



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE NANOBIO MATERIALES**

**PREPARACIÓN Y PROPIEDADES BIOACTIVAS DE BIONANOCOMPÓSITOS
PARA REGENERACIÓN ÓSEA BASADOS EN BIOPOLÍMEROS Y
NANOPARTÍCULAS CERÁMICAS**

Isabel Celhay Rodríguez

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo

Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342

Santiago – Chile

2014

A mi querida Facultad y a la Universidad de Chile, por incentivar me a buscar la verdad a través de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, por la formación y cariño que me han entregado durante toda mi vida, y que han sido punto de partida de todos mis logros.

A mis abuelos y tíos, que me han acompañado y acogido siempre, sobre todo durante los 6 años de universidad.

A José Manuel Bordeu, por ser un gran compañero y mi mejor amigo.

A mis amigas del colegio, que me han acompañado en todas las aventuras, alegrías, penas y enojos, y han sido un pilar y una segunda familia muy importante para mí.

A mis amigos de la universidad, por todo el apoyo y ayuda incondicional que recibí de ustedes durante todos estos años y la alegría que me da haberlos conocido y tenerlos cerca.

A todos mis profesores, por todo lo enseñado y por ser el ejemplo a seguir que tengo hoy como profesional.

A los funcionarios de la universidad, por toda la ayuda durante la carrera, gracias a ustedes el camino se hizo mucho más llevadero.

Al Prof. Dr. Cristián Covarrubias, por todo lo que aprendí de él realizando este proyecto de investigación, especialmente su dedicación al trabajo.

A Carla y Fabi por acompañarme y ayudarme en el laboratorio.

Al proyecto FONDECYT 1130342, por el financiamiento otorgado para este trabajo.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ASPECTOS TEÓRICOS.....	6
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVOS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMEN

La hidroxiapatita (HA) y el vidrio bioactivo (BG) son materiales cerámicos conocidos por sus propiedades bioactivas para inducir la formación de tejido óseo. Los bionanocompuestos son materiales compuestos por cerámicas bioactivas, en forma de nanopartículas, y polímeros biodegradables que combinan la bioactividad de las nanopartículas con las propiedades de soporte del polímero poroso (andamio), guiando la proliferación celular y el crecimiento del nuevo tejido. Alginato (ALG) y gelatina (GEL) son biopolímeros que están siendo actualmente evaluados como materiales para la preparación de andamios de regeneración. En este trabajo se presenta la preparación de bionanocompuestos a base de blendas de ALG-GEL cargadas con nanopartículas de HA y BG, y la evaluación de sus propiedades bioactivas y estructurales *in vitro*, para su potencial aplicación en ingeniería tisular ósea en odontología.

Objetivos: Preparación y caracterización de bionanocompuestos a base de blendas de ALG-GEL cargadas con nanopartículas biocerámicas, y la evaluación de sus propiedades bioactivas y estructurales *in vitro*.

Materiales y Métodos: Se sintetizaron nanopartículas de HA y BG (nHA, nBG) utilizando la técnica Sol-Gel. Los bionanocompuestos se prepararon a base de geles de ALG-GEL con un contenido en peso de 25% de nanopartículas. La porosidad 3D fue producida mediante congelación a -80°C y liofilizado. La bioactividad se evaluó por la capacidad de inducir apatita tipo ósea en suero fisiológico simulado (SBF) y su capacidad de adsorción de proteínas. Se realizaron ensayos de degradación *in vitro* en medio acuoso hasta 7 días de incubación. Los bionanocompuestos y la formación de apatita fueron analizados mediante difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia infrarrojo (FTIR-ATR) y microscopia electrónica de barrido equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX). Se realizó un ensayo preliminar de proliferación celular

mediante el ensayo colorimétrico MTS utilizando células madres provenientes de la pulpa dental.

Resultados y discusión: Los bionanocompósitos presentaron una estructura porosa interconectada con diferente forma y tamaño (30-280 μm), apropiado para conducir la formación de nuevo tejido. Los ensayos en SBF y de adsorción de proteínas demostraron que bionanocompósitos basados en partículas de HA y BG tienen mejores propiedades bioactivas con respecto al andamio puro. En particular, los bioanocompósitos con BG presentaron mayor capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea con respecto a HA, esto se atribuye a la mayor reactividad de nBG. La tasa de degradación de la blenda ALG-GEL resultó ser similar a la de andamios compuestos por nanopartículas. Los bionanocompósitos también permitieron la proliferación de células madre, sugiriendo que estos materiales no alterarían la viabilidad celular.

Conclusión: Bionanocompósitos de ALG-GEL, cargados con nanopartículas de cerámicas, presentan propiedades *in vitro* adecuadas para su potencial uso en aplicaciones de ingeniería tisular ósea, particularmente aquellos cargados con nanopartículas de BG.

INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica es frecuente encontrar pacientes que han perdido tejido óseo por diversos motivos, principalmente debido al proceso natural de reabsorción ósea posterior a la pérdida piezas dentarias, o producto de la destrucción de tejido a causa de la enfermedad periodontal, la cual es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por la pérdida de soporte alrededor del diente, padecida por gran parte de la población adulta. Esta enfermedad se asocia a lesiones gingivales, pérdida de inserción periodontal y destrucción alveolar, teniendo como resultado la exposición de las raíces de los dientes e incluso la pérdida dentaria (Sowmya y cols., 2012). Además, existen otras condiciones que implican pérdida ósea en la región maxilofacial, tales como defectos causados por diversos traumatismos, defectos congénitos, como paladar fisurado, y enfermedades adquiridas como cáncer (Kaigler y Mooney, 2001).

Hoy en día, mantener la integridad y el contorno del reborde óseo es un aspecto relevante para la futura rehabilitación de los pacientes (Ashman, 2000). El potencial reparativo del periodonto es extremadamente limitado en la dentición adulta, por lo que sólo la intervención terapéutica es capaz de inducir su regeneración para poder restaurar la forma y función de las estructuras perdidas. (Aichelmann-Reidy y Reynolds, 2008). Los injertos óseos son utilizados ampliamente en odontología para promover la regeneración ósea y periodontal. Existen revisiones sistemáticas de ensayos clínicos que proveen importante evidencia acerca del uso de injertos óseos de reemplazo en periodoncia y mejorías en parámetros clínicos de la enfermedad, tales como profundidad al sondaje, nivel de inserción clínica y relleno del defecto, en relación al tratamiento periodontal quirúrgico por sí solo (colgajo y debridamiento) (Reynolds y cols., 2003), otorgando un marco estructural para el desarrollo, maduración y remodelación del coágulo que soporta la formación de hueso (Reynolds y cols., 2010). En implantología, la disponibilidad de hueso es clave en el éxito de la

colocación de implantes endóseos tanto en maxilar como en mandíbula. Cuando el espesor del hueso entre el seno maxilar y la cresta alveolar es insuficiente para la colocación de implantes, se hace necesaria la elevación del seno maxilar, la cual es un procedimiento quirúrgico que consiste en aumentar el grosor del piso del seno maxilar a través de un injerto óseo. Este procedimiento quirúrgico es muy útil en caso de maxilares atróficos debido a enfermedad periodontal, ausencias dentales antiguas o traumatismos (Tan y cols., 2008). En mandíbula, cuando la distancia entre el canal mandibular y reborde alveolar es crítica, se sugiere la colocación de injertos para evitar daño neurológico al instalar el implante.

Para poder entender en forma más completa el proceso de reparación ósea, se deben considerar los mecanismos presentes en su fisiología normal. El hueso humano es un tejido dinámico, altamente vascularizado, con la habilidad de remodelarse a lo largo de la vida a través de la formación de nuevo tejido por parte de los osteoblastos, y la resorción ósea, producida por osteoclastos (Cortizo y cols., 2006). Estos procesos están regulados por una variedad de agentes, tanto locales como sistémicos (Marie y cols., 2001), incluyendo factores de crecimiento, hormonas y estrés (Yamaguchi, 1998). Los tres elementos esenciales en regeneración y reparación ósea son osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción (Giannoudis y cols., 2005). La osteogénesis es el proceso de formación de nuevo hueso a partir de células osteoprogenitoras presentes dentro del material de injerto. La osteoinducción es la capacidad de un material de estimular y activar las células osteoprogenitoras que se encuentran en los tejidos adyacentes a él. De acuerdo con este fenómeno, hueso nuevo es formado en un área que previamente carecía de él, es decir, 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 (Costantino y Friedman, 1994), el cual actúa como un andamio para la formación de hueso nuevo (Burchardt, 1983).

La investigación y desarrollo de nuevas técnicas de reconstrucción de tejido óseo en odontología ha adquirido gran popularidad, debido a los avances en biomedicina y a la necesidad de realizar procedimientos reconstructivos, que demandan mayor nivel de exigencias en relación a la devolución de la estética y función perdidas, en los cuales se busca mayor exactitud y semejanza al reemplazar el tejido dañado. Actualmente, muchas terapias dentales y reconstructivas existentes no logran devolver las estructuras óseas a un estado normal de salud. Por este motivo, este nuevo auge en reparación tisular podría tener importantes consecuencias en salud pública, logrando el acceso de la población a terapias que mejoren su calidad de vida en forma significativa.

ASPECTOS TEORICOS

1. Estrategias para reparación de tejidos

Los objetivos principales de los enfoques clínicos actuales para reemplazo y reparación de tejidos son aliviar el dolor y restaurar la estabilidad mecánica y función perdida. Otras metas importantes son la 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, 2009). Las estrategias utilizadas hoy en día para tratamiento de pérdida de tejido óseo comprenden la utilización de injertos autógenos, obtenidos de fuentes locales o distantes, aloinjertos, xenoinjertos y materiales sintéticos (aloplásticos) (Kaigler y Mooney, 2001).

Los **autoinjertos** son considerados actualmente como el gold estándar entre las técnicas de reconstrucción ósea (Marx, 1994). El receptor y donante son el mismo individuo, por lo que se obvian problemas de compatibilidad con el sistema inmune del hospedero y se disminuye la posibilidad de rechazo. Dentro de las fuentes intra orales de injertos están la sínfisis mandibular, rama mandibular, área retromolar, proceso coronoides, tuberosidad maxilar, torus palatino o mandibular y hueso cigomático. Dentro de las fuentes extra orales se encuentran la cresta iliaca anterior o posterior, calota, costillas y tibia (Kainulainen y cols., 2002; Kainulainen y cols., 2003). Los injertos oseos autógenos proveen una fuente rica de células óseas vivas que tienen propiedades osteogénicas, es decir, son capaces de realizar diferenciación y formación de hueso. La mayor desventaja de este tipo de injerto es la existencia de un segundo sitio quirúrgico y la morbilidad resultante de la cosecha. También se debe considerar que la fuente de sitios donantes no es ilimitada para el paciente y que la potencial molestia, complicaciones quirúrgicas y dolor asociado son una razón para evitar este tipo de

procedimientos reconstructivos (Sàndor y cols, 2003). Aproximadamente el 8% de injertos provenientes de cresta iliaca resultan en complicaciones mayores como infección, pérdida de sangre, daño neurológico, dolor a corto y largo plazo y déficit funcional (Ueda, 2011).

Los **aloinjertos** se componen de tejido óseo no vital tomado de un individuo y transferido a otro de la misma especie. Existen tres formas de hueso alogénico: congelado fresco, liofilizado (secado en frío) y matriz ósea desmineralizada (DMB). El tipo congelado fresco es raramente utilizado hoy en día, ya que existe evidencia de riesgo de transmisión de enfermedades virales. El hueso liofilizado es osteoconductor pero no tiene capacidades osteogénicas u osteoinductivas, por lo que requiere una fuente de células osteocompetentes. El hueso desmineralizado (DBM) pierde su fuerza mecánica pero retiene propiedades osteoinductivas, ya que al remover el contenido mineral del hueso se exponen proteínas nativas (Sàndor y cols, 2003). De esta forma proporcionan un estímulo biológico que induce la progresión de las células madre mesenquimales y otras células osteoprogenitoras hacia el linaje de osteoblastos (Reynolds y cols., 2010).

Los **xenoinjertos** consisten en tejido esquelético colectado de una especie y transferido al sitio receptor de otra especie. Estos injertos pueden provenir de huesos de mamíferos y exoesqueletos de coral (Biocoral®). Hueso derivado de bovinos ha sido comúnmente utilizado, a pesar de que existan otras fuentes disponibles como porcino o murino. Algunas formas comerciales de hueso obtenido de bovinos son Bio-Oss®, Endobone®, Laddec®, entre otros. El contenido orgánico es completamente removido, quedando la matriz inorgánica, la cual es osteoconductor, sin las habilidades osteoinductivas dadas por los elementos orgánicos (Sàndor y cols., 2003). El uso de xenoinjertos elimina el sitio donante, lo que reduce la morbilidad, pero tiene como desventaja la posibilidad de contraer a futuro encefalopatía bovina espongiiforme debido a la potencial transmisión lenta del virus a través de productos derivados de bovinos (Bons y cols., 2002).

Los distintos tipos de injertos óseos antes mencionados han conseguido éxito y han sido uno de los mejores avances en la medicina. Sin embargo, poseen ciertas limitaciones. Cabe destacar que ninguno ha demostrado ser ideal y quizás no será reemplazado por hueso en años (Langer y Vacanti, 1993; Kaigler y Mooney, 2001). Considerando las desventajas previamente expuestas, se hace necesario contar con técnicas de regeneración tisular avanzadas, que busquen restituir la función de los elementos de la cavidad oral que se han perdido, y que impliquen menor morbilidad asociada a la técnica, menor cantidad de procedimientos invasivos, mayor aceptación del paciente y menor riesgo de transmisión de enfermedades. Debido a esta situación existe hoy en día gran interés en el desarrollo y uso de nuevos materiales para reparación de tejidos. Los **materiales aloplásticos** son sustancias sintéticas que han sido procesadas para su uso clínico en regeneración ósea. Los más utilizados hoy en día son la hidroxiapatita, fosfato tricálcico (TCP), vidrio bioactivo (BG) y polímeros como por ejemplo, ácido poliglicólico (PGA) y ácido poli láctico (PLA) (Sàndor y cols., 2003).

2. Hidroxiapatita

La **hidroxiapatita (HA)**, cuya fórmula general es $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$, es un mineral formado por fosfato de calcio. Su composición química es similar a la matriz inorgánica del hueso y exhibe alta afinidad por los tejidos duros del huésped a través de unión química (Zhou y Lee, 2011), lo que ofrece grandes ventajas en aplicaciones médicas comparada con otros materiales de sustitución como aloinjertos o implantes metálicos (Bauer y cols., 1991). Tanto la apatita biológica que configura la fase inorgánica del hueso humano, como la hidroxiapatita sintética, tienen como principales componentes los minerales calcio (Ca) y fosfato (P). La hidroxiapatita se caracteriza por ser biocompatible, osteoconductiva, no tóxica, no inflamatoria, no inmunogénica y bioactiva, es decir, tiene la habilidad de formar una unión química directa con tejidos vivos (Aoki H, 1994; Currey, 2001). Biocerámicas de HA se han utilizado recientemente en gran variedad de

aplicaciones biomédicas, incluyendo matrices para liberación controlada de medicamentos y materiales de ingeniería tisular ósea (Ginebra y cols., 2006). Usos comunes en odontología incluyen reparación ósea, aumento óseo, recubrimiento para implantes y material de relleno en hueso o dientes (Bohner, 2000). HA convencional de tamaño micrométrico se usa en forma de películas delgadas, polvos, blocks densos o porosos (Murugan y Rao, 2003; Murugan y Ramakrishna, 2004). Algunos biomateriales aloplásticos disponibles actualmente en el mercado a base de HA sintética son: OsteoGraf® (Dentsply), Periograf®, Calcitite®(Zimmer), IngeniOS™ (Zimmer). Estos materiales han sido diseñados para aplicaciones dentales como mantención de hueso alveolar para preservación de la cresta alveolar, o aumento de cresta alveolar atrófica en altura y ancho. Sin embargo, la baja resistencia mecánica de HA convencional restringe su uso a aplicaciones de bajo soporte de cargas (Zhou y Lee, 2011), así como la alta cristalinidad de la HA hace que en general sea un material estable y poco reactivo.

3. Vidrio Bioactivo

El **vidrio bioactivo (BG) 45S5**, de nombre comercial Bioglass®, ha sido el vidrio más investigado para aplicaciones biomédicas (Hench LL, 1998), siendo utilizado en mas de 1 millón de pacientes para reparar defectos óseos en la mandíbula y tratamientos ortopédicos (Jones, 2013). Este material es un vidrio silicado basado en la red tridimensional de SiO₂ formada por vidrio, en la cual un átomo de silicio (Si) está coordinado con cuatro átomos de oxígeno (O), y además están presentes iones de fosfato y calcio (**Figura 1**). El vidrio 45S5 posee la siguiente composición química: 24.5Na₂O; 24.5CaO; 45.0SiO₂; 6.0P₂O₅ (% masa). El vidrio bioactivo ha sido estudiado e investigado 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 y cols., 1999). En relación a reparación de tejidos blandos, existe evidencia reciente que muestra

la habilidad de BG para promover la angiogénesis (Gorustovich y cols., 2010). Existen aplicaciones clínicas disponibles en el mercado que contienen BG, entre las cuales se encuentran Bioglass®, Perioglas® (Novabone) y Biogran® (Biomet 3i), utilizadas 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 preimplantitis, entre otros. Su mayor éxito comercial es un agente de reparación activa presente en una pasta dental, bajo el nombre NovaMin® (GlaxoSmithKline, UK). Estudios clínicos muestran que el dentífrico puede mineralizar pequeños túbulos de la dentina, reduciendo la sensibilidad dentaria (Jones, 2013). Dentro de sus propiedades se encuentran la biocompatibilidad, la bioactividad (Wilson y cols., 1981), la osteoconductividad y la osteoinductividad, siendo investigadas las señales que provee a células para crear hueso nuevo (Xynos y cols., 2000; Xynos y cols., 2001). Por otro lado, se considera que BG es osteoestimulativo debido a su habilidad para estimular la osteogénesis a través del control directo sobre genes que regulan la inducción del ciclo celular y progresión hacia fenotipo de osteoblasto maduro, mediante productos de disolución iónica liberados durante su degradación. Estos iones (Ca^{2+} , Si), influyen y controlan el ciclo celular de células precursoras osteogénicas y de la población de células diferenciadas (Xynos y cols., 2000; Hench y Polak, 2002; Valerio, 2004), teniendo como consecuencia biológica la proliferación y diferenciación rápida a osteoblastos, lo que tiene como ventaja en aplicaciones clínicas, el relleno de defectos óseos en forma expedita con hueso neoformado, equivalente en forma estructural y mecánica a hueso normal y sano (Hench, 2009). Se ha demostrado en otros estudios 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.

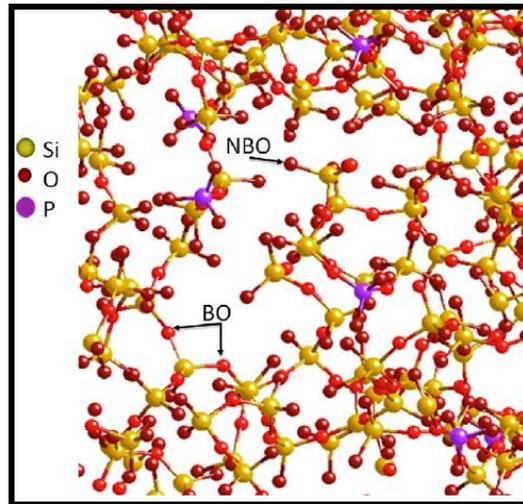


Figura 1: Estructura química del Vidrio Bioactivo 45S5 (Para mayor claridad en el esquema se han omitido los iones de calcio y sodio).

4. 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. El **comportamiento bioactivo** de HA y otras cerámicas se puede demostrar preliminarmente por la mineralización *in vitro* (Kokubo test) (Kokubo y Takadama, 2006). Este experimento permite evaluar la bioactividad de un material por su capacidad de generar una capa de HA en su superficie cuando es sumergido en fluido corporal simulado (SBF) (Kokubo y cols., 1990). El mecanismo propuesto es que los materiales bioactivos muestran una carga superficial negativa en SBF, debido a deprotonación de grupos tipo -COOH u -OH a pH fisiológico (Oliveira y cols., 2003). Esta carga negativa atrae iones de calcio creando una capa rica en Ca^{2+} con potencial de superficie positivo, que atrae a iones negativos en soluciones tipo fosfato, llevando a la deposición de una capa pobre en Ca^{2+} . Este proceso se repite generando la capa de HA en la superficie del material (Kim y cols., 2005; Landi y cols., 2005). Se ha sugerido que la bioactividad *in vitro* es un índice del potencial bioactivo de un material *in vivo*

(Ducheyne, 1987). Los mecanismos de bioactividad y de unión a tejido óseo de vidrio 45S5 han sido estudiados ampliamente y descritos en detalle (Hench LL, 1998; Huang W. y cols., 2006). Basado en esos estudios, esta unión se ha atribuido a la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) sobre la superficie del vidrio, en contacto con el fluido corporal (**Figura 2**), que se une firmemente con hueso y tejidos vivos, gracias a su similitud con el tejido óseo. Previa formación inicial de la capa de apatita carbonatada, se cree que los mecanismos biológicos de adhesión a hueso involucran posteriormente adsorción de factores de crecimiento, seguido por anclaje, proliferación y diferenciación de células osteoprogenitoras (Hench y Polak, 2002). Osteoblastos secretan matriz extracelular (colágeno), que mineraliza formando un mineral nanocrystalino y colágeno en la superficie del implante de vidrio, mientras la degradación y la conversión del biomaterial continúa en el tiempo (Ducheyne, 1987).

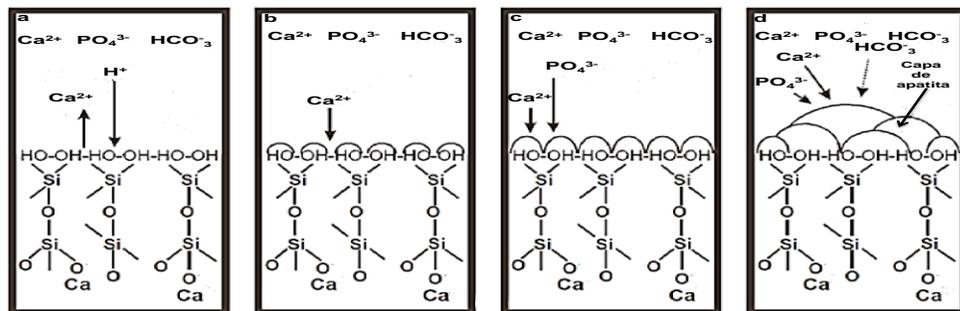


Figura 2: Formación de Apatita Sobre una Superficie de Vidrio Bioactivo.

5. Nanotecnología

La tendencia actual en investigación en biocerámicas está focalizada en superar las limitaciones de las cerámicas a base de fosfatos de calcio y en mejorar sus propiedades biológicas explorando las ventajas únicas que ofrece la nanotecnología (Fathi y cols., 2008). HA y BG se han utilizado normalmente en forma de partículas de tamaño micrométrico. Actualmente, gracias al desarrollo de nuevas técnicas de síntesis que ofrece la nanotecnología, es posible preparar

estos biomateriales con tamaño de partícula nanométrico. La **Nanotecnología** se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia en la escala nanométrica (1-100 nm), y explotación de nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala (NASA) (Mendonça y cols, 2008). Los nanomateriales exhiben propiedades únicas de superficie (topografía, química, humectabilidad y energía de superficie), debido a un aumento significativo en el área superficial, rugosidad y energía superficial, lo cual se traduce en una mayor reactividad, comparado con los materiales convencionales o microestructurados. La nanotecnología está siendo explorada en múltiples ámbitos biomédicos. 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 superficie favorables pueden promover mayor cantidad de interacciones específicas de proteínas para estimular de manera más eficiente el crecimiento de nuevo hueso, en comparación con los materiales convencionales. Todos estos mecanismos son clave para comprender por qué los nanomateriales tendrían propiedades superiores en relación a los materiales microestructurados para estimular la regeneración ósea (Nayar y cols., 2011). **Nanopartículas de HA y BG (nHA, nBG)** poseen propiedades bioactivas mejoradas para reparación de tejido óseo. Esto se explica debido a que cristales más pequeños se disuelven más rápidamente que cristales de mayor tamaño de la misma composición química, gracias a la exposición de mayor área superficial al ambiente biológico y a un mayor número de defectos presentes en la trama cristalina (Daculsi y cols.,1989; Suvorova y cols.,1998).

Las unidades funcionales básicas de células y tejidos están definidas en la escala manométrica. El hueso es un compuesto cerámico natural formado por fibras colágenas que contienen nanocristales inorgánicos de hidroxiapatita, cuyo tamaño fluctúa entre los 25-50 nanómetros de largo (Zhou y Lee, 2011). Estos cristales se forman en una matriz orgánica y tienen uniones cristal-cristal débiles, por lo tanto, la reabsorción mediada por osteoclastos es homogénea. HA

micrométrica al contrario, presenta menor área superficial y uniones cristal-cristal fuertes, es altamente estable, y en consecuencia, menos bioreabsorbible, lo cual constituye una característica indeseable, retrasando la tasa de regeneración ósea al ser utilizada como sustituto de hueso (Kivrak y Taş, 1998). Por estas razones, el mineral óseo presenta mayor bioactividad que HA sintética (Kim, 2003). HA nanométrica (nHA) presenta morfología, tamaño y cristalinidad comparable con aquellas apatitas que constituyen los tejidos duros humanos. La liberación de iones Ca^{2+} de nHA es similar a la de apatita ósea y significativamente más rápida que la de la apatita convencional (micro-HA) (Murugan y Ramakrishna, 2004). Se ha registrado que el proceso de reabsorción de HA sintética (forma convencional) es diferente al del mineral óseo. Otras publicaciones han concluido que la bioreabsorción in vitro de nHA es mayor que la de HA convencional, por tanto más cercana a la de la apatita biológica (Fathi y cols., 2008). En relación a las propiedades mecánicas, se ha demostrado que nHA posee sinterabilidad mejorada y densificación aumentada debido a su mayor área de superficie, lo que podría mejorar su resistencia a la fractura como también otras propiedades (LeGeros, 1993).

La preparación de polvos en base a calcio y fosfato con una particular morfología, estequiometría, cristalinidad y distribución del tamaño del cristal es importante en biomedicina y en ciencias de los materiales (Zhou y Lee, 2011). Las partículas de HA y el BG micrométricas se preparan a altas temperaturas (1300-1450 °C), lo que implica un alto consumo de energía, y la obtención de una estructura altamente cristalina, la cual es considerada ser insoluble en medio fisiológico (Kim y cols., 2000). En contraste, se pueden obtener nanopartículas de HA y BG utilizando temperaturas de procesamiento relativamente bajas, a partir del método de precipitación sol-gel (Sanosh y cols., 2009). Se ha reportado que nHA sintetizada a través de este método exhibe estructura de apatita carbonatada, de tamaño nanométrico y baja cristalinidad, semejante a la de la apatita ósea humana, mostrando propiedades deseables in vitro, ideales en la síntesis de nanopartículas.

6. Ingeniería Tisular

Uno de los puntos clave en la regeneración de tejidos es desarrollar estructuras tridimensionales que sustituyan parte del órgano dañado o actúen como vehículo para transportar células y moléculas a lugares concretos del organismo. A pesar de las excelentes propiedades de las cerámicas bioactivas, su uso aislado en forma de polvo no cumple con estos objetivos. Aplicaciones de ingeniería tisular han indagado en el desarrollo de nuevos biomateriales para estos fines. La **ingeniería tisular (IT)** se define como un campo interdisciplinario que aplica principios de ingeniería y ciencia para desarrollar sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función tisular (Langer y Vacanti, 1993). Esta disciplina se ha dedicado durante la década pasada a recrear órganos y tejidos funcionales con el objetivo de reemplazar tejidos enfermos o muertos (Kaigler y Mooney, 2001). La IT involucra conocimiento de áreas como biología celular, bioquímica, química, física, medicina e ingeniería, entre otros.

En el desarrollo de la ingeniería tisular confluyen tres elementos fundamentales: **andamios, señales biológicas y células** (Kaigler y Mooney, 2001). Los **andamios** (*scaffolds*) son matrices tridimensionales cuya función principal es proveer una estructura temporal para las células formadoras de tejido, guiando la proliferación y diferenciación celular en la reparación o síntesis de un nuevo tejido. Ejemplos son el uso de membranas de barrera en regeneración tisular guiada para regeneración de tejidos de soporte periodontal (Nyman y cols., 1982). El andamio ideal debe ser biocompatible (no tóxico); promover la adhesión y proliferación celular; exhibir propiedades mecánicas comparables con el tejido a reemplazar, siendo capaz de soportar stress in vivo y cargas fisiológicas; tener una arquitectura porosa tridimensional, la cual es crítica, ya que debe proveer a las células un microambiente optimizado para permitir la proliferación celular, vascularización y difusión de nutrientes entre ellas, la matriz celular y el entorno que la rodea; degradarse en productos no tóxicos, que puedan ser fácilmente reabsorbidos o excretados por el cuerpo a una tasa que sea compatible con la

producción de nuevo tejido; ser capaz de ser procesado en forma económica en formas y dimensiones anatómicas relevantes, y ser esterilizable para uso clínico (Griffith, 2002; Deville y cols., 2006; Rahaman y cols., 2011). La porosidad, tamaño e interconexión de los poros son parámetros críticos. En general, poros interconectados con un diámetro (o ancho) de 100 micrones o más y porosidad mayor a 50% son considerados en la mayoría de los casos, requerimientos mínimos para permitir el crecimiento y función tisular (Rodríguez y cols., 2002; Zhang y cols., 2003). Las **señales biológicas** permiten la inducción o activación de células vecinas al sitio del defecto a través de señales químicas específicas. Hoy en día se está volviendo cada vez más popular el uso de factores de crecimiento, como proteína morfogenética ósea (BMP), y **partículas bioactivas**. Se sabe que iones inorgánicos libres, como calcio (Hinoi, 2004; Valerio, 2009), fósforo (Julien y cols., 2009), silicio (Carlisle, 1981; Reffitt y cols., 2003), estroncio (Marie y cols., 2001), zinc (Yamaguchi, 1998), vanadio (Cortizo y cols., 2006), boro (Uysal y cols., 2009), cobalto (Tanaka y cols., 2005) y magnesio (Zreiqat y cols., 2002), están involucrados en el metabolismo óseo y juegan roles fisiológicos en procesos como angiogénesis, crecimiento y mineralización de tejido óseo. En particular, iones metálicos actúan como cofactores enzimáticos influenciando vías de señalización y estimulando efectos metabólicos que ocurren durante la formación de tejido (Sun y cols., 1997). Evidencia creciente presente en la literatura, indica que productos de la disolución iónica de materiales inorgánicos juegan un papel clave para entender su comportamiento *in vivo* e *in vitro*, en el contexto de aplicaciones de ingeniería tisular. Se cree que la liberación de estos iones luego de su exposición al ambiente fisiológico, afecta favorablemente el comportamiento de células humanas y estimula la bioactividad de andamios para osteogénesis y angiogénesis (Hoppe y cols., 2011). En relación a las **células**, lo ideal es que sean fáciles de obtener y expandir, conservar el fenotipo, mantener su función, ser multipotenciales para diferenciarse a una variedad especializada y no generar respuesta inmune (Yang y cols., 2001). Las células madre se han definido como células clonogénicas capaces de autorenovarse y diferenciarse a

múltiples linajes celulares. Existen poblaciones altamente proliferativas de células madre en dientes, que pueden ser fácilmente obtenidas de dientes perdidos en forma natural o extraídos quirúrgicamente (Volponi y cols., 2010).

El objetivo final de la IT es el desarrollo de un “constructo bioactivo” (Marolt y cols., 2010). Esto involucra la siembra de células en un andamio puro o compósito, su cultivo *in vitro* y su implantación final en el cuerpo para producir la regeneración del tejido (Rabkin y Schoen, 2002).

7. Biopolímeros

Los materiales utilizados comúnmente en la fabricación de andamios para aplicaciones de IT son polímeros biodegradables naturales o sintéticos (Griffith, 2000). Los polímeros sintéticos tienen propiedades mecánicas relativamente buenas, y su forma y tasa de degradación pueden ser fácilmente modificadas. Sin embargo, sus superficies son hidrofóbicas y no poseen señales de reconocimiento celular. Los polímeros naturales tienen la ventaja de ser biodegradables y poseer componentes similares a componentes extracelulares naturales, lo que podría influir positivamente en el soporte, adhesión y función celular, no obstante, algunos de ellos poseen propiedades mecánicas limitadas. Ejemplos de estos materiales son: polímeros sintéticos como policaprolactona, ácido poliláctico-co-glucólico, polietilenglicol, polivinilalcohol, poliuretano, y polímeros naturales como alginato, colágeno, gelatina, quitina y quitosano (Sowmya y cols., 2011).

El **alginato (ALG)** es un polisacárido natural, biocompatible, hidrofílico y bioreabsorbible, que se encuentra en todas las especies de algas marrón (Al-Shamkhani y Duncan, 1995). Su composición química corresponde a un ácido polimérico lineal, compuesto por residuos de ácido 1,4 - β -D-manurónico (bloque M) y ácido α -L-glucorónico (bloque G) (**Figura 3**). En presencia de cationes bivalentes (Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+}) a bajas concentraciones, forma hidrogeles estables

a través de interacción iónica entre cationes y grupos funcionales carboxílicos ubicados en la cadena polimérica del bloque G (Wang y cols., 1993). ALG ha sido utilizado ampliamente para transplantes celulares (Novikova y cols., 2006), regeneración de piel (Hashimoto y cols., 2004), cartílago (Li y Zhang, 2005), hueso (Alsberg y cols., 2001), hígado (Yang y cols., 2001) y tejido cardíaco (Dar y cols., 2002). Debido a su naturaleza hidrofílica, la siembra de células en andamios de ALG es simple y rápida (Wang y cols., 2003). Para estabilizar y disminuir la solubilidad del polímero en soluciones acuosas y medio de cultivo, se realiza el entrecruzamiento de las cadenas de ALG. Este procedimiento permite su uso como estructura de soporte para células sembradas, al ser utilizado como andamio de regeneración in vitro o in vivo. ALG entrecruzado mediante enlaces iónicos se degrada cuando iones Ca^{2+} son intercambiados por otros iones presentes en fluido corporal, como Na^+ , al ser utilizado in vivo (Mohan y Nair, 2005; Bonino y cols., 2011).

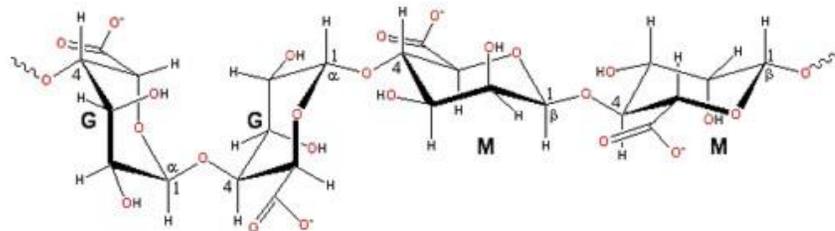


Figura 3: Estructura química de Alginato.

Por otro lado, la **gelatina** (GEL) es un biopolímero derivado de proteínas naturales, obtenido por la hidrólisis controlada de colágeno insoluble fibroso. Su estructura química se puede observar en la **Figura 4**. A pesar de que el colágeno presenta antigenicidad en condiciones fisiológicas, la gelatina no posee esta condición (Chvapil, 1977), y es más fácil y menos costosa de obtener en soluciones concentradas. GEL ha sido ampliamente utilizada en la industria

farmacéutica, así como en el campo biomédico. Entre sus aplicaciones frecuentes se encuentran dispositivos como cápsulas blandas y duras, microesferas, sellantes para prótesis vasculares, vendajes para heridas y dispositivos absorbentes para uso quirúrgico. Otras aplicaciones en este campo incluyen revestimiento de placas de cultivos celulares para mejorar la adhesión celular, estabilización de la Taq DNA polimerasa en PCR (Dieffenbach y Dveksler, 2003), y usos como reactivo bloqueante en Western blotting, ELISA e inmunohistoquímica (Vogt y cols., 1987). Adicionalmente, como polímero biocompatible, la gelatina ha sido utilizada como vehículo de liberación de moléculas bioactivas (Young y cols., 2005), y para la producción de andamios en aplicaciones de ingeniería tisular (Huang Y. y cols., 2005). Como la gelatina es soluble en medio acuoso, los materiales basados en gelatina para aplicaciones biomédicas a largo plazo, deben ser sometidos a un proceso de entrecruzamiento, que mejora la estabilidad térmica y mecánica del biopolímero. Entre los agentes químicos entrecruzantes, el glutaraldehído (GTA) constituye uno de los más utilizados, debido a su alta eficiencia al estabilizar materiales en base a colágeno, a través de enlace covalente (Bigi y cols., 2001).

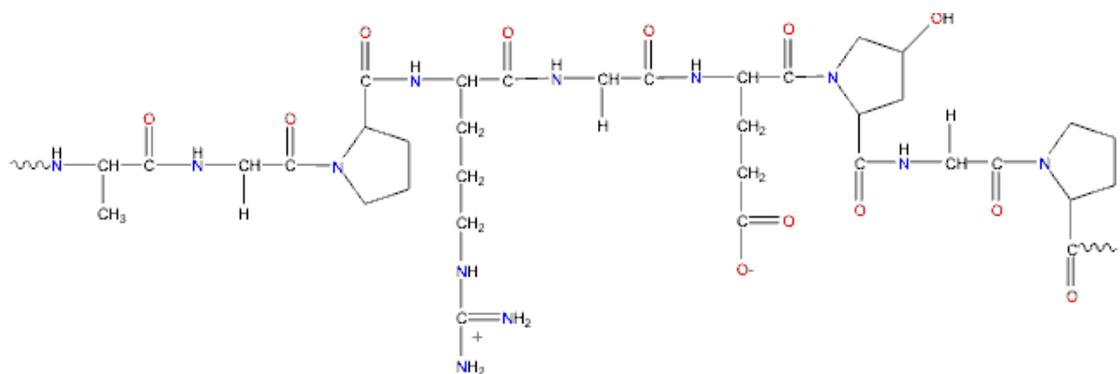


Figura 4: Estructura química de Gelatina.

9. Bionanocompósitos

Los **compósitos bioactivos** (Swetha y cols., 2010; Boccaccini y cols., 2010) son materiales compuestos, preparados por la incorporación de partículas cerámicas bioactivas en matrices poliméricas biodegradables. De esta forma se combina la bioactividad de partículas inorgánicas con las propiedades de soporte de una matriz polimérica que actúa como andamio. Los **bionanocompósitos** son una nueva clase de nanomateriales híbridos, tal que uno de sus componentes está comprendido en la escala nanométrica. En comparación a los compósitos tradicionales, estos biomateriales ofrecen mayor área superficial, mayor reactividad superficial, unión entre las interfases relativamente fuerte, flexibilidad de diseño y propiedades mecánicas mejoradas (Murugan y cols., 2005). Materiales nanocompósitos muestran a menudo un excelente balance entre resistencia mecánica y dureza, y usualmente características mejoradas comparado con sus componentes en forma individual (Tjong, 2006). Es de suma importancia mencionar que la matriz ósea natural es un compuesto formado por una matriz orgánica (colágeno) y relleno inorgánico (apatita). Considerando esta situación, materiales compósitos son opciones excelentes para la fabricación de andamios para ingeniería de tejido óseo (Murugan y Ramakrishna, 2005). La incorporación de nanopartículas cerámicas a este tipo de matrices, no solo impartiría bioactividad, sino que también el nanorelleno produciría un efecto de reforzamiento mecánico del andamio. En particular, estudios recientes sobre la adición de partículas de nBG a andamios de regeneración evidencian que las nanopartículas no sólo mejoran la capacidad de biomineralización de los andamios compósitos, sino que también aumentan la rigidez del material sin comprometer la resistencia mecánica (Ehrlich y cols., 2008; Rezwan y cols., 2006). Se ha reportado la preparación de compósitos basados en ALG usando HA comercial micrométrica (Turco y cols., 2009), fosfato octacálcico micrométrico (Shiraishi y cols., 2010), nBG (Srinivasan y cols., 2012), y recientemente, la preparación de nanocompósitos formados por nHA/ALG y nBG/ALG, capaces de acelerar la formación de apatita en SBF (fluido corporal simulado) (Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012). Sin embargo,

bionanocompósitos de alginato puro presentan relativamente baja estabilidad dimensional en medio de cultivo celular, lo cual constituye una propiedad no deseada.

A pesar de la gran cantidad de investigación y de la alta disponibilidad de materiales poliméricos para aplicaciones de IT, ningún polímero biodegradable puede cumplir con todos los requisitos necesarios para su uso como andamio en forma aislada. Por este motivo, el diseño y preparación de sistemas de polímeros basados en múltiples componentes representan una estrategia viable en el desarrollo de biomateriales innovadores (Armentano y cols., 2010). Además, se sabe que la realización de mezclas de polímeros homogéneas o blendas es un método efectivo y conveniente para mejorar el desempeño de materiales poliméricos (Dong y cols., 2006). La preparación de blendas de ALG con otros biopolímeros podría producir andamios porosos con estabilidad mejorada. Evidencia disponible en relación a la síntesis y utilización de blendas de ALG/GEL, muestra que la caracterización físico-química de ALG/GEL revela una buena miscibilidad y la presencia de interacciones a través de grupos funcionales de ambos biopolímeros (Rosellini y cols., 2009). Andamios de ALG/GEL porosos preparados a través de entrecruzamiento covalente (no tóxico) de gelatina han presentado adecuada estabilidad en medio de cultivo celular, y al ser sometidas a ensayos de cultivo celular con células madre, han demostrado promover la viabilidad, proliferación y diferenciación celular, mediante la expresión de marcadores osteogénicos (Bernhardt y cols., 2009).

En este trabajo de tesis se prepararán y caracterizarán bionanocompositos basados en ALG/GEL, cargados con nanopartículas de HA y BG y se evaluarán sus propiedades de bioactividad *in vitro* orientadas a la regeneración ósea. Particularmente evaluando el efecto de las nanopartículas con respecto al polímero puro.

HIPÓTESIS.

Bionanocompósitos a base de nanopartículas cerámicas bioactivas y matrices poliméricas de alginato/gelatina presentan propiedades bioactivas y estructurales *in vitro* mejoradas con respecto al andamio puro.

OBJETIVO GENERAL

Preparar bionanocompósitos a base de nanopartículas cerámicas bioactivas y andamios de alginato/gelatina, y comparar sus propiedades bioactivas y estructurales *in vitro* con respecto al andamio puro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Preparar bionanocompósitos basados en blendas de ALG/GEL con nanopartículas cerámicas de HA y BG.
- Caracterizar la estructura de los materiales bionanocompósitos.
- Evaluar bioactividad *in vitro* (inducción de apatita tipo ósea) de los materiales en fluido corporal simulado (SBF).
- Evaluar la capacidad de adsorción de proteínas extracelulares de los bionanocompósitos.
- Evaluar la degradación *in vitro* de bionanocompósitos.
- Evaluar la proliferación de células madre obtenidas de pulpa dental humana (DPSCs) al ser cultivadas en presencia de bionanocompósitos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (nHA) y vidrio bioactivo (nBG).

1.1 Síntesis de nHA

La síntesis de las nanopartículas de nHA fue realizada través del método de precipitación sol-gel (Sanosh y cols., 2009), utilizando nitrato de calcio tetrahidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich) y dihidrógeno fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; Baker) como precursores iniciales de calcio y fosfato a través del siguiente procedimiento: 50 mL de una solución 0.6 M de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ fueron agregados gota a gota a un volumen igual de una solución 1M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, bajo agitación constante. Para regular el pH, fue agregada una solución de amonio acuoso (NH_3) gota a gota hasta alcanzar pH 11. La solución resultante estuvo bajo agitación por 1 hora y se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente. El precipitado fue separado y lavado a través de tres ciclos repetidos de centrifugado y redispersión en agua destilada, de 20 minutos cada uno, a 1200 rpm. Luego, el precipitado blanco fue secado en una estufa a 40°C por 24 horas y posteriormente calcinado a 200°C por una hora, a una tasa de 10°C/min, obteniéndose un polvo blanco y fino de nHA (**Figura 5**).

1.2 Síntesis de nBG

Las nanopartículas de BG fueron preparadas a través del método sol-gel reportado por Hong y cols., compuesto por tres etapas (Hong y cols., 2009). Sin embargo, para obtener mejor bioactividad se utilizó la siguiente composición molar: 58SiO₂:40CaO:5P₂O₅ (Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012). El nBG fue

obtenido a través del siguiente procedimiento: una solución basada en calcio (Solución 1) fue preparada disolviendo 7.7 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 117 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Una segunda solución (Solución 2), fue preparada mediante la dilución de 9.7 mL de tetraetilortosilicato (TEOS 98%; Sigma-Aldrich) en 63.5 mL de etanol. Esta solución fue agregada a la solución 1, y el pH fue regulado adicionado ácido nítrico (HNO_3), hasta alcanzar pH 1-2. La solución resultante fue nombrada solución "A". Paralelamente, se preparó una solución agregando 1,2 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Solución "B") en 1500 mL de agua destilada, a la cual se agregó lentamente la solución "A", manteniendo el pH alrededor del valor 10 durante todo el proceso, mediante la adición gota a gota de amonio acuoso (NH_4). La mezcla resultante fue sometida a agitación constante durante 48 horas y se dejó reposar por un período de 24 horas a temperatura ambiente. El precipitado fue separado mediante centrifugado durante 20 minutos a 12000 rpm, y luego lavado a través de 3 ciclos de centrifugado y redispersión de 40 minutos cada uno. El sólido obtenido fue congelado a -80°C por 12 horas, luego liofilizado por 48 horas y finalmente calcinado a 700°C por 3 horas, obteniéndose un polvo blanco y fino de nBG (**Figura 5**).

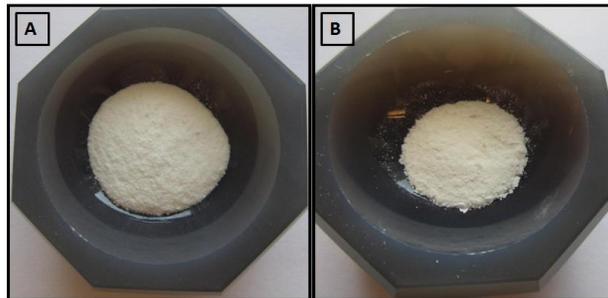


Figura 5: partículas de nHA (A) y nBG (B) sintetizadas por el método sol-gel.

2. Preparación de bionanocompuestos

Los bionanocompuestos fueron preparados utilizando como matrices poliméricas naturales polímeros puros (GEL) y blendas de distintas proporciones de ALG:GEL, logrando una concentración de 4% de biopolímero. Como relleno inorgánico se utilizaron nanopartículas de hidroxiapatita y vidrio bioactivo con contenidos de 25% con respecto a la masa total de biopolímero.

En una preparación típica, la blenda ALG: GEL fue formada mezclando soluciones acuosas de ALG y GEL, preparadas a base de alginato de sodio de algas café (Sigma-Aldrich) y polvo de gelatina derivado de piel bovina tipo B (Sigma-Aldrich), respectivamente. Se prepararon blendas de proporciones en peso de 50:50 (AG50) y 25:75 (AG75) de ALG:GEL, y biopolímeros puros de GEL, manteniendo en todas las preparaciones una concentración de biopolímero al 4%. Las cantidades de reactivos utilizadas en cada mezcla se presentan en la **Tabla 1**. Después, se agregó una dispersión acuosa de 10 mL de partículas cerámicas (nHA o nBG), previamente tratada con ultrasonido por 20 minutos, bajo agitación constante a 40°C. La mezcla resultante fue sometida a otros 20 minutos de ultrasonido para lograr la dispersión homogénea de las nanopartículas. Luego se agregó gota a gota una solución de gluconato de calcio ($C_{12}H_{22}CaO_{14}$; Sigma-Aldrich) al 0.4% para producir la reacción de entrecruzamiento de las cadenas del polímero ALG. En el siguiente paso se llevó a cabo el entrecruzamiento de la gelatina adicionando gota a gota una solución de glutaraldehído (JT Baker) al 0.5%.

Los geles formados fueron colocados en placas de 48 pozos, congelados a -80°C por 12 horas y liofilizados por 48 horas, obteniéndose de esta forma materiales bionanocompuestos porosos con forma de esponjas cilíndricas. También se prepararon andamios de polímero puro (sin nanopartículas), siguiendo el procedimiento antes descrito.

Se sintetizaron un total de 9 tipos de bionanocompuestos con forma de andamios porosos cilíndricos, a partir de 3 matrices poliméricas distintas, las dos primeras compuestas a partir de blendas de distintas proporciones de alginato y gelatina: alginato-gelatina 50:50 (AG 50), alginato-gelatina 25:75 (AG 75), y la tercera a base de gelatina pura (GEL), y 2 tipos de nanopartículas cerámicas (nanopartículas de HA y BG). Como grupo control fueron utilizadas matrices puras (sin nanopartículas cerámicas).

Tabla 1: Materiales y cantidad correspondiente utilizados en la preparación de bionanocompuestos a base de blendas de biopolímeros de ALG: GEL y GEL pura.

Bionanocompuesto	GEL (g)	ALG (g)	H ₂ O (mL)	Glut.0.5% (mL)	CaCl ₂ 0.4% (mL)	n-HA (g)	n-BG (g)
AG50	1	1	25	12.5	12.5	--	--
25%HA/AG50	1	1	25	12.5	12.5	0.665	--
25%BG/AG50	1	1	25	12.5	12.5	--	0.665
AG75	1.5	0.5	25	12.5	12.5	--	--
25%HA/AG75	1.5	0.5	25	12.5	12.5	0.665	--
25%BG/AG75	1.5	0.5	25	12.5	12.5	--	0.665
GEL	2	--	25	25	--	--	--
25%HA/GEL	2	--	25	25	--	0.665	--
25%BG/GEL	2	--	25	25	--	--	0.665

3. Caracterización

Nanopartículas de HA y BG fueron caracterizadas a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Microscopio electrónico de transmisión modelo Zeiss m-109, 50 kv), análisis de difracción de rayos-X (DRX) (difractómetro de rayos-X de polvo, SIEMES D 5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$), y espectroscopía infrarrojo con reflectancia atenuada (FTIR-ATR) (espectrofotómetro infrarrojo con transformadas de Fourier (FTIR), Bruker modelo Alpha). La caracterización de la estructura química de los bionanocompósitos fue ejecutada a través de FTIR-ATR y DRX. La estructura porosa de los andamios fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (EDX), para identificar los elementos constituyentes de cada material (microscopio electrónico de barrido modelo Jeol5410).

4. Ensayos de bioactividad en fluido corporal simulado (SBF)

La habilidad de los bionanocompósitos para inducir la formación de apatita fue evaluada en fluido corporal simulado acelular (SBF), el cual tiene concentraciones iónicas similares a las del fluido extracelular humano. Para la realización de este ensayo, basado en el método propuesto por Kokubo (Kokubo y Takadama, 2006), se preparó en primer lugar la solución de SBF bajo la siguiente composición iónica estándar: Na^+ : 142.0 mM; K^+ : 5.0 mM; Ca^{2+} : 2.5 mM; Mg^{2+} : 1.5 mM; Cl^- : 148.0 mM; HCO_3^{-2} : 4.2 mM; HPO_4^{-2} : 1.0 mM; SO_4^{2-} : 0.5 mM. En segundo lugar, se disolvieron las sales antes mencionadas en un vaso precipitado de 1000 mL, en el mismo orden en el cual se mencionan. La cantidad de cada reactivo utilizado se encuentra detallada en la **Tabla 2**. La adición de cada reactivo se realizó una vez disuelto completamente el reactivo previo. El fluido se neutralizó, ajustándolo a pH fisiológico 7.4, a 37°C con tri-(hidroximetil) aminometano ($(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) y ácido clorhídrico (HCL). Una vez agregada la última sal y ajustado el pH, se llenó el recipiente con agua destilada hasta completar 1000 mL de volumen.

Tabla 2: Cantidades de reactivos utilizadas en la preparación de 1000 mL de SBF.

Reactivo	Cantidad
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 · 6H ₂ O	0,305 g
HCl 1M	40 mL
CaCl ₂	0,278 g
Na ₂ SO ₄	0,071 g
(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 g
HCl (para ajuste a pH 7.4)	-----

Muestras cilíndricas de bionanocompósitos fueron sumergidas en 50 mL de SBF, en contenedores de polietileno a 36.5°C, usando un baño termostático con agitación leve y constante. Después de incubar por un periodo de tiempo designado (12 horas, 24 horas, 3 días y 7 días), los andamios fueron removidos del SBF, lavados con agua destilada y secados a 40°C por 24 horas. La fase de formación de apatita en la superficie del andamio fue analizada con DRX, espectroscopia FTIR-ATR, y microscopia SEM equipada con EDX.

5. Ensayos de adsorción de proteínas

Como proteínas modelo del estudio, se utilizaron albúmina de suero bovino y fibrinógeno de plasma humano. Estas proteínas se encuentran en altos porcentajes en el fluido extracelular y sirven como modelo de las proteínas que participan en el proceso de adhesión de las células formadoras de hueso

(osteoblastos). Para preparar la solución proteica se utilizó un buffer de fosfato. La solución de proteínas (1 mg/mL) fue contactada con los andamios porosos en una placa de cultivo de 24 pozos, y luego incubada a 37°C por 30 minutos. Las proteínas no adherentes fueron removidas lavando con buffer de fosfato. Para remover las proteínas adheridas, cada muestra fue puesta en contacto con 1,5 ml de una solución al 2% p/v del surfactante dodecil sulfato de sodio. Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 37°C en un baño termostático por 12 horas. Una vez transcurridas las 12 horas, se eliminó la solución de dodecil sulfato y se lavó esta placa con 1,5 ml del mismo surfactante con el fin de retirar la totalidad de las proteínas desorbidas desde la placa. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el ensayo Micro BCA™ Protein Assay Kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este ensayo utiliza un método colorimétrico indirecto para cuantificar las proteínas y está basado en la reacción del ácido bicinquinónico el cual forma un complejo purpura-violeta con el Cu^{+1} , al producirse la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+} , en un ambiente alcalino. La absorbancia de la solución, medida a 562 nm, es proporcional a la cantidad de proteínas presentes (Hulbert y cols., 1970; Walker, 1994). El ensayo fue realizado en triplicado y se consideró el promedio de las 3 muestras para su posterior análisis.

6. Ensayos de degradación in vitro

La degradación de los bionanocompuestos fue estudiada utilizando medio de cultivo celular (alfa-MEM), y se evaluó la pérdida de peso del andamio en función del tiempo. Andamios puros AG50 y bionanocompuestos de HA y BG, fueron cortados por la mitad y depositados en 10 mL de medio de cultivo cada uno, dispuesto en placas de 24 pozos. Previo a sumergirlas en el medio, fue registrado su peso inicial (M_i). Se realizaron mediciones en los días 1, 3, 5 y 7 de incubación. Al realizar cada control, se midió el pH del medio de cultivo, luego se extrajo la esponja, se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos, y el sólido separado fue secado

en una estufa a 40°C por 24h. Finalmente, se obtuvo el peso seco (M_s) de cada esponja. La degradación fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Degradación (\%)} = (M_i - M_s) / M_i \times 100$$

El ensayo fue realizado en triplicado y se consideró el promedio de las 3 muestras para su posterior análisis.

7. Ensayos de cultivo celular

Estos ensayos fueron realizados utilizando 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 mismo proyecto FONDECYT (Balanda C., 2013). Estas fueron extraídas mediante digestión enzimática.

7.1 Ensayo MTS.

La proliferación celular en los andamios de biopolímero fueron evaluadas preliminarmente utilizando el ensayo colorimétrico MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfopenil]-2H-tetrazolio), según el kit CellTiter 96 AQueus Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. El MTS es bio-reducido por las células viables a través de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales en un producto coloreado llamado formazán, que a su vez es soluble en el medio de cultivo y su absorbancia puede ser medida con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. La absorbancia de este producto es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el medio de cultivo (Buttke y cols., 1993).

En una etapa previa, los andamios bionanocompuestos fueron expuestos a luz UV por 24 horas, luego lavados una vez con PBS (buffer de fosfato salino) e

incubados 48 horas con medio basal para eliminar sustancias que pudiesen ser tóxicas para las células. Una vez concluido el período, estos fueron colocados en papel filtro para eliminar el exceso de medio y depositados en placas de 24 pozos.

Para la realización del ensayo, se sembraron 200.000 células madre de pulpa humana (DPSCs) por pozo, contenidas en 60 μ l de medio basal α -MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), y se depositaron en el centro del andamio. Los bionanocompósitos cargados con DPSCs se dejaron 2 horas en el incubador para favorecer la adherencia celular, y posteriormente cada pozo fue completado con medio basal α -MEM. Con el objetivo de descartar que las células que estuviesen adheridas al pozo, los andamios fueron cambiados de placa. Luego de 4 días se realizó un ensayo de proliferación celular, para el cual las células fueron incubadas con MTS durante 2 horas a 37° C y a una atmósfera de 5% CO₂. Luego fue medida la absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un espectrofotómetro. El ensayo fue realizado en triplicado y como control negativo se realizaron mediciones en blanco, es decir, sobre células sin la presencia del material.

8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los ensayos de adsorción de proteínas, degradación *in vitro* y ensayo de proliferación celular MTS fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, fue realizada la prueba estadística de Shapiro Wilk. Dado que la distribución de datos fue normal, se aplicó un test de ANOVA, con post-test de Bonferroni para ver diferencias de medias entre cada grupo a los diferentes días y para cada caso en particular. Se utilizó un nivel de significancia de 95% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1. Caracterización de nanopartículas de HA y BG

HA y BG fueron sintetizados a escala nanométrica a través del método de precipitación sol-gel. Imágenes TEM (**Figura 6**), muestran que ambas nanopartículas presentan un tamaño comprendido entre 40-70 nm. En relación a la morfología observada, las partículas de nHA presentan nanocristales de forma alargada y aguda, mientras que nBG presenta una estructura más amorfa, de forma esférica.

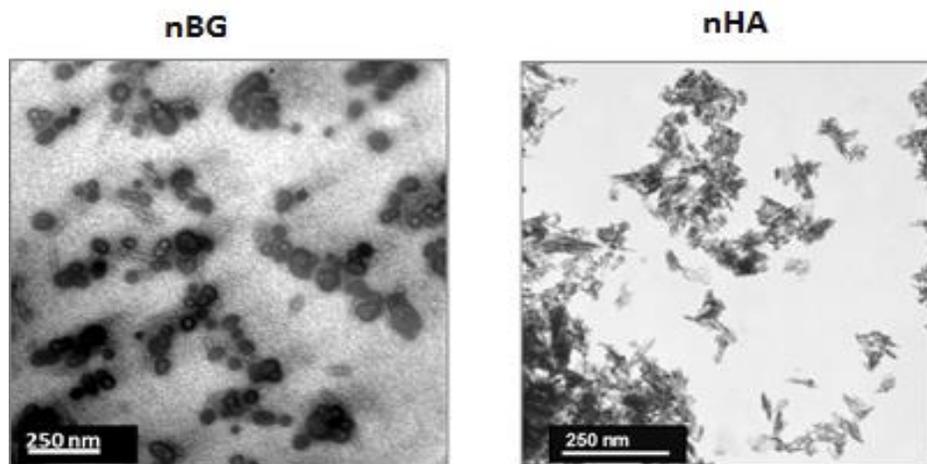


Figura 6: Imágenes TEM de nBG y nHA sintetizados por técnica sol-gel.

Para identificar la estructura química y cristalina de los materiales sintetizados, se utilizó el análisis de difracción de rayos X (DRX), el cual permite obtener información acerca de las propiedades cristalográficas (**Figura 7**). El patrón DRX de nHA expresó los peaks de difracción característicos correspondientes a su estructura cristalina, específicamente a 31.8 y 25.9° (2θ) (Hughes y cols., 1989). El patrón de nBG presentó una banda amplia sin la presencia de señales, entre $15-35^\circ$ (2θ), lo cual está de acuerdo con la estructura amorfa de este material.

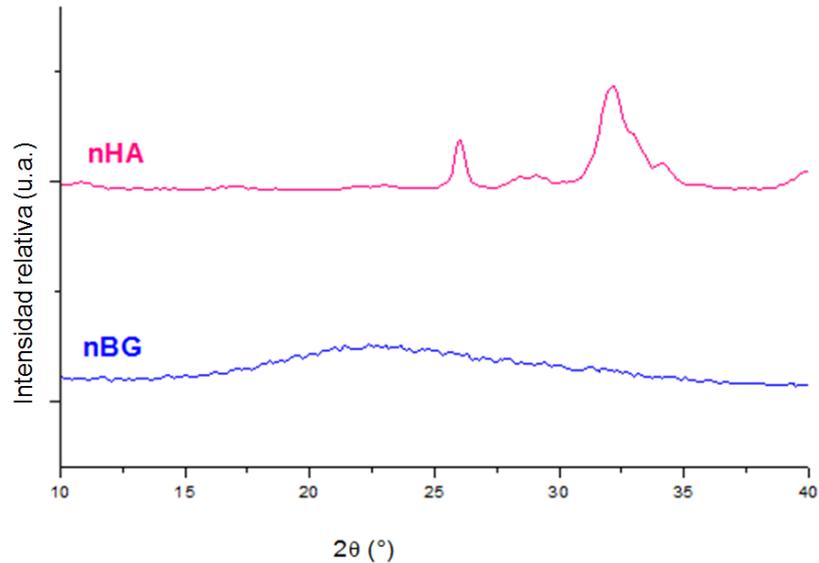


Figura 7: Patrones DRX de nHA y nBG.

2. Selección de bionanocompuestos

Se sintetizaron bionanocompuestos compuestos por 25% de nanopartículas cerámicas de HA y BG, y matrices poliméricas con 50 % (AG50) y 75% (AG75) de gelatina, además de compósitos a base de gelatina pura (GEL). La selección de la composición de matriz polimérica más apropiada para la preparación de los bionanocompuestos se realizó en función de las características de la estructura porosa observada por microscopia SEM.

Las imágenes SEM de los nanocompuestos cargados con BG y con distinta composición de matriz polimérica se presentan en la **Figura 8**. Se puede observar que bionanocompuestos AG50 poseen poros heterogéneos tanto circulares como alargados, interconectados entre sí mientras que a medida que el porcentaje de gelatina aumenta (matrices AG75 y GEL), estos se vuelven más pequeños e irregulares, y las paredes presentes entre ellos se observan más delgadas. Además, no se observan interconexiones evidentes entre ellos. En todas las matrices existen poros de tamaño pequeño (20-60 μm) y poros de mayor tamaño

(100-350 μm). Sin embargo, el tamaño es menor en matrices AG75 y GEL, con poros comprendidos entre 25-200 μm , comparado con matrices AG50, con un rango comprendido entre 30-280 μm . Como resultado del análisis SEM de las matrices poliméricas, se escogió la matriz AG50. Bionanocompuestos preparados a partir de esta blenda polimérica muestran las características más adecuadas para su uso en ingeniería tisular, debido a que presentan una estructura compuesta de poros aparentemente interconectados.

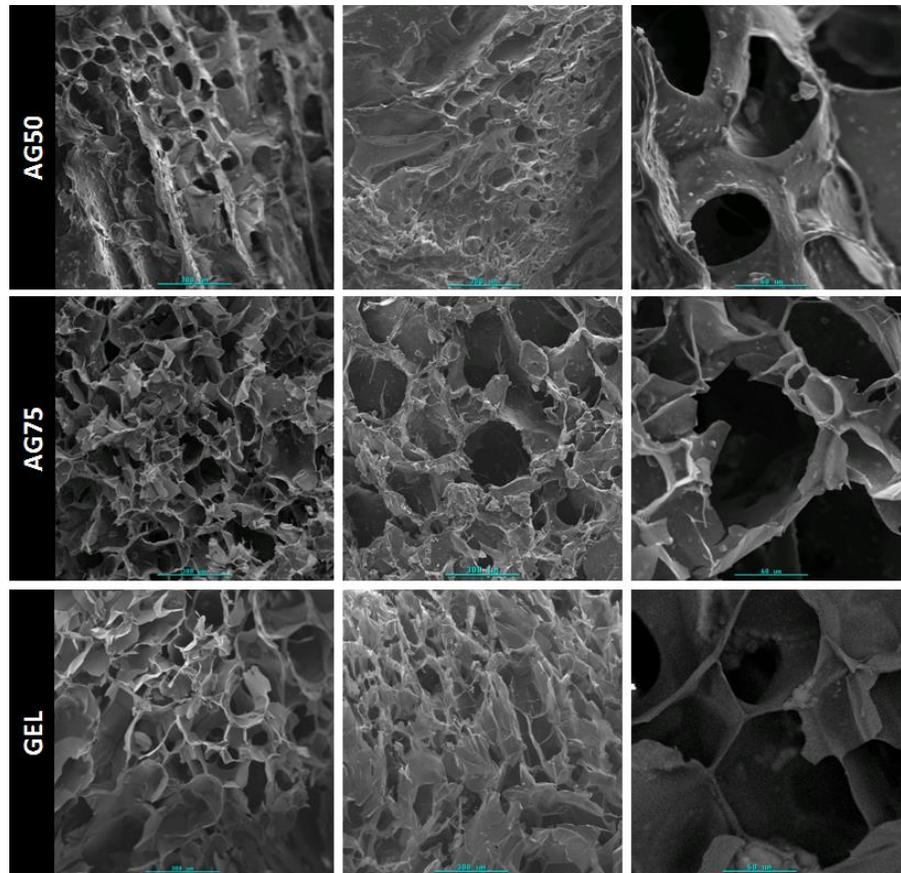


Figura 8: Microscopia SEM de bionanocompuestos 25%BG/AG50, 25%BG/ AG75 y 25%BG/GEL

3. Caracterización de Bionanocompuestos

Bionanocompuestos compuestos por la blenda AG50, puros y dopados con 25% de nanopartículas de HA y BG en relación a la masa total del biopolímero fueron caracterizados mediante microscopía SEM, análisis DRX y espectroscopia FTIR-ATR.

En la

Figura 9, se muestra el análisis DRX de los bionanocompuestos. El patrón obtenido en AG50 y 25%BG/AG50 está de acuerdo con la naturaleza amorfa de la matriz polimérica y de las partículas de BG. Sin embargo, el patrón DRX del bionanocompuesto a base de HA presenta peaks de difracción característicos de las partículas cristalinas de hidroxiapatita contenidas en la matriz, a 31.8° y 25.9° (2θ) (Hughes y cols., 1989).

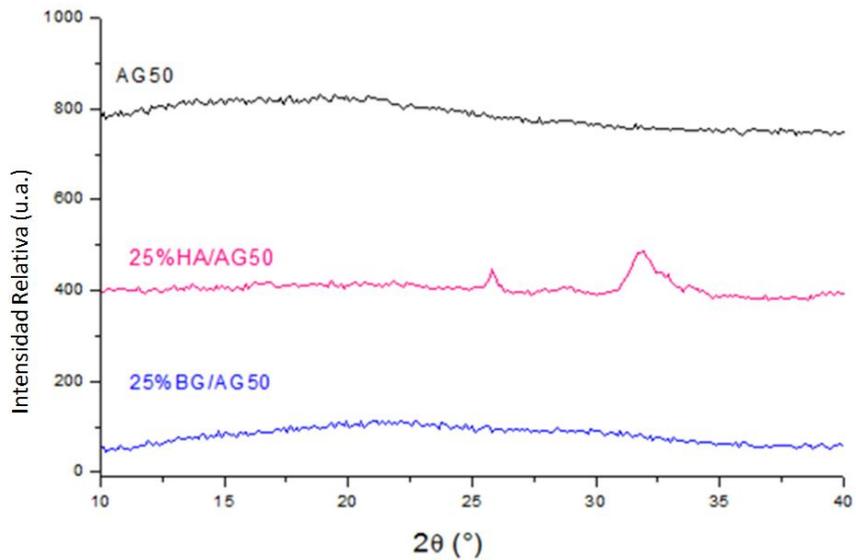


Figura 9: Patrón DRX del material polimérico puro AG50, y de los bionanocompuestos 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50.

La espectroscopia infrarrojo (FTIR) permite analizar la estructura química de una sustancia. En la **Figura 10** se presentan los espectros FTIR-ATR de los bionanocompuestos estudiados.

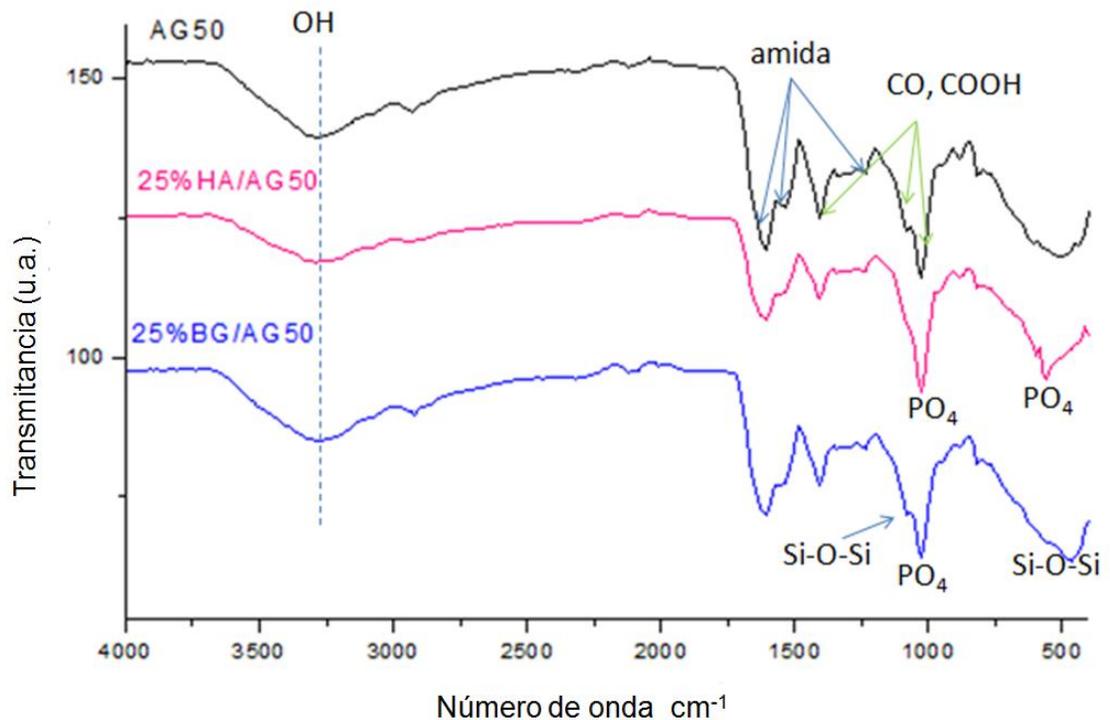


Figura 10: Espectros FTIR-ATR de AG50, 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50.

Se puede observar la combinación de bandas vibratorias de ambos biopolímeros utilizados en la blenda AG50 (AG y GEL). La matriz polimérica AG presenta bandas características de alginato en las regiones 3240 cm^{-1} (grupos OH), $1400\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$ (grupos -COOH) y $1000\text{--}1240\text{ cm}^{-1}$ (grupos CO). Mientras que la estructura de la gelatina, presenta las bandas características del enlace amida (-CONH-) ubicadas a 1650 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} y 1250 cm^{-1} . En particular, bandas en la región 1000 , 1125 , 1240 cm^{-1} , confirman la presencia de ácido glucurónico, manurónico y o-acetil éster, que se caracterizan por ser los bloques que constituyen el ácido algínico (Kazy y cols., 2002). Mediante este análisis se confirma además la incorporación del relleno inorgánico (HA, BG) a la matriz orgánica del material, a través de la combinación de bandas características de la estructura de cada nanopartícula en los espectros correspondientes. Para

25%HA/AG50, se observaron bandas vibratorias acentuadas, típicas de hidroxiapatita, entre $960-1100\text{ cm}^{-1}$ y $610-567\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a distintos modos vibratorios del grupo fosfato (PO_4). En relación a nanocompuestos de nBG, se observaron las bandas correspondientes al enlace Si-O-Si presente en la estructura química del vidrio bioactivo a 467 y 1200 cm^{-1} (Heinemann y cols., 2007). Además, nBG muestra en su estructura bandas vibratorias correspondientes a grupos fosfato a 1070 cm^{-1} que aparecen solapadas con las bandas de alginato (Xia y Chang, 2007; Ehrlich y cols., 2010; Sowmya y cols., 2011).

La estructura porosa de los andamios nanocompuestos fue analizada mediante microscopía SEM (**Figura 11**).

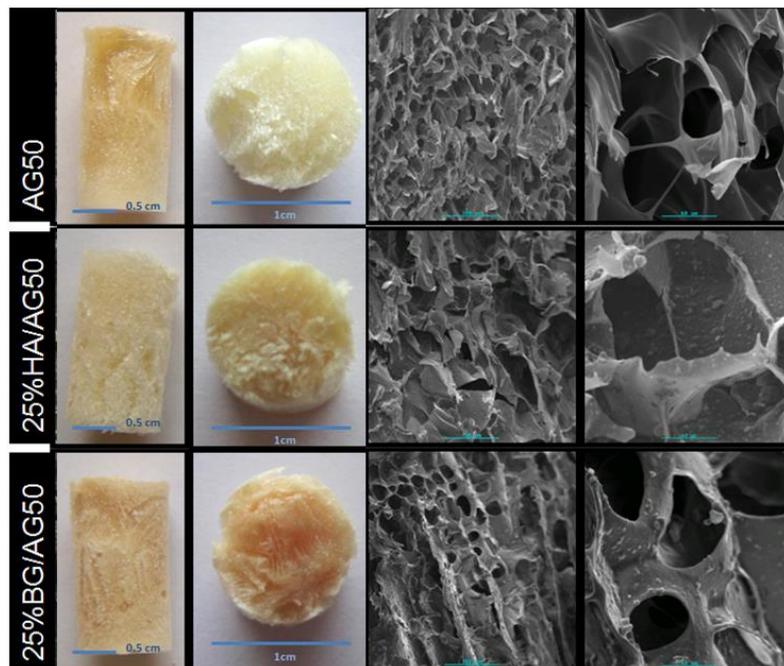


Figura 11: Microscopía SEM y estructura macroscópica de AG50, 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50.

Se observa que la matriz pura (AG50) presentó poros de menor tamaño, comprendidos entre los $20-90\text{ }\mu\text{m}$, más homogéneos que los poros de bionanocompuestos de HA y BG, cuyo tamaño oscila entre los 60 y $350\text{ }\mu\text{m}$, con

una morfología más alargada e irregular. Además los poros de 25%BG/AG50 se observan que presentan algún grado de interconexión. La pared de los poros fue además más delgada en andamios puros. La superficie de AG50 es más lisa, en comparación a la de bionanocompuestos cargados con nanopartículas, en los cuales se observa más irregular. Las nanopartículas observadas presentaron una distribución aleatoria en la matriz polimérica, observándose como pequeños cristales incrustados en ella, algunos de mayor tamaño, debido a la posible aglomeración de partículas durante la preparación del biomaterial.

4. Ensayos de bioactividad *in vitro* en SBF

La bioactividad de los biomateriales sintetizados fue evaluada en SBF durante 7 días. La habilidad de los bionanocompuestos para inducir la formación de apatita tipo ósea fue analizada por DRX, SEM/EDX y FTIR-ATR. El patrón DRX de cada biomaterial luego de diferentes periodos de inmersión en SBF se puede observar en la **Figura 12**. La formación de apatita en los biomateriales fue evaluada por la presencia e intensidad relativa del peak más característico de la fase apatita a $31,8^\circ$, correspondiente a la reflexión 211 del cristal de apatita (JCPD250166). Se observa que a medida que aumenta el tiempo de inmersión, aumenta gradualmente el grado de cristalización de la apatita formada en todos los materiales analizados, registrándose las mayores intensidades de los peaks de apatita para todas las muestras al tercer día de inmersión en SBF. Al realizar la comparación entre cada biomaterial, los bionanocompuestos 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50 mostraron peaks de difracción más intensos que en el control (matriz pura AG50). En particular, el bionanocompuesto cargado con BG (25%BG/AG50) registró los peaks de apatita más intensos para todos los tiempos medidos y a tiempos tempranos de inmersión en SBF, induciendo de esta forma una formación más rápida y más abundante de apatita en el medio fisiológico.

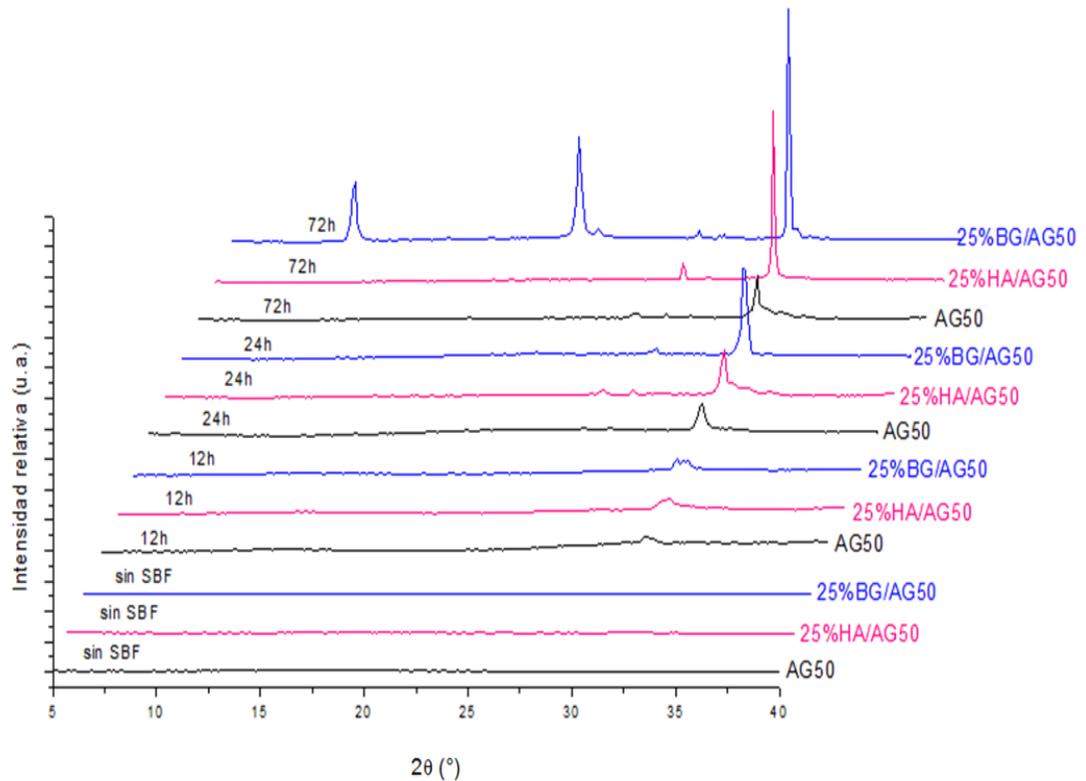


Figura 12: Patrón DRX de bionanocompuestos después de diferentes tiempos de inmersión en SBF.

La formación de apatita fue constatada además mediante análisis FTIR-ATR (**Figura 13**). En el análisis FTIR se observa la presencia de las bandas características del biomaterial a $960\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ y $610\text{-}567\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a distintos modos vibratorios del grupo fosfato (PO_4) de la apatita cristalina. A medida que se va depositando una capa de apatita en la superficie de los materiales, estas bandas se van intensificando. En relación al ensayo, a medida que aumentó el tiempo de incubación, se intensificaron las bandas en los 3 materiales evaluados, alcanzándose valores mayores en los bionanocompuestos que en el control. Las bandas observadas en 25%HA/AG50 fueron mayores que las de 25%BG/AG50 antes de la inmersión en SBF y a las 12 horas; sin embargo, a las 24 y 72 hrs los espectros resultaron tener bandas de similar intensidad. Estos resultados concuerdan con lo obtenido mediante análisis de DRX.

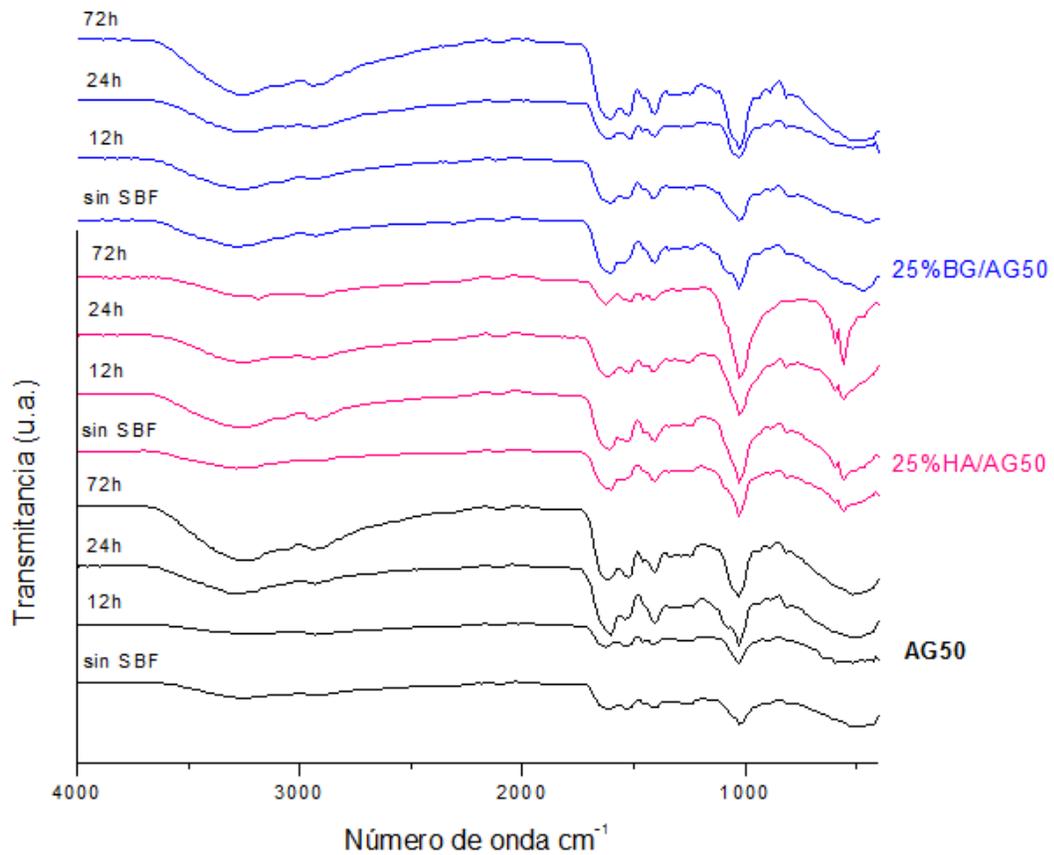


Figura 13: Espectro FTIR de bionanocompuestos después de distintos tiempos de inmersión en SBF.

La formación de apatita tipo ósea fue también confirmada mediante observaciones de microscopía SEM-EDX. Las imágenes obtenidas (**Figura 14**) muestran la formación de depósitos de apatita en la superficie de la matriz pura AG50 y de los correspondientes bionanocompuestos a los distintos tiempos de inmersión en SBF.

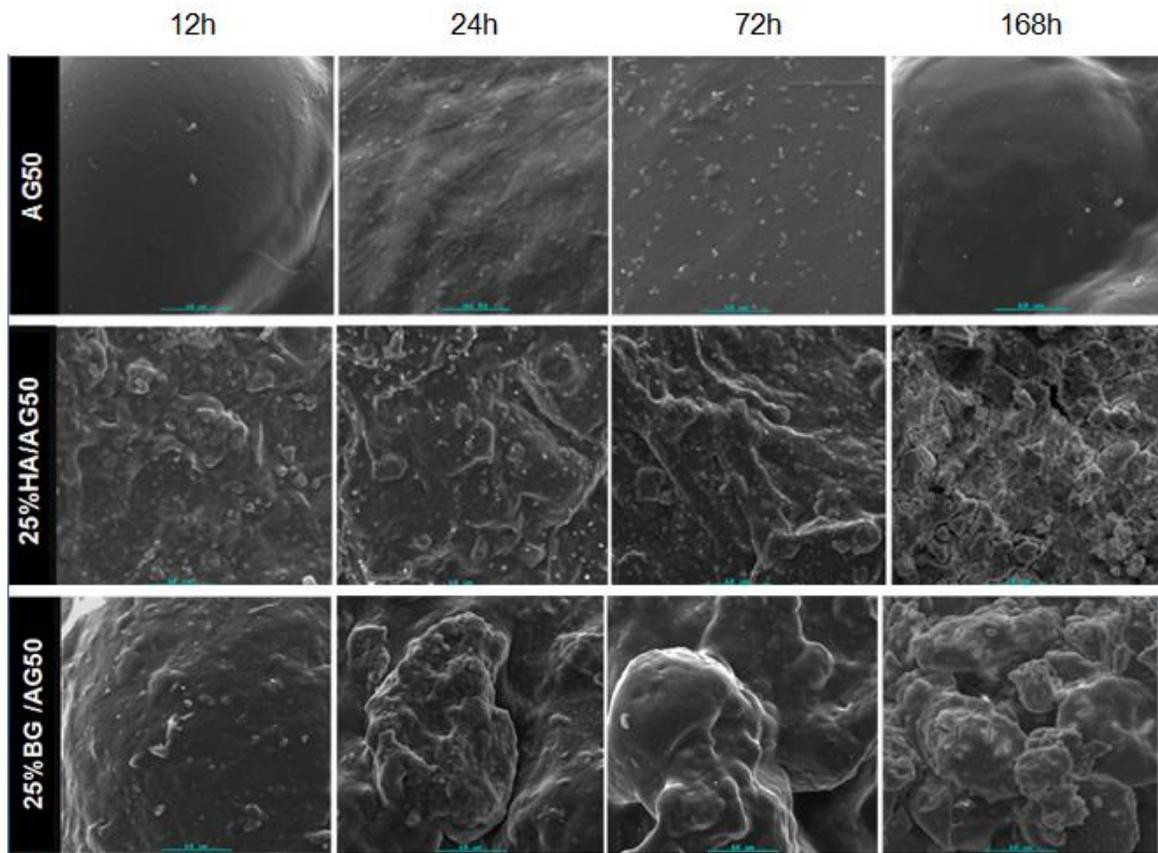


Figura 14: Imágenes SEM representativas de matriz pura y bionanocompuestos después de distintos tiempos de inmersión en SBF.

Se puede observar que la formación de depósitos de apatita fue mayor a medida que aumentó el tiempo de inmersión en todos los materiales, encontrándose que el grado de mineralización es considerablemente mayor en los bionanocompuestos. Particularmente, bionanocompuestos 25%BG/AG50 indujeron la formación de una capa de apatita más continua, densa y constituida por un mayor número de cristales, que además presentaron mayor tamaño que aquellos formados sobre 25%HA/AG50. En la matriz pura, se observó una discreta formación de apatita, detectándose sólo cristales aislados y pequeños.

El análisis elemental EDX asociado a la observación por microscopía SEM (**Figura 15**), permite conocer la cantidad presente de cada elemento químico en el material estudiado.

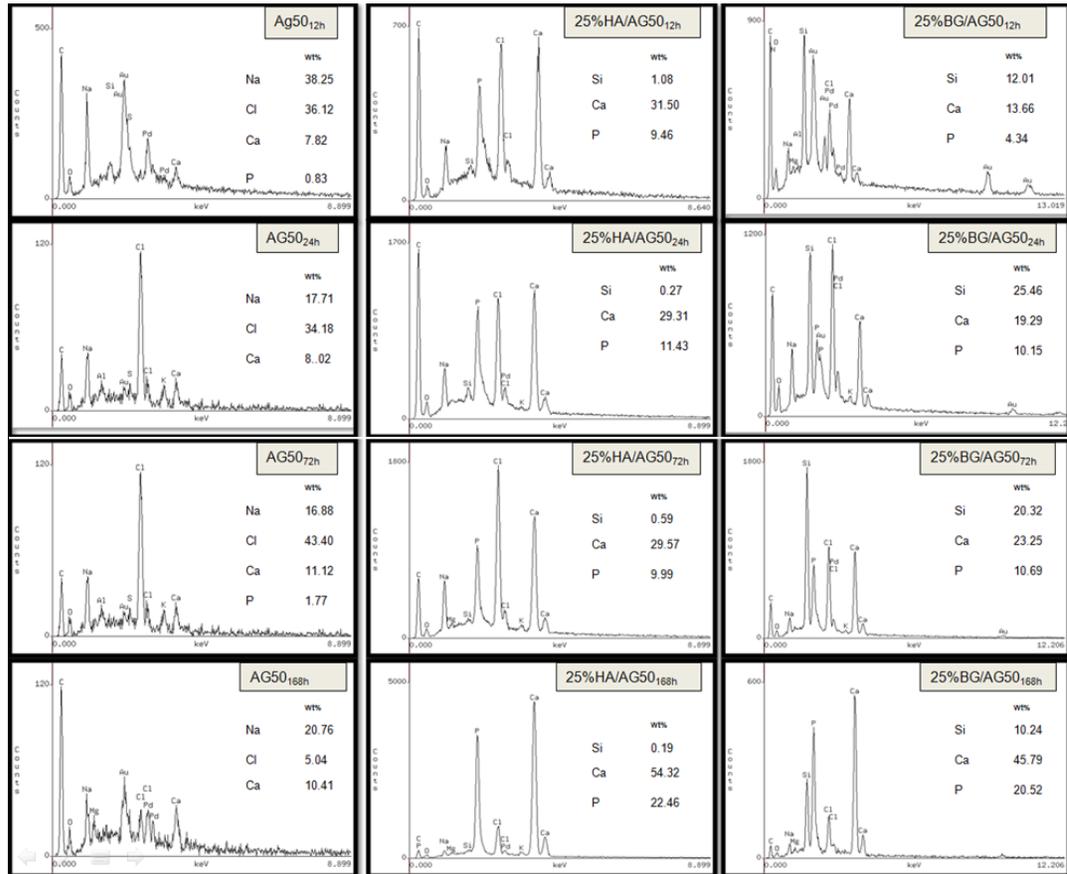


Figura 15: Análisis elemental EDX de las superficies de los bionanocompuestos después de distintos tiempos de inmersión en SBF.

La composición química de la apatita formada sobre los biomateriales, se evaluó de acuerdo al porcentaje en peso de calcio y fosfato (Ca, P) (Wt%). En general, los niveles de calcio y fosfato aumentaron con el tiempo. En el andamio de polímero puro, los valores medidos fueron menores para todos los tiempos en relación a los bionanocompuestos. Los valores iniciales y finales de calcio y fosfato en la muestra 25%HA/AG50, fueron más altos que en 25%BG/AG50.

El total de Ca y P (Ca+P) y la razón molar (Ca/P) de la fase mineral formada sobre la superficie de los bionanocompósitos se resumen en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Contenidos de Ca y P, suma de ambos (Ca+P) y razón molar (Ca/P) para apatita tipo ósea formada sobre AG50, 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50 determinados mediante microanálisis elemental EDX.

Andamio	Tiempo	Ca (%masa)	P (%masa)	Ca+P (%masa)	Razón molar Ca/P
AG50	12h	7.82	0.083	7.9	72.80
	24h	8.02	0	8.0	
	72h	11.12	1.77	12.9	4.86
	168h	10.41	0	10.4	
25%HA/AG50	12h	31.5	9.46	40.9	2.57
	24h	29.31	11.43	40.7	1.98
	72h	29.57	9.99	39.6	2.29
	168h	54.32	22.46	76.8	1.87
25%BG/AG50	12h	13.66	4.34	18.0	2.43
	24h	19.29	10.15	29.4	1.47
	72h	23.25	10.69	33.9	1.68
	168h	45.79	20.52	66.3	1.72

A pesar de que los valores de (Ca+P) fueron más altos en 25%HA/AG50 que en 25%BG/AG50, *el aumento* en el valor de (Ca + P) en función del tiempo fue mayor en bionanocompósitos de BG. Esto indica mayor formación de Ca y P, ya que en el caso del bionanocompósito 25%HA/AG50 los altos contenidos de Ca y P están dados por la composición química inicial de las nanopartículas de HA, más que por la formación de apatita formada producto de la inmersión en SBF. El aumento en el contenido (Ca+P) entre 12 hrs y 168 hrs fue para 25%HA/AG50 de 35.8, mientras que para 25%BG/AG50 fue de 48.3.

Por otro lado, 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 teórico de 1.667 (Hughes y cols., 1989).

Valores de Ca/P cercanos a la de una hidroxiapatita estequiométrica fueron observados en bionanocompuestos de HA a las 168 h (Ca/P= 1.87), mientras que para el compuesto de BG este valor se produjo a solo 72 horas de inmersión en SBF (Ca/P= 1.68). Estos valores indican que la capa de apatita formada en estos bionanocompuestos presentó una estructura muy cercana a la esperada teóricamente para el biomineral.

5. Adsorción de proteínas

Las proteínas juegan un rol importante en la adhesión de las células encargadas de la formación de hueso u osteoblastos, durante el proceso de oseointegración. La capacidad de adsorción de proteínas de los biomateriales se evaluó utilizando albúmina y fibrinógeno como proteínas modelos. Los resultados de la capacidad de adsorción de proteínas se muestran en la **Figura 16**.

Los materiales bionanocompuestos mostraron mayor adsorción de proteínas con respecto a la matriz pura (AG50). En relación a la albúmina, la adsorción fue significativamente mayor en el bionanocompuesto 25%HA/AG50, al compararla con la matriz pura ($p < 0.05$). En relación a la adsorción de fibrinógeno hubo diferencia significativa entre ambas matrices ($p < 0.05$), donde la adsorción en la matriz pura fue mayor que en 25%HA/AG50. La adsorción de albúmina fue significativamente mayor en 25%BG/AG50 al compararlo con AG50 ($p < 0.05$), lo mismo ocurrió con la adsorción de fibrinógeno ($p < 0.05$). Al comparar los andamios bionanocompuestos de HA y BG, la adsorción de albúmina fue significativamente mayor en 25%HA/AG50 ($p < 0.05$) y la de fibrinógeno significativamente mayor en 25%BG/AG50 ($p < 0.05$). La baja adsorción presentada por la matriz pura también fue acompañada de alta degradación del biopolímero observada en la solución de proteínas.

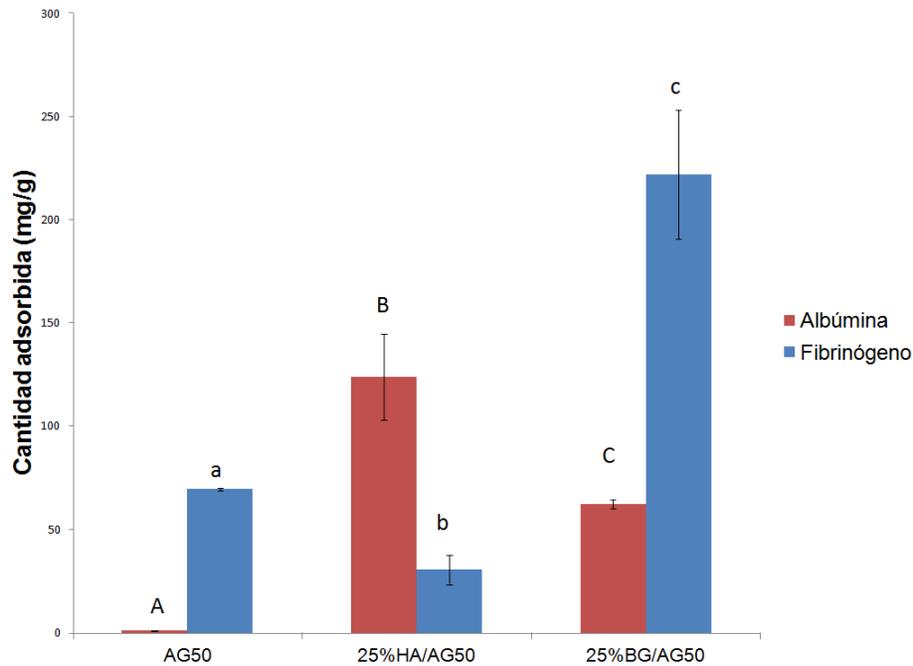


Figura 16: Adsorción de proteínas albúmina y fibrinógeno en bionanocompuestos 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50 y matriz pura (AG50), expresada en cantidad de proteínas adsorbidas. Las barras representan el promedio de 3 muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Los valores de las barras con letras distintas corresponden a valores con diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

6. Ensayos de degradación *in vitro*

La degradación *in vitro* de los bionanocompuestos AG50, 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50 fue medida en función del porcentaje de pérdida de peso en el tiempo. Los resultados se muestran en la **Figura 17**.

Para los tres biomateriales se observó un patrón de pérdida de peso que aumentó gradualmente en el tiempo, con un rango comprendido entre 9-10% aproximadamente en el día 1, hasta 18-21% en el día 7. Al realizar una comparación de los valores obtenidos por cada muestra en cada tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre AG50 y

25%HA/AG50 en ninguno de los días ($p>0.05$). Al comparar AG50 con 25%BG/AG50, la degradación del andamio de BG fue significativamente mayor en los días 3, 5 y 7 ($p<0.05$). Al comparar 25%HA/AG50 con 25%BG/AG50, hubo diferencias significativas ($p<0.05$) en los días 3, 5 y 7, obteniéndose valores de degradación mayores en BG.

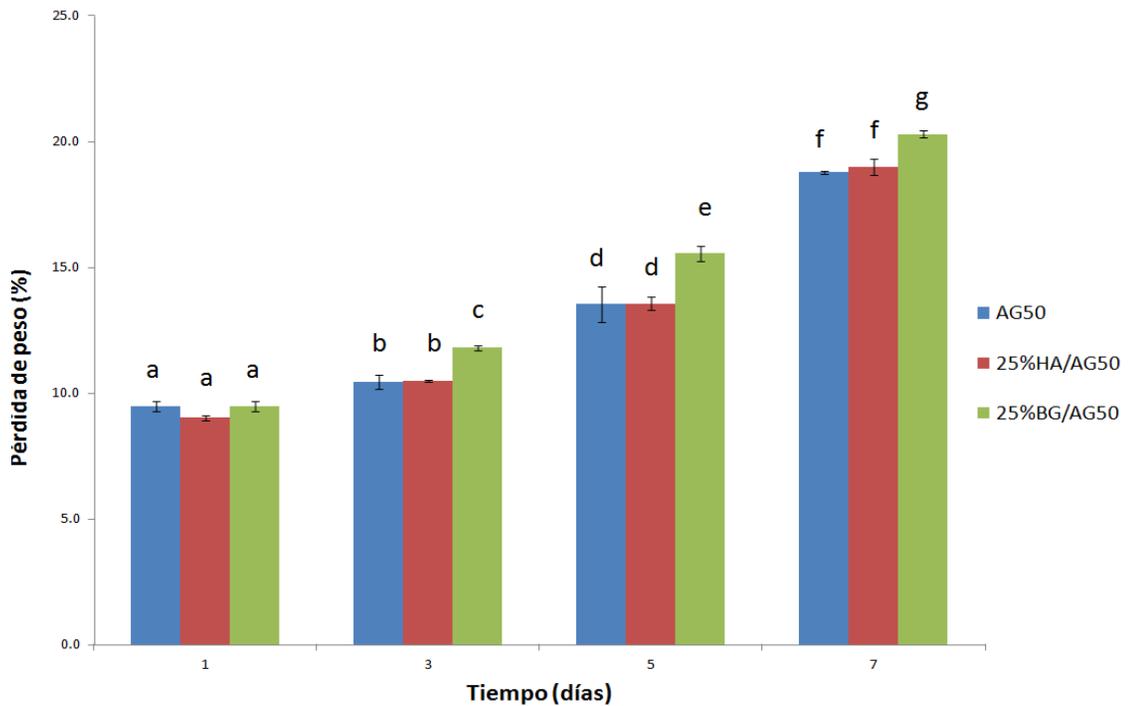


Figura 17: Degradación en medio de cultivo celular expresada en % pérdida de peso de bionanocompuestos 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50, y matriz pura (AG50), por 7 días. Las barras representan el promedio de 3 muestras dependientes en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Los valores de las barras con letras distintas corresponden a valores con diferencias significativas entre ellos ($p<0.05$).

7. Ensayo de MTS

La proliferación celular fue evaluada preliminarmente en DPCSs cultivadas sobre andamios bionanocompuestos y matrices puras, a partir de la absorbancia del compuesto MTS, al cuarto día de incubación. Los resultados se muestran en la **Figura 18**. En relación a todos los andamios estudiados, se observan niveles de absorbancia que indican que existe proliferación celular en presencia del material, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

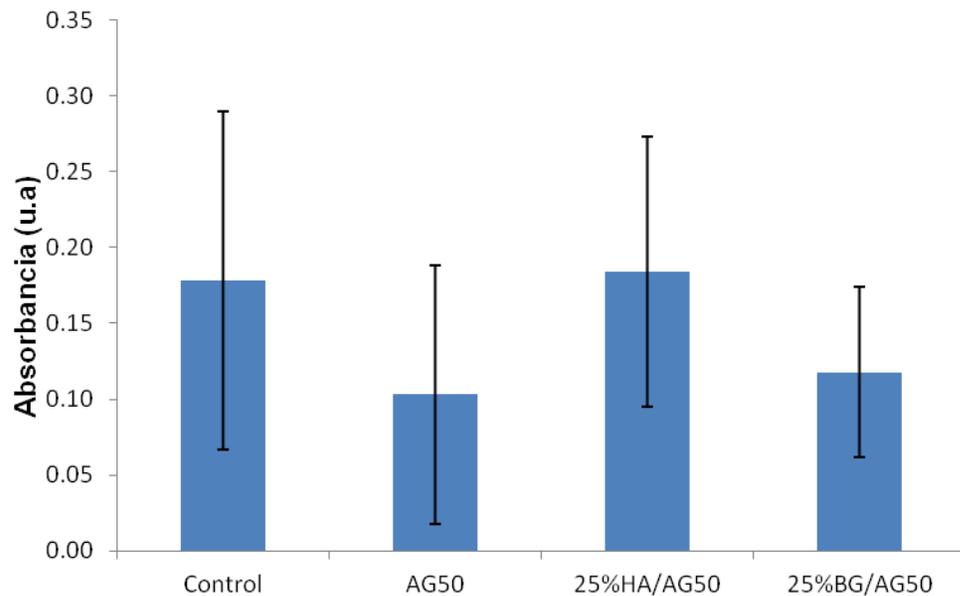


Figura 18: Absorbancia de MTS en bionanocompuestos 25%HA/AG50, 25%BG/AG50, matriz pura (AG50) y control (celulas sin presencia del material). Las barras representan el promedio de 3 muestras en triplicado. Los corchetes simbolizan la desviación estándar.

DISCUSION

Nanopartículas de hidroxiapatita y vidrio bioactivo fueron sintetizadas mediante el método sol-gel. Al analizar su nanoestructura mediante microscopía TEM y patrón DRX, se observó que nanopartículas de BG poseían una estructura amorfa, mientras que nanopartículas de HA una estructura más cristalina, aunque en menor grado que HA convencional de tamaño micrométrico. La presencia de una estructura menos cristalina indicaría partículas más activas en procesos fisiológicos (Kim y cols., 2000).

En relación a los bionanocompuestos sintetizados, se optó por seguir el estudio con la blenda polimérica AG50, con 25% de contenido de nanopartículas (AG50, 25%HA/AG50, 25%BGAG50). El contenido de nanopartículas fue seleccionado a partir de evidencia previa obtenida por un trabajo anterior perteneciente al mismo laboratorio (Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012), en el cual se indica que bionanocompuestos con 25% de nanopartículas presentan en general mejores propiedades de bioactividad. Esto último a pesar de que nanocompuestos con 35% de contenido de HA y BG obtuvieron mayor grado de mineralización en pruebas de bioactividad *in vitro* en SBF, pero no poseían la porosidad deseada. La matriz polimérica basada en los distintos biopolímeros (AG50, AG75, GEL) fue seleccionada mediante microscopía SEM, a través de la observación de su arquitectura porosa tridimensional. La porosidad, tamaño, morfología e interconexión de los poros son parámetros críticos para los andamios. Una porosidad adecuada es esencial para proveer a las células un microambiente optimizado para permitir la proliferación celular, vascularización y difusión de nutrientes entre ellas. Las imágenes obtenidas mostraron que a medida que el porcentaje de gelatina aumentaba en los bionanocompuestos (AG75, GEL), los poros se tornaban más irregulares y pequeños, y las paredes entre ellos más delgadas. No obstante, la blenda AG50, cuyo contenido de gelatina es menor, presentó poros interconectados entre sí, de mayor tamaño y de formas tanto esféricas como alargadas, siendo más adecuados para la formación de un nuevo

tejido. En general, poros interconectados con un diámetro (o ancho) de 100 micrones o más y porosidad mayor a 50% son considerados, en la mayoría de los casos, requerimientos mínimos para permitir el crecimiento y función tisular (Rodríguez y cols., 2002; Zhang y cols., 2003). También se observaron poros de menor tamaño (20-40 μm) en los todos los andamios, los cuales aportarían en funciones de colonización fibrovascular y transporte de nutrientes (Armentano y cols., 2010), y tendrían una rol importante en la osteoinducción (Yuan y cols., 1999). El tamaño de los poros observados en la matriz pura AG50 está comprendido en este rango, por lo que bionanocompósitos basados en la mezcla de alginato y gelatina (AG50) poseen características compatibles para aplicaciones de ingeniería tisular.

Resultados similares se han obtenido en otras publicaciones, en las cuales se ha visto que el tamaño de poro y porosidad se redujeron al incrementar la concentración de gelatina (Wu y cols., 2010). La concentración de gelatina tendría un efecto en la porosidad de la matriz, afectando el crecimiento de cristales de hielo en la etapa de congelamiento. Este fenómeno se podría explicar debido a que en una solución de GEL, las moléculas de agua son separadas por las macromoléculas de GEL, lo que no permite a las moléculas de agua concentrarse y organizarse durante el congelamiento. Al aumentar la concentración de GEL, la viscosidad de la solución de gelatina aumenta, especialmente en la presencia de agente entrecruzante, entonces el solvente (agua) tiene mayor dificultad para formar cristales de hielo que se convertirán tras el proceso de liofilización en poros, y estos en consecuencia serán más pequeños y delgados, su estructura será más irregular y las paredes de los poros se verán más delgadas (Wu y cols., 2010).

Al ser caracterizados AG50, 25%HA/AG50 y 25%BG/AG50 con microscopia SEM, se observó que la matriz pura presentó poros de menor tamaño y más homogéneos que los bionanocompósitos. Este comportamiento ya ha sido observado en otros estudios (Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012), y es atribuido

a que partículas de HA y BG podrían modificar el mecanismo de formación de poros a partir de los cristales de hielo. Adicionalmente, se ha encontrado que diferentes tipos y tamaños de nanopartículas pueden inducir inestabilidad en el frente de congelamiento y que su energía superficial puede causar distintos comportamientos de segregación (Rohatgi y Adams, 1967; Lee y cols., 2010) e inducir distintas estructuras de hielo (Ehre y cols., 2010). Por otra parte, existe evidencia donde se señala que el método de liofilización a partir de soluciones acuosas resulta siempre en una destrucción parcial de la red polimérica al formarse los cristales de hielo, y en consecuencia se obtienen andamios más suaves y con degradación más rápida (Dittrich y cols, 2007), por lo que el método de obtención de la matriz porosa podría afectar sus propiedades.

El control de la cristalización durante el proceso de biomineralización con moduladores de crecimiento orgánicos se ha convertido gradualmente en una poderosa estrategia para el diseño de nuevos biomateriales para ingeniería tisular. El proceso de mineralización del hueso está controlado por colágeno, el cual es una proteína que contiene un grupo iónico que interactúa con HA y un grupo dispersivo que estabiliza a HA en el medio. La gelatina, al provenir del colágeno podría inducir biomineralización biomimética en los bionanocompuestos, ya que a pesar de ser una proteína de colágeno desnaturalizada posee una cantidad considerable de bandas amida a 1650 cm^{-1} y 1550 cm^{-1} , sugiriendo que su estructura aun mantendría en un alto grado la estructura de alfa-hélice del colágeno (Payne y Veis, 1988). La matriz de gelatina juega además un rol en alinear cristales de HA, de forma que crecen alrededor del eje "c", resultando en una forma elongada. La cristalización heterogénea de HA en las macromoléculas de gelatina puede imitar la cristalización de minerales en tejidos duros (Kim HW, 2005). Entonces, la incorporación de gelatina a la matriz polimérica de alginato, además de mejorar propiedades mecánicas, podría tener un rol en la biomineralización al constituir un material para reemplazo de tejidos y poseer afinidad natural por el biomaterial que forma parte de la matriz natural sobre la cual mineraliza el hueso. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en

pruebas de bioactividad, las nanopartículas tendrían mayor influencia que la composición de la matriz.

Se ha sugerido que la bioactividad *in vitro* es un índice del potencial bioactivo de un material in vivo (Ducheyne, 1987). Para evaluar la bioactividad *in vitro* del biomaterial, se realizaron ensayos de bioactividad en SBF y de adsorción de proteínas. La cristalización de la fase de apatita en los biomateriales depende fuertemente de la concentración iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} del fluido que los rodea (Daculsi y cols., 1989). De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de SBF, bionanocompósitos mostraron mejores propiedades bioactivas que la matriz pura, ya que indujeron mayor formación de apatita sobre su superficie, a pesar de que estuvieron en contacto con la misma solución. Por lo tanto, la presencia de nanopartículas cerámicas es relevante en la fabricación de andamios de ingeniería tisular, ya que mejora significativamente la bioactividad del material debido a los productos que genera la disolución de las bionanocerámicas. Además se ha visto en otros estudios que su incorporación a las matrices poliméricas refuerza las propiedades mecánicas (Rezwan y cols., 2006; Ehrlich y cols., 2008).

Bionanocompósitos compuestos por BG mostraron mayor formación de apatita en relación a HA en todos los análisis realizados (DRX, FTIR-ATR, SEM-EDX), lo que se traduce en mejores propiedades bioactivas para este andamio. En el ensayo FTIR-ATR, se observaron bandas de infrarrojo mayores en 25%HA/AG50 que en 25%BG/AG50 en tiempos iniciales, debido a la presencia previa de nanopartículas de hidroxiapatita en el primero, no obstante, a los 3 días los valores se igualaron, lo que destaca las excelentes propiedades bioactivas de BG. El mismo fenómeno se observó a través de imágenes de microscopia SEM-EDX, que muestran mayor, tamaño y cantidad de cristales, y mayor cantidad de total de apatita formada, comparando valores iniciales (12 hrs) y finales (168 hrs) de los elementos calcio y fósforo ($\text{Ca}+\text{P}$) presentes en las muestras. En términos generales, la disolución de las partículas de BG produce iones libres, los cuales en combinación con iones de la solución de SBF precipitan y forman la fase de

apatita, mientras que nanopartículas de HA actúan como centros de nucleación para estos iones (presentes en SBF), induciendo la mineralización (Hench LL, 1998; Valenzuela, Covarrubias y cols., 2012). Las propiedades bioactivas de BG como por ejemplo, la rápida formación de la capa de apatita, son un resultado directo de su estructura atómica, compuesta por una red de puentes de oxígeno Si-O-Si, en la cual el sodio y calcio son modificadores de red que interrumpen su estructura a través de la formación de enlaces iónicos con el oxígeno, como Si-O^- ^+Na (Cormack, 2012). El fósforo está presente en la red como estabilizador de cargas, sin formar ningún enlace P-O-Si (Cerruti y cols., 2005; FitzGerald y cols., 2007). Por este motivo, el fósforo se encuentra aislado de la red de silicio y remueve al sodio y al calcio de sus roles como modificadores de red (Pedone y cols., 2010). Esto explica por qué el fosfato es perdido rápidamente al exponer el vidrio a ambientes acuosos (Sepulveda y cols., 2002). En contacto con el fluido corporal se produce la formación de una capa de hidroxiapatita carbonatada (HCA) sobre la superficie de BG, que se une firmemente con hueso y tejidos vivos. El mecanismo no está claro, sin embargo, se cree que a través de la disolución de iones Na^+ , Ca^{2+} y P presentes en la molécula de BG se produce la desintegración de la red de silicio, que es atacada por iones del medio, quedando Si libre que se deposita en la superficie del material y crea una capa rica en sílice, que atrae iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} . La hidroxiapatita al contrario, es una molécula termodinámicamente más estable a pH fisiológico (Hench LL, 1998; Dorozhkin, 2010), esto se traduce en una menor reactividad, razón por la cual presenta menor solubilidad, por lo que forma la capa de apatita carbonatada en forma más lenta que BG. Se conoce que la unión de hueso a la capa de apatita carbonatada involucra la adsorción de proteínas, incorporación de fibrillas de colágeno, unión de células osteogénicas, diferenciación celular y secreción de matriz extracelular, seguida de mineralización (Hench y Polak, 2002). Debido a su naturaleza bioactiva, bionanocompuestos compuestos por partículas de BG presentarían propiedades más favorables para el asentamiento de células y acelerar la

deposición de matriz extracelular ósea compuesta por apatita, lo cual resulta relevante para aplicaciones de regeneración ósea.

La bioactividad también fue evaluada a través de la adsorción de proteínas, las cuales cumplen un rol importante en el proceso de osteointegración, al facilitar la adhesión celular sobre la superficie del material. Se sabe que la adsorción de proteínas influencia la adhesión celular a través de la adsorción de moléculas clave para la adhesión (Binulal y cols., 2010; Sudheesh y cols., 2011). Los materiales bionanocompuestos mostraron mayor adsorción de proteínas con respecto a la matriz pura, lo cual podría explicarse debido a la exposición de las nanopartículas sobre la superficie del andamio, que aumentan los sitios de unión en la superficie del material y proveen mayor área superficial total para la interacción con proteínas, además de promover interacciones electrostáticas entre las proteínas y la superficie del material (Hunt y cols., 2010). El bionanocompuesto 25%BG/AG50, mostró mayor cantidad total de proteínas adsorbidas. La interacción entre las proteínas y BG es facilitada en forma primaria por enlaces de hidrógeno y enlaces electrostáticos. La formación de una capa rica en sílice a través del intercambio iónico provee un sustrato adecuado para la adsorción de proteínas (Lobel y Hench, 1996). Al producirse la disolución de BG en el medio, la superficie de silicio queda cargada negativamente al perderse iones Ca^{2+} y Na^+ presentes en la red. Las interacciones electrostáticas ocurren entre esta superficie de cargas negativas y grupos amino protonados (-NH) de las proteínas, las cuales son generalmente irreversibles. Otro factor que podría tener influencia es la porosidad e interconexión de poros presentes en la arquitectura de la matriz, que facilita la difusión de proteínas con menor impedimento hacia sitios al interior del andamio los cuales son menos accesibles si no hay interconexión. Imágenes de microscopia SEM muestran mejor interconexión en 25%BG/AG50. En particular, la muestra 25%BG/AG50 obtuvo mayor cantidad de fibrinógeno adherido en su superficie, mientras que 25%HA/AG50 mayor cantidad de albúmina. Ambas proteínas muestran carga negativa a pH fisiológico (7.4). El punto isoeléctrico es de 4,8 para la albúmina y entre 5,1-6,3 para fibrinógeno, por lo que cambios

menores del pH del medio inducirían mayores posibilidades de formar grupos amino-protonados en el fibrinógeno y en consecuencia mayor probabilidad de adsorción sobre el BG cargado negativamente. El mecanismo de adsorción del fibrinógeno puede deberse a un cambio conformacional en la proteína y además a la presencia de un dominio cargado positivamente en región alfa-C debido a la presencia de arginina y lisina (Jung y cols., 2003). La presencia de estos dominios positivos facilita la adsorción a superficies negativas, como por ejemplo BG. En el caso de la albúmina, la interacción parece ser causada por un cambio conformacional en la proteína, lo cual es esperado ya que la albumina posee una resistencia menor a la deformación (Marucco y cols., 2013). En la reparación de tejido óseo, se espera que un material que adsorbe mayor cantidad de proteínas, muestre mayor adhesión celular y en consecuencia mayor diferenciación osteogénica. Por lo tanto, bionanocompuestos de BG poseerían propiedades superiores para la adhesión celular que aquellos basados en HA o la matriz pura.

La degradación de la matriz pura observada durante este ensayo podría haber sido afectada por la acción del surfactante aniónico dodecil sulfato sobre la gelatina. Este compuesto se utiliza comúnmente en la electroforesis de proteínas y actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, provocando que las moléculas proteicas pierdan su conformación nativa (Azadi y cols., 2013). Al ser la gelatina una proteína proveniente del colágeno, podría verse afectada por la acción de esta sustancia que fue utilizada con el propósito de desorber las proteínas desde los compósitos.

Se considera un aspecto importante que el andamio sea capaz de degradarse en el tiempo en productos no tóxicos, que puedan ser fácilmente reabsorbidos o excretados por el cuerpo a una tasa compatible con la producción de nuevo tejido, permitiendo además la remodelación ósea en forma natural. La degradación observada durante 7 días de los bionanocompuestos de HA y la matriz pura no mostró diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos medidos. No obstante, andamios en base a BG mostraron mayor pérdida

de peso en el tiempo, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros andamios, a partir del tercer día. Esto podría deberse a la disolución preferencial del componente inorgánico de partículas de nBG durante la incubación en medio de cultivo (Hong et al., 2009), además de la modificación de la superficie y las propiedades de andamios compósitos, aumentando la hidrofiliidad y la absorción de agua de la matriz (Armentano y cols., 2010). En otros estudios se ha visto que Bioglass 45S5 se degrada más rápido que HA, y que la degradación se ha atribuido a la disolución mediada por la solución más que a acción enzimática o celular (Oonishi y cols., 2000; Wheeler y cols., 2000). En un material biocompósito, es relevante que los componentes o fases que forman parte del él se degraden gradualmente a una tasa adecuada para la aplicación para la cual se han diseñado, manteniendo idealmente sus propiedades mecánicas hasta que el nuevo tejido pueda soportar cargas. Sin embargo, en compósitos actuales de BG y polímeros, las dos fases se degradan a distintas tasas (Blaker y cols., 2010), lo que puede causar inestabilidad del andamio y migración de las partículas *in vivo*. Materiales compósitos basados en nanopartículas inorgánicas han mostrado degradación superior en relación al polímero puro (Armentano y cols., 2010). De acuerdo a los resultados, la matriz pura y el andamio 25%HA/AG50 se degradaron en forma similar, y con respecto a bionanocompósitos de BG, no hubo diferencias importantes entre los porcentajes de degradación, lo que sugiere que la presencia de las partículas no afecta las propiedades de degradación de la matriz polimérica.

Con respecto a los resultados obtenidos en ensayos preliminares de cultivo celular, la viabilidad celular se mantuvo en la presencia andamios bionanocompósitos y matrices puras después de cuatro días de incubación, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos y con respecto al control (células sin el material). Estos resultados preliminares indicarían que los materiales sintetizados son compatibles con células madre con potencial osteogénico, y que eventualmente, podrían promover su proliferación y posterior diferenciación al ser

implantados en un sitio afectado. Sin embargo, en este proyecto se realizarán posteriormente ensayos más prolongados de citocompatibilidad, así como de diferenciación osteogénica con el objeto de confirmar las propiedades de los bionanocompósitos en presencia de células madre. La citocompatibilidad es un aspecto fundamental, especialmente en la posibilidad de generar constructos bioactivos para regeneración ósea, es decir, la siembra de células en un andamio puro o compuesto, su cultivo *in vitro* y su implantación final en el cuerpo para producir la regeneración del tejido (Rabkin y Schoen, 2002).

Los esfuerzos en ingeniería tisular están orientados a crear materiales que se asemejen cada vez más a los tejidos humanos en su forma y estructura natural, y que además incorporen nuevas tecnologías que sean beneficiosas y optimicen procesos de reparación. En ingeniería de tejido óseo, el desarrollo de andamios compuestos por fases orgánicas e inorgánicas intenta simular las características naturales del hueso, al poseer una matriz con propiedades semejantes al colágeno y un relleno con propiedades bioactivas semejante a la hidroxiapatita, capaz de lograr el proceso de mineralización en el tiempo. Sin embargo, hasta la fecha, no existe ningún material que cumpla con todos los estándares, y el tejido por sí solo, aunque con muchas limitaciones, sigue siendo el gold estándar en aplicaciones biomédicas. Los polímeros biodegradables utilizados en este trabajo, se caracterizan por mostrar alta biocompatibilidad con células y tejidos, facilidad de manipulación y ser relativamente de bajo costo, no obstante, la resistencia mecánica y tasa de degradación no son las más adecuadas para ser utilizados como andamios de regeneración, razón por la cual se debe seguir indagando en la búsqueda de materiales poliméricos para el diseño de matrices de ingeniería tisular. Por otro lado, el uso de Bioglass® está adquiriendo cada vez más popularidad, ya que además de acelerar la mineralización de tejidos, es capaz de inducir la diferenciación celular a células osteogénicas y estimular la angiogénesis, entre otros. Se debe tener en consideración las múltiples ventajas que ofrece sintetizarlo a nivel nanométrico y continuar desarrollando biomateriales que lo

incorporen en su estructura. Los resultados del presente trabajo demuestran que la incorporación de nanopartículas biocerámicas a andamios poliméricos mejoran considerablemente las propiedades bioactivas de estos materiales, particularmente su capacidad para inducir la mineralización de apatita tipo ósea, y de adsorción de proteínas extracelulares. Este efecto podría tener consecuencias en el futuro diseño de biomateriales y constructos para el desarrollo de terapias de regeneración ósea mediante ingeniería de tejidos.

En el campo odontológico, es importante mantenerse actualizado de las nuevas tecnologías que se van introduciendo y tener una formación crítica con respecto a los materiales disponibles actualmente para el tratamiento de nuestros pacientes. El desarrollo de bionanocompuestos para ingeniería tisular ósea traería múltiples beneficios para especialidades como implantología y cirugía maxilofacial, y podría acelerar considerablemente los tiempos de reparación ósea, y mejorar al mismo tiempo la calidad de hueso neoformado.

CONCLUSIONES

- La preparación de andamios bionanocompuestos a partir de mezclas de biopolímeros ALG y GEL, permite generar una matriz polimérica con adecuada porosidad interconectada y con tamaños en el rango requerido para aplicaciones en ingeniería tisular ósea.
- La incorporación de nanopartículas biocerámicas en matrices de biopolímeros, permite obtener bionanocompuestos con mejoradas propiedades bioactivas in vitro en relación a un andamio polimérico puro, tanto en su capacidad de inducir la formación de apatita tipo ósea, como en su capacidad de adsorción de proteínas.
- Bionanocompuestos compuestos por nanopartículas de BG exhiben mejores propiedades bioactivas que aquellos preparados con nanopartículas de HA, debido a la naturaleza más reactiva de las partículas de BG, las cuales inducen una más rápida y completa formación de apatita en condiciones fisiológicas.
- Los nanocompuestos presentaron similar tasa de degradación en relación a la matriz pura, lo cual indica que la presencia de las nanopartículas no afecta significativamente la degradación de la matriz; manteniendo una tasa de degradación apropiada para la aplicación.
- Ensayos preliminares de MTS con células madre obtenidas de pulpa dental humana, indican que las células proliferan al ser incubadas con los bionanocompuestos, sugiriendo que estos materiales no alterarían la viabilidad celular.
- Los resultados de este estudio podrían tener consecuencias en el futuro diseño de biomateriales y constructos más eficientes, particularmente orientados a acelerar el proceso de regeneración ósea en terapias de ingeniería de tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aichelmann-Reidy M, Reynolds M. (2008). Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *Journal of Periodontology*, 79(3), 387–393.
- Al-Shamkhani, Duncan R. (1995). Radioiodination of alginate via covalently bound tyrosinamide allows for monitoring of its fate in vivo. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 10, 4–13.
- Aoki H. (1994). Medical Applications of Hydroxyapatite. *Ishiyaku EuroAmerica*. Tokyo.
- Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny JM. (2010). Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*, 95(11), 2126–2146.
- Ashman A. (2000). Postextraction ridge preservation using a synthetic alloplast. *Implant Dentistry*, 9(2), 168–176.
- Azadi G., Chauhan A., Tripathi A. (2013). Dilution of protein-surfactant complexes: a fluorescence study. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 22(9), 1258–1265.
- Balanda Maluenda C. (2013). Aislamiento de células madre a partir de tejidos dentales y su capacidad de diferenciación osteogénica. (Trabajo de investigación para optar al título de cirujano dentista). *Facultad de Odontología. Universidad de Chile*
- Bauer TW, Geesink RC, Zimmerman R, McMahon JT. (1991). Hydroxyapatite-coated femoral stems. Histological analysis of components retrieved at autopsy. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 73(10), 1439–1452.
- Bernhardt A, Despang F, Lode A, Demmler A, Hanke T, Gelinsky M. (2009). Proliferation and osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on alginate-gelatine-hydroxyapatite scaffolds with anisotropic pore structure. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(1), 54–62.
- Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. (2001). Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials*, 22(8), 763–768.

- Binulal N, Deepthy M, Selvamurugan N, Shalumon K, Suja S, Mony U, Nair S. (2010). Role of nanofibrous poly(caprolactone) scaffolds in human mesenchymal stem cell attachment and spreading for in vitro bone tissue engineering--response to osteogenic regulators. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2), 393–404.
- Blaker J, Bismarck A, Boccaccini A, Young, A, Nazhat S. (2010). Premature degradation of poly(alpha-hydroxyesters) during thermal processing of Bioglass-containing composites. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 756–762.
- Bohner M. (2000). Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*, 31 Suppl 4, 37–47.
- Bonino C, Krebs M, Saquing C, Jeong S, Shearer K, Alsberg E, Khan S.(2011). Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. *Carbohydrate Polymers*, 85(1), 111–119.
- 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.
- Brinker J, Scherer G. (1990). *Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing*. Gulf Professional Publishing.
- Burchardt 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.
- Carlisle E. (1981). Silicon: a requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcified Tissue International*, 33(1), 27–34.
- Cerruti M, Bianchi C, Bonino F., Damin A, Perardi A, Morterra C. (2005). Surface modifications of bioglass immersed in TRIS-buffered solution. A multitechnical spectroscopic study. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 109(30), 14496–14505.
- Chvapil M. (1977). Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*, 11(5), 721–741.
- Cormack A. (2012). The Structure of Bioactive Glasses and Their Surfaces. In J. R. Jones & A. G. Clare (Eds.), *Bio-Glasses* (pp. 65–74). John Wiley & Sons, Ltd. Retrieved

- Cortizo A, Molinuevo M, Barrio D, 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), 1171–1180.
- Costantino P, Friedman C.(1994). Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 27(5), 1037–1074.
- Currey J. (2001). Sacrificial bonds heal bone. *Nature*, 414(6865), 699.
- Daculsi G, LeGeros R, Mitre D. (1989). Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcified Tissue International*, 45(2), 95–103.
- Dar A, Shachar M, Leor J, Cohen S. (2002). Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(3), 305–312.
- Deville S, Saiz, E, Tomsia, A. (2006). Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(32), 5480–5489.
- Dieffenbach C, Dveksler G. (2003). *PCR Primer: A Laboratory Manual, Second Edition (2003) Paperback*. CSHL Press.
- Dong Z, Wang Q, Du, Y. (2006). Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. *Journal of Membrane Science*, 280(1–2), 37–44.
- Dorozhkin S. (2010). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31(7), 219–236.
- Ducheyne, P. (1987). Bioceramics: material characteristics versus in vivo behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21(A2 Suppl), 219–236.
- Ehre D, Lavert E, Lahav M, Lubomirsky I. (2010). Water Freezes Differently on Positively and Negatively Charged Surfaces of Pyroelectric Materials. *Science*, 327(5966), 672–675.
- Ehrlich H, Janussen D, Simon P, Bazhenov V, Shapkin N, Erler C, Vournakis, J. (2008). Nanostructural Organization of Naturally Occurring Composites—Part II: Silica-Chitin-Based Biocomposites. *Journal of Nanomaterials*, 2008.
- Ehrlich H, Simon P, Carrillo-Cabrera W, Bazhenov V, Botting J, Ilan M, Brunner E. (2010). Insights into Chemistry of Biological Materials: Newly Discovered Silica-Aragonite-Chitin Biocomposites in Demosponges. *Chemistry of Materials*, 22(4), 1462–1471.
- Fathi M, Hanifi A, Mortazavi V. (2008). Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology*, 202(1–3), 536–542.

- FitzGerald V, Pickup D, Greenspan D, Sarkar G, Fitzgerald J, Wetherall K, Newport R. (2007). A Neutron and X-Ray Diffraction Study of Bioglass® with Reverse Monte Carlo Modelling. *Advanced Functional Materials*, 17(18), 3746–3753.
- Ghosh S, Nandi S, Kundu B, Datta S, De D, Roy S, 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, Dinopoulos H, Tsiridis E. (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3, S20–27.
- Ginebra M, Traykova, T, Planell J.(2006). Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 113(2), 102–110.
- Gorustovich A, Roether J, Boccaccini A. (2010). Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(2), 199–207.
- Griffith L.(2002). Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 961, 83–95.
- Griffith L. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 48, 263–77.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Tanihara M, Kakimaru Y, Suzuki K. (2004). Development of alginate wound dressings linked with hybrid peptides derived from laminin and elastin. *Biomaterials*, 25(7-8), 1407–1414.
- Heinemann S, Ehrlich H, Knieb C, Hanke, T. (2007). Biomimetically inspired hybrid materials based on silicified collagen. *International Journal of Materials Research*, 98(7), 603–608.
- Hench LL. (1998). Bioceramics. *J Am Ceram Soc*, 81, 1705–28.
- Hench LL. (2009). Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(7), 1257–1265.
- Hench LL, Polak JM. (2002). Third-generation biomedical materials. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1014–1017.
- Hinoi E, Takarada T, Yoneda Y. (2004). Glutamate signaling system in bone. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(3), 215–220.

- Hong Z, Reis R, Mano J. (2009). Preparation and in vitro characterization of novel bioactive glass ceramic nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 88(2), 304–313.
- Hoppe A, Güldal N, Boccaccini A. (2011). A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*, 32(11), 2757–2774.
- Huang W, Day D, Kittiratanapiboon K, Rahaman M. (2006). Kinetics and mechanisms of the conversion of silicate (45S5), borate, and borosilicate glasses to hydroxyapatite in dilute phosphate solutions. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 17(7), 583–596.
- Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally S. (2005). In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(36), 7616–7627.
- Hughes J, Cameron M, Crowley K. (1989). Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *American Mineralogist*, 74(7-8), 870–876.
- Hulbert S, Young F, Mathews R, Klawitter J, Talbert C, Stelling, F.(1970). Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4(3), 433–456.
- Hunt N, Smith A, Gbureck U, Shelton R, Grover L. (2010). Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation. *Acta Biomaterialia*, 6(9), 3649–3656.
- Jones J. (2013). Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia*, 9(1), 4457–4486.
- Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gadius M, Bozec A, Wagner E, Guicheux J. (2009). Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24(11), 1856–1868.
- Jung S, Lim S, Albertorio F, Kim G, Gurau M, Yang R, Cremer P. (2003). The Vroman Effect: A Molecular Level Description of Fibrinogen Displacement. *Journal of the American Chemical Society*, 125(42), 12782–12786.
- Kaigler D, Mooney D. (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of Dental Education*, 65(5), 456–462.

- Kainulainen V, Sándor G, Caminiti M, Clokie C, Oikarinen K. (2002). Extraoral bone harvesting sites for oral and maxillofacial surgery. *Finnish Dental Journal*, 10-11, 570–576.
- Kainulainen V, Sándor G, Caminiti M, Clokie C, Oikarinen K. (2003). The Intraoral bone harvesting sites for osseous reconstruction in oral and maxillofacial surgery. *Oral Health*, 93(5), 10–24.
- Kazy S, Sar P, Singh S, Sen A, D'Souza S. (2002). Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and a copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), 583–588.
- Kim H, Kim Y, Park S, Rey C, Lee H, Glimcher M, Ko, J. (2000). Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials*, 21(11), 1129–1134.
- Kim H-M. (2003). Ceramic bioactivity and related biomimetic strategy. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 7, 289–299.
- 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), 4366–4373.
- Kim H.-W, Knowles J, Kim, H.-E. (2005). Porous scaffolds of gelatin-hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 74(2), 686–698.
- Kivrak N, Taş, A. (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.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka, S, Kitsugi T, Yamamuro, T. (1990). Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(6), 721–734.
- Kokubo Tadashi, 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), 2835–2845.
- Langer R, Vacanti J. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920–926.

- Lee M, Chung N, Lee J. (2010). Membranes with through-thickness porosity prepared by unidirectional freezing. *Polymer*, 51(26), 6258–6267.
- LeGeros R. (1993). Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clinical Materials*, 14(1), 65–88.
- Lobel K, Hench L L. (1996). In-vitro protein interactions with a bioactive gel-glass. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 7(1-2), 69–76.
- Marie P, Ammann P, Boivin G, Rey C. (2001). Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcified Tissue International*, 69(3), 121–129.
- Marolt D, Knezevic M, Novakovic G. (2010). Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), 10.
- Marucco A, Fenoglio I, Turci F, Fubini B. (2013). Interaction of fibrinogen and albumin with titanium dioxide nanoparticles of different crystalline phases. *Journal of Physics: Conference Series*, 429(1), 012014.
- Marx RE. (1994). Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinics in Plastic Surgery*, 21(3), 377–392.
- Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão F, Cooper L. (2008). Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials*, 29(28), 3822–3835.
- Mohan N, Nair P. (2005). Novel porous, polysaccharide scaffolds for tissue engineering applications. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*.
- Murugan R, Ramakrishna S. (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Comput Sci Technol*, (65), 2385–2406.
- Murugan R, Ramakrishna S. (2004). Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. *Biomaterials*, 25(15), 3073–3080.
- Murugan R, Rao K. (2003). Grafting of Glycidyl Methacrylate upon Coralline Hydroxyapatite in Conjugation with Demineralized Bone Matrix Using Redox Initiating System. *Macromolecular Research*, 11(1), 14–18.
- Nayar S, Bhuminathan S, Muthuvignesh J. (2011). Upsurge of Nanotechnology in Dentistry and Dental Implants. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry*, 1(5), 264–268.
- Nieto A, Areva S, Wilson T, Viitala R, Vallet-Regi M. (2009). Cell viability in a wet silica gel. *Acta Biomaterialia*, 5(9), 3478–3487.

- Novikova L, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth J, Novikov, L. (2006). Alginate hydrogel and matrigel as potential cell carriers for neurotransplantation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 77(2), 242–252.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. (1982). New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(4), 290–296.
- Oliveira A, Mano J, Reis R. (2003). *Curr Opin Solid State Mater Sc*, 7, 309.
- Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Kushitani S, Iwaki H. (1999). Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44(1), 31–43.
- Oonishi H, Hench LL, Wilson J, Sugihara F, Tsuji E, Matsuura M, Mizokawa S. (2000). Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(1), 37–46.
- Payne K, Veis A. (1988). Fourier transform ir spectroscopy of collagen and gelatin solutions: Deconvolution of the amide I band for conformational studies. *Biopolymers*, 27(11), 1749–1760.
- Pedone A, Charpentier T, Malavasi G, Menziani M. (2010). New Insights into the Atomic Structure of 45S5 Bioglass by Means of Solid-State NMR Spectroscopy and Accurate First-Principles Simulations. *Chemistry of Materials*, 22(19), 5644–5652.
- Rabkin E, Schoen F. (2002). Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 11(6), 305–317.
- Rahaman M, Day D, Bal B, Fu Q, Jung S, Bonewald, L. F., & Tomsia, A. P. (2011). Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2355–2373.
- Reffitt D, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung H, Evans B, Thompson R, Hampson G. (2003). Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone*, 32(2), 127–135.
- Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson I, Glimcher M. (1989). The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcified Tissue International*, 45(3), 157–164.

- Reynolds M, Aichelmann-Reidy M, Branch-Mays G. (2010). Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dental Clinics of North America*, 54(1), 55–71.
- Reynolds M, Aichelmann-Reidy M, Branch-Mays G, Gunsolley J.(2003). The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology*, 8(1), 227–265.
- Rezwan K, Chen Q, Blaker J, Boccaccini A. (2006). Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(18), 3413–3431.
- Rodríguez J, Ríos S, González M. (2002). Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(1), 92–100.
- Rohatgi PK, Adams C. (1967). Effect of freezing rates on dendritic solidification of ice from aqueous solutions. *Trans Metallurg Soc AIME*, (239), 1729–1736.
- Rosellini E, Cristallini C, Barbani N, Vozzi G, Giusti, P. (2009). Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 91(2), 447–453.
- Sàndor G, Lindholm T , Clokie C. (2003). Bone regeneration of the Cranio-maxillofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering. *Topics in Tissue Engineering, University of Oulu, Chapter 7*, 1–46.
- Sanosh KP, Chu M, Balakrishnan A, Lee Y, Kim TN, & Cho S. (2009). Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle. *Current Applied Physics*, 9, 1459–1462.
- Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim, J, Shi S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429), 149–155.
- Sepulveda P, Jones J, Hench LL. (2002). In vitro dissolution of melt-derived 45S5 and sol-gel derived 58S bioactive glasses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 61(2), 301–311.
- Shiraishi N, Anada T, Honda Y, Masuda T, Sasaki K, Suzuki O. (2010). Preparation and characterization of porous alginate scaffolds containing various amounts of octacalcium phosphate (OCP) crystals. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 21(3), 907–914.

- Sowmya S, Sudheesh Kumar P, Chennazhi K, Nair S, Tamura H, Jayakumar R. (2011). Biocompatible β -chitin Hydrogel/Nanobioactive Glass Ceramic Nanocomposite Scaffolds for Periodontal Bone Regeneration. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 25(1), 1–11.
- Srinivasan S, Jayasree R, Chennazhi K, Nair S, Jayakumar R. (2012). Biocompatible alginate/nano bioactive glass ceramic composite scaffolds for periodontal tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 274–283.
- Sudheesh Kumar P, Srinivasan S, Lakshmanan, V, Tamura H, Nair S, Jayakumar R. (2011). β -Chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 584–591.
- Sun Z, Wataha J, Hanks C. (1997). Effects of metal ions on osteoblast-like cell metabolism and differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34(1), 29–37.
- Suvorova E, Christensson F, Lundager Madsen H, Chernov 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.
- Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N. (2010). Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 1–4.
- Tan WC, Lang N, Zwahlen M, Pjetursson B. (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), 241–254.
- Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger J, Adler S, Fujita T, Nangaku M. (2005). Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 85(10), 1292–1307.
- Tjong SC. (2006). Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 53(3–4), 73–197.
- Turco G, Marsich E, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, Paoletti S. (2009). Alginate/Hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules*, 10(6), 1575–1583.

- Ueda M. (2011). Tissue engineered bone; Application for implant surgery. *Inflammation and Regeneration*, 31(2), 202–218.
- Uysal T, Ustidal A, Sonmez M, Ozturk F. (2009). Stimulation of bone formation by dietary boron in an orthopedically expanded suture in rabbits. *The Angle Orthodontist*, 79(5), 984–990.
- 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.
- Valerio P, Pereira M, Goes A, Leite M. (2009). Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 4(4), 045011.
- Valerio P, Pereira M, Goes A, Leite M. (2004). The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25(15), 2941–2948.
- Vogt R, Phillips D, Henderson L, Whitfield W, Spierto F.(1987). Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. *Journal of Immunological Methods*, 101(1), 43–50.
- Volponi A, Pang Y, Sharpe PT. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*, 20(12), 715–722.
- Walker J M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 32, 5–8.
- Wang L, Shelton RM., Cooper PR, Lawson M, Triffitt J, Barralet J. (2003). Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials*, 24(20), 3475–3481.
- Wheeler D, Eschbach E, Hoellrich R, Montfort M, Chamberland D. (2000). Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 18(1), 140–148.
- Wheeler D, Stokes K, Hoellrich R, Chamberland D, McLoughlin S. (1998). Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(4), 527–533.

- Wheeler D, Stokes K, Park H, Hollinger J. (1997). Evaluation of particulate Bioglass in a rabbit radius ostectomy model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 35(2), 249–254.
- Wilson J, Pigott G, Schoen F, Hench LL. (1981). Toxicology and biocompatibility of bioglasses. *Journal of Biomedical Materials Research*, 15(6), 805–817.
- Wu X, Liu Y, Li X, Wen P, Zhang Y, Long Y, Gao J. (2010). Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1167–1177.
- Xia W, Chang J. (2007). Preparation and characterization of nano-bioactive-glasses (NBG) by a quick alkali-mediated sol–gel method. *Materials Letters*, 61(14–15), 3251–3253.
- Xynos I, Edgar A, Buttery L, Hench LL, Polak JM. (2001). Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(2), 151–157.
- Xynos I, Hukkanen M, Batten J, Buttery LD, Hench LL., Polak JM. (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.
- Yamaguchi M. (1998). Role of zinc in bone formation and bone resorption. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 11(2-3), 119–135.
- Yang J, Chung T, Nagaoka M, Goto M. (2001). Hepatocyte-specific porous polymer scaffolds of alginate/galactosylated chitosan sponge for liver-tissue engineering. *Biotechnology Letters*, 23, 1385.
- Yang, S, Leong, K, Du Z, Chua C. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689.
- Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos A. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 109(1-3), 256–274.
- Yuan H, Kurashina K, Bruijn, J, Li Y, de Groot K, Zhang X. (1999). A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 20(19), 1799–1806.
- Zhang J, Huang J, Xu S, Wang K, Yu S. (2003). Effects of Cu²⁺ and pH on osteoclastic bone resorption in vitro. *Progress in Natural Science*, 13(4), 266–270.

- Zhou H, Lee, J. (2011). Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2769–2781.
- Zreiqat H, Howlett C, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. (2002). Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(2), 175–184.