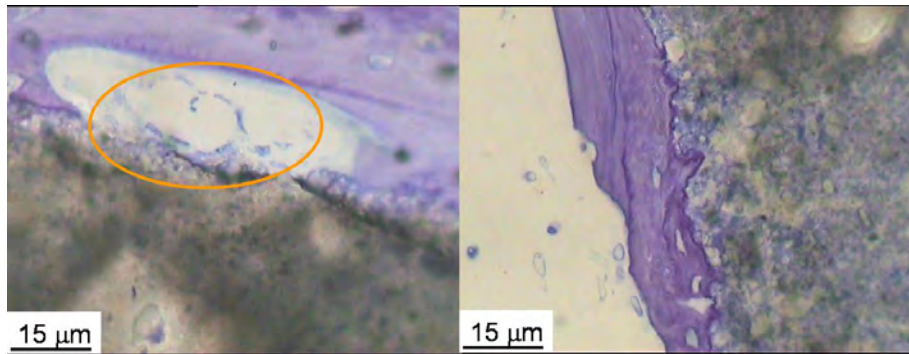


Figura 6.19: Imagen izquierda: Interfase entre el cemento microporoso y el hueso a las cuatro semanas del estudio, la elipse indica la formación de un vaso sanguíneo en la zona de interfase (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó). Imagen derecha: Interfase hueso-implante (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó). En ambas imágenes se observa la unión directa entre el cemento y el hueso.

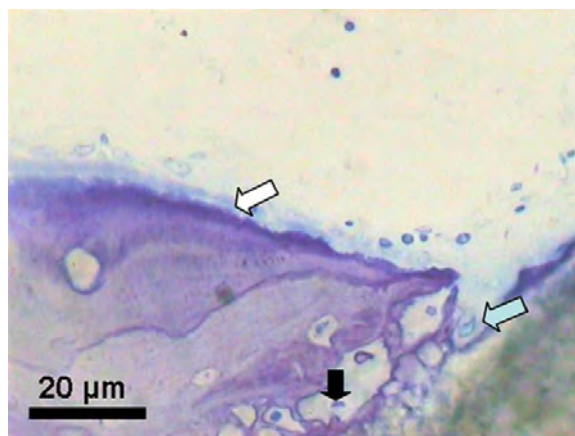


Figura 6.20: Interfase entre el cemento microporoso y el hueso a las cuatro semanas del estudio. La flecha blanca señala osteoblastos en la superficie del hueso nuevo. La flecha negra la formación de un vaso sanguíneo. La flecha azul la presencia de macrófagos. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).

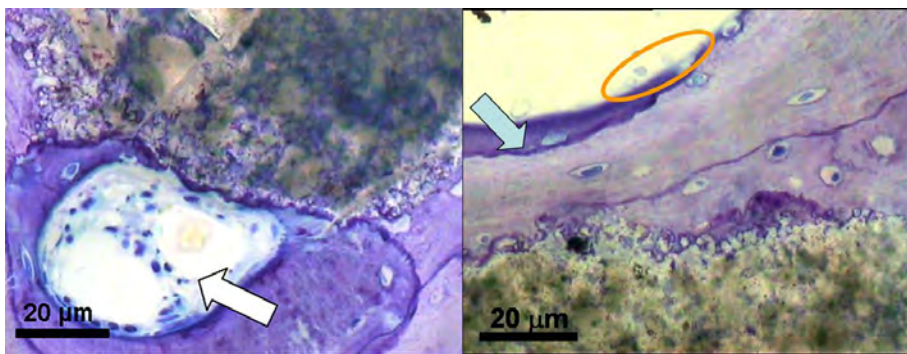


Figura 6.21: Imagen izquierda: Interfase cemento-hueso donde se observa la formación de un vaso sanguíneo (flecha blanca) y la unión directa del hueso con el implante. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó). En la imagen derecha se puede ver la interfase entre cemento y hueso. Se distingue claramente un ribete de osteoide (flecha azul) y la presencia de osteoblastos (elipse) y de osteocitos. (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).

6.4.6.3. Cemento macroporoso

La Figura 6.22 muestra la evolución macroscópica del cemento macroporoso a lo largo del estudio.

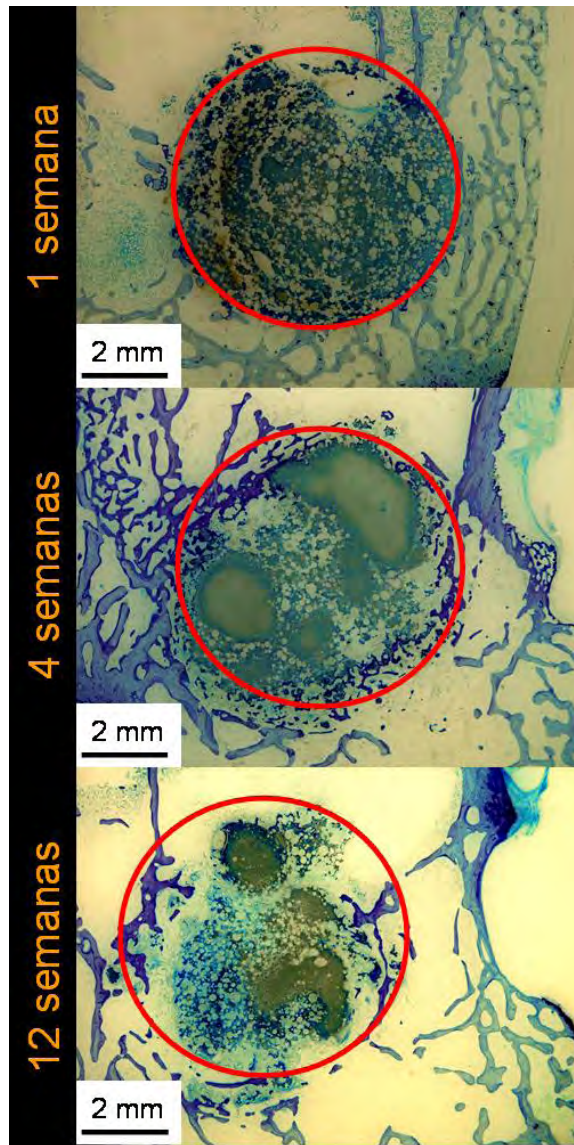


Figura 6.22: Evolución Macroscópica del Cemento Macroporoso (Microscopía estereoscópica, tinción de Lévai-Lazckó).

El cemento macroporoso, al igual que el cemento microporoso, produce desde la primera semana una rápida respuesta en el hueso receptor. A las cuatro semanas ya se observa la formación de hueso inmaduro tanto en la superficie del cemento como en el interior de los poros del mismo, aunque sólo en las zonas más periféricas. A las 12 semanas este hueso es en gran

parte hueso ordenado en trabéculas óseas siendo difícil distinguir las trabéculas neoformadas de las del hueso receptor. En el centro del implante, donde el proceso de osteogénesis es mucho más activo, se observa la formación de numerosos vasos sanguíneos y de tejido osteoide nuevo, con osteoblastos de forma cúbica. La reabsorción del cemento macroporoso es visible desde la primera semana, en un principio en la totalidad del cemento, aunque con un carácter más marcado en los bordes del cemento. Este proceso de reabsorción ósea continua a lo largo de todo el estudio, aunque a las 4 semanas se puede observar que tiene un carácter centrípeto. A las 12 semanas, se observa en algunos casos que el proceso de reabsorción ha sido más rápido que el crecimiento del hueso lo que puede llevar a cierta inestabilidad mecánica, aunque seguramente el hueso acabará creciendo hasta ocupar la totalidad del defecto cavitario.

El estudio microscópico muestra la ausencia de reacción inflamatoria ni de cuerpo extraño. La formulación de este cemento, tal como ha sido detallado anteriormente contiene albumen, por lo que la presencia de un pequeño porcentaje de proteínas exógenas podía producir una respuesta inmunogénica, que podría complicar la viabilidad del cemento. En la Figura 6.23 se puede ver una zona de la periferia del implante, donde el cemento ha empezado a degradarse y la zona de separación existente todavía entre el cemento macroporoso y el hueso. La imagen de la derecha muestra la formación de vasos sanguíneos en dicha zona, donde se puede observar la presencia de osteoclastos.

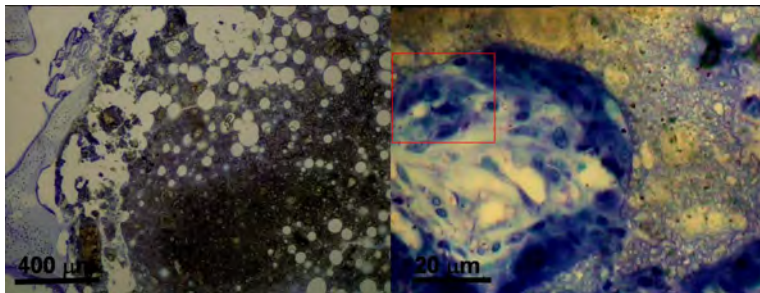


Figura 6.23: Imagen izquierda: Interfase cemento-hueso donde se observa la zona de degradación del cemento macroporoso a la semana de implantarse (Microscopía óptica 5x, tinción de Lévai-Lazckó). Imagen derecha: Formación de un vaso sanguíneo en la zona de degradación del material. En el cuadro rojo se resalta la presencia de osteoclastos (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).

A las 4 semanas el tejido óseo ha empezado crecer tanto en la superficie del implante como en el interior de los macroporos. El crecimiento en el interior de los poros no es homogéneo en toda la superficie, siendo más pronunciado en las zonas más exteriores del implante. La reabsorción del implante es muy pronunciada y con un carácter centrípeto. Se pueden observar numerosos gránulos (Figura 6.24) en la zona de degradación, rodeados de tejido óseo, con abundantes osteoblastos y la presencia de numerosos macrófagos.

Algunas veces se puede observar la presencia de células multinucleadas. Las trabeculas óseas que se forman están en continuación con el hueso receptor.

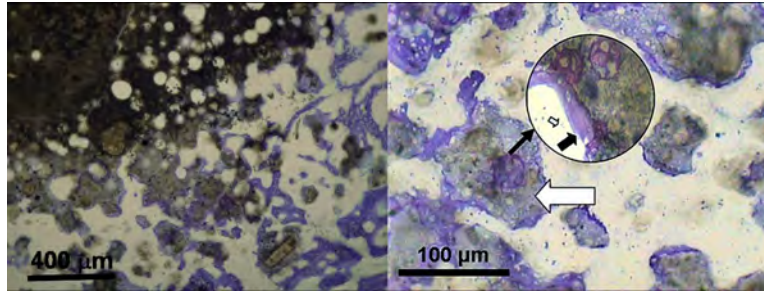


Figura 6.24: Imagen izquierda: Zona de degradación del cemento macroporoso a las 4 semanas de implantarse (Microscopía óptica 5x, tinción de Lévai-Lazckó). Imagen derecha: Fragmentos de implante rodeados de hueso nuevo. Se observa la presencia de numerosos osteoblastos (flecha negra) y macrófagos (flecha blanca) (Microscopía óptica 10x, tinción de Lévai-Lazckó).

En la Figura 6.25 se puede observar la presencia de macrófagos en el interior de un poro. También se puede ver en la imagen de la derecha distintos ribetes de osteoide en una zona cercana a un fragmento del implante y como algunos de los osteoblastos embebidos en la matriz ósea han pasado a ser osteocitos.

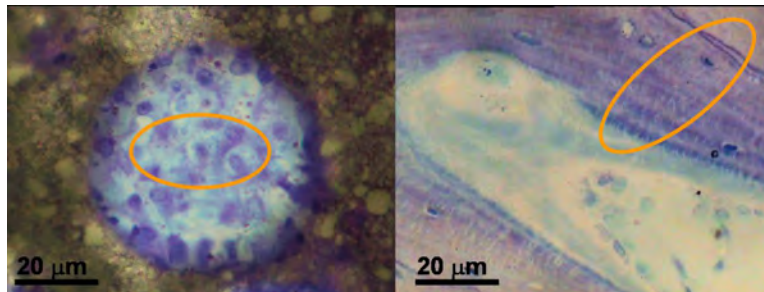


Figura 6.25: Imagen izquierda: Macrófagos en el interior de un poro (elipse, microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó). Imagen derecha: Avance del ribete de osteoide en la zona de degradación (Microscopía óptica 40x, tinción de Lévai-Lazckó).

6.5. Discusión

Uno de los principales objetivos de esta Tesis era el desarrollo de nuevos cementos macroporosos inyectables e implantables y/o la fabricación de scaffolds para ingeniería de tejidos. Por lo tanto, uno de los principales resultados a comentar del estudio *in vivo* es la conservación de la macroporosidad después de que el cemento haya sido preparado e inyectado *in situ*, tal como demuestran las diferentes imágenes de histología de la sección de Resultados del presente capítulo. La mayoría de estudios con cementos macroporosos *in vivo* que se pueden encontrar en la literatura científica son realizados con cementos previamente fraguados [5, 33, 45]. Los ejemplos de cementos macroporosos fraguados *in vivo* encontrados en la literatura contienen partículas que se han de disolver una vez implantados, como son PLGA (ácido poliláctico-glicólico) [37] o gelatina [36], para originar la macroporosidad.

En este estudio, se ha mostrado la viabilidad del uso de agentes espumantes, como el albumen, para la preparación de cementos macroporosos inyectables conservando la macroporosidad en presencia de fluidos biológicos después de su inyección. El proceso de preparación de los cementos macroporosos en este caso es todavía bastante complejo, lo que dificulta su aplicación. Con respecto a la inyectabilidad, como se ha comentado anteriormente, es buena, ya que ha permitido en todos los casos un completo llenado del defecto cavitario, e incluso en algunos casos de espacios adyacentes. Sin embargo, uno de los parámetros críticos en este proceso es el tiempo en el cual se inyecta la muestra desde el inicio de la preparación. En el Capítulo 5, se observó que en un tiempo inferior a los 5min la inyectabilidad es óptima, no perdiéndose porosidad. Si se inyecta en un tiempo superior a los 5min, la espuma de cemento comienza a perder su elasticidad y se pierde macroporosidad durante la extrusión del cemento. La pérdida de macroporosidad es mayor cuanto mayor tiempo transcurre. El factor del tiempo en la inyectabilidad y/o manipulación de la pasta de cemento es siempre un parámetro crítico común en los cementos de fosfato de calcio.

En el caso que se quisiera obtener un producto comercial, sería necesaria una fase de desarrollo, fuera del alcance de esta tesis, para poder facilitar al cirujano un producto de más fácil uso y manejo [46]. Se habría de eliminar en lo posible el factor humano de la preparación ya que, a pesar de no representar una gran dificultad, es necesario un cierto grado de familiarización con el proceso para evitar la pérdida de porosidad durante la mezcla del albumen espumado con el cemento.

A continuación se discutirán las ventajas que la introducción de la macroporosidad aporta respecto a un cemento microporoso en cuanto a su comportamiento biológico, y se comparará con los estudios existentes de fosfatos de calcio macroporosos.

Uno de los principales factores a analizar era la posibilidad de que el cemento indujera una reacción inflamatoria por falta de cohesión *in vivo* o

por alguno de los componentes usados. Hay diversos estudios que muestran reacciones inflamatorias *in vivo* a los cementos, a pesar de que las pruebas realizadas *in vitro* con distintos fluidos biológicos o con la simulación de los mismos fueron satisfactorias. Esto se debe a una falta de fraguado en presencia de fluidos biológicos tanto en implantación en hueso o en implantaciones subcutáneas e intramusculares [15] [21, 47–50]. El cemento macroporoso ha de resistir la presión sanguínea evitando el colapso de la estructura porosa y la desintegración por la penetración de los fluidos biológicos. En algunos de los estudios referenciados arriba, la falta de cohesión provocó la dispersión de las partículas del cemento en el lecho operatorio lo que conllevó la posterior respuesta inflamatoria. La adición del alginato de sodio como agente de cohesión permite inyectar el cemento antes del fraguado y evita la penetración de líquidos, mostrándose eficaz *in vivo* al evitar su desintegración. Tampoco se observó la formación de tejido fibroso o una reacción inflamatoria debida a otros componentes del cemento. Un posible factor de riesgo era el albumen, una mezcla de proteínas exógenas, sin embargo no se observó respuesta inmunogénica.

El estudio muestra también la buena osteoconductividad de los cementos de fosfato de calcio. El defecto cavitario de 6mm de diámetro creado en la parte distal del fémur no presentó una curación espontánea, mostrando el carácter crítico del mismo tal como habían mostrado estudios anteriores [51, 52]. El uso de este tipo de defectos se muestra, por lo tanto, necesario para poder evaluar la capacidad de curación de los materiales usados al no interferir con los procesos de curación espontánea. En el estudio de materiales reabsorbibles en defectos de tamaño no crítico puede darse el caso de una curación espontánea del defecto al mismo tiempo que el material desaparece, dificultando la evaluación de la respuesta biológica al material.

El tejido osteoide creció en contacto directo con ambos cementos a las 4 semanas de estudio. En el caso del cemento microporoso, este crecimiento fue únicamente observado en la superficie del implante. La microporosidad de los cementos es demasiado pequeña para permitir la penetración de las células óseas [13]. Sin embargo, las grietas que aparecían en el cemento eran rápidamente recubiertas de tejido osteoide, lo que muestra el problema del acceso celular. En el caso del cemento macroporoso, el crecimiento óseo y la neovascularización fue observada también en el interior de los poros, tal como muestra el mayor índice de Proporción de Penetración del Tejido, el mayor valor de Volumen de Hueso Neoformado y las imágenes de histología. El crecimiento óseo fue observado principalmente en los poros periféricos, pero también en algunos poros centrales. La falta de un mayor crecimiento óseo en la parte interior es debida a la limitada interconectividad entre poros adyacentes en el rango de las 50-150 μm tal como se pudo observar por porosimetría de mercurio en las muestras analizadas *in vitro* (Figuras 6.6 y 6.5) [7]. Aunque el tamaño de los poros está en el rango de las 100-300 μm , presentan una interconexión relativamente alta alrededor de las 30 μm . En

la literatura consultada se considera que el tamaño mínimo de poro para la colonización de tejido óseo está alrededor de las 100 μm en el caso de los cerámicos [26], siendo considerado como un tamaño óptimo de poro el de las 200-400 μm [6, 16, 28, 53, 54]. Ekholm *et al.* mostraron en placas de titanio crecimiento óseo en poros con 50 μm de diámetro [55], sin embargo el grosor de los implantes estudiados era inferior al de este estudio. En un estudio hecho por Tamai *et al.* con implantes de hidroxapatita macroporosa ($\sim 70\%$ porosidad) en conejos, el tejido óseo tuvo una gran capacidad de penetración hacia el interior del implante. La morfología de los poros era muy similar a la de este estudio, pero sin embargo el implante estaba más extensamente interconectado en el rango de las 40 μm que el de este estudio [56].

El factor más importante, tal como se ha comentado anteriormente, es la interconectividad de la porosidad. En el estudio de Flautre *et al.*, se observó un crecimiento óseo extenso con poros interconectados en el rango de 60-100 μm , siendo sin embargo el tamaño óptimo unas 130 μm [6]. Otro de los parámetros importantes es la tortuosidad de la porosidad. El crecimiento óseo en el interior de los poros se verá incrementado cuando más fácil sea llegar al interior del poro desde la superficie del implante [42]. Sin embargo, este parámetro es de difícil control en el tipo de proceso utilizado en este estudio. Otros autores han mostrado que otro de los factores más determinantes que favorecen la aparición de hueso es la microestructura de los implantes [57]. Yuan *et al.* mostraron cómo en una implantación ectópica en perros con dos implantes con características macroscópicas similares pero con diferente microestructura, la respuesta obtenida fue en un caso hueso osteoinducido mientras que en el otro no hubo crecimiento óseo [28]. La microestructura de ambos cementos en el presente trabajo es muy similar, formada por cristales de apatita de forma acicular, eliminando así una posible diferencia en la respuesta biológica.

El crecimiento en el interior de los poros aumentó con la reabsorción del cemento macroporoso, al aumentar al mismo tiempo la interconexión de los poros. Esto también fue observado por Lu *et al.* [58]. El cemento macroporoso evidenció una mayor reabsorción que el cemento microporoso al cabo de tan solo 4 semanas, siendo ésta muy elevada al cabo de las 12 semanas. En contraste la reabsorción del cemento microporoso fue inferior al 10% al final del estudio, a pesar que la superficie del mismo estaba rodeada de tejido óseo. En ambos materiales el crecimiento óseo se produjo y comenzó en la superficie del material. La reabsorción del cemento macroporoso a las 12 semanas era casi completa en algunos casos. Otros autores también observaron un aumento en la velocidad de reabsorción en cementos macroporosos [5] y al igual que en gránulos [59] fabricados con apatita deficiente en calcio. Sólo las partes no macroporosas del material permanecían casi enteras debido a la falta de macroporosidad (Figura 6.22). En bloques porosos de β -TCP, von Doernberg *et al.* observaron una reabsorción más rápida que el crecimiento del hueso con poros de tamaño superior a 510 μm , mientras que en un tama-

ño de poro inferior el crecimiento se dio de forma más acoplada, aunque en todos los casos se produjo un cierto desfase entre la reabsorción y el crecimiento óseo [54]. En el presente trabajo, no en todos los implantes se observó una falta de acoplamiento entre la velocidad de reabsorción y el crecimiento óseo. En la Figura 6.26 se muestran ejemplos donde en algunos casos existió mejor acoplamiento, quizás debido a implantes con una mejor interconexión que favoreció una mayor penetración del tejido óseo. Sin embargo, el hecho de que la velocidad de formación ósea sea inferior a la velocidad de reabsorción del material, puede provocar una falta de estabilidad biomecánica. La velocidad de reabsorción puede verse influenciada también por el sitio de implantación, por lo que es un factor a tener en cuenta. La velocidad de reabsorción es más elevada en hueso cortical que en hueso esponjoso en cementos microporosos [29, 60]. En el caso de un implante macroporoso parece más elevada para esponjoso que para cortical aunque en cortical el ratio de formación de hueso es más elevado [58].

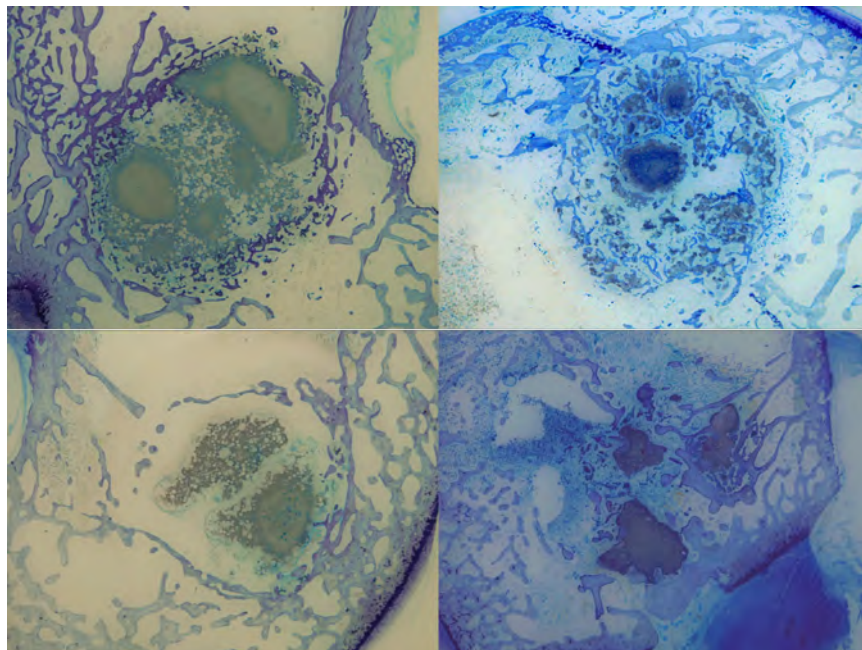


Figura 6.26: Imagen superiores: cemento macroporoso a las 4 semanas. Imágenes Inferiores: cemento macroporoso a las 12 semanas (Microscopía estereoscópica, tinción de Lévai-Lazckó).

En la reabsorción de los fosfatos de calcio existen dos posibles mecanismos de reabsorción:

- La reabsorción activa es decir la que proviene como consecuencia de la actividad celular
- La reabsorción pasiva es la que se produce como consecuencia de los

procesos de disolución debida a la solubilidad en presencia de fluidos biológicos [59].

Driessens *et al.* observaron como el mecanismo de reabsorción en el caso de los cementos cuya fase final es la apatita deficiente en calcio el mecanismo de reabsorción era activa [61], ya que al impedir el contacto del cemento con las células pero no con los fluidos biológicos el cemento apenas experimentó ninguna reabsorción, permaneciendo casi intacto. En el caso de que el cemento estuviera en contacto con las células del hueso, se observó la presencia de numerosos osteoclastos en la superficie del cemento [62]. Ooms *et al.* también observaron la presencia de osteoclastos en la superficie de un cemento de apatita deficiente en calcio [63]. La reabsorción pasiva puede verse incrementada debido a la presencia de macroporos en el implante y cambios en la cristalinidad [58, 61]. En el caso del cemento microporoso se observó la presencia de macrófagos y osteoclastos. La baja velocidad de reabsorción del cemento al cabo de 12 semanas (VMNR inferior al 10 % al final del estudio) muestra que el proceso de reabsorción en este caso es únicamente la activa, y desde la superficie del material hacia el interior por capas. La aparición de una capa de apatita (Figura 6.10) muestra la bioactividad del material pero su baja disolución al mismo tiempo. Dicha capa no se observó en el caso del cemento macroporoso. En el caso del cemento macroporoso ambos mecanismos tienen lugar. De hecho, partículas procedentes de la degradación del cemento macroporoso pueden ser observadas ya al cabo de 4 semanas de implantación rodeadas de tejido óseo. La disgregación del cemento en partículas debido a su reabsorción en este sentido permite que penetre con mayor facilidad el hueso, tal como se puede observar en las imágenes de histología al mismo tiempo que no supone un riesgo de provocar una inflamación. Las partículas de cemento en este caso harían el mismo papel que los compuestos inyectables de basados en BCP [7, 10, 59].

En la misma zona de degradación, se observó la presencia de macrófagos, junto a osteoclastos y células multinucleadas (Figuras (6.23, 6.24 y 6.25)). La presencia de macrófagos en la zona de degradación puede ser interpretada en ciertos casos como una respuesta inflamatoria, pero en el caso de los cementos de fosfato de calcio su presencia es frecuente. Según Theiss *et al.* “La presencia de macrófagos debe ser considerada como una reacción normal hacia los cementos de fosfato de calcio con alta reabsorción en ausencia de respuesta inflamatoria o inmunológica” [64]. Así, en los fosfatos de calcio cuya interfase tiene una lenta velocidad de reabsorción es más frecuente ver la presencia de osteoclastos, mientras que en los fosfatos de calcio con una mayor velocidad de reabsorción en la interfase es normal ver la presencia de macrófagos y de células multinucleadas [5, 60]. Constantz *et al.* observaron inicialmente la presencia de macrófagos en la degradación de un cemento de brushita, cuando posteriormente el cemento se convirtió en apatita carbonatada la degradación pasó a ser controlada por osteoclastos [15]. Theiss

et al. observaron la presencia de macrófagos durante todo el estudio en un cemento de brushita, mientras que los osteoclastos no aparecieron hasta al cabo de 8 semanas de llevar el cemento implantado [64]. Los macrófagos juegan un papel importante en los procesos de homeostasis de formación y reabsorción del hueso. También se cree que pueden ser precursores de células osteoclasticas. Su capacidad de fagocitosis hacia las partículas de fosfatos de calcio ha sido demostrada *in vivo* [31] e *in vitro* [64, 65]. En un implante compuesto de apatita deficiente en calcio, se observó la presencia de células multinucleadas que fagocitan las partículas de fosfato de calcio procedentes de la degradación sin provocar reacción inflamatoria. La presencia de macrófagos y osteoclastos en implantes de apatita deficiente en calcio junto a una disolución más elevada mostró una reabsorción más elevada que materiales bifásicos [59, 66].

6.6. Conclusiones

Existe una buena aceptabilidad biológica tanto del cemento microporoso como del cemento macroporoso, al no producirse en ningún caso fenómenos de respuesta inflamatoria, reacciones de cuerpo extraño, osteolisis ni fracturas. Tanto en el cemento microporoso como en el cemento macroporoso se observa la presencia de macrófagos como principal fuente de reabsorción activa, acompañada de osteoclastos pero en menor cantidad.

Tanto el cemento microporoso como el cemento macroporoso poseen capacidades osteoconductoras, al haber unión directa entre el tejido óseo y el implante a las 4 semanas de implantación.

El uso de alginato de sodio y del albumen como agente espumante permite obtener un cemento de CDHA macroporoso inyectable que fragua in vivo.

La introducción de la macroporosidad en el cemento tiene como consecuencia una mejor respuesta biológica al incrementarse la capacidad de penetración del tejido óseo en el cemento, aumentando así la formación de hueso.

El crecimiento óseo se produce principalmente en los poros exteriores del cemento, debido a una baja interconexión entre los poros.

La velocidad de reabsorción del cemento macroporoso es mucho mayor que la del cemento microporoso. Esto es debido al aumento de la permeabilidad y del área de contacto con los fluidos biológicos que aumenta el mecanismo de reabsorción pasiva. La morfología del cemento aumenta también la capacidad de disgregación del cemento favoreciendo la penetración del hueso, así como su reabsorción.

En ciertos casos se observa una velocidad de reabsorción mayor que la velocidad de crecimiento óseo, lo cual puede provocar cierta inestabilidad biomecánica, aunque esto no evitaría la completa curación del defecto en cuestión.

Referencias

- [1] H.I.Roach, J.R. Shearer, and C.Archer. The choice of an experimental model. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 71-B:549–553, 1989.
- [2] AENOR. *Norma española UNE-en ISO 10993-6:Evaluación biológica de los productos sanitarios. Parte 6:Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación (ISO 10993-6:2007)*, 2007.
- [3] M.A.K. Liebschner. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, 25:1697–1714, 2004.
- [4] B.D.Ratner, A.S.Hoffman, F.J.Schoen, and J.E.Lemons. *Biomaterials Science:An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 1996.
- [5] del Real, E. Ooms, J. G. Wolke, M. Vallet-Regi, and J. A. Jansen. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 65(1):30–36, 2003.
- [6] B. Flautre, M. Descamps, C. Delecourt, M. C. Blary, and P. Hardouin. Porous ha ceramic for bone replacement: role of the pores and interconnections - experimental study in the rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(8):679–682, 2001.
- [7] O. Gauthier, E. Goyenvalle, J. M. Bouler, J. Guicheux, P. Pilet, P. Weiss, and G. Daculsi. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics versus injectable bone substitute: a comparative study 3 and 8 weeks after implantation in rabbit bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(5):385–390, 2001.
- [8] B.H. Fellah, P.Weiss, O. Gauthier, T. Rouilon, P.Pilet, G.Daculsi, and P. Layrolle. Bone repair using a new injectable self-crosslinkable bone substitute. *Journal of Orthopaedic Research*, 24:628–635, 2006.
- [9] M.J. Voor, J.J.C. Arts, S.A. Klein, L.H.B. Walschot and N. Verdonschot, and P.Buma. Is hydroxiapatite cement an alternative for allograft bone chips in bone grafting procedures? a mechanical and histological study in a rabbit cancellous bone defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 71-B:398–407, 2004.
- [10] O. Gauthier, I. Khairoun, J. Bosco, L. Obadia, X. Bourges, C. Rau and D. Magne, J. M. Bouler and E. Aguado and G. Daculsi, and P. Weiss. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 66(1):47–54, 2003.

-
- [11] C. L. Camire, S. J. Saint-Jean, C. Mochales, P. Nevsten, J. S. Wang, L. Lidgren, I. McCarthy, and M. P. Ginebra. Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted alpha-tricalcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 76(2):424–431, 2006.
- [12] S. Itoh, S. Nakamura, M. Nakamura, K. Shinomiya, and K. Yamashita. Enhanced bone ingrowth into hydroxyapatite with interconnected pores by electrical polarisation. *Biomaterials*, 27:5572–5579, 2006.
- [13] O. Gauthier and J. M. Bouler, P. Weiss, J. Bosco, G. Daculsi, and E. Aguado. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(1):28–35, 1999.
- [14] O. Gauthier, R. Muller, von Stechow, B. Lamy, P. Weiss, J. M. Bouler, E. Aguado, and G. Daculsi. In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: a three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and sem study. *Biomaterials*, 26(27):5444–5453, 2005.
- [15] B. R. Constantz, B. M. Barr, I. C. Ison, M. T. Fulmer, J. Baker, L. McKinney, S. B. Goodman, S. Gunasekaran, D. C. Delaney, J. Ross, and R. D. Poser. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(4):451–461, 1998.
- [16] O. Gauthier, J. M. Bouler, E. Aguado, P. Pilet, and G. Daculsi. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*, 19(1-3):133–139, 1998.
- [17] K. Kurashina, H. Kurita, M. Hirano, A. Kotani, C. P. Klein, and K. de Groot. In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste. *Biomaterials*, 18(7):539–543, 1997.
- [18] M. C. Kruyt, W. J. A. Dhert, F. C. Oner, C. A. van Blitterswijk, A. J. Verbout, and J. D. de Bruijn. Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell-based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterials*, 28:1798–1805, 2007.
- [19] E. M. Ooms, J. G. C. Wolke, M. T. van de Heuvel, B. Jeschke, and J. A. Jansen. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials*, 24:989–1000, 2003.

- [20] P. Habibovic, H. Yuan, C. van der Valk, Gert Meijer, C.van Blitterswijk, and K. De Groot. 3d microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*, 26(17):3565–3575, 2005.
- [21] B. Flautre, C. Delecourt, M. C. Blary, Van Landuyt, J. Lemaitre, and P. Hardouin. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone*, 25(2 Suppl):35S–39S, 1999.
- [22] M. Bohner, F. Theiss, D. Apelt, W. Hirsiger, R. Houriet, G. Rizzoli, E. Gnos, C. Frei, J. A. Auer, and von Rechenberg. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials*, 24(20):3463–3474, 2003.
- [23] M. Mastrogiacomo, A. Papadimitropoulos, A. Cedola, F. Peyrin, P. Giannoni, S.G. Pearce, M. Alini, C. Giannini, A. Guagliardi, and R. Canceda. Engineering of bone usin bone marrow sromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: Evidence for a coupling between bone formation and scaffold resoprtionn. *Biomaterials*, 28:1376–1384, 2007.
- [24] D. Apelt, F. Theiss, El Warrak, K. Zlinszky, R. Bettschart-Wolfisberger, M. Bohner, S. Matter, J. A. Auer, and von Rechenberg. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*, 25(7-8):1439–1451, 2004.
- [25] S. F. Hulbert, S. F. Morrison, and J.J. Klawitter. Tissue responses to 3 ceramics of porous and nonporous structure. *American Ceramic Society Bulletin*, 50(9):790, 1971.
- [26] S.F. Hulbert, J.J.Klawitter, F. A. Young, R. S. Mathews, C. D. Talbert, J. C. Morrison, J. C. Chapin, F. M. King, T. L. Bridges, and C.N. Wilson. Compatibility of bioceramics with physiological environment. *American Ceramic Society Bulletin*, 49(4):482, 1970.
- [27] H.Yuan, Y. Li, J.D. de Bruijn, K.Groot, and X.Zhang. Tissue responses of calcium phosphate cement:a study in dogs. *Biomaterials*, 21:1283–1290, 2000.
- [28] H. Yuan, K. Kurashina, J.D. de Bruijn, Y. Li, K. de Groot, and X. Zhang. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20(19):1799–1806, 1999.
- [29] E. P. Frankenburg, S. A. Goldstein, T. W. Bauer, S. A. Harris, and R. D. Poser. Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, 80(8):1112–1124, 1998.

-
- [30] M. Takechi, K. Ishikawa, Y. Miyamoto, M. Magayama, and K. Suzuki. Tissue responses to anti-washout apatite cement using chitosan when implanted in the rat tibia. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(7):597–602, 2001.
- [31] O. Malard, J.M. Bouler, J. Guicheux, D. Heymann, P. Pilet, C. Coquard, and G. Daculsi. Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth and ceramic resorption and inflammatory reactions: preliminary in vitro and in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research*, 46:103–111, 1999.
- [32] C. Niedhart, U. Maus, E. Redmann, and C.H. Siebert. In vivo testing of new in situ setting β -tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55:530–537, 2001.
- [33] R. O. Huse, Q. Ruhe, J.G.C. Wolke, and J.A. Jansen. The use of porous calcium phosphate scaffolds with transforming growth factor beta i as an onlay bone graft substitute: An experimental study in rats. *Clinical oral implants research*, 15:741–749, 2004.
- [34] M. Okamoto, Y. Dohi, H. Ohgushi, H. Shimaoka, M. Ikeuchi, A. Matsushima, K. Yonemasu, and H. Hosoi. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on *in vitro*, *in vivo* bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17:327–336, 2006.
- [35] D.P. Link, J. van Den Dolder, J.J. van Den Beucken, V.M. Cuijpers, J.G.C. Wolke, A. Mikos, and J.A. Jansen. Evaluation of the biocompatibility of calcium phosphate cement/plga microparticle composites. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87:760–769, 2008.
- [36] D.P. Link, J. van den Dolder, J.J. van den Beucken, J.G. Wolke, A.G. Mikos, and J.A. Jansen. Bone response and mechanical strength of rabbit femoral defects filled with injectable CaP cements containing TGF- β 1 loaded gelatin microparticles. *Biomaterials*, 29(6):675 – 682, 2008.
- [37] A. Plachokova, D.P. Link, J. van den Dolder, J.J. van den Beucken, and J.A. Jansen. Bone regenerative properties of injectable PGLA–CaP composite with TGF- β 1 in a rat augmentation model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1:457–464, 2007.
- [38] H.G. Moghadam, G.K.B. Sándor, H.H.I. Holmes, and C.M.L. Clokie. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic substitutes. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 62:202–213, 2004.
-

- [39] N. Miño. *Estudio Comparativo de la respuesta ósea generada por dos cementos y un biovidrio basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales*. PhD thesis, Universidad de Santiago de Compostela and Lugo, 2007.
- [40] D. W. Jackson, P. A. Lalor, H. M. Aberman, and T. M. Simon. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. a preliminary study. *Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, 83-A(1):53–64, 2001.
- [41] A. M. Parfitt, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, and R. R. Recker. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature and symbols and and units. report of the asbmr histomorphometry Nomenclature committee. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2(6):595–610, 1987.
- [42] B. Otsuki, M. Takemoto, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Kokubo, and T. Nakamura. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-ct based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 27:5892–5900, 2006.
- [43] L. L. Hench. Bioceramics - from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(7):1487–1510, 1991.
- [44] C. Aparicio. *Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*. PhD thesis, Universitat Politècnica de Catalunya and Barcelona, 2004.
- [45] P. Tang, G. Li, J. Wang, Q. Zheng, and Y. Wang. Development, characterization, and validation of porous carbonated hydroxyapatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B.
- [46] M.P. Ginebra, M. Espanol, E.B. Montufar, R.A. Perez, and G. Mestres. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, 6.
- [47] K. Ishikawa, Y. Miyamoto, M. Kon, M. Nagayama, and K. Asaoka. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate. *Biomaterials*, 16(7):527–532, 1995.
- [48] Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, T. Toh, T. a Yuasa, M. Nagayama, and K. Suzuki. Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48(1):36–42, 1999.

-
- [49] K. Kurashina, H. Hurita, and A. Kotani. Experimental cranio-plasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate dibasic/tretacalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short term experiment in rabbits. *Biomaterials*, 19(7-9):701–716, 1998.
- [50] E. W. H. Bodde, C.T. R. Cammaert, J. G. C. Wolke, P. H. M. Spauwen, and J. A. Jansen. Investigation as to the osteoinductivity of macroporous calcium phosphate cement in goats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 83:161–168, 2007.
- [51] K.U. Lewandroski, S.P. Bondre, D.L. Wise, and D.J. Trantolo. Healing of osteochondral osteotomies after fixation with a hydroxyapatite buffered polylactide. a histomorphometric and radiographic study in rabbits. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 12:259–270, 2002.
- [52] P.Q. Ruhé, H.C. Kroese, J.G.C. Wolke, P.H.M Spauwen, and J.A. Jansen. Bone inductive properties of rhbmp-2 loaded porous calcium phosphate cement implant in cranial defects in rabbits. *Biomaterials*, 25:2123–2132, 2004.
- [53] R. E. Holmes. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 63(5):626–633, 1979.
- [54] M.C. von Doernberg, B. von Rechenberg, M. Bohner, S. Grünenfelder, G.H. van Lenthe, R. Müller, B. Gasser, R. Mathys, G. Baroud, and J. Auer. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*, 27:5186–5198, 2006.
- [55] A.I. Itäla, H.O. Ylänen, C. Ekholm, K.H. Karlsson, and H.T. Aro. Pore diameter of more than 100 μm is not requisite for bone ingrowth in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research: Applied Biomaterials*, 58(6):679–683, 2001.
- [56] N.Tamai, A. Myoui, T. Tomita, T.Nakase, J. Tanaka, T. Ochi, and H. Yoshikawa. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction *in vivo*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 59:110–117, 2002.
- [57] D.Rekow, P. Van Thompson, and J.L. Ricci. Influence of scaffold meso-scale features on bone tissue response. *Journal of Materials Science*, 41:5113–5121, 2006.
- [58] J. X. Lu, A. Gallur, B. Flautre, K. Anselme, M. Descamps, B. Thierry, and P. Hardouin. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous and cortical and and medullar bone sites in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(3):357–367, 1998.

- [59] B. Bourgeois, O. Laboux, L. Obadia, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Daculsi, and J. M. Bouler. Calcium-deficient apatite: a first in vivo study concerning bone ingrowth. *J.Biomed.Mater.Res.A*, 65(3):402–408, 2003.
- [60] C.Tsai, R. Lin, and C. Ju an J.C. Lin. Bioresorption behavior of tetracalcium phosphate-derived calcium phosphate cement implanted in femur of rabbits. *Biomaterials*, 29:984–993, 2008.
- [61] F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, M.I. Zapatero, R.M.H. Verbeeck, W. Bonfield, O. Bermúdez, E. Fernández, M.P. Ginebra, and J.A. Planell. In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6:272–278, 1995.
- [62] J.A. Jansen, J.E. de Ruijter, H.G. Schaeken, J.P.C.M. van der Waerden, J.A. Planell, and F.C.M. Driessens. Evaluation of tricalciumphosphate/hydroxyapatite cement for tooth replacement:an experimental study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6:653–657, 1995.
- [63] E.M. Ooms, J.G.C. Wolke, J.P.C.M. van der Waerden, and J.A. Jansen. Trabecular response to injectable calcium phosphate (ca-p) cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61:9–18, 2002.
- [64] F. Theiss, D. Apelt, B. Brand, A. Kutter, K. Zlinszky, M. Bohner, S. Matter, C. Frei, J.A. Auer, and B. von Rechenberg. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 26:4383–4394, 2005.
- [65] D.P. Pioletti, H. Takei, T. Lin, P. van Landuyt, Q.J. Ma, S.Y. Kwon, and K.L.P. Sung. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials*, 21:1103–1114, 2000.
- [66] I.Khairoun, D. Magne, O. Gauthier, J.M. Bouler, E. Aguado, G. Daculsi, and P. Weiss. In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60:633–642, 2002.

Conclusiones Generales

- El producto final de la reacción de fraguado del cemento de fosfato tricálcico alfa corresponde, para los dos tamaños de partícula inicial, a una hidroxiapatita deficiente en calcio.
- El control sobre la distribución inicial del tamaño de partícula del cemento de fosfato de calcio (TP Fino y TP Grueso) permite obtener diferentes tamaño de cristales obteniéndose por lo tanto diferencias en la microestructura, la topografía superficial, la superficie específica y la porosidad. Estos tres factores afectan a su vez el comportamiento biológico del cemento de fosfato de calcio.
- Los sustratos de apatita deficiente en calcio obtenidos a partir del TP Fino muestran una mayor adsorción de albúmina, fibronectina y lisozima en comparación con las muestras de TP Grueso tal como reflejan los resultados obtenidos a partir del sobrenadante y la desorción con EDTA. Este hecho concuerda con la mayor superficie específica de los sustratos de TP Fino.
- La utilización de distintos agentes de desorción ha puesto de relieve diferencias en la adhesión de las proteínas, atribuibles a diferencias en los mecanismos de adhesión en ambos sustratos. La diferente morfología y tamaño de los cristales apunta a una influencia de la topografía en la adhesión que puede inducir cambios conformacionales.
- En los estudios *in vitro* con materiales bioactivos, no es posible separar los efectos de la topografía superficial de los efectos del intercambio iónico con el medio de cultivo en el comportamiento celular. Las diferencias en la micro/nanoestructura de los cristales de apatita de los sustratos de este trabajo resulta en diferencias topográficas, diferentes superficies específicas y a su vez en diferencias en el intercambio iónico en la interfase célula-biomaterial.
- Los experimentos *in vitro* con las células osteoblásticas MG-63 han mostrado la fuerte influencia de la microestructura de la apatita deficiente en calcio en la actividad celular. Los sustratos de TP Fino inducen una disminución de la proliferación celular y un aumento de la

diferenciación celular demostrado por la mayor actividad de la fosfatasa alcalina, la secreción de osteocalcina y una mayor producción de matrix extracelular.

- Los cultivos celulares realizados con los extractos obtenidos a partir de los sustratos mostraron la influencia del intercambio iónico en la proliferación celular. Sin embargo, no se observó un aumento de la diferenciación celular. El incremento de la diferenciación celular del TP Fino fue relacionado con los defectos topográficos en la escala nano- y micrométrica en sinergia con el intercambio iónico.
- El uso del albumen como agente espumante permite introducir macroporosidad en los cementos de fosfato de calcio, obteniendo valores de macroporosidad entre el 10 y el 35 %. El uso combinado con un agente de cohesión, como el alginato de sodio, permite a su vez la obtención de una pasta macroporosa que fragua *in vivo* con la cohesión suficiente para ser inyectado después de su preparación en condiciones fisiológicas tal como han mostrados los experimentos en fémures de conejo.
- La inyectabilidad de las muestras se mostró excelente, conservándose la macroporosidad. Esto habilitaría el uso de este cemento para técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas.
- Los principales factores que afectan en la obtención de la macroporosidad son la relación líquido/polvo así como la cantidad de agente espumante. El tamaño de partícula no se ha mostrado en este caso ser un factor significativo.
- La aceptabilidad biológica de los CPC ha mostrado ser excelente, tanto para el cemento microporoso como para el cemento macroporoso, al no producirse en ningún caso fenómenos de respuesta inflamatoria, reacciones de cuerpo extraño, osteolisis ni fracturas.
- La introducción de la macroporosidad en el cemento tiene como consecuencia una mejor respuesta biológica al incrementarse la capacidad de penetración del tejido óseo en el cemento, aumentando así la formación de hueso. El crecimiento óseo se produce principalmente en los poros exteriores del cemento, debido a una baja interconexión entre los poros. A su vez la velocidad de reabsorción del cemento macroporoso es mucho mayor que la del cemento microporoso.

General Conclusions

- The final product of the setting reaction of the α tricalcium phosphate, for both particle sizes, was a calcium deficient hydroxyapatite.
- The control of the initial particle size distribution of the calcium phosphate cement (TP Coarse and TP Fine) allowed to obtain different crystal sizes and therefore different microstructures, surface topographies, specific surface areas and porosities. These factors influence the biological behavior of the calcium phosphate cement.
- The calcium deficient hydroxyapatite substrates obtained using the TP Fine showed a higher albumin, fibronectin and lysozyme adsorption in comparison to the TP Coarse substrates as evidenced by the results from the supernatant and the desorption with EDTA. This behavior correlated to the higher specific surface area of the TP Fine substrates.
- The use of different desorption agents suggested the differences in the protein adhesion strength between both substrates due to different adsorption mechanisms. The differences in crystal size and morphology, and therefore a different topographies, could probably influence the protein adhesion inducing conformational changes.
- It is not possible to separate the effect of surface topography from the ion exchange with the medium in the *in vitro* studies of bioactive materials. In the substrates studied in this work, the differences in the micro/nanostructure provoked changes in topography and in specific surface area, which in turn affected the ion exchange at the cell-biomaterial interface.
- According to the results obtained, osteoblast activity was strongly affected by surface microstructure. The Fine CPC substrates induced a decrease in proliferation and an increase in cell differentiation demonstrated by a higher ALP activity, osteocalcin secretion and higher extra-cellular matrix production.
- Ionic exchange could explain partially the decrease in cell proliferation but cell cultures with the material's extracts did not prove any increase

in cell differentiation. The increased differentiation was mostly related to the micro- and nanoscale topographical features of the substrate in synergy with the ion-exchange behavior.

- Macroporosity in calcium phosphate cements was achieved through the use of albumen as a foaming agent. The obtained macroporosities ranged between 10 and 35 %. The combined use of albumen with a cohesion agent, like sodium alginate, allowed the macroporous paste to set *in vivo*. The macroporous paste can be injected after its preparation in physiological conditions as it has been proved in vivo experiments.
- The injectability *in vivo* of the macroporous CPC proved to be excellent and the macroporosity was retained. This would allow the use of this CPC in minimally invasive surgical techniques.
- Macroporosity in the CPC was mainly affected by the L/P ratio and the amount of foaming agent. Particle size distribution was not a significant factor.
- The biological behavior of both CPC, microporous and macroporous, was excellent. There were no foreign body reaction, inflammatory response, osteolysis or fractures.
- The macroporosity in the CPC allowed a better biological behavior due to the increase of the bone tissue penetration into the cement, increasing bone formation. The bone growth was mainly on the periphery of the cement, due to a poor pore interconnectivity. The macroporous CPC resorption speed was much higher than the microporous CPC resorption.

Perspectivas Futuras

Los estudios de adhesión y desorción de proteínas han evidenciado diferencias en la fuerza de adhesión de las proteínas dependiente de la microestructura. Los estudios aquí realizados han mostrado evidencias de la poca penetración de las proteínas en el sustrato debido al tamaño de poro tan pequeño. Uno de los usos para los cuales se plantea los cementos de fosfato de calcio es para la liberación de fármacos o proteínas en el sitio de implantación. Estudios más detallados permitirían por ejemplo seleccionar la correcta microestructura y la correcta relación líquido/polvo para poder optimizar la adsorción o la liberación en función de la proteína o sustancia objetivo.

El espumado del cemento como método para introducir macroporosidad en el cemento se ha mostrado eficaz, permitiendo obtener una pasta inyectable. Sin embargo, el tamaño de la interconexión de la porosidad se ha mostrado todavía insuficiente para permitir una completa invasión del implante por parte del tejido óseo. Métodos para un correcto espumado de la pasta de cemento con un tamaño de poro superior y una mayor interconexión permitiría un proceso de curación y regeneración optimizado. La mezcla con partículas solubles tipo PGLA o reabsorbibles, como la gelatina, por el organismo podría abrir una vía de obtener una porosidad más interconectada.

Unos de los puntos que se han visto a través del estudio in vivo es la alta velocidad de resorción del cemento, estando ésta no acompañada con el crecimiento óseo. En este sentido, una mayor tamaño de la interconexión de la porosidad permitiría más penetración del óseo. Por otro lado sería interesante investigar el comportamiento biológico del cemento en función del tamaño de partícula y por lo tanto de la microestructura de la apatita. Tal como se ha visto en los experimentos con células y en la adsorción de proteínas la microestructura de la apatita influye en el comportamiento biológico.