



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

**SÍNTESIS DE NANOCERÁMICAS BIOACTIVAS PARA REGENERACIÓN ÓSEA Y
EL EFECTO DE LA NANOESTRUCTURA EN SUS PROPIEDADES IN VITRO**

Fabiola Verónica Arroyo Ibacache

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO - DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

DEDICATORIA

A mis papás, que me han apoyado y han estado siempre a mi lado, durante toda mi carrera y mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme las oportunidades que me han hecho crecer como persona.

Agradezco a cada uno de los que hicieron posible este trabajo, que por cierto no fue sencillo y requirió de la ayuda y buena voluntad de muchas personas. Entre ellos quiero mencionar a mi profesor guía de tesis el Dr. Cristian Covarrubias.

También docentes y ayudantes que a lo largo de estos años han sido importantes en mi formación profesional. Al profesor Mario Díaz y Gonzalo Rodríguez por apoyarme en mis proyectos, así también a Carlita Cerda e Isabel Celhay por hacer de este periodo de tesis un tiempo más ameno.

Agradezco a mi familia, papás, hermanos, Víctor y Ángela, que son el apoyo fundamental en todo lo que hago.

No puedo dejar de mencionar a mis grandes amigos, los "Odontololos".

Por último agradezco al Proyecto FONDECYT 1130342 por el financiamiento otorgado para la investigación realizada en este trabajo.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ASPECTOS TEORICOS.....	5
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
METODOLOGIA.....	21
RESULTADOS.....	30
DISCUSION.....	45
CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	55

RESUMEN

Introducción: La reconstrucción de defectos del complejo craneomaxilofacial es un actual desafío clínico en odontología. Actualmente se requieren sistemas y terapias clínicas más eficientes para lograr la regeneración de tejido óseo; especialmente en aplicaciones de cirugía maxilofacial, implantología y periodoncia. El desarrollo de la nanotecnología en conjunto con la ingeniería de tejidos ofrece innovadoras soluciones, mediante el estudio, diseño y uso de nanopartículas cerámicas bioactivas. Sin embargo, actualmente se requiere conocer de qué forma las diferentes características estructurales a nano escala de estos biomateriales afectan sus propiedades bioactivas. En este trabajo se sintetizan nanobiomateriales cerámicos con propiedades potenciales para regeneración ósea, nanopartículas de hidroxiapatita (n-HA), nanopartículas de vidrio bioactivo (n-BG) y vidrio bioactivo mesoporoso (MBG) y se estudia el efecto de sus características estructurales sobre sus propiedades de bioactividad *in vitro*.

Objetivos: Sintetizar materiales cerámicos bioactivos (n-HA, n-BG y MBG) con diferente nanoestructura (tamaño de partícula y nanoporosidad) y naturaleza química y evaluar sus propiedades osteogénicas *in vitro*.

Metodología: Se sintetizaron partículas de n-HA, n-BG y MBG utilizando la técnica de síntesis sol-gel. Estos materiales fueron caracterizados por medio de difracción de rayos-X (DRX), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía de infrarrojo (FTIR-ATR), y mediciones de área superficial y tamaño de nanoporos por sortometría de N₂.

La bioactividad *in vitro* se evaluó mediante la capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea en fluido fisiológico simulado (SBF) a 36.5°C; analizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-EDX) y DRX. Se evaluó preliminarmente la capacidad de adsorción de proteínas, de citocompatibilidad y diferenciación osteogénica de células madres dentales.

Resultados y discusión: Las partículas n-HA y n-BG presentaron tamaño nanométrico (40 nm, 70 nm), con áreas superficiales entre 66 y 76 m²/g, mientras que MBG un tamaño micrométrico (2 μm) pero con una nanoestructura interna altamente ordenada, compuesta de poros de 4 nm y un área superficial de 480 m²/g.

Todas las partículas presentaron capacidad para inducir formación de apatita en SBF, para adsorber proteínas extracelulares, así como de diferenciación celular osteogénica, siendo estas propiedades mayores para la partícula de n-BG. Estos resultados se explican, debido a que el tamaño de partícula parece ser la propiedad más determinante en el comportamiento bioactivo (n-BG), en comparación con la nanoestructura porosa interna (MBG). La formación de apatita parece estar determinada por la superficie externa más que por la superficie interna que produce la nanoporosidad. Por otra parte, los biomateriales de vidrio bioactivo (n-BG y MBG) resultan más bioactivos que la hidroxiapatita (n-HA), como consecuencia de su estructura amorfa, mayor producción de productos de iónicos de disolución, y por lo tanto reactividad en condiciones fisiológicas.

Conclusión: El tipo de nanoestructura afecta las propiedades de bioactividad osteogénica de los biomateriales cerámicos. Un tamaño nanométrico de partícula (n-BG) parece ser más favorable que una nanoestructura porosa interna (MBG) para acelerar la formación de apatita tipo ósea y estimular la diferenciación osteogénica de células madres *in vitro*. Las propiedades demostradas en estas bionanocerámicas parecen ser promisorias en el campo de regeneración ósea.

1. INTRODUCCION

En odontología diariamente se deben resolver problemáticas de pacientes que han sufrido la pérdida de piezas dentarias y hueso alveolar. El hueso alveolar es la parte especializada del esqueleto cráneo-maxilofacial que entrega el soporte primario a los dientes. Sin embargo, en este tejido se pueden sufrir una serie de defectos, principalmente debido al proceso natural de resorción ósea posterior a la pérdida de piezas dentarias y a la destrucción producida por la enfermedad periodontal. Adicionalmente se producen defectos óseos por deformidades del aparato bucomaxilofacial, traumas, defectos congénitos, por ejemplo: paladar fisurado, y enfermedades adquiridas como cáncer (Kaigler y Mooney, 2001). Después de la extracción de un diente, el alveolo sana naturalmente, pero debido a la ausencia del diente se produce reabsorción ósea. La conservación del hueso después de la extracción tiene un significativo impacto en los resultados funcionales y estéticos de un futuro tratamiento (Klemetti E.,1996; Nemcovsky C,1996; Wiesen M. y Kitzis R.,1998).Este fenómeno de reabsorción y remodelación ósea debilita el apoyo de los dientes adyacentes, disminuye la altura del reborde y disminuye el soporte óseo, lo que dificulta la retención de prótesis y la colocación de implantes dentales en el futuro.

En la cirugía de implante, la disponibilidad de hueso es fundamental en la colocación de los implantes endóseos. En situaciones donde el espesor del hueso entre el seno maxilar y la cresta alveolar es menor a 5 mm, es necesario aumentar el grosor del piso del seno a través de un injerto, para soportar la longitud requerida de los implantes. Esta cirugía se denomina elevación del seno maxilar y es muy útil en caso de maxilares atróficos debido a enfermedad periodontal, ausencias dentales antiguas o traumatismos (Tan WC.y cols, 2008). En casos de pacientes, en los cuales la distancia desde el canal mandibular al reborde alveolar, es crítica, se sugiere la colocación de injertos, con el objeto de evitar lesiones graves en los nervios durante la instalación del implante.

En situaciones de insuficiente hueso alveolar, se necesita un aumento del reborde, verticalmente, a través de injertos onlay de modo de aumentar la altura del hueso alveolar (Minoru Ueda, 2011).

Otra situación en donde se pierde tejido óseo es la pérdida de hueso alveolar provocado por la periodontitis, enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por la pérdida de soporte alrededor del diente. Esta enfermedad se asocia a lesiones gingivales, pérdida de inserción periodontal y destrucción alveolar. Como resultado las raíces de los dientes se encuentran expuestas y puede llegar a ocurrir la pérdida dentaria. De esta manera, la periodontitis, afecta la integridad del sistema periodontal, llegando a la destrucción del hueso alveolar (Haffajee A. y Socransky S., 1994; Slots J. y cols, 2000; Pihlstrom B. y cols, 2005; Sowmya S. y cols, 2011). Gran parte de la población adulta padece enfermedad periodontal. El tratamiento de defectos periodontales, la prevención de reabsorción de hueso alveolar consecuente a extracciones dentarias, o en su defecto, su reconstrucción, la reconstrucción ósea asociada con la colocación de implantes, las complicaciones post-implantación, quistes o defectos óseos de los maxilares requieren del desarrollo de investigación en tecnologías de nuevos biomateriales y terapias avanzadas. La reconstrucción de tejido óseo en odontología se vislumbra como un área de investigación con consecuencias en la salud pública y requiere definirse a través de acercamientos interdisciplinarios avanzados. El avance reciente de técnicas de síntesis y diseño de biomateriales con dimensiones nanométricas, ofrece la posibilidad de desarrollar biomateriales y tratamientos más eficientes para la regeneración de tejido óseo; particularmente a través de la nanotecnología y la ingeniería de tejido aplicada al ámbito odontológico. Para este propósito es fundamental conocer de qué forma las características de la estructura a nano escala de los biomateriales afecta sus propiedades bioactivas.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

Principios de regeneración ósea

El hueso humano es un tejido dinámico, altamente vascularizado con la habilidad de remodelarse a lo largo de la vida mediante la regulación de la actividad de osteoformación por parte de los osteoblastos, y la resorción ósea, generada por osteoclastos (Cortizo A.M. y cols, 2006). **Osteogénesis, osteoinducción, y osteoconducción** son los tres elementos esenciales de la regeneración ósea. (Giannoudis PV. y cols., 2005). La osteogénesis es el proceso de formación de nuevo hueso por parte de células osteoprogenitoras que viven dentro del material de injerto. La osteoinducción por su parte, es la capacidad de un material de estimular y activar las células osteoprogenitoras huéspedes que se encuentran en los tejidos adyacentes. En este proceso el nuevo hueso es formado en un área que previamente carecía de él, donde un tejido o sus derivados provocan la diferenciación de otro tejido que se encontraba en un estado indiferenciado. La osteoconducción es la facilitación y orientación de vasos sanguíneos y la creación de nuevo sistemas de Havers dentro del injerto óseo (Constantino, P.D. y cols, 1994). Así, se produce la formación de hueso por el proceso de crecimiento interno de capilares y células osteoprogenitoras del lecho receptor, alrededor y a través de un injerto, el cual actúa como un andamio para la formación de hueso nuevo (Buchardt H., 1983).

Tratamientos de regeneración ósea.

En la actualidad, muchas terapias dentales utilizadas aún no logran devolver las estructuras óseas a un estado normal de salud. En este contexto, es importante mencionar el déficit existente en los resultados obtenidos mediante tratamientos de regeneración de hueso y oseointegración, ya que sigue existiendo una tasa de fracaso o bien, no se logra alcanzar el ideal fisiológico. La gran necesidad de generar tejido óseo en numerosas situaciones

clínicas, como las nombradas anteriormente, y la limitada disponibilidad de injertos adecuados han llevado al desarrollo de nuevas aproximaciones de reparación ósea (Minoru Ueda, 2011).

Los injertos de reemplazo de hueso (injertos y sustitutos de óseos), son ampliamente utilizados en odontología para promover la regeneración ósea y periodontal, proporcionando una estructura base para el desarrollo de coágulos, la maduración y remodelación que soporta la formación de nuevo hueso en los defectos óseos. Además, los diversos tipos de injertos exhiben capacidad variable de promover una coordinada formación de hueso, cemento y ligamento periodontal cuando son posicionados y retenidos en un defecto periodontal (Reynolds y cols., 2010).

Los objetivos que se persiguen en la búsqueda de mejores tratamientos y materiales de injerto son lograr una exitosa regeneración ósea del defecto con una alta predictibilidad de proveer una correcta función y estética a largo plazo, bajo riesgo de complicaciones, una mínima cantidad de intervenciones quirúrgicas, baja morbilidad para el paciente y la reducción de los periodos de sanación (Buser, D. 2009).

Los materiales de injerto son utilizados en cirugía reconstructiva para rellenar espacios, reemplazar porciones de hueso, aumentar hueso, facilitar o mejorar la reparación ósea de defectos mediante osteoconducción, proveer soporte mecánico a las membranas, estabilizar los coágulos sanguíneos, y servir de vehículos para antibióticos y factores de crecimiento (Buser, D. ,2009).

Estos materiales, para ser utilizados como injertos deben poseer algunas características indispensables: biocompatibilidad, es decir, que carecen de una respuesta inmunogénica, y osteoconductividad, que proporciona una estructura y topografía de superficie que permita la adhesión, proliferación y migración celular. Los injertos pueden poseer otras propiedades que apoyen la osteogénesis. De esta manera, los materiales de injerto osteogénicos, tales como hueso esponjoso-médula ósea, contienen células vivas que son capaces

de realizar diferenciación y formación de hueso. Aquellos materiales de injerto osteoinductores, tales como matriz desmineralizada ósea (DBM), proporcionan un estímulo biológico (proteínas y factores de crecimiento) que induce la progresión de las células madre mesenquimales y otras células osteoprogenitoras hacia el linaje de osteoblastos (Reynolds y cols., 2010).

Tipos de injertos y biomateriales de reparación ósea.

Las estrategias actuales usadas para el tratamiento de tejidos perdidos del esqueleto craneomaxilofacial incluyen la utilización de **injertos autógenos** obtenidos desde una fuente local o distante, **aloinjertos** provenientes desde otro individuo de la misma especie, **xenoinjertos** que provienen desde otra especie, **materiales sintéticos (aloplásticos)**, factores de crecimiento, etc. A pesar de que estos materiales y terapias han conseguido éxito y han sido uno de los mejores avances en la medicina, cada uno de ellos tiene sus limitaciones (Kaigler y Mooney, 2001). Por otro lado ninguno de los materiales que actualmente son utilizados es ideal y quizás no sea reemplazado por hueso en años (Langer, R. y Vacanti, J.P. 1993).

El “gold standard” de los injertos óseos ha sido el **autoinjerto** de hueso esponjoso-medula ósea (Marx RE., 1994), debido a que el receptor y el donante son el mismo individuo se evitan problemas de rechazo inmune. Las fuentes de los injertos autógenos varían según la cantidad y tipo de hueso que se necesite. En general, dentro de las intraorales están la sínfisis mandibular, rama mandibular, área retromolar, proceso coronoides, tuberosidad maxilar, torus palatino o mandibular y hueso cigomático. Las fuentes extraorales suelen ser la cresta iliaca anterior o posterior, calota, costillas y tibia (Kainulainen y cols., 2002; Kainulainen y cols., 2003). Los autoinjertos son una fuente rica de células óseas y medulares que tienen propiedades osteogénicas. Sus principales desventajas son la existencia de un segundo sitio quirúrgico, la morbilidad significativa resultante de la obtención, el suministro limitado y la existencia de un porcentaje de pacientes (aproximadamente el 8% de injertos de cresta iliaca) que resulta desarrollar complicaciones como infección, pérdida

de sangre, injurias a nervios, dolor a corto o largo plazo, déficit funcional (Minoru Ueda, 2011). Múltiples consideraciones clínicas han limitado el uso de autoinjertos externos, particularmente de la cresta iliaca, debido a la posibilidad de complicaciones quirúrgicas y morbilidad del paciente (Langer F. y cols, 1975; Schallhorn R., 1980).

Por otra parte, los **injertos alogénicos**, si bien son osteoconductivos, no tienen capacidad osteogénica ni osteoinductiva. Hay tres formas de hueso alogénico: el congelado fresco, el liofilizado (secado en frío) y la matriz ósea desmineralizada (DMB). El primer tipo no se usa mayormente hoy en día, debido al riesgo de transmisión de enfermedades virales y un posible rechazo inmunológico. El hueso liofilizado es simplemente osteoconductivo, por lo que requiere adicionalmente de una fuente de células osteocompetentes. El hueso desmineralizado (DBM), debido al proceso de desmineralización, pierde su estabilidad mecánica, por lo tanto necesita de un andamio para ser posicionado en defectos no retentivos.

Los **xenoinjertos** óseos tomados desde bovino (Bio-Oss®, Endobone®, Laddec®, etc), porcinos, o exoesqueleto de corales (Biocoral®), tienen estructura ósea, lo cual los hace osteoconductivos, pero no le otorga propiedades osteoinductivas, ya que su contenido orgánico es removido. (G.K.B. Sándor y cols, 2003). Aquellos provenientes de bovino, eliminan la problemática de la morbilidad asociada al sitio donante, pero generan la preocupación por la posibilidad de una futura encefalopatía espongiiforme bovina debido a la potencial transmisión lenta del virus en productos derivados de bovinos (Bons y cols., 2002).

Para superar estas limitaciones, tanto investigadores como clínicos están actualmente buscando nuevos materiales sintéticos o mediadores biológicos, donde la disponibilidad del material, el manejo quirúrgico, la transmisión de enfermedades y las propiedades bioactivas no sean un factor limitante. Debido a los distintos problemas y limitaciones presentados por los diversos tipos de injertos óseos, los sustitutos aloplásticos han sido desarrollados para reemplazar hueso (G.K.B. Sándor y cols, 2003). Los **materiales aloplásticos** son materiales sintéticos que han sido diseñados y procesados para su uso clínico en regeneración ósea. Actualmente existen

tres tipos de materiales aloplásticos utilizados: los **fosfatos de calcio** (hidroxiapatita (HA) y fosfato tricalcico (TCP)), **vidrios bioactivos** (BG) y **polímeros** (ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico (PLA)) (G.K.B. Sándor y cols, 2003). Dentro de los materiales cerámicos, la **hidroxiapatita (HA)** y **vidrio bioactivo (BG)**, debido a sus propiedades especiales de bioactividad, son muy atractivos para la reparación ósea. Particularmente, el vidrio bioactivo (BG), resulta de importancia en la regeneración y reparación ósea, considerando que es capaz de solubilizarse a lo largo del tiempo, liberando sus iones al medio que estimulan el proceso de regeneración ósea. El proceso de formación y resorción ósea (remodelación) está regulado por una variedad de agentes tanto sistémicos como locales, incluyendo factores de crecimiento, hormonas y estrés (Yamaguchi M., 1998). Adicionalmente, se sabe que iones inorgánicos individuales como calcio (Ca) (Marie P.J. y cols., 2006), fósforo (P) (Lossdörfer, S. y cols. 2004; Julien M. y cols, 2009), silicio (Si), estroncio (Sr), zinc (Zn), así como el boro (B), vanadio (V), cobalto (Co) y magnesio (Mg) (Zreiqat, H., 2002), están implicados en el metabolismo óseo y juegan un rol fisiológico en la angiogénesis, crecimiento y mineralización de tejido óseo. Los principales componentes de la apatita biológica son el Ca y el P, ellos configuran la fase inorgánica del hueso humano, por lo que estos iones obviamente juegan un rol esencial en la formación y resorción ósea. Por otra parte, el Ca extracelular juega un papel importante en la remodelación del hueso, ya que produce la activación directa de los mecanismos intracelulares mediante la interacción con los receptores sensibles al Ca en las células osteoblásticas. Por ejemplo, el Ca aumenta la expresión de *Insulin like growth factors* IGF-I or IGFII (Xynos, I.D., y cols., 2000), los cuales regulan la proliferación de osteoblastos humanos. Estos hallazgos han sido descritos recientemente en la literatura (Marie P.J., 2001). Resultados similares fueron observados (Valerio P. y cols, 2004), encontrando que el Ca extracelular aumenta la liberación de glutamato desde las células osteoblásticas. Desde que se sabe que las vías de señalización del glutamato juega un papel importante para la mecanosensibilidad del hueso (Hinoi E. y cols, 2004), la concentración de Ca extracelular debe ser considerado como un agente regulador importante en el metabolismo óseo. El fosfato inorgánico (P) ha

demostrado recientemente que estimula la expresión de proteína de la matriz GLA (MGP), un regulador clave para la formación de hueso, en las células osteoblásticas cuando se añade (10 Mmoles) al medio del cultivo celular (Julien M. y cols, 2009).

Hidroxiapatita

La HA sintética con fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$ presenta similitud química y estructural con el componente inorgánico de los huesos y dientes humanos (Hutmacher DW., 2007). Es biocompatible, osteoconductor, no tóxico, no inflamatorio, no inmunogénico y es bioactivo, es decir, posee la capacidad de formar un enlace químico directo con el tejido vivo del hueso (Aoki H., 1994; Currey J., 2001). Biocerámicas de HA han sido utilizadas recientemente en una gran variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo matrices para liberación controlada de medicamentos y materiales de ingeniería tisular ósea. (Ginebra y cols., 2006). Aplicaciones comunes en odontología incluyen reparación ósea, aumento óseo, recubrimiento para implantes y material de relleno en hueso o dientes (Bohner, 2000). Actualmente HA convencional, de tamaño micrométrico, se usa en forma de películas delgadas, polvos, o blocks densos o porosos (Murugan and Rao, 2003; Murugan and Qiu, 2004). La HA micrométrica convencional utilizada en algunos productos comerciales (Periograf®, Calcitite®, OsteoGraf®, etc.) es altamente cristalina y estable, por tanto menos bioabsorbible, siendo ésta una característica indeseable (Kivrak N. y Taş A.C., 1998), debido a que provoca que el proceso de su resorción sea muy diferente al que sufre el mineral óseo. Estos productos han sido diseñados para aplicaciones odontológicas como mantenimiento de hueso alveolar para preservación de la cresta alveolar, o aumento de cresta alveolar atrófica en altura y ancho, reduciendo el nivel de reabsorción ósea y permitiendo una restauración más estética y predecible. Sin embargo, la baja resistencia mecánica de HA convencional restringe su uso a aplicaciones de bajo soporte de cargas. (Zhou y Lee, 2011).

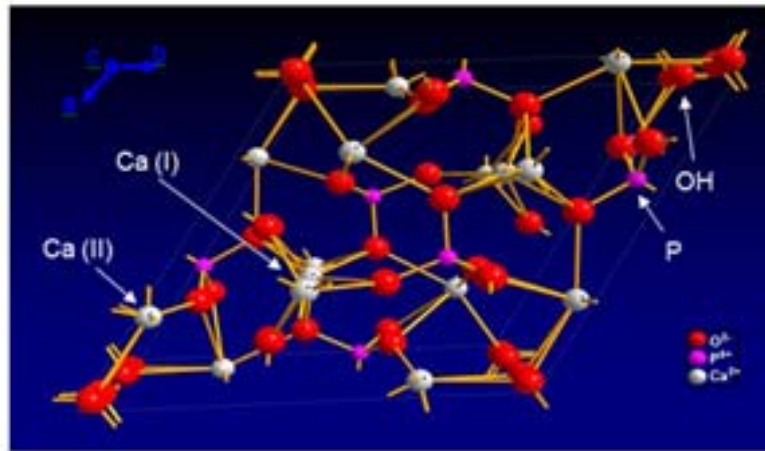


Figura 1: Estructura química de la hidroxiapatita.

Vidrios Bioactivos

Por otra parte, los **vidrios bioactivos (BG)** (Hench LL., 1998), muestran bioactividad superior, biocompatibilidad mejorada, osteoconductividad y propiedades osteoinductivas. Este biomaterial es osteostimulante y mejora la osteogénesis (Hench L., 2009). Ha sido reportado que influye en la diferenciación celular osteoblástica (Wheeler y cols, 1997; Wheeler y cols.,1998). Actualmente están siendo investigadas las señales que provee a células para crear hueso nuevo (Xynos y cols., 2000).

El **BG 45S5** (comercialmente **Bioglass®**), ha sido el vidrio más ampliamente investigado para aplicaciones biomédicas (Hench L.L, 1998). Este biomaterial es un silicato basado en la red tridimensional de SiO_2 , en la cual un átomo de Silicio (Si) está coordinado con cuatro átomos de Oxígeno (O). Su composición química es $24.5\text{Na}_2\text{O} : 24.5\text{CaO} : 45.0\text{SiO}_2 : 6.0\text{P}_2\text{O}_5$ (% peso). A diferencia de la HA, el BG posee una estructura fundamentalmente amorfa, compuesta a base de red de tetraedros de sílice (SiO_2) unidos por enlace de oxígeno, y que contiene los iones fosfatos (PO_4) generalmente separados de esta red. La estructura del BG también posee grupos OH localizados en su superficie.

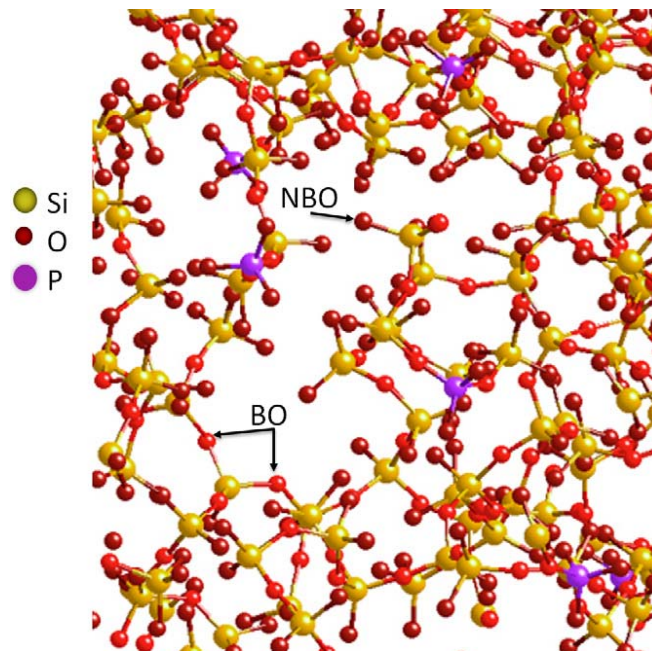


Figura 2: Estructura química de biovidrio, BG. (los iones Ca y Na fueron removidos del esquema para mayor claridad).

El BG también posee la gran propiedad de unirse químicamente al tejido óseo. Su unión al hueso se atribuye a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA), biológicamente activa, sobre la superficie del BG al encontrarse en contacto con el fluido corporal (Suvorova E. y cols, 1998; Hench LL. cols, 2002), la cual genera la unión entre el tejido vivo y el biomaterial. El hueso nuevo se forma alrededor de las partículas de BG, fenómeno etiquetado como osteoproducción u osteoestimulación. Tanto el cristal como los productos de disolución iónica liberados influyen y controlan el ciclo celular de las células precursoras osteogénica (Valerio y cols., 2004). La combinación de iones Na^+ , Ca^{2+} y sílice soluble, liberados durante degradación de BG, gatillan a las células a producir hueso (Hench y Polak, 2002).

Estudios indican que BG tiene mayor bioactividad que HA (Ghosh y cols., 2008), probablemente debido a la formación de una capa rica en sílice biológicamente activa, que promueve fuertemente el crecimiento óseo. **Bioglass®** ha sido el vidrio más investigado para aplicaciones biomédicas (Hench L.L., 1998), estudiado ampliamente para reparación y regeneración

ósea. Se ha demostrado que es capaz estimular la neoformación de hueso in vivo (Wheeler y cols, 1997; Wheeler y cols., 1998) y que promueve proliferación ósea en forma más rápida que HA sintética. (Oonishi et al., 1999). En relación a reparación de tejidos blandos, existe evidencia reciente que muestra la habilidad de BG para promover la angiogénesis. (Gorustovich, A.A., y cols., 2010). De esta manera, la biocompatibilidad, la bioactividad (Wilson, J. y cols, 1981), la osteoconductividad y la osteoinductividad, son propiedades que se le atribuyen al BG y están siendo investigadas las señales específicas que entrega a las células para crear hueso nuevo. (Xynos y cols., 2000; Xynos y cols., 2001). Además, se considera que BG es osteoestimulativo, debido a su capacidad para estimular, mediante productos de disolución iónica (Ca^{2+} , Si) liberados durante su degradación, la osteogénesis mediante del control directo sobre genes que regulan la inducción del ciclo celular y la progresión hacia fenotipo de osteoblasto maduro. Dichos iones influyen y controlan el ciclo celular de células precursoras osteogénicas y de la población de células diferenciadas (Xynos, I.D., y cols, 2000; Hench y Polak, 2002; Valerio y cols., 2004), teniendo como consecuencia biológica la rápida proliferación y diferenciación a osteoblastos, lo cual es una ventaja en las aplicaciones clínicas, produciéndose el relleno de defectos óseos en forma expedita con hueso neoformado, equivalente en forma estructural y mecánica a hueso normal y sano (Hench, 2009).

Nanotecnología

A pesar de las excelentes propiedades bioactivas exhibidos por HA y BG, la mayoría de los estudios publicados, así como los productos dentales comerciales tratan de HA o BG con un tamaño de partícula micrométrico. Además, estos materiales se sintetizan mediante procesos de altísima temperatura (1300-1450 °C), lo que implica un alto gasto energético y menor reactividad por parte de los materiales. Hoy en día, los avances en la investigación de **nanomateriales** permiten la síntesis de las biocerámicas con tamaño de partícula nanométrico, usando temperaturas de procesamiento relativamente bajas mediante técnicas de “Sol-gel” (Sanosh y cols., 2009;

Hong, Z. y cols, 2009), método que además permite controlar la adaptación molecular y la textura de los materiales (Avnir D. y cols, 2006).

El desarrollo durante la última década en física e ingeniería ha resultado en un gran interés en las propiedades de partículas de un tamaño mínimo y sus posibles aplicaciones en diferentes campos. Se establece el término “**Nanotecnología**” dado por el Prof. Kerie E. Drexler, que ha sido definida como “la creación de materiales funcionales, dispositivos y sistemas a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100 nm), y la explotación de nuevos fenómenos y propiedades físicas, químicas y biológicas en aquella escala (NASA) (Mendonça G y cols, 2008).

Los nanomateriales exhiben propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a su significativo aumento de área superficial y rugosidad, comparado con los materiales convencionales o microestructurados. La nanotecnología está siendo explorada en múltiples ámbitos biomédicos (Salata OV., 2004). Las propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, regulando el comportamiento celular y dictando la regeneración de tejidos. Estudios previos han demostrado que los materiales nanoestructurados con propiedades de superficies favorables pueden promover mayores cantidades de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera más eficiente el crecimiento del nuevo hueso, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para comprender el por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores que la de los microestructurados para estimular la regeneración ósea (Nayar S. y cols, 2011). Por otra parte, el hueso es un compuesto cerámico natural formado por fibras colágenas que contienen nanocristales inorgánicos, cuyo tamaño fluctúa entre los 25-50 nanómetros de largo. (Zhou H. y Lee J., 2011). Por lo que es esperable que materiales con la misma dimensión de organización provoquen una respuesta mejor y más fisiológica, además la resorción por los osteoclastos es más rápida y homogénea que en materiales microestructurados.

Bioactividad

Un material bioactivo se define como un material que provoca una reacción específica de superficie cuando es implantado en el cuerpo, llevando a la formación de una capa tipo HA que es responsable de generar una unión firme con los tejidos duros. La bioactividad de HA y otras biocerámicas se demuestra preliminarmente por mineralización *in vitro* (prueba de Kokubo) (Kokubo T. y Takadama H., 2006). Se ha sugerido que la bioactividad *in vitro* es un índice del potencial bioactivo de un material *in vivo*. (Ducheyne, 1987)

Gracias a la energía superficial elevada se genera un depósito en capa de HA en la superficie del material (Landi E. y cols, 2005; Kim H. y cols, 2005). Se espera que **partículas nanométricas de HA (n-HA) y BG (n-BG)** exhiban mejores propiedades bioactivas para la reparación ósea, debido a la mayor “razón de aspecto” (razón entre el área superficial y el volumen de la partícula) superior dado por la nanodimensión (Ghosh y cols., 2008; Zhou H. y Lee J., 2011). Cristales más pequeños se disuelven más rápido que los más grandes de la misma composición, debido a la mayor área superficial expuesta al ambiente biológico y por el mayor número de defectos superficiales (Daculsi G. y cols, 1989; Suvorova E. y cols, 1998). Además los polvos nanocristalinos exhiben una mejor sinterización y una mayor densificación debido a la mayor área de superficie, mejorando la resistencia a la fractura y otras propiedades mecánicas (LeGeros, R. Z., 1993).

La liberación de iones Ca^{+2} de n-HA es similar a la apatita ósea y significativamente más rápida que los convencionales micro HA (Ducheyne P., 1993). Numerosos estudios también indican que las propiedades de superficie químicas de las nanopartículas desempeñan un papel crucial en su interacción con las células (Verma A. y Stellacci F., 2010). Nanopartículas de HA presentan la morfología, tamaño y cristalinidad comparables a las de HA que constituye tejido duro humano.

Actualmente en el ámbito clínico el BG, en sus diferentes formatos comerciales, Bioglass®, Perioglass®, Biogran®, etc., es utilizado como injerto óseo en cirugía bucal de defectos óseos menores, tales como cirugías de regeneración de hueso alveolar, relleno de alveolo post extracción dentaria,

regeneración ósea guiada, elevación de seno maxilar, aumento de cresta ósea, relleno en exéresis de quistes y apicectomías, y tratamiento de perimplantitis, etc. Hasta la fecha, estos productos comerciales para aplicaciones clínicas se limitan a fabricarse sintetizados por procesos de fusión, por lo que todos ellos presentan tamaño de partícula micrométrico. Además estos materiales presentan limitaciones importantes como su alta temperatura de preparación, la estrecha gama de composiciones bioactivas y características texturales limitadas. El desarrollo de BG con dimensiones nanométricas podría conducir al desarrollo de biomaterial y tratamientos más eficientes para la reparación en odontología.

Vidrio Bioactivos nanométricos.

Actualmente gracias a procedimientos de síntesis basados en la técnica Sol-Gel es posible la preparación de BG con tamaño nanométrico (**n-BG**), con lo cual se espera que presenten propiedades superiores al BG convencional de tamaño micrométrico. Además, la incorporación de la química supramolecular a los procesos de Sol-Gel ha proporcionado una nueva generación de **vidrios bioactivos mesoporosos** altamente ordenados (**MBG**) para aplicaciones biomédicas (Vallet-Regí M. y cols, 2006; Vila M. y cols, 2009). El tamaño de partícula del MBG es micrométrico, pero presenta en su interior poros de tamaño nanométrico. MBG exhibe comportamiento y bioactividad mejoradas, alta capacidad de adsorción de las proteínas del suero, maduración mineral similar a la fisiológica, capacidad para albergar agentes activos que contribuyen a los procesos de reparación del tejido debido a sus sobresalientes valores de área superficial y porosidad. Actualmente este biomaterial es investigado ampliamente para aplicaciones de liberación controlada de fármacos, revestimientos de implantes y en reparación y regeneración ósea. El MBG se sintetiza utilizando la técnica Sol-Gel en conjunto con el proceso de Autoensamblaje Inducido por Evaporación (*Evaporation Induced Self-Assembly*, EISA) (López-Noriega A. y cols, 2006). En el proceso EISA se utiliza un surfactante no iónico, como Pluronic 123 (EO₂₀PO₇₀EO₂₀), cuyas micelas

formadas espontáneamente en solución actúan como molde para la formación de nanoporos, generándose una nanoestructura porosa altamente ordenada. La formación de las micelas es fundamental para las aplicaciones en las que se combina el proceso sol-gel con la química de surfactantes (**Figura 3**), debido a que la estructura micelar es la que da forma y define los poros de la estructura, en este caso nanoporos. Esto se debe a la organización espontánea o auto-ensamblaje de las micelas. Este proceso además, permite utilizar temperaturas de calcinación relativamente bajas, alrededor de los 400°C, en comparación con los materiales convencionales que bordean los 1200°C, lo cual afecta la bioactividad de la partícula, reduciendo su capacidad de reacción.

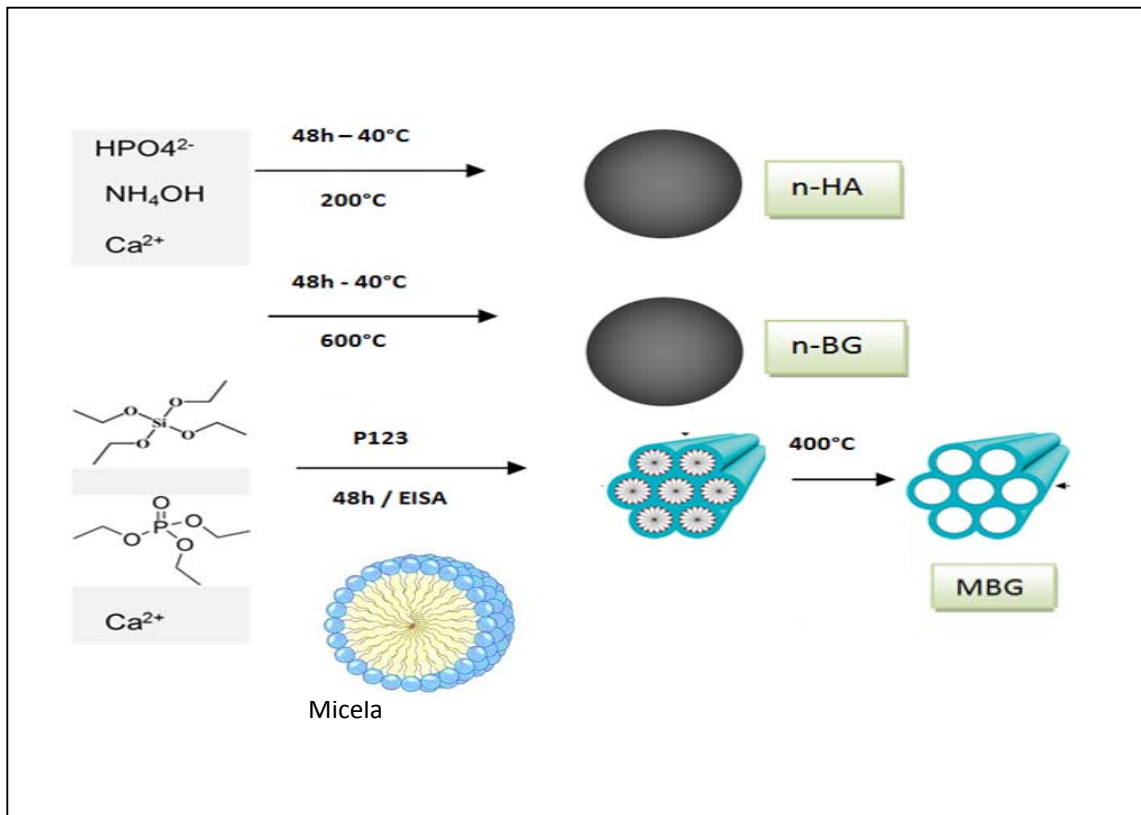


Figura 3. Esquema de la preparación y estructura de las nanobiocerámicas.

Dado que la bioactividad es una cascada de eventos de superficie, el control de ésta a escala nanométrica, hace que sea posible imitar el proceso

fisiológico de biomineralización y estimula la función de los osteoblastos para los propósitos de regeneración. En este sentido, la búsqueda de materiales con propiedades altas y regulables de textura en la escala nanométrica se ha convertido en uno de los objetivos más interesantes de la ciencia en biomateriales.

Nanotecnología e Ingeniería de Tejidos.

Estos biomateriales avanzados resultan atractivos para aplicaciones de reparación ósea en odontología como una alternativa mejorada a los materiales actuales de injerto. Esto sumado a que existe una tendencia hacia el desarrollo de la **nanotecnología** en conjunto con la **ingeniería de tejidos**, como una alternativa a las técnicas tradicionales de reparación ósea, lo cual cada vez cobra más relevancia en vista a las actuales limitaciones. Estos avances en odontología podrían tener impacto en aplicaciones en áreas como cirugía maxilofacial, periodoncia e implantología. La ingeniería de tejidos ha sido definida como “un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y las ciencias biológicas en pro de desarrollar sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular o un órgano completo (Langer R. y Vacanti J.P., 1993). La bioactividad que presentan la nanopartículas de HA y BG resultan atractivo para su uso en aplicaciones de ingeniería tisular ósea. En el desarrollo de la ingeniería tisular tres elementos fundamentales se asocian estrechamente: **andamios, señales biológicas y células** (Kaigler y Mooney, 2001). Los denominados andamios o *scaffolds* son matrices tridimensionales (Boccaccini, A.R, 2010), que proveen una estructura temporal para las células formadoras de tejido, guiando la proliferación y diferenciación celular . Por otra parte, las señales biológicas permiten la inducción o activación de células madres vecinas al sitio del defecto a través de señales químicas específicas. Como señales de estimulación biológica comúnmente se estudian factores de crecimiento como la proteína morfogenética ósea (BMP). Sin embargo el uso de **nanopartículas bioactivas** está cobrando atención como componente para la generación de estímulos

biológicos (Valenzuela F., Covarrubias C., y cols. 2012). En este contexto, las nanopartículas biocerámicas resultan atractivas para el desarrollo de constructos bioactivos para la ingeniería tisular ósea. Sin embargo, actualmente no se tiene información acerca de qué propiedad a nanoescala es más determinante en regular la bioactividad de estas nanocerámicas bioactivas. El n-BG es un vidrio bioactivo con tamaño de partícula nanométrico, que tendría una bioactividad dada principalmente por su superficie externa. El MBG es el mismo material con tamaño de partícula micrométrico pero con una estructura interna nanoporosa lo cual aumenta su área superficial total, lo cual favorece su bioactividad. Por otro lado, n-HA presenta similar tamaño nanométrico que n-BG pero con una composición química diferente, que se traduciría en un comportamiento bioactivo distinto. De acuerdo a lo anterior, resulta de interés el conocer de qué forma estas diferentes propiedades estructurales de las nanobiocerámicas afectan su bioactividad, y cuál de ellas tendría un rol más determinante en su comportamiento.

En este trabajo se sintetizan y caracterizan las biocerámicas **n-HA, n-BG y MBG**, y se compara el efecto de su nanoestructura sobre sus propiedades de bioactividad *in vitro*.

2. HIPÓTESIS

Materiales cerámicos bioactivos con diferente nanoestructura (tamaño de partícula y nanoporosidad) y naturaleza química presentan diferentes propiedades osteogénicas *in vitro*.

3. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar materiales cerámicos bioactivos con diferente nanoestructura (tamaño de partícula y nanoporosidad) y naturaleza y evaluar sus propiedades osteogénicas *in vitro*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas bioactivas de n-HA, n-BG y MBG.
2. Evaluar la bioactividad *in vitro* de los nanomateriales en suero fisiológico simulado (SBF).
3. Evaluar la capacidad de adsorción de proteínas extracelulares de los nanomateriales.
4. Evaluar las propiedades de diferenciación osteogénica de los nanomateriales frente a células madres provenientes de pulpa dental humana (DPSCs).

5. METODOLOGÍA

5.1 Síntesis de nanomateriales.

5.1.1. Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita.

La síntesis de n-HA se llevará a cabo a través del método de precipitación sol-gel (Sanosh y cols., 2009). Los precursores iniciales de la reacción a utilizar serán: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KH_2PO_4 , aportando calcio y fosfato.

Para su preparación 50 mL de potasio dihidrógeno fosfato 0.6M o KH_2PO_4 (May & Baker) será agregado gota a gota a un igual volumen de nitrato de calcio 1M ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich). Esta solución se mantendrá bajo agitación constante. Amonio acuoso (NH_3) será adicionado por goteo a la solución resultante hasta que se alcance un pH 11. La solución precipitante será agitada por 1 hora y envejecida a temperatura ambiente por 24 horas. Se obtendrá un precipitado de color blanco, el cual será separado y lavado por centrifugación y redispersión con agua fresca destilada, en tres ciclos. Posteriormente será secado a 40°C por 24 horas y calcinado a un ritmo de 10°C/min a 200°C, manteniéndose en esta última por 1 hora.

La temperatura de calcinación de 200°C fue elegida a fin de obtener una nano partícula de HA menos cristalina y más reactiva.

5.1.2. Síntesis de nanopartículas de vidrio bioactivo.

Las partículas de n-BG fueron sintetizadas a través de una modificación del método sol-gel reportado inicialmente por Hong y cols., 2009. A fin de obtener n-BG con mejor bioactividad, Valenzuela, Covarrubias y cols. 2012, reportaron la síntesis de n-BG utilizando la siguiente composición molar en la mezcla reaccionante: 58 SiO_2 :40 CaO :5 P_2O_5 (2012). Este sistema de sol-gel se formó mediante el uso de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$, y tetraetil orto silicato (TEOS) de fórmula $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, como precursores, en un medio de amonio.

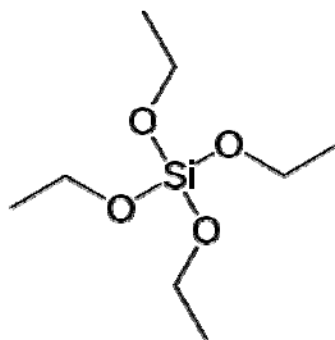


Figura 4: Estructura de la molécula de TEOS.

Una solución basada en calcio fue preparada disolviendo 7,7 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- Aldrich) en 117 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Una segunda solución se preparó diluyendo 9,7 mL de tetraortosilicato (TEOS 98%; Aldrich) en 63,5 mL de etanol, la cual fue adicionada a la solución de nitrato de calcio. El pH de la solución resultante fue ajustado a 1-2 con ácido cítrico. La solución transparente fue lentamente adicionada por goteo bajo agitación rigurosa. La solución transparente fue lentamente goteada bajo agitación vigorosa sobre una solución de 1,2 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (May & Becker) en 1500 mL de agua destilada. Durante el proceso de goteo el pH debió ser mantenido alrededor de 10 adicionando amonio acuoso. La mezcla se agitó por 48 horas y posteriormente se dejó envejeciendo por otras 24 horas a temperatura ambiente.

El precipitado obtenido fue separado por centrifugación a 12000 rpm, y lavado mediante tres ciclos de centrifugación- redispersión con agua destilada. El sólido separado fue dispersado en 200 mL de una solución acuosa al 2% p/v de polietilenglicol (PEG 10000) y agitado por 24 horas. Esta solución fue congelada a -80°C , liofilizada y sometida a calcinación a 700°C por 3 horas para obtener un polvo blanco y fino de n-BG.

5.1.3. Síntesis de vidrio bioactivo mesoporoso.

MBG-85 de fórmula general $85\text{SiO}_2-10\text{CaO}-5\text{P}_2\text{O}_5$ (mol.%) fue sintetizado usando el método sol-gel/autoensamblaje por evaporación inducida (EISA) (García A. y cols, 2009). La síntesis de la solución sol-gel fue preparada usando TEOS, trietil fosfato (TEP), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ como fuente de SiO_2 , P_2O_5 y CaO , respectivamente. Además se utilizó un surfactante denominado Pluronic123 (Aldrich). Los surfactantes son moléculas que contienen una parte apolar que consta de una larga cadena hidrocarbonada, y otra polar, que consta de una parte o “cabeza” polar soluble en agua. Estas moléculas a una concentración determinada se reúnen y forman conglomerados llamados micelas, la cual varía en su forma según el tipo de surfactante que se utilice, actuando como agente de molde para producir y ordenar poros. La solución sol-gel fue formada usando HCl como catalizador en un medio agua-etanol. En la primera solución preparada se hidrolizó 4 ml de TEOS en 20 ml de etanol con 0.5 ml de HCl, ajustando de esta forma el pH a 2. Esta solución se mantuvo en agitación por 20 minutos. Posteriormente la primera solución debió ser adicionada sobre una segunda solución, la cual se compone de 2 g de Pluronic123, disueltos en 20 ml de etanol. Una vez que, ambas soluciones se mezclaron se debió agregar 0.34 g de TEP y 0.49 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. El sol incoloro resultante fue agitado a temperatura ambiente por 3 horas, y luego fue transferido a placas Petri, en pequeñas cantidades que apenas cubran la superficie del fondo.

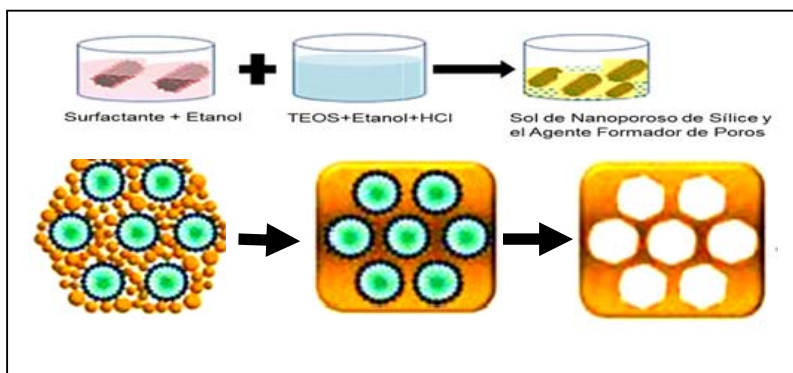


Figura 5: Esquema del proceso de la síntesis del MBG.

El solvente se evaporó a 35°C por 24 horas. Posteriormente, el gel seco se removió como un film homogéneo y transparente y fue calcinado a un ritmo de 1°C/ min hasta llegar a los 400°C, se mantuvo esta temperatura por 3 horas para obtener finalmente MBG.

5.2. Caracterización de nanomateriales.

La estructura cristalina de los materiales, se caracterizó por medio de difracción de rayos-X (DRX), el tamaño de partícula y la nanoestructura fue analizada por microscopía electrónica de transmisión (TEM), la estructura química por espectroscopía de infrarrojo con reflectancia atenuada (FTIR-ATR), el área superficial y el tamaño de nanoporos de los materiales se determinó por sortometría de N₂ a 77 K.

5.3 Bioactividad en SBF.

Para estos ensayos las partículas de n-HA, n-BG y MBG fueron prensadas para formar piezas circulares de 9 mm de diámetro por 2 mm de espesor (**Figura 6**).

La bioactividad fue evaluada *in vitro* mediante la capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea en fluido fisiológico simulado (SBF), el cual tiene concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano.

La solución de SBF se preparó de acuerdo a la composición iónica estándar (Na⁺ 142.0, K⁺ 5.0, Ca²⁺ 2.5, Mg²⁺ 1.5, Cl⁻ 148.0, HCO₃⁻² 4.2, HPO₄⁻² 1.0, SO₄²⁻ 0.5 mM) (Kokubo y Takadama, 2006). El fluido fue neutralizado, ajustándolo a pH fisiológico 7.4 con tri-(hidroximetil) aminometano y ácido hidroclicórico.

Tabla 1: Cantidades de reactivos utilizados en la preparación de SBF.

Reactivo	SBF Para 1 L
Agua destilada	750 mL
NaCl	7,996 g
NaHCO ₃	0,350 g
KCl	0,224 g
K ₂ HPO ₄	0,179 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,305 g
HCl 1 M	40 mL
CaCl ₂	0,278 g
Na ₂ SO ₄	0,071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂ (Buffer Tris)	6,057 g
HCl para ajustar a pH 7,4	-----

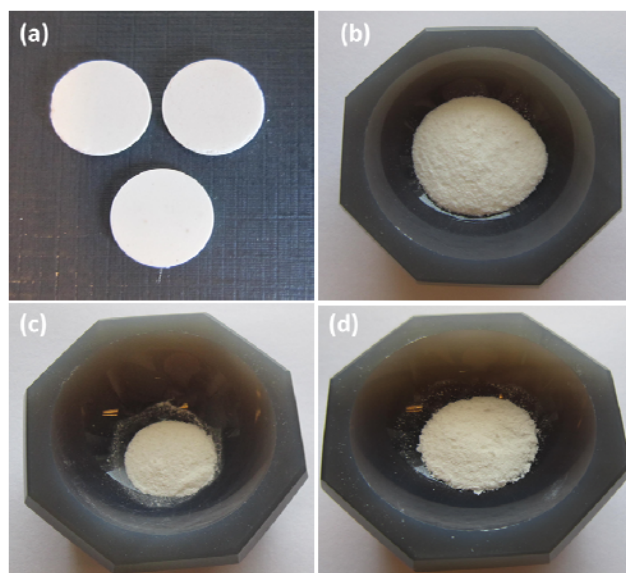


Figura 6. (a) Prensados de cada biomaterial, nanopartículas en polvo de (b) n-HA, (c) MBG, (d) n-BG.

Las piezas prensadas de cada material fueron sumergidas en 50 ml SBF en contenedores de polietileno y mantenidas bajo leve agitación en condiciones termostalizadas a 36.5°C por diferentes tiempos (12 horas, 24 horas y 3 días). Las piezas fueron removidas del SBF al cumplir sus correspondientes tiempos y lavadas con agua destilada. Posteriormente se sometieron a secado a 40°C.

La formación de apatita tipo ósea sobre los materiales fue identificada mediante DRX, microscopía electrónica de barrido con microanálisis elemental (SEM-EDX) y espectroscopía FTIR-ATR.

5.4. Ensayos de adsorción de proteínas.

Se realizaron pruebas preliminares para cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas extracelulares de las nanobiocerámicas.

Las proteínas utilizadas para realizar los ensayos fueron la albúmina de suero bovino y fibrinógeno de plasma humano. Un buffer de fosfato se usó para preparar la solución proteica.

La solución de proteínas (1 mg/mL) fue contactada con una muestra (0,1mg material / 908.75 ppm-1047.9ppm, volumen de solución de proteínas) en una placa de cultivo de 24 pozos, y luego incubada a 37°C por 6 horas. Posteriormente fueron centrifugadas. Las proteínas no adherentes fueron removidas mediante lavados con buffer de fosfato. Luego, una solución al 2% de dodecyl sulfato de sodio fue agregada a cada pozo, y posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C por una noche para extraer las proteínas adheridas.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el ensayo de ácido micro Bicinchoninic espectrofotométrico (BCA, Sigma) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Adicionalmente se analizó mediante FTIR-ATR las moléculas de proteínas adsorbidas sobre la superficie de cada nanomaterial. Para este propósito se obtuvieron los espectros FTIR de los materiales luego del periodo

de 6 horas de incubación con la solución de proteínas, removiendo previamente con buffer fosfato las proteínas no adherentes.

5.5 Ensayos celulares de viabilidad y de diferenciación osteogénica.

El potencial que presentan las partículas cerámicas para inducir la diferenciación osteogénica se evaluó usando células madres dentales.

En este estudio se utilizaron células madre de pulpa humana (DPSCs), provenientes de terceros molares impactados sanos, de adultos jóvenes (15-24 años), aisladas y cultivadas en el marco de otra tesis suscrita al proyecto FONDECYT.

5.5.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células madre de pulpa dental humana (DPSCs) en un medio condicionado previamente para cada una de los tres tipos de nanopartículas.

Para realizar el acondicionamiento del medio de cultivo (Xynos, I.D. y cols, 2000; Sepúlveda, P., y cols, 2002; Pirayesh, H. y Nychka, A. 2013), se depositaron las diferentes nanopartículas en polvo sobre placas de 100 mm a una concentración 1% p/v. Los biomateriales fueron esterilizados mediante radiación ultravioleta 24 h previas a la adición del medio basal α -MEM (Hyclone) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin (GIBCO) y 0,25 μ g/ml de anfotericina B (SIGMA). Una vez transcurrido el tiempo de acondicionar los medios (24 h, 72 h y 5 días), los biomateriales fueron centrifugados a 4000 rpm por 20 minutos y filtrados empleando un tamaño de poro de 0,2 μ m. De esta manera se obtuvo un medio que contiene los productos de disolución bioactivos de la biocerámica. Posteriormente se igualaron los volúmenes de los medios a 6 ml que

corresponden al volumen inicial para estandarizar y se suplementó con suero fetal bovino (SFB, Hyclone) al 10% para su posterior uso.

Luego de un determinado tiempo de incubación, se midió la viabilidad celular utilizando el ensayo 3-(4,5-dimetiltiazol-2YL)5-(3-Carboximetofenil)-2-(4-solfenil)2H-tetrazolium (MTS), de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante. Las células se incubaron durante dos horas con MTS. Posteriormente se midió la absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia observada corresponde al producto de reducción del MTS (formazán), el cual es producido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo.

5.5.2 Actividad de fosfatasa alcalina (ALP) mediante Ensayo NBT/BCIP.

La actividad de ALP fue medida indirectamente y de manera preliminar a través del ensayo cualitativo NBT/ BCIP. La combinación de NBT (cloruro de tetrazolio nitro-azul) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato sal de p-toluidina) produce un intenso precipitado insoluble, negro-púrpura cuando se hace reaccionar con ALP. Este sustrato insoluble puede ser observado con microscopia óptica y la intensidad de este es proporcional a la cantidad de ALP de la muestra.

Se sembraron 6.500 células en pozos de 35 mm, en una placa de 48, en duplicado para cada condición. Una vez alcanzada la confluencia, se agregó el medio osteogénico a la muestra diferenciada y por otra parte, se mantuvo con alfa-MEM la muestra control.

Las dos muestras fueron suplementadas con 10% SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 0,25 µg/ml de anfotericina B, pero sin suplementos de diferenciación osteogénica. El medio fue cambiado cada 3 días. El día 8 las muestras se fijaron con ETOH/formaldehido (9:1) bajo campana de flujo durante 1 minuto, luego se lavaron con TBS 1 x 3 veces y se agregó la mezcla de NBT/BCIP. Se incubaron durante 1 hora a 37°C de

temperatura, 5% CO₂ a la oscuridad. Luego se lavaron 2 veces y finalmente fueron observadas las placas al microscopio óptico (Seo y cols., 2004).

5.6 Análisis estadístico.

Se realizó prueba estadística de Kolmogorow- Smirnov y Shapiro Wiks (inferior a 30 casos) para comprobar la normalidad de la distribución. Se aplica el test de ANOVA con post-test de Bonferonni, para ver diferencias de medias entre los grupos a los diferentes días, según sea el caso. Se utiliza un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05\%$). Este análisis fue aplicado mediante el programa GraphPad Prism 5 para los ensayos de adsorción de proteínas y viabilidad por MTS.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las nanobiocerámicas

Las distintas nanoestructuras de las partículas y sus respectivos tamaños se observaron a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (**Figura 7**) revelando que n-HA y n-BG presentan un tamaño de estimado de partículas de 40 y 70 nm, respectivamente, mientras que las partículas del MBG presentaron un tamaño mayor (2 μm).

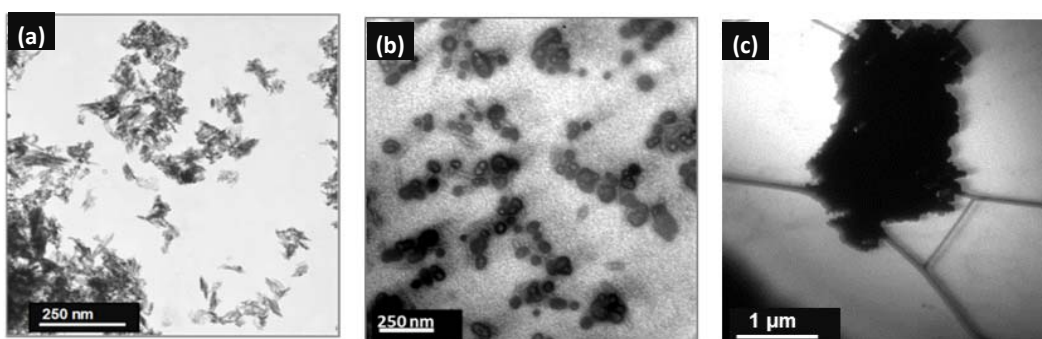


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de (a) n-HA, (b) n-BG, (c) MBG.

De acuerdo a la morfología de las partículas se puede observar que n-HA presenta nanocristales tipo aguja, mientras que n-BG presenta forma más ovalada y en agrupaciones tipo racimo. Las partículas de MBG se observan con una apariencia amorfa.

En la **Figura 8**, se presenta el análisis de difracción de rayos-X (DRX) para identificar el ordenamiento estructural de los biomateriales. n-HA presentó una estructura cristalina, lo cual se puede observar por los peaks de difracción característicos de la hidroxiapatita, a $31,7^\circ$ y 27° . En cambio los biovidrios, tanto n-BG como MBG, se muestran como estructuras amorfas, no presentando peaks característicos de su ordenamiento.

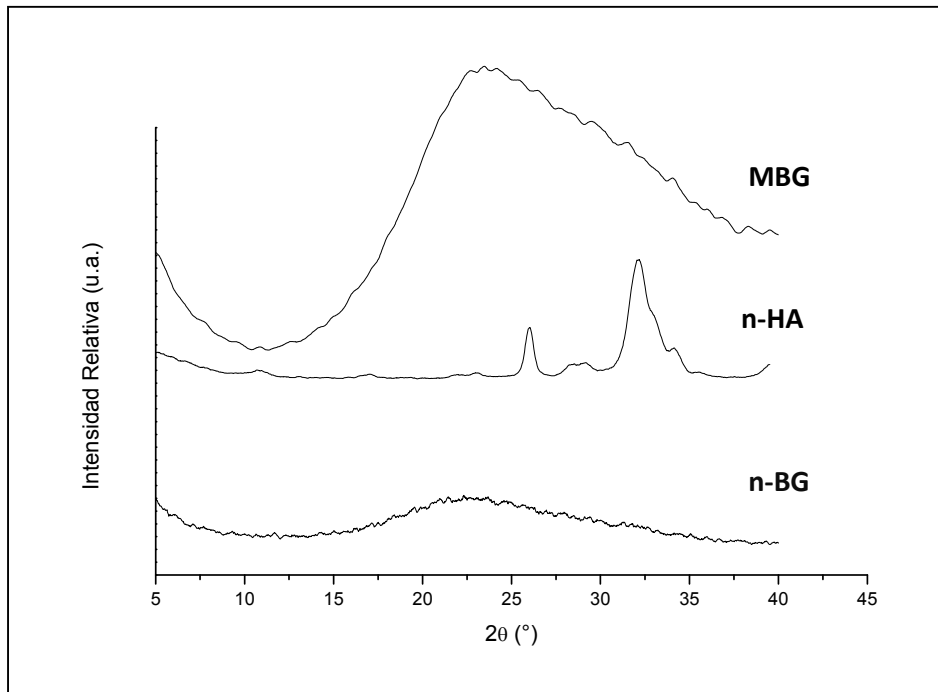


Figura 8. Patrones de DRX de los biocerámicas estudiadas.

La estructura química de las nanopartículas fue analizada por FTIR-ATR (**Figura 9**). Se muestra el espectro FTIR de las partículas de n-HA, n-BG y MBG. Las señales a 470, 810 y 1058 cm^{-1} corresponden a vibraciones del enlace Si-O. Por otro lado las señales que aparecen a 576, 613 y 1058 cm^{-1} corresponden a vibraciones del enlace P-O [ref]. La banda ancha que aparece alrededor de 3500 cm^{-1} , es atribuida a grupos OH- propios de los derivados del proceso sol-gel. En el espectro de las partículas de nHA, las señales que aparecen a 570, 604 y 1058 cm^{-1} corresponden a vibraciones del enlace P-O. En el caso del n-BG la señal mucho más intensa que aparece a 1058 cm^{-1} se debe al solapamiento de las vibraciones de los enlaces Si-O y P-O. Así, fue posible corroborar la estructura química de las nanopartículas sintetizadas mediante el método sol-gel.

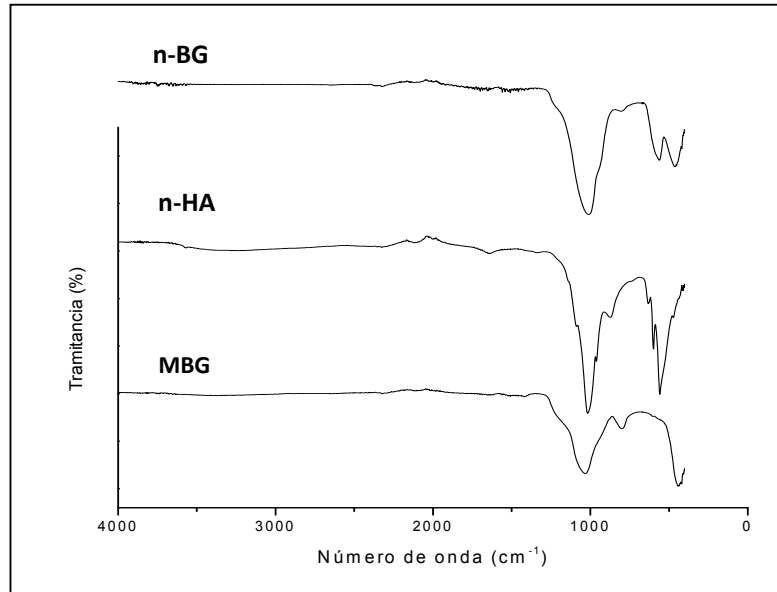


Figura 9. Espectros FTIR-ATR de las biocerámicas estudiadas.

Por medio del método de Sortometría de N₂ a 77 K se realizó la medición del área superficial de cada una de las biopartículas y se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Valores de Área superficial y tamaño de partícula para las biocerámicas.

	n-HA	n- BG	MBG
Tamaño de partícula (nm)	40	70	2 000
Área superficial específica (m ² / g)	66	76	487

Con el propósito de estudiar el ordenamiento de la nanoestructura interna, los nanomateriales fueron, además, analizados , por DRX de ángulo bajo (**Figura 9**). El patrón de DRX del MBG presenta un peak a 2° 2θ (**Figura 10(b)**), el cual indica que este material está constituido por una estructura interna porosa altamente ordenada. Este peak no lo presentan los patrones de

DRX de n-HA y n-BG (**Figura 10(a)**), confirmando la ausencia de este ordenamiento interno en estas partículas. La **Figura 10(c)** muestra una imagen de HR-TEM del MBG. Se puede observar que este material posee una nanoestructura interna porosa altamente ordenada, compuesta de poros hexagonales de aproximadamente 4nm de diámetro.

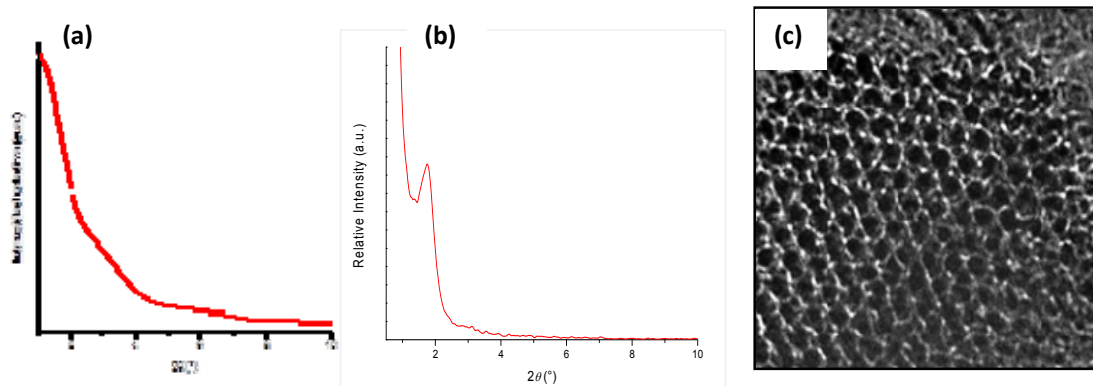


Figura 10. Patrón de DRX de ángulo bajo para a) n-BG y n-HA, b) MBG, c) Estructura porosa interna del MBG, observada por HR-TEM.

6.2. Bioactividad en SBF.

La formación de apatita tipo ósea formada en el ensayo de bioactividad en SBF, se analizó mediante DRX, SEM-EDX y FTIR-ATR.

En la **Figura 11** se presentan los patrones de DRX para los tres tipos de nanopartículas bioactivas, luego de diferentes periodos de inmersión en SBF. Los patrones correspondientes a n-BG, MBG y n-HA presentan señales de difracción alrededor de 27° y $31,7^\circ$ 2θ , que pueden ser atribuidas a la formación de apatita. A las 12 h, ya es posible observar tanto en n-BG como en MBG formación de apatita sobre su superficie, intensificándose significativamente en los días 1 y 3 para n-BG. Igualmente MBG se intensifica en su fase de apatita que logra formarse los días 1 y 3, pero las señales son considerablemente menos intensas que las observadas en n-BG. Por otra parte la n-HA muestra desde tiempo 0 peaks correspondiente a la fase apatita, sin embargo esto es debido a que la naturaleza del material corresponde a hidroxiapatita. En el ensayo SBF lo que interesa como parámetro de bioactividad es la apatita formada producto del contacto del material con el SBF. En este sentido, el

aumento proporcional de los peaks de DRX de la n-HA inmersa en SBF es muy inferior al observado en los vidrios bioactivos (n-BG, MBG).

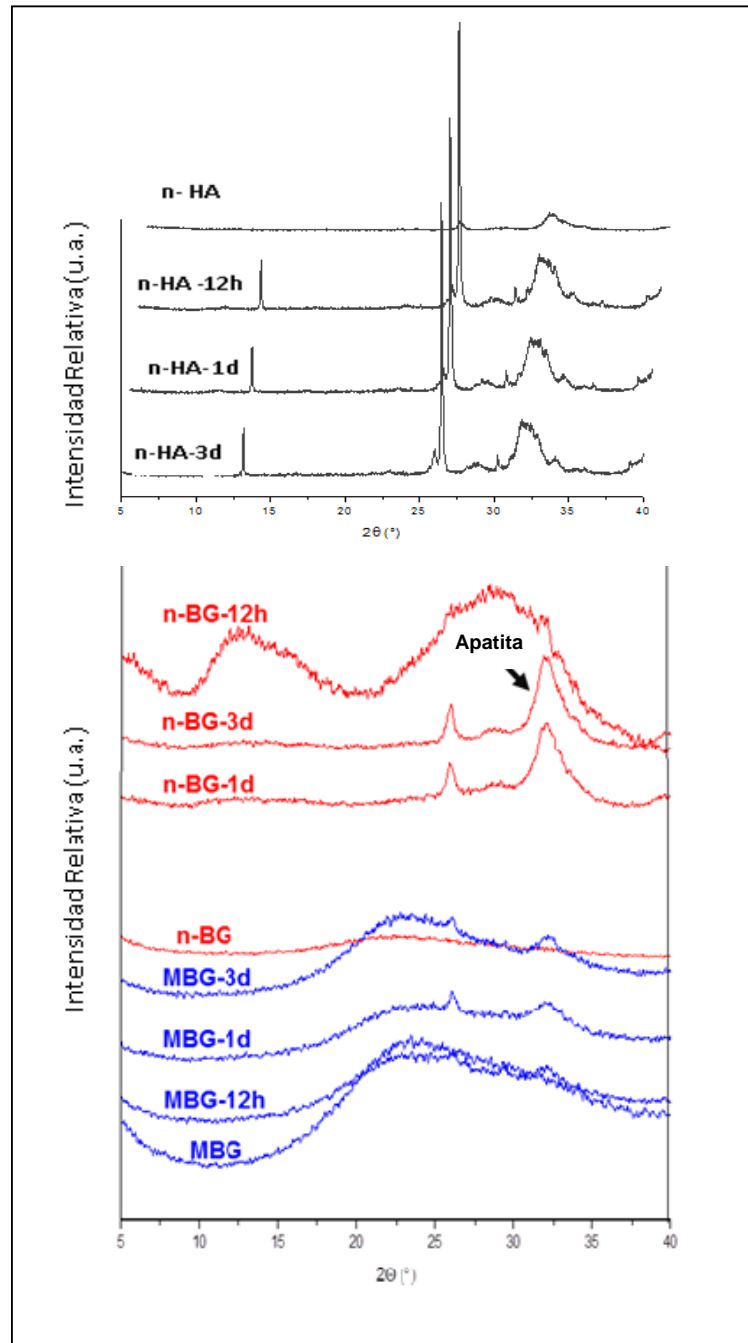


Figura 11. Análisis DRX de la formación de apatita en n-BG, MBG n-HA a diferentes tiempos de inmersión en SBF.

La formación de apatita sobre las nanopartículas fue también verificada mediante FTIR-ATR (**Figura 12**).

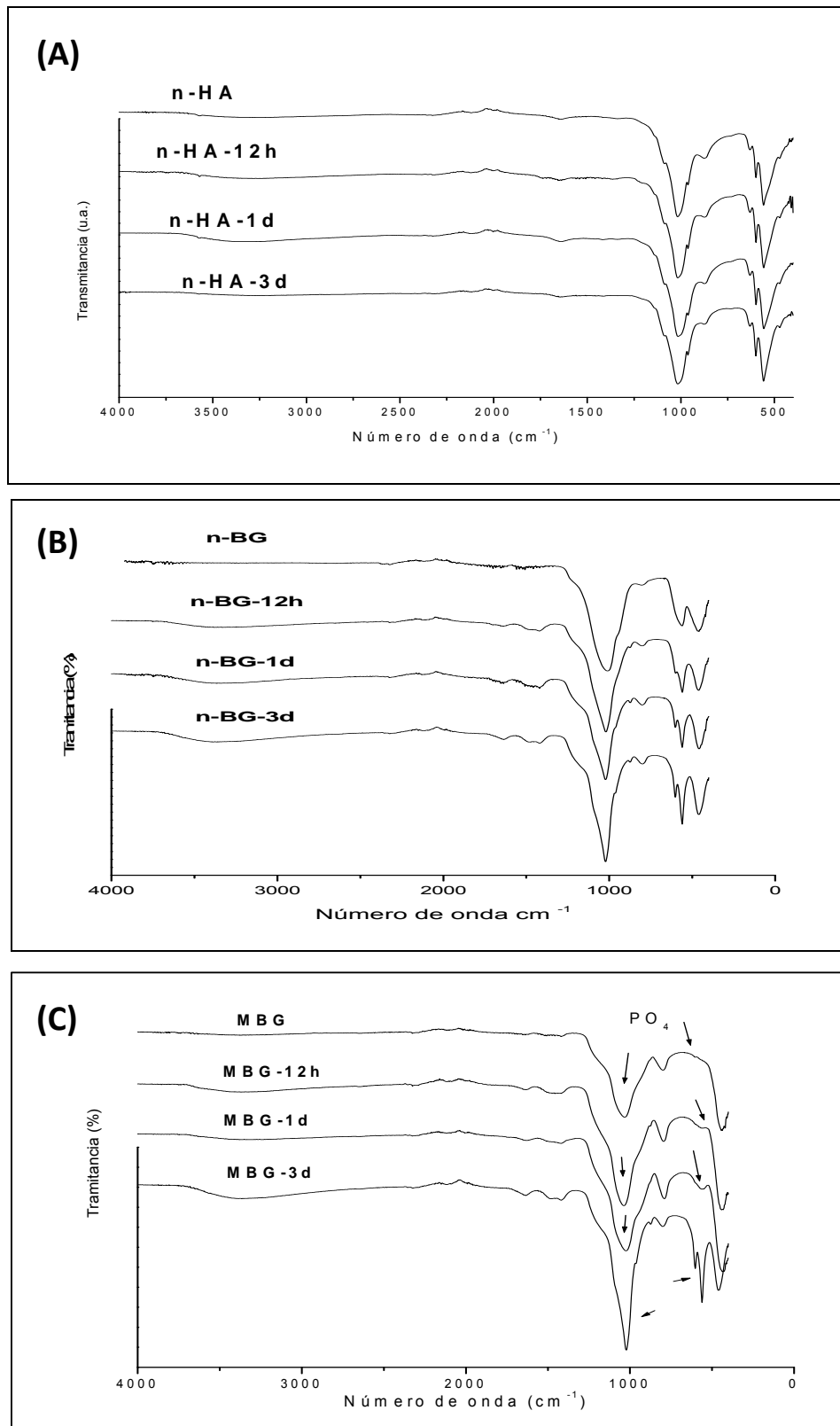


Figura 12. Análisis FTIR-ATR para (A) n-HA, (B) n-BG y (C) MBG luego de diferentes periodos de inmersión en SBF.

En los espectros FTIR de la **Figura 12**, se observa que la intensidad de las bandas correspondientes a los enlaces de la fase de apatita aumenta con el tiempo expuesto a SBF, siendo el material con mayor incremento en n-BG. Nuevamente es difícil observar realmente la fase de apatita formada por n-HA. Se confirma la formación de apatita en el análisis FITR-ATR, principalmente por la verificación dos bandas, una alrededor de los 600 cm^{-1} , atribuido a la vibración de flexión del enlace P-O del PO_4 y otra banda más marcada en la zona entre los $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$, atribuida a la vibración de estiramiento simétrico extendida del PO_4 en la apatita cristalina. Como la capa de apatita comienza a desarrollarse en la superficie de los materiales, el peak de estiramiento de PO_4 se hace más intenso y agudo. A las 12 h de inmersión en SBF, el n-BG exhibía una banda de apatita más intensa de PO_4 que los observados en los otros en MBG. Tras 1 y 3 días de exposición se repite el mismo resultado, n-BG exhibe peaks más intensos y agudos que el MBG. A diferencia de estos biomateriales n-HA es apatita, por lo tanto, si bien los peaks correspondientes aumentan, lo hacen en una proporción menor (con respecto a la intensidad de la banda inicial de la apatita) a la de los biovidrios.

La formación de apatita fue también verificada mediante observaciones por microscopía SEM acoplado a análisis elemental EDX (**Figura 14**). Se puede observar en las imágenes SEM (**Figura 13**), que a medida que aumentan el tiempo de exposición de los biomateriales en SBF existe mayor formación de de apatita sobre las superficies, en cantidad superior en la superficie del n-BG, en donde se ven agrupaciones cada vez mayores de apatita sobre el material y se aprecia claramente esta diferencia en función del paso de los días. En las imágenes del MBG también se observa formación de apatita, con un patrón diferente al n-BG, teniendo una distribución más disgregada, y en proporciones menores a la formada sobre el n-BG. En cambio en n-HA a pesar del aumento del tiempo de inmersión en SBF, la formación de apatita no se observa, sin embargo esto podría significar que existe una cristalinización de la superficie.

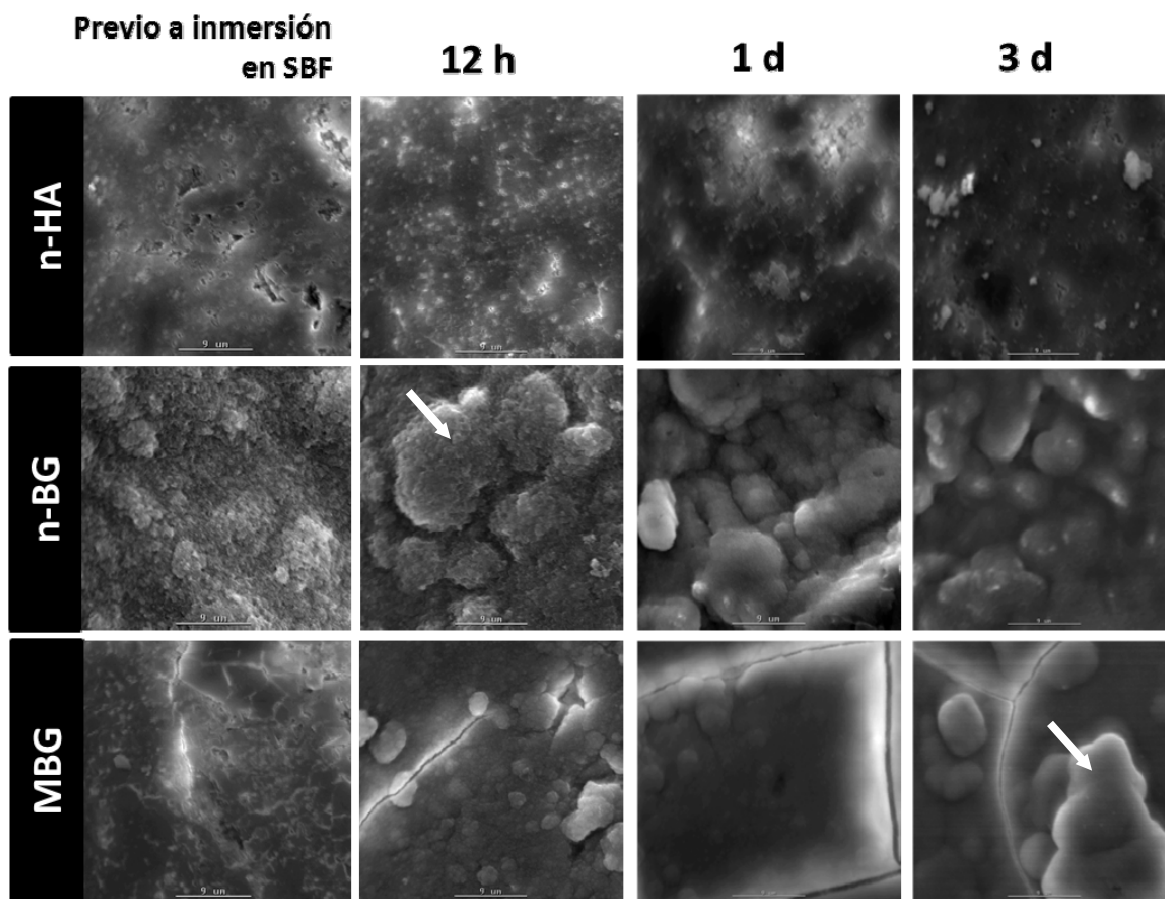


Figura 13: Imágenes SEM de n-HA, n-BG y MBG, previas a ser inmersas en SBF, a 12 horas, 1 y 3 días de inmersión en SBF. Las flechas de color blanco indica la presencia de apatita.

El análisis elemental EDX (**Figura 14**) permite conocer la cantidad presente de cada elemento químico en el material estudiado y visualizado previamente en las imágenes SEM. Todos los espectros EDX muestran principalmente las señales correspondientes a los Ca y P de la apatita formada en los materiales, y de Si para las muestras de vidrio bioactivo.

Para evaluar la composición química de la apatita, se evaluó el contenido de calcio y fosfato (Ca, P) a partir del porcentaje de peso de cada uno en relación al total de la muestra (% W_t). Los contenidos de Ca y P (Ca+P) y la razón molar (Ca/P) de los minerales depositados sobre la superficie de los bionanomateriales se muestran en la **Tabla 3**.

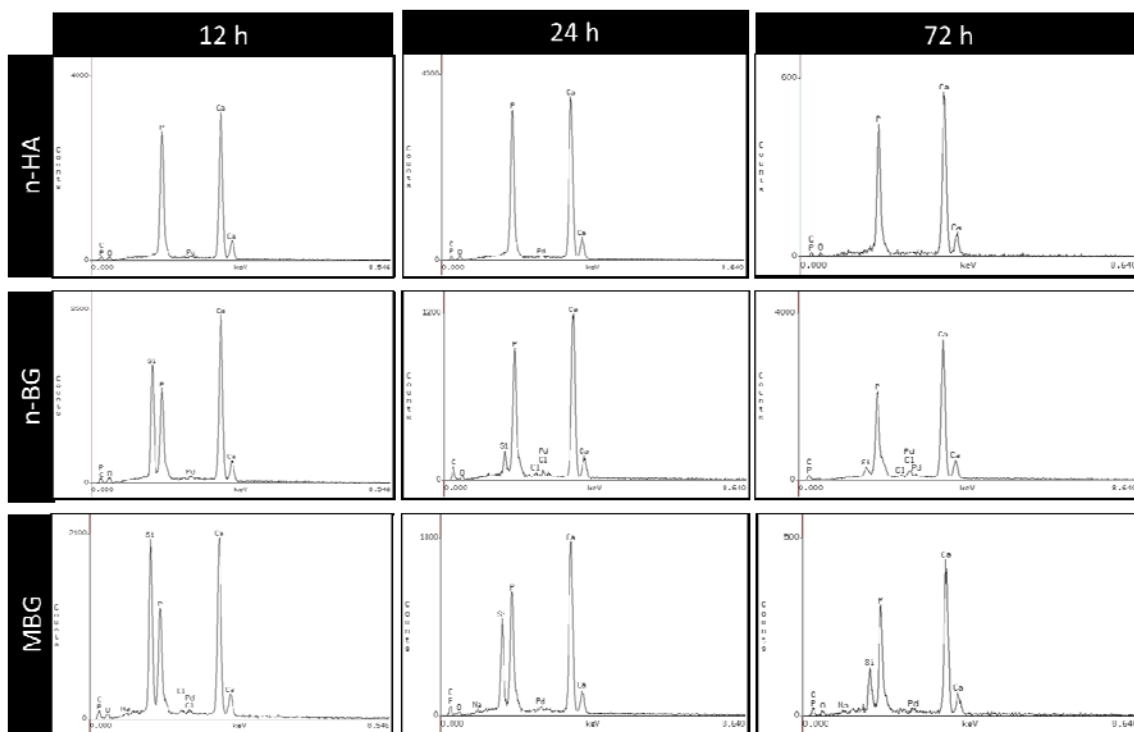


Figura 14. Análisis elemental EDX de las superficies de los biomateriales después de distintos tiempos de inmersión en SBF.

Tabla 1. Contenidos de Ca y P (Ca+P) y razón molar (Ca/P) de apatita formada en SBF sobre n-HA, n-BG y MBG.

		Sin SBF	12 h	24 h	72 h
n-HA	Ca (%masa)	57.4	57.5	57.4	62.7
	P (%masa)	28.3	27.5	28.2	28.3
	Ca+P (%masa)	85.7	85.1	85.6	91.0
	Razón molar Ca/P	1.6	1.6	1.6	1.7
n-BG	Ca (%masa)	43.3	49.8	61.7	67.3
	P (%masa)	14.7	17.6	26.7	25.8
	Ca+P (%masa)	58.0	67.5	88.3	93.1
	Razón molar Ca/P	2.3	2.2	1.8	2.0
MBG	Ca (%masa)	13.9	47.3	56.2	55.1
	P (%masa)	0.9	19.0	22.3	22.4
	Ca+P (%masa)	14.7	66.3	78.5	77.5
	Razón molar Ca/P	12.2	1.9	2.0	1.9

En general los contenidos de calcio y fósforo aumentaron a medida que aumentaba el tiempo de inmersión en SBF. La **Tabla 3** indica que n-BG y MBG presentaron mayor formación de Ca y P, lo cual se obtuvo restando los valores iniciales, dados por la composición química de las nanopartículas, a la obtenida tras las 72 h en SBF. La razón molar Ca/P expresa la proporción de moles de Ca y P presentes en una sustancia determinada. La razón molar estequiométrica de la **hidroxiapatita pura** tiene un valor de alrededor de 1.7. Valores cercanos a éste fueron observados en n-BG a las 24 h, lo que indica que la estructura de apatita formada sobre la superficie de estos biomateriales es muy similar a la de estructura ideal de la hidroxiapatita. Aunque en general todos los materiales alcanzaron valores cercanos a 1,7; en el caso de n-HA este valor corresponde principalmente a la estructura propia de HA, más que a la de apatita formada en SBF. Esto también se puede observar debido que el aumento de (Ca+P) en n-HA luego de 72 h en SBF es solo de alrededor de 6 %.

6.3 Adsorción de proteínas

En el proceso de reparación y regeneración ósea, las proteínas desempeñan un importante rol en la adhesión de las células encargadas de la formación de hueso u osteoblastos sobre el biomaterial, así, la adsorción de proteínas sobre la superficie podrá guiar el posterior proceso de adhesión celular. Este ensayo se realizó con el propósito de evaluar la bioactividad de estos materiales en función de su capacidad de adsorber proteínas en su superficie. Se utilizaron dos proteínas como modelo de estudio, fibrinógeno y albúmina.

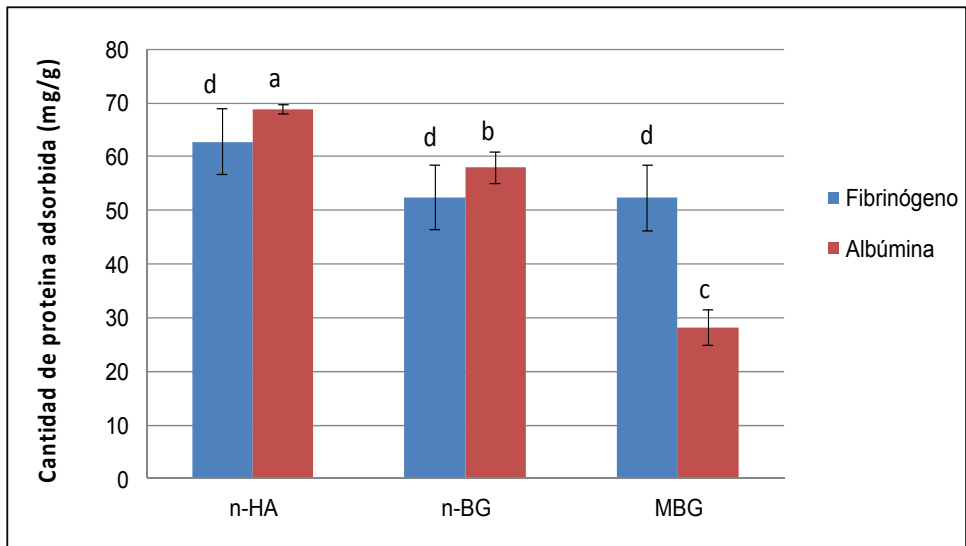


Figura 15. Cantidad de proteína adsorbida sobre las distintas biocerámicas. Cada valor es la media \pm SD ($n = 3$). Los valores de cada barra con letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Se observa en la **Figura 15**, las cantidades de proteína adsorbidas, tanto albúmina como fibrinógeno, por los distintos biomateriales. Las partículas de n-HA fueron aquellas que mostraron mayor cantidad de adsorción de ambas proteínas, en segundo lugar n-BG y por último, MBG y considerablemente en menor cantidad para la albúmina.

Se corroboró la adsorción de proteínas (albúmina) por las nanopartículas mediante análisis FITR-ATR (**Figura 16**). Es posible observar la presencia de bandas correspondientes a la vibración de los enlaces amida (1225 cm^{-1} , 1660 cm^{-1}) correspondientes a la proteína.

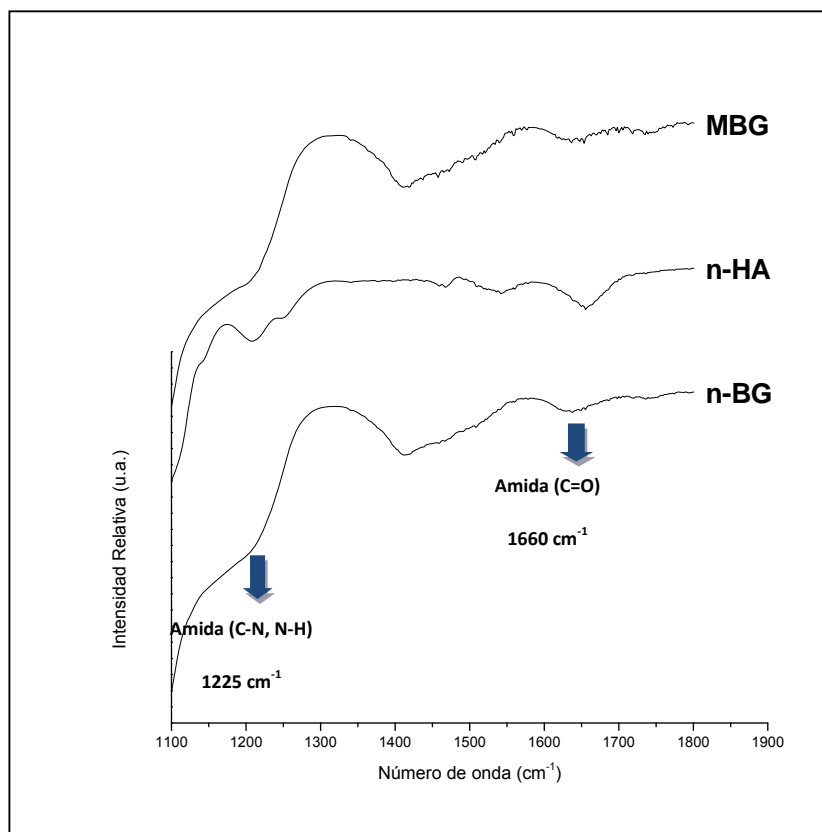


Figura 16. Espectros FTIR-ATR de las biocerámicas con la proteína albúmina adsorbida sobre su superficie. Las flechas azules indican las bandas correspondientes a la vibración de los enlaces amida (1225 cm^{-1} , 1660 cm^{-1}).

6.4 Ensayos celulares

Se realizaron cultivos celulares para determinar la viabilidad de las células madres al exponerse a los medios condicionados de distintos biomateriales y para medir preliminarmente la actividad de ALP mediante NBT como un parámetro de la capacidad de diferenciación osteogénica de las diferentes nanopartículas.

6.4.1 Viabilidad celular

A los tres tipos de partícula se les realizó el ensayo MTS, midiendo la viabilidad celular, comparando la incubación de las células con medio basal, medio de diferenciación y los medios condicionados de n-HA, n-BG y MBG. En la **Figura 17** se observan los resultados, en donde en el día 1 de cultivo se obtuvo niveles de viabilidad estadísticamente mayores con las partículas comparados al control. Sin embargo, a los 4 días, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los distintos cultivos, demostrando que la viabilidad celular se mantiene en presencia de todos los medios acondicionados con los bionanomateriales

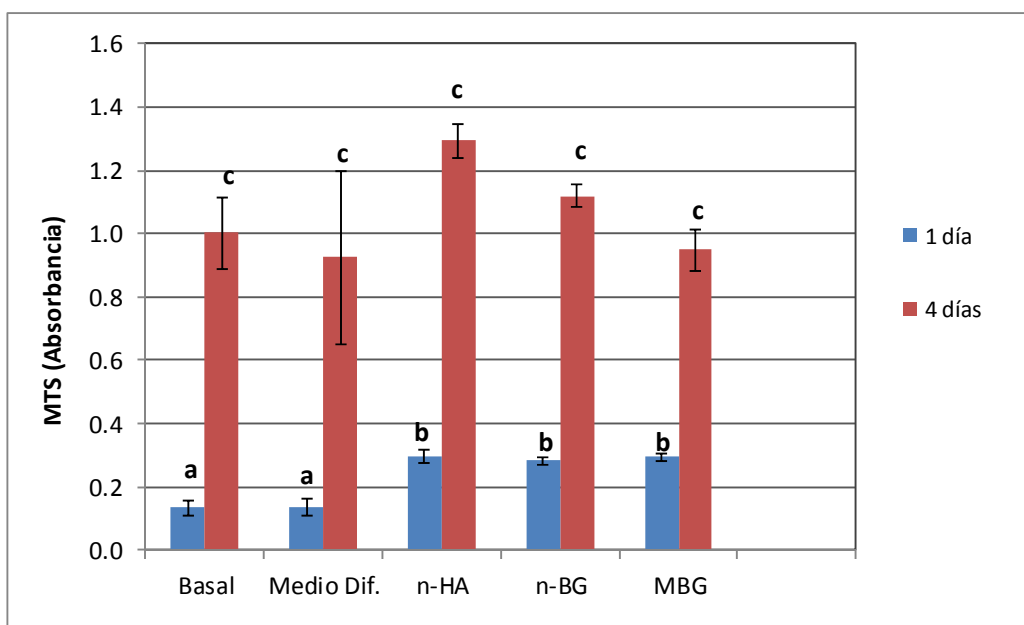


Figura 17. Gráfico representativo de la viabilidad celular mediante ensayo MTS, de los diferentes biomateriales, tras 1 y 4 días de incubación. Cada valor es la media \pm SD ($n = 3$). En cada barra correspondientes a cada uno de los días, los valores con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

6.4.2 Ensayos de fosfatasa alcalina (NBT)

Mediante el uso del NBT se detectó de forma indirecta los niveles de fosfatasa alcalina. La cual es una enzima producida por las células osteoblásticas, por lo cual puede ser usado como un parámetro de diferenciación osteogénica de las células madres. El ensayo se constituyó por dos muestras control (**Figura 18**). Estos medios de cultivo se observaron a los 7 días. La muestra de control (-) consistía únicamente del medio α MEM. Finalizado su periodo de incubación no se observa diferenciación celular. En cambio el control (+), incubado con medio de diferenciación osteogénico, mostró un alto nivel de diferenciación celular, observado por el grado de tinción alcanzado.

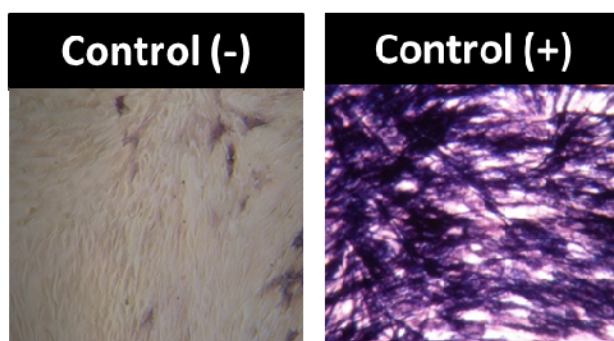


Figura 18. Imágenes de ensayo NBT, visualizado por microscopía óptica a muestras controles de cultivo celulares a los 7 días. Control (-) condicionado con medio α MEM. Control (+) condicionado con medio de diferenciación osteogénica.

En la **Figura 19** se muestran las imágenes de microscopía óptica con la tinción del ensayo NBT, mostrando los diferentes grados de producción de enzima ALP en las muestras estudiadas.

Las partículas de n-BG fueron capaces de generar productos de disolución suficientes para estimular la producción de ALP al primer día de acondicionamiento del medio, mientras que los otros biomateriales no producen este efecto. MBG al tercer día de acondicionamiento produce

cantidad suficiente de productos iónicos de disolución para estimular la producción de ALP, presentando una respuesta similar a la exhibida por n-BG al mismo día. Los resultados de los vidrios bioactivos (n-BG y MBG) contrastan con lo encontrado en la n-HA, que incluso prolongando el acondicionamiento hasta 5 días no logra generar un medio que estimule la producción de ALP al mismo nivel de los vidrios bioactivos.

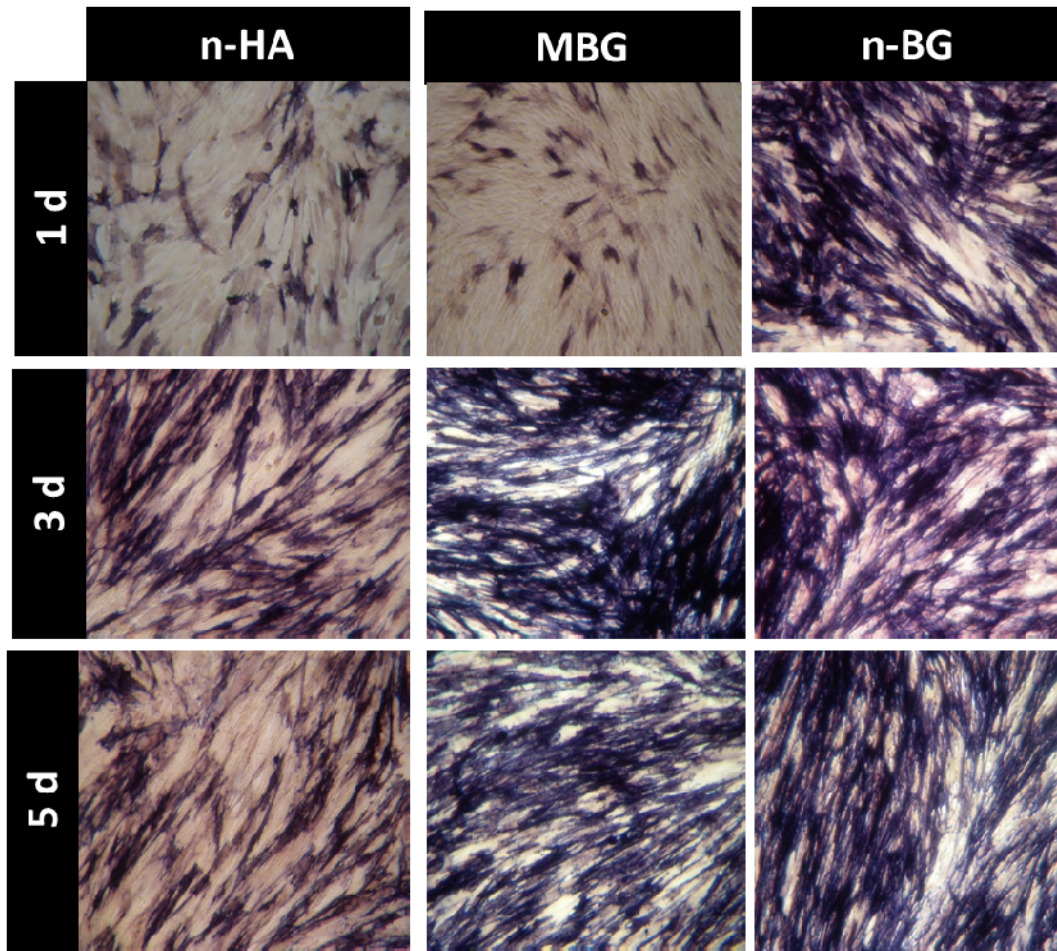


Figura 19. Imágenes de ensayo NBT, visualizado por microscopía óptica, mostrando las zonas teñidas la producción de ALP, luego de 7 días de incubación de células madres, en medios acondicionados con los nanobiomateriales a distintos tiempos (1, 3 y 5 días).

7. DISCUSIÓN

Caracterización de los materiales

Las nanobiocerámicas sintetizadas en este trabajo fueron detalladamente caracterizadas por varias técnicas. Con respecto al **tamaño de partícula** observado mediante imágenes TEM, n-BG y n-HA presentan dimensiones en escala nanométrica (70 nm y 40 nm), mientras que la partícula de MBG se encuentra en el rango micrométrico (~2 μm). A pesar del tamaño micrométrico de MBG, este material está compuesto de una **estructura interna** porosa altamente ordenada, lo cual contrasta con el BG tradicional el cual es un biomaterial completamente amorfo. Aunque el MBG posee este ordenamiento de nanoporos, la matriz de este material es amorfa; lo cual se corroboró con su patrón amorfo de DRX. La característica amorfa es importante debido a que le confiere mayor solubilidad y por lo tanto mayor bioactividad al material. Por otro lado n-HA es un material completamente cristalino, por lo tanto más estable y consecuentemente menos reactiva y con menor bioactividad. Sin embargo, n-HA presenta tamaño nanométrico lo cual podría mejorar su bioactividad. n-BG a diferencia de MBG no tiene una nanoestructura porosa interna, pero su tamaño de partícula nanométrico, eleva su área superficial externa, mejorando su capacidad de contacto con el medio fisiológico. Al ser menor el tamaño de las partículas, el área expuesta al medio biológico es mayor, con lo cual las posibilidades de interacción y de disolución de los productos de los biomateriales son mayores, en comparación con partículas de mayor tamaño. El ordenamiento estructural tiene estrecha relación con la bioactividad de las partículas, n-HA al ser cristalina y estable, es menos reactiva, por lo que es de esperar que materiales amorfos, tales como n-BG y MBG, menos estables sean más bioactivos, siendo capaces de interactuar de mejor forma con el medio biológico, generando mayor cantidad productos iónicos y favoreciendo el proceso de mineralización ósea.

El **área superficial** de las partículas es mucho más elevada para MBG que para las otras dos biocerámicas debido a la presencia de nanoporos en su estructura interna, lo cual incrementa considerablemente el área superficial total que posee. Aunque n-HA y n-BG no poseen nanoporosidad interna, el tamaño de partícula nanométrico de estos materiales también incrementa su área superficial, principalmente por un aumento en el área superficial externa del nanobiomaterial.

De esta forma las propiedades de la estructura a escala nanométrica aumentan su propiedades de área superficial. Al existir una mayor área superficial, aumenta la energía superficial del material, por tanto, la capacidad de reacción con el medio se ve incrementada, lo cual se traduce en una respuesta biológica, por medio de interacciones celular-biomolecular con el material. Esto indica que los materia al presentarse en escala nanométrica presenta un comportamiento distinto a cuando se encuentra en mayores escalas apareciendo nuevas propiedades que puede favorecer o acelerar la el proceso de reparación del tejidos óseo dañado.

Bioactividad en SBF

La habilidad de las nanopartículas cerámicas de inducir la formación de la fase de apatita fue en general mejor en los vidrios bioactivos (n-BG y MBG) en comparación con la partícula de hidroxiapatita (n-HA) En particular las partículas de n-BG presentaron una mejor respuesta para inducir la formación de apatita tipo ósea en SBF que MBG y n-HA. Estos resultados se pueden explicar a partir de las diferencias que presentan los materiales en su nanoestructura.

Como observación, es necesario aclarar que para n-HA, si bien puede mostrar peaks más intensos en las distintas pruebas realizadas para medir la formación de apatita en SBF (DRX, FTIR), es importante mencionar que la naturaleza química de n-HA es hidroxiapatita. Esto significa que en el caso de n-HA la intensidad del peak DRX de apatita corresponde principalmente a la estructura del material inicial más que a una fase de apatita formada por el

contacto con SBF. Esto contrasta con lo observado en los vidrios bioactivos en donde no se detectan señales de apatita en el material inicial, y que solo aparecen luego de ser contactados con el SBF; demostrando que estos biocerámicas efectivamente inducen la formación de apatita en el medio SBF. El comportamiento bioactivo de las nanopartículas presenta directa relación con su nanoestructura y la naturaleza química que poseen. La naturaleza química de los BG en comparación con HA es distinta. El BG está compuesto principalmente de sílice (SiO_2) con iones de calcio (Ca^{2+}) y fosfato (PO_4^{3-}) en su estructura, y otros elementos en menores proporciones (Na^+ , K^+) específicas. Son vidrios de silicato conformados por una red de silicatos tetraédricos conectados a través de enlaces de puentes de oxígeno. Un alto contenido de silicio resulta en una red altamente conectada y una baja tasa de disolución y por tanto menor bioactividad. Esta conectividad se logra disminuir adicionando más cationes modificadores de red como el Na^+ o Ca^{2+} (Jones, J.R., 2012). En los BG preparados por la técnica sol-gel, el grado de conectividad de la red es más bajo que en los BG preparados por métodos tradicionales de fusión a alta temperatura.

En consecuencia, BG, posee gran posibilidad de interactuar con el medio que lo rodea, potenciando las propiedades bioactivas en regeneración de tejidos duros. Esto permite que sea capaz de lograr en inmersión en SBF interactuar con los iones circundantes y generar así la capa de HCA en su superficie. Además, la estructura amorfa de n-BG y de MBG, favorece la capacidad de interactuar con iones de fluidos circundantes, de reaccionar y ser potenciales materiales bioactivos. Al ser más inestable la partícula permite intercambios y disoluciones iónicas con el medio biológico. Por otra parte, la cristalización de la fase de la apatita sobre las de nanopartículas depende fuertemente de la concentración de iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el fluido circundante. La disolución de las partículas de BG produce liberación de iones, las cuales en combinación con otros iones provenientes desde el SBF forman la fase de apatita.

En cambio la naturaleza de HA es diferente, es un fosfato de calcio de fórmula general $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, si bien presenta similitud química y

estructural con el componente inorgánico de los huesos y dientes humanos (Hutmacher DW., 2007), su estructura presenta un alto orden cristalino, que le confiere una gran estabilidad química, y por lo tanto baja capacidad de disolverse y generar iones para la cristalización de apatita, por lo que sus propiedades bioactivas son menores a los biovidrios,.

De esta forma la bioactividad de n-HA, se podría atribuir a que estas partículas actúan principalmente como centros de nucleación nanométricos para el crecimiento de la apatita, eliminando de esta manera la fase de inducción durante el proceso de cristalización de la apatita.

En general los contenidos de calcio y fósforo depositados en la superficie de los biomateriales aumentaron a medida que aumentaba el tiempo de inmersión en SBF, debido a la reactividad de las diferentes nanopartículas.

La diferente reactividad determinada por la estructura química, solubilidad, cristalinidad genera la obtención de diferentes cantidades de adsorción de estos iones.

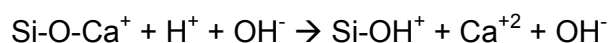
Los vidrios bioactivos (n-BG y MBG) presentaron mayor incorporación de Ca y P, lo cual se obtuvo restando los valores iniciales, dados por la composición química de las nanopartículas, a la obtenida tras su inmersión a 72 h en SBF. Es relevante mencionar que los valores de Ca y P finales de n-BG fueron considerablemente mayores a los incorporados por MBG. En el caso de n-HA, por su gran estabilidad química y cristalinidad, se logró incorporar una cantidad muy baja de iones Ca y P, lo que se traduce en una baja interacción con el medio. Por lo tanto, sus cantidades de Ca y P se mantuvieron relativamente similares con el paso del tiempo de inmersión en SBF. La razón molar Ca/P expresa la proporción de moles de Ca y P presentes en una sustancia determinada. La razón molar estequiométrica de la hidroxiapatita pura tiene un valor de alrededor de 1.7. La fase de apatita formada en SBF sobre los vidrios bioactivos (n-BG y MBG) alcanzaron valores muy cercanos a 1,7, demostrando que sobre estos materiales se forma una apatita con una estructura muy similar a la esperada teóricamente. Se debe considerar que la apatita detectada sobre los vidrios bioactivos se genera a

partir del intercambio iónico producido en el SBF, en cambio aquella medida sobre n-HA corresponde principalmente a la apatita de la estructura propia del material, más que de una fase formada durante la inmersión en SBF.

Al considerar las propiedades a nano escala de las partículas, se encontró que el tamaño de la nanopartícula parece ser una propiedad más determinante en la bioactividad que la nanoestructura interna. Esto se pudo verificar al comparar el n-BG con el MBG que tienen la misma naturaleza química, en donde el n-BG presentó mayor capacidad para inducir la formación de apatita. A pesar de que la nanoestructura porosa del MBG le confiere una alta área superficial total (Sg), y que el n-BG tiene un menor valor de Sg, el tamaño de partícula nanométrico de n-BG produce mayor bioactividad que un MBG micrométrico con alto valor de Sg. Esto se podría explicar en términos de que no toda la superficie del MBG se encontraría disponible para realizar intercambios iónicos durante el proceso de formación de apatita en SBF. Es posible la existencia de limitaciones de accesibilidad por medio de los nanoporos desde y hacia el área superficial interna. Esto podría generar un microambiente distinto al interior de la partícula (concentración de iones, pH) por lo que es posible que la disolución de productos iónicos y la reacción de formación de apatita no ocurra de la misma forma a como se llevan a cabo en la superficie externa de la partícula. Es recomendable realizar más estudios sobre lo que sucede específicamente en la superficie interna, en los nanoporos del MBG.

El mecanismo propuesto por Hench mediante el cual los BG forman esta íntima unión con el hueso y tejidos blandos, consta de 11 etapas, de las cuales las primeras 5 involucran reacciones y cambios químicos, los últimos son procesos fisiológicos :

- i. Rápido intercambio catiónico de Ca^{2+} con H^+ o H_3O^+ desde el ambiente fisiológico, causando hidrólisis de los grupos de sílice lo que da lugar a la formación de silanoles:



El pH de la solución se incrementa debido al intercambio de iones H^+ y con iones Ca^{2+} y debido a esto el aumento de la concentración de OH^- .

- ii. El aumento de la concentración de iones OH^- lleva a un ataque de estos grupos a la red de sílice. El resultado es la pérdida de sílice soluble, $Si(OH)_4$ en el medio, a partir de la ruptura de los enlaces de Si-O-Si y la continua formación de silanoles Si-OH en la interfase del medio y el vidrio bioactivo.



- iii. Condensación y re-polimerización de una capa rica en sílice, SiO_2 en la superficie del material.
- iv. Migración de grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} a la superficie del material, a través de la capa rica en SiO_2 , formando una película de $CaO-P_2O_5$ sobre la capa de SiO_2 , seguido por un crecimiento de una capa de $CaO-P_2O_5$ amorfo gracias a la migración de cationes desde el medio.
- v. Cristalización de la capa amorfa de $CaO-P_2O_5$ por la incorporación de OH^- y CO_3^{2-} desde el medio para formar una capa mixta de carbonato-hidroxiapatita (HCA).

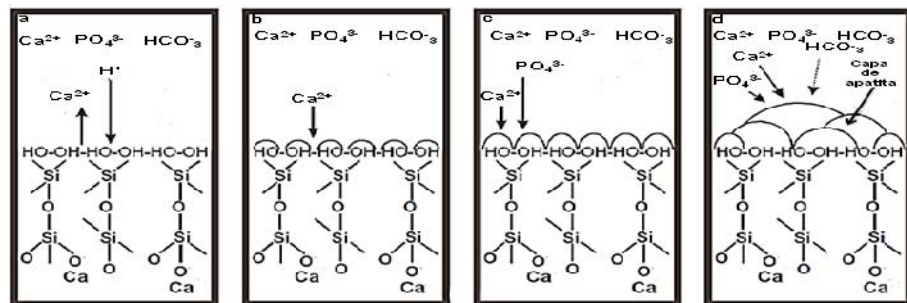


Figura 20. Formación de Apatita Sobre una Superficie de Vidrio Bioactivo.

A partir de este mecanismo se puede apreciar, que la bioactividad de estos vidrios cerámicos se basa en la disolución controlada del material, el cual provoca la liberación selectiva de calcio y silicio al medio. Este mecanismo debería verse acelerado en el caso del n-BG, debido a su alta área superficial

expuesta para producir las reacciones de intercambio. Por otro lado MBG tiene similar composición química que n-BG, pero la presencia de una estructura nanoporosa interna, posiblemente genere cambios en esta disolución controlada del material desde y hacia al interior de los poros de la partícula, produciendo probablemente limitaciones difusionales en el transporte de los iones, afectando su liberación al medio y la formación de apatita.

Adsorción de proteínas

Es importante medir la **adsorción de proteínas** ya que el proceso de reparación y regeneración ósea, se compone de una cascada de eventos, entre los que son fundamentales las proteínas que son capaces de adsorber los biomateriales, ya que permiten la posterior adhesión de las células osteoprogenitoras.

Se atribuye la unión fisiológica entre el biomaterial y el hueso a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada, debido a la liberación de los productos de disolución del biomaterial y sus interacciones con los fluidos biológicos y finalmente a las proteínas del medio biológico que son capaces de adsorber y posteriormente permitir la adhesión celular.

En este estudio se observó que todas las biopartículas presentaron una buena capacidad de adsorber proteínas. La biocerámica que más realizó adsorbancia de proteínas fue n-HA, seguido por n- BG. Lo cual podría deberse a la naturaleza de la partícula de n-HA que presenta una “compatibilidad natural” con la estructura ósea y de esta manera gran similitud estructural con los tejidos biológicos duros. Pero n-BG, al ser más bioactiva, logra una adsorción relativamente similar, no así MBG, que presenta menores valores, especialmente en el caso de la albúmina. Esto último podría deberse a que la estructura interna porosa, cuyos poros miden 4 nm, si bien le otorgan un alta área superficial, esta superficie interna podría no ser completamente accesible a las macromoléculas de proteínas considerando sus medidas y forma, albúmina (4nm x 4 nm x 14nm) y fibrinógeno (6.5 nm x 6.5 nm x 46nm) (Inzunza, Covarrubias y cols., 2013), limitándose principalmente a adsorberse a

la superficie externa . Por lo tanto se podría esperar que lo que determina este proceso de adsorción de proteínas es el área de superficie externa de las partículas expuestas, la cual es superior en n-HA y n-BG por tratarse de nanopartículas a diferencia de MBG que es una micropartícula con menor área externa.

Las propiedades de superficie median la adsorción específica de proteínas y la bioactividad celular, regulando el comportamiento celular y dictando la regeneración de tejidos. Los resultados del presente trabajo demuestran que los materiales nanoestructurados con propiedades de superficies favorables pueden promover mayores cantidades de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera más eficiente el crecimiento del nuevo hueso, en comparación con los materiales convencionales. La nanoestructura también afecta la adsorción de proteínas lo cual podría tener consecuencias favorables en el proceso de regeneración ósea.

Ensayos de viabilidad y diferenciación celular

Todas bionanocerámicas estudiadas no producen alteraciones en la viabilidad de las células madres, ya que en cada uno de los medios condicionados con los productos iónicos de n-HA, n-BG y MBG la viabilidad de las células cultivadas se mantuvo, comparada con un medio basal y con un medio de diferenciación.

Por otro lado, el ensayo NBT mide indirectamente la diferenciación celular a osteoblastos, ya que detecta la presencia de fosfatasa alcalina. Esta es una enzima que secretan solamente los osteoblastos diferenciados de las células madres. Todos los cultivos celulares fueron observados a los 7 días de incubación en sus respectivos medios de acondicionamiento. Los resultados muestran que entre los productos de disolución liberados por las biocerámicas luego de 1 día de acondicionamiento, solamente los producidos por n-BG son capaces de estimular una diferenciación osteogénica significativa, demostrado por la producción de fosfatasa alcalina. A los tres días de acondicionamiento del medio, MBG logra producir una cantidad suficiente de productos iónicos de

disolución para estimular significativamente la diferenciación osteogénica y presentar una respuesta similar a la de n-BG. Durante todos los periodos de acondicionamientos de los medios (1, 3 y 5 días) n-HA demostró una capacidad para estimular la diferenciación osteogénica considerablemente menor a la de los vidrios bioactivos. Por lo tanto los resultados obtenidos de los vidrios bioactivos contrastan con aquellos del n-HA, que incluso prolongando el periodo de acondicionamiento a 5 días no logra generar un medio con suficientes productos iónicos como para estimular la diferenciación osteogénica al mismo nivel de los vidrios bioactivos. Estos resultados se explican por las diferencias de solubilidad y liberación de productos iónicos de los biomateriales. n-BG, y MBG son materiales amorfos, más inestables y más reactivos que la n-HA, la cual es altamente cristalina y estable, por lo mismo su producción iónica es menor y posee menos capacidad de reacción y bioactividad con el medio. La mayor capacidad para acelerar la diferenciación osteogénica de n-BG, está de acuerdo con su mayor capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea comprobada anteriormente en SBF.

La nueva información obtenida de las nanobiocerámicas, indica que el **tamaño de partícula nanométrico y el área superficial externa** parecen ser las propiedades más determinantes en la bioactividad de las partículas, en comparación con la nanoestructura y superficie interna. De la misma forma la **estructura amorfa**, inestable y reactiva de las partículas de vidrio bioactivo (n-BG, MBG), produce mejores propiedades para inducir la formación de apatita ósea que la estructura cristalina, estable y menos reactiva de n-HA. Estos resultados demuestran que la estructura y propiedades a nanoescala son factores determinantes en la bioactividad de los materiales cerámicos; siendo especialmente n-BG un potencial biomaterial osteogénico para crear nuevas alternativas terapéuticas aplicables en clínica. Estas nanobiocerámicas podrían favorecer o acelerar el proceso de regeneración tejido óseo, aportando al futuro diseño de productos y terapias más eficientes para regeneración ósea en odontología.

CONCLUSIONES

1. El método sol-gel a diferencia de la técnica tradicional, permite preparar bionanocerámicas con diferentes tamaños de nanopartículas, nanoestructura porosa y naturaleza química; y consecuentemente con distintas propiedades de área superficial, cristalinidad, solubilidad y reactividad.
2. El tamaño de partícula nanométrico y el área superficial externa son factores más determinantes en la bioactividad de la nanobiocerámicas que la presencia de una nanoestructura porosa con una alta área superficial interna.
3. La bioactividad *in vitro* de las partículas de BG (n-BG y MBG) resulta en general mayor que la presentada por HA (n-HA), como consecuencia de su estructura amorfa, más soluble y más reactiva.
4. La nanopartícula de n-BG es la biocerámica que presenta las mejores propiedades bioactivas con respecto a la capacidad de acelerar la formación de apatita ósea *in vitro* y el proceso de diferenciación osteogénica de células madres; constituyéndose en un potencial biomaterial para aplicaciones de regeneración ósea.
5. La información del efecto de las propiedades a nanoescala de las biocerámicas podría ser usada para futuros trabajos en el diseño de tratamientos más eficientes para regeneración ósea en odontología.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aoki, H. (1994). Medical Applications of Hydroxyapatite. *Ishiyaku EuroAmerica. Tokyo.*

Avnir, D., Coradin, T., Lev, O. & Livage, J.(2006). Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 16: 1013- 1030.

Boccaccini, A.R., Erol, M., Stark, W.J., Mohn, D., Hong, Z., Mano, J.F. (2010) Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications. A review. *Composites science and technology*, 70 (13): 1764-1776.

Bohner, M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31 Suppl 4, 37–47.

Bons, N., Lehmann, S., Mestre-Francès, N., Dormont, D., & Brown, P. (2002). Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion*, 42(5): 513–516.

Buchardt, H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 174: 28-42.

Buser, D. (2009). *20 years of guided bone regeneration in implant dentistry*. Chicago: Quintessence Pub. Co.

Cortizo, A.M., Molinuevo, M.S., Barrio, D.A., Bruzzone, L (2006). Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7):1171e80.

Constantino, P.D., & Friedman, C.D. (1994). Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngology Clinics of North America*, 27(5):1037-74.

Currey, J. (2001). Sacrificial bonds heal bone. *Nature*, 414(6865): 699.

Daculsi, G., LeGeros, RZ., Nery, E., Lynch, K. & Kerebel, B. (1989). Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 23(8):883-94.

Delannoy, P., Bazot, D., Marie, P.J. (2002). Long-term treatment with strontium ranelate increases vertebral bone mass without deleterious effect in mice. *Metabolism*, 51(7):906e11.

Ducheyne, P., Radin, S. & King, L. (1993). The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(1):25-34.

García, A., Cicuendez, M., Izquierdo-Barba, I., Arcos, D. & Vallet-Regí M. (2009). Essential Role of Calcium Phosphate Heterogeneities in 2D-Hexagonal and 3D-Cubic SiO₂-CaO-P₂O₅ Mesoporous Bioactive Glasses. *Chemistry of Materials*, 21 (22): 5474–5484.

Ghosh, S.K., Nandi, S.K., Kundu, B., Datta, S., De, D. K., Roy, S. K., & Basu, D. (2008). In vivo response of porous hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method and comparison with bioglass scaffolds. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 86(1): 217–227.

Giannoudis, P.V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 (3): S20-7.

G.K.B. Sándor, T.C. Lindholm and C.M.L. Clokie. (2003). Bone regeneration of the Cranio-maxilofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering, University of Oulu*, Chapter 7: 1–46.

Gorustovich, A.A., Perio, C., Roether J.A., Boccaccini, A.R. (2010). Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidence. *Tissue Engineering Biomaterials*, 16: 199–207.

Haffajee, A. & Socransky, S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5: 78-111.

Hench, L.L. (2009). Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(7): 1257–1265.

Hench, L.L., & Polak, J.M. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557): 1014–1017.

Hench LL. (1998). Bioceramics. *Journal of American Ceramic Society*, 81: 1705–28.

Hench, L.L., Wheeler, D.L., Greenspan, D.C. (1998). Molecular control of bioactivity in sol-gel glasses. *Journal of sol-gel science and technology*, 13: 245–250.

Hinoi, E., Takarada, T., Yoneda, Y. (2004). Glutamate signaling system in bone. *Journal of Pharmacological Sciences* ;94(3):215-20.

Hong, Z., Reis, R.L., & Mano, J.F. (2009). Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 88(2): 304–313.

Hutmacher, D.W., Schantz, J.T., Lam, C.X.F., Tan, K.C., Lim, T.C. (2007) 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.

Inzunza, D., Covarrubias, C., Marttens, A.V., Leighton, Y., Carvajal, J.C., Valenzuela, F., Díaz-Dosque, M., Méndez, N., Martínez, C., Pino, A.M., Rodríguez, J.P., Cáceres, M., Smith, P. (2013). Synthesis of nanostructured porous silica coatings on titanium and their cell adhesive and osteogenic differentiation properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* ;00A:000–000.

Jones, J.R. (2013). Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta biomaterialia*, 9: 4457-4486.

Jones, J.R., Lin, S., Yue, S., Lee, P.D., Hanna, J.V., Smith, M.E., Newport, R.J. (2010). Bioactive glass scaffolds for bone regeneration and their hierarchical characterisation. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 22: 1373-1385.

Julien, M., Khoshniat, S., Lacreusette, A., Gatius, M., Bozec, A., Wagner, E.F., et al. (2009). Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *Journal Bone Mineral Research*, 24(11):1856e68.

Kaigler, D., & Mooney, D. (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of dental education*, 65(5): 456–462.

Kainulainen, V.T., Sándor, G.K.B., Caminiti, M.F., Clokie, C.M.L., Oikarinen, K.S. (2002). Extraoral bone harvesting sites for oral and maxillofacial surgery. *Finnish Dental Journal*, 10-11: 570–576.

Kainulainen, V.T., Sándor, G.K.B., Caminiti, M.F., Clokie, C.M.L., Oikarinen, K.S. (2003). The Intraoral bone harvesting sites for osseous reconstruction in oral and maxillofacial surgery. *Oral Health*, 93(5): 10–24.

Kim, H.M., Himeno, T., Kokubo, T. & Nakamura, T. (2005). Process and kinetics of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in a simulated body fluid. *Biomaterials*, 26(21): 4366-73.

Kivrak, N., & Taş, A.C. (1998). Synthesis of Calcium Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate (HA-TCP) Composite Bioceramic Powders and Their Sintering Behavior. *Journal of the American Ceramic Society*, 81(9): 2245–2252.

Klemetti, E. (1996). A review of residual ridge resorption and bone density. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 75(5): 512-4.

Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?. *Biomaterials*, 27(15): 2907–2915.

Landi, E., Tampieri, A., Celotti, G., Langenati, R., Sandri, M. & Sprio, S. (2005). Nucleation of biomimetic apatite in synthetic body fluids: dense and porous scaffold development. *Biomaterials*, 26(16): 2835-45.

Langer, F., Czitrom, A., Pritzker, KP. & Gross, AE. (1975). The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 57(2): 216-20.

Langer, R., & Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110): 920–926.

LeGeros, R.Z. (1993). Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical materials*, 14(1): 65–88.

López-Noriega, A., Arcos, D., Izquierdo-Barba, I., Sakamoto, Y., Terasaki, O. & Vallet-Regí, M. (2006). Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chemistry of Materials*, 18: 3137-3144.

Lossdörfer, S., Schwartz, Z., Lohmann, C.H., Greenspan, D.C, Ranly, D.M., Boyan, B.D. (2004). Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. *Biomaterials*, 25: 2547-2555.

Marie, P.J. (2006). Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*, 38(2, Suppl. 1):10e4.

Marie, P.J., Ammann, P., Boivin, G., Rey, C. (2001). Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcified Tissue International*, 69(3):121e9.

Marx, R.E. (1994). Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinics in plastic surgery*, 21(3): 377–392.

Mendonça, G., Mendonça, D.B.S., Aragão, F.J.L., Cooper, L.F. (2008). Advancing dental implant surface technology - from micron- to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28): 3822–3835.

Minoru, Ueda. (2011). Tissue engineered bone; Application for implant surgery. *Inflammation and Regeneration*, 31(2): 202–218.

Murugan, R., & Rao, K. P. (2003). Grafting of Glycidyl Methacrylate upon Coralline Hydroxyapatite in Conjugation with Demineralized Bone Matrix Using Redox Initiating System. *Macromolecular Research*, 11(1), 14–18.

Murugan, R., & Ramakrishna, S. (2004). Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. *Biomaterials*, 25(15), 3073–3080.

Nayar, S., Bhuminathan, S. Muthuvignesh, J. Upsurge of Nanotechnology in Dentistry and Dental Implants. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*, Vol. 1, Issue 5.

Nemcovsky, C. (1996). Alveolar ridge preservation following extraction of maxillary anterior teeth: Report on 23 conservative cases. *Journal of Periodontology*, 67:390–395.

Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S., Johnson, N.W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 19; 366(9499):1809-20.

Pirayesh, H., Nychka, A. (2013). Sol–Gel synthesis of bioactive glass-ceramic 45S5 and its in vitro dissolution and mineralization behavior. *Journal of the American Ceramic Society*, 96 (5): 1643-1650.

Reynolds, M.A., Aichelmann-Reidy, M.E., Branch-Mays, G.L. (2010). Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dental clinics of North America*, 54(1): 55–71.

Salata, O.V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 30;2(1):3.

Sanosh, K.P., Chu, M., Balakrishnan, A., Lee, Y., Kim, T.N., Cho, S. (2009). Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle. *Current Applied Physics*, 9: 1459–1462.

Schallhorn, R.G. (1980). Long term evaluation of osseous grafts in periodontal therapy. *International Dentistry Journal*, 30(2):101-16.

Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429): 149–155.

Sepúlveda, P., Jones, J.R., Hench, L.L. (2002). In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61(2): 301-311.

Slots, J., MacDonald, E.S., Nowzari, H. (1999). Infectious aspects of periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, 19:164-72.

Sowmya, S., Sudheesh Kumar, P.T., Chennazhi, K.T., Nair, S.V. , Tamura, H., Jayakumar, R. (2011). Biocompatible β -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic nanocomposite scaffolds for periodontal bone regeneration. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 25; pp. 1–11.

Suvorova, E.I., Christensson, F., Lundager Madsen, H.E., Chernov, A. A. (1998). Terrestrial and space-grown HAP and OCP crystals: effect of growth conditions on perfection and morphology. *Journal of crystal growth*, 186(1-2): 262–274.

Tan, W.C., Lang, N.P., Zwahlen, M., Pjetursson, B.E. (2008). A systematic review of the success of sinus floor elevation and survival of implants inserted in combination with sinus floor elevation. Part II: transalveolar technique. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl): 241-54.

Tanaka, T., Kojima, I., Ohse, T., Ingelfinger, J.R., Adler, S., Fujita, T., et al. (2005). Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Laboratory Investigation*, 85(10): 1292e307.

Valenzuela, F., Covarrubias, C., Martínez, C., Smith, P., Díaz-Dosque, M., Yazdani-Pedram, M. (2012). Preparation and bioactive properties of novel bone-repair bionanocomposites based on hydroxyapatite and bioactive glass nanoparticles. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 100(6): 1672–1682.

Vallet-Regí, M., Ruiz-González, L., Izquierdo, I. & González-Calbet, JM. (2006). Revisiting silica based ordered mesoporous materials: Medical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16: 26-31.

Verma, A, Stellacci, F. (2010). Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small*, 6(1):12-21.

Valerio, P., Pereira, M.M., Goes, A.M., Leite, M.F. (2004). The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25(15): 2941–2948.

Vila, M., Hueso, J.L., Manzano, M., Izquierdo, I., De Andres, A., Sanchez-Marcos, J., Prieto, C., Vallet-Regi, M. (2009). Carbon nanotubes-mesoporous silica composites as controllable biomaterials. *Journal of Materials Chemistry*, 19(41):7745-7752.

Wheeler, D.L., Stokes, K.E., Hoellrich, R.G., Chamberland, D.L., McLoughlin, S.W. (1998). Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *Journal of biomedical materials research*, 41(4): 527–533.

Wheeler, D.L., Stokes, K.E., Park, H.M., Hollinger, J.O. (1997). Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. *Journal of biomedical materials research*, 35(2): 249–254.

Wiesen, M., Kitzis, R.(1998) Preservation of the alveolar ridge at implant sites. *Periodontol Clinical Investigation*, 20(2):17-20.

Wilson, J., Pigott, G.H., Schoen, F.J., Hench, L.L. (1981). Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *Journal of Biomedical Materials Research*. 15(6):805-17.

Xynos, I.D., Hukkanen, M.V., Batten, J.J., Buttery, L.D., Hench, L.L., Polak, J.M. (2000). Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcified tissue international*, 67(4): 321–329.

Xynos, I.D., Edgar, A.J., Buttery, L.D.K., Hench, L.L., Polak, J.M. (2000). Ionic Products of Bioactive Glass Dissolution Increase Proliferation of Human Osteoblasts and Induce Insulin-like Growth Factor II mRNA Expression and Protein Synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 461–465.

Yamaguchi, M. (1998). Role of zinc in bone formation and bone resorption. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11(2e3):119e35.

Zhou, H., Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 7(7): 2769–2781.

Zreiqat, H., Howlett, C.R., Zannettino, A., Evans, P., Schulze-Tanzil, G., Knabe, C., et al. (2002) Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants, *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(2):175e84.