



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

**“PREPARACIÓN Y EVALUACION *IN VITRO* DE MATERIALES PARA  
REGENERACIÓN ÓSEA BASADOS EN POLIURETANO BIODEGRADABLE Y  
NANOPARTÍCULAS BIOCERÁMICAS”**

**Amaru Simón Agüero Jiménez**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dr. Cristian Covarrubias Gallardo**

**TUTOR ASOCIADO**

**Prof. Dr. Mario Díaz Dosque**

**Adscrito a Proyecto FONDECYT 1130342**

**Santiago – Chile**

**2016**



## **AGRADECIMIENTOS.**

Al proyecto **FODECYT 1130342**, por el financiamiento otorgado para esta investigación.

Al Laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a su equipo y al docente encargado. Prof. Dr. Cristian Covarrubias G.

Al Laboratorio de Microscopia Electrónica de Barrido de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y su operadora T.M. Rocío Orellana F.

Al Prof. Dr. Mario Díaz Dosque por su colaboración para la síntesis del poliuretano y el apoyo brindado en las pruebas mecánicas y de DRX.

Al Prof. Dr. Merhdad Pedram-Yazdani por su colaboración en los materiales y consejos para la síntesis de poliuretano.

A la Ing. Bio. Tec. Gisselle Escobar A. por otorgar las células madres de pulpa dental humana para este estudio.

## **INDICE**

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	6
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
RESULTADOS.....	33
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	75

## RESUMEN.

Los bionanocompósitos son materiales compuestos por cerámicas bioactivas, en forma de nanopartículas y polímeros biodegradables, sintéticos o naturales, 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. El poliuretano (PU) es un polímero sintético que cumple las propiedades de un andamio poroso. En este trabajo se presenta la síntesis de un PU biocompatible, más la preparación de bionanocompósitos a de PU cargadas con nanopartículas de hidroxapatita (HA), vidrio bioactivo (BG) y vidrio bioactivo mesoporoso (MBG). Evaluando sus propiedades estructurales y bioactivas *in vitro*, para su potencial aplicación en ingeniería en tejido ósea.

**Objetivos:** Sintetizar y evaluar propiedades bioactivas *in vitro* de bionanocompósitos a base de nanopartículas cerámicas bioactivas y poliuretano biodegradable.

**Materiales y Métodos:** Se sintetizaron biocerámicas de HA y BG (nHA, MBG, nBG y nMBG) utilizando la técnica Sol-Gel. Los bionanocompósitos se prepararon a base de PU con un contenido de 2,5% y 5% de biocerámicas. Los materiales sintetizados se caracterizaron con difracción de rayos-X (DRX), espectroscopia infrarrojo (FTIR-ATR), pruebas mecánicas de compresión y microscopia electrónica de barrido equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (SEM-EDX). La bioactividad de los bionanocompósitos se evaluó por la capacidad de inducir apatita tipo ósea en suero fisiológico simulado (SBF). La formación de apatita fue analizada con DRX, FTIR-ATR y SEM-EDX. Se realizó un ensayo preliminar de proliferación celular mediante el ensayo colorimétrico MTS utilizando células madres provenientes de la pulpa dental (DPSCs).

**Resultados y discusión:** Los bionanocompósitos de PU presentaron un patrón poroso interconectados, con diferentes formas y tamaños (40-300  $\mu\text{m}$ ), apropiado para conducir la formación de nuevo tejido. Los bionanocompósitos con nBG presentaron mejor modulo elástico de compresión que PU. Los ensayos en SBF demostraron que bionanocompósitos nBG y nMBG tienen mejores propiedades

bioactivas con respecto al andamio de PU y que los bionanocompuestos de MBG y nHA. Adicionalmente, los bionanocompuestos de nBG(5%)/PU y nMBG (5%)/PU no afectaron la viabilidad de células madres de pulpa dental humana.

**Conclusión:** La incorporación de nanopartículas biocerámicas en andamios de poliuretano, permite obtener bionanocompuestos con mejoradas propiedades para inducir la formación de apatita tipo ósea *in vitro*. Los resultados de este estudio podrían tener consecuencias en el futuro diseño de biomateriales más eficientes, particularmente orientados a acelerar el proceso de regeneración ósea en terapias de ingeniería de tejidos.

## INTRODUCCIÓN.

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado cuyo origen es la mesénquima embrionaria proveniente del mesodermo. Este tejido óseo está compuesto por células osteogénicas, proteínas de la matriz extracelular (MEC), factores de crecimiento, calcio en forma de hidroxapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) y un sistema vascular complejo. Su matriz extracelular está calcificada y su principal célula formadora de hueso es el osteoblasto (Polo y cols., 2014). Como cualquier tejido conectivo normal puede sufrir reparación o regeneración, lo que está determinado principalmente por la extensión de la pérdida. La regeneración tisular es la respuesta que consigue la restitución morfológica y funcional del tejido tras un trauma, a diferencia de la reparación, donde el tejido que se forma es un tejido cicatricial. El tejido conectivo normal tiene una capacidad regenerativa relativamente baja. En el caso del hueso este se restituye totalmente tras una lesión que no involucre una pérdida del tejido (Gerstenfeld y cols., 2003). Al haber un trauma, hay dos casos fisiológicos donde el hueso se regenera: una vía directa y una vía intra membranosa o indirecta. En las dos la regeneración ósea origina una respuesta en que están involucrados los vasos sanguíneos, las células y la matriz extracelular. Se produce una respuesta inflamatoria y un hematoma inicial, con hematíes, plaquetas y fibrina. Las células del coágulo liberan interleuquinas y factores de crecimiento, originando la migración de linfocitos, macrófagos y células mesénquimales pluripotenciales. Estas señales moleculares promueven la diferenciación hacia células endoteliales, fibroblastos, condroblastos y osteoblastos. (Marsell y Einhorn, 2011).

La odontología tiene estrecha relación con el tejido óseo en especial con el hueso alveolar que es un componente óseo del cráneo- maxilofacial que forma el soporte principal de los dientes. La pérdida de este tejido puede ser el resultado de trastornos del desarrollo congénitos, trauma, enfermedad periodontal, producto de una acción quirúrgica o generalmente por reabsorción post extracción (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 métodos comúnmente utilizados para la falta de estas estructuras óseas son el uso de injertos óseos naturales como lo son los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos, materiales aloplastos, plasma rico en plaquetas, materiales para la regeneración ósea guiada y combinaciones entre ellos.

Los autoinjertos son considerados actualmente como el método clínico más efectivo 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. 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 en periodoncia, mejorando 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 desbridamiento) (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).

Actualmente estos injertos, materiales y métodos que buscan la regeneración del defecto óseo, no han demostrado muchas veces formar u obtener un hueso de características similares al original (Reynolds y cols., 2003). Es donde la ingeniería de tejido se ha desarrollado como una alternativa potencial para superar las deficiencias asociadas a los métodos actuales de regeneración ósea. La **ingeniería de tejidos** es un campo multidisciplinario que abarca las ciencias básicas, la ingeniería y la medicina regenerativa, destinada a desarrollar tratamientos para la

regeneración de los tejidos del cuerpo que no tienen capacidad regenerativa, así como para sustituir las funciones biológicas de los órganos dañados y heridos controlando las células con el potencial de proliferación y diferenciación (Tabata 2003). En general, la ingeniería en tejidos implica el uso de varias combinaciones de células, factores de crecimiento y / o citoquinas, y materiales portadores como matrices (andamios) (Warren y cols., 2015).

La investigación de nuevas técnicas y materiales para la reconstrucción de tejido óseo en odontología está adquiriendo gran popularidad, debido a los avances en biomedicina, la tecnología y a la necesidad de realizar procedimientos reconstructivos, que demandan un mayor nivel de exigencias. Actualmente, muchos tratamientos dentales y reconstructivos existentes no logran devolver las estructuras óseas a un estado normal de salud. Por este motivo, este nuevo auge en medicina regenerativa podría tener importantes consecuencias en salud pública, logrando el acceso de la población a terapias que mejoren su calidad de vida en forma significativa.

## **MARCO TEORICO.**

### **Tratamientos de los defectos óseos en odontología**

Los defectos óseos son aquellos hallazgos anatómico anormales o patológicos de los huesos en los cuales se observa una falta de tejido óseo. Las causas de dichos defectos suelen ser variadas, al igual que su forma y ubicación. La pérdida de tejido óseo se puede deber a trastornos del desarrollo congénitos, trauma, enfermedades inflamatorias o producto de una acción quirúrgica. Esto también afecta al campo odontológico en especial al hueso alveolar. El hueso alveolar es un componente óseo del cráneo- maxilofacial y es el soporte principal de los dientes. Después de la extracción de un diente el alveolo cicatriza, pero debido a la ausencia del diente este se reabsorbe (Jimi y cols., 2012). Este fenómeno de reabsorción y remodelación del hueso en última instancia, afecta a los dientes adyacentes alterando la biomecánica de todo el componente maxilofacial. Un defecto óseo anatómico grave puede complicar posteriormente los tratamientos. Los pacientes que carecen del volumen óseo adecuado requieren recuperar este tejido perdido para hacer viable su rehabilitación (Ashman, 2000).

La mayoría de los casos de pérdida ósea es por enfermedad periodontal, siendo esta una enfermedad de alta prevalencia. La enfermedad periodontal es un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan a la salud de las encías y las estructuras de soporte de los dientes específicamente el hueso alveolar. Algunos indicadores de riesgo, descritos para esta enfermedad, son el nivel socioeconómico, la edad, el sexo, los índices de placa y sangrado al sondaje. También influyen como factores de riesgo el tabaquismo y la diabetes (Borrell y Crawford, 2012; Genco y Borgnakke, 2013).

La enfermedad periodontal, es padecida por el 92% de la población mundial, la cual junto con la caries, es la enfermedad bucal de mayor prevalencia. Cuando la enfermedad periodontal alcanza la fase de periodontitis, los pacientes presentan pérdida de inserción clínica, presencia de sacos periodontales, movilidad dentaria,

reabsorción ósea, entre otros signos. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre el 10 y 15% de la población mundial padece periodontitis severa (Jacobs. 2012). Solo en Chile, más del 50% de la población adulta pose pérdidas de inserción clínica que se asocian a pérdida ósea (Gamonal y cols., 2010).

En el tiempo la pérdida del hueso alveolar en un paciente puede ser tal, que el espesor entre el piso del seno maxilar y la cresta alveolar es insuficiente para la colocación de implantes. O en el caso de la mandíbula, cuando la distancia entre el canal mandibular y reborde alveolar es mínima, un implante puede comprometer el nervio alveolar inferior (Aichelmann-Reidy y Reynolds, 2008; Al-Nawas y Schiegnitz 2014).

Los métodos comúnmente utilizados para la rehabilitación de estas estructuras óseas son el uso de injertos óseos naturales como son los autoinjertos, aloinjertos, xenoinjertos y materiales de sustitución ósea. En donde se encuentra la hidroxiapatita sintética, plasma rico en plaquetas, membranas de regeneración ósea guiada y /o combinaciones entre ellos (Peral y cols., 2008).

Los injertos óseos y materiales de sustitución ósea buscan las características de osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción. La osteoinducción consiste en la estimulación de las células osteoprogenitoras para diferenciarse en osteoblastos, que luego empiezan la formación de hueso nuevo. La osteoconducción es una característica de la matriz que facilita la colonización y el crecimiento interno de nuevas células óseas y capilares que crecen en razón de su estructura tridimensional. La osteoconducción es por definición un proceso pasivo y depende principalmente de la porosidad de la matriz y en un menor grado por sus propiedades químicas y físicas que estimulan la adhesión y crecimiento celular. Por último las propiedades osteogénicas se producen cuando los osteoblastos vitales procedentes del injerto óseo contribuyen al crecimiento de hueso nuevo (Giannoudis y cols., 2005 Al-Nawas y Schiegnitz 2014).

### **Autoinjertos.**

Los autoinjertos son considerados como el método clínico más efectivo entre las técnicas de reconstrucción ósea (Marx, 1994). El receptor y donante son el mismo individuo, por lo que no hay problemas de compatibilidad con el sistema inmune del hospedero, disminuyendo 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). El hueso autógeno se considera como gold estándar para la regeneración ósea ya que posee las características osteogénicas, osteoinductoras y osteoconductoras. Contiene osteoblastos, células precursoras de osteoclastos, células mesénquimales indiferenciadas y monocitos, que promueven la remodelación y la formación de nuevo hueso (Jayakumar y Silvio, 2010). A pesar de esto, los autoinjertos tiene grandes limitantes, como el aumento de los tiempos quirúrgicos, la limitada disponibilidad de tejido trasplantable, la calidad ósea del paciente, reabsorciones impredecibles, la inflamación del sitio donante y su posterior recuperación, que suele tardar más que la recuperación del defecto original (Nkenke y Stelzle 2009; Noia y cols., 2011). 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 un déficit funcional (Ueda, 2011).

### **Aloinjertos y Xenoinjertos.**

Otras alternativas como los aloinjertos (hueso liofilizado, hueso liofilizado desmineralizado), que son material óseo proveniente de otra persona, y los xenoinjertos (hueso bovino liofilizado) de origen animal; pueden producir reacciones de rechazo por procesos inmunológicos o ser reabsorbidos por falta de osteoinducción (Neovius, y Engstrand 2010).

Actualmente estos injertos que buscan la regeneración del defecto óseo, no han demostrado muchas veces formar u obtener un hueso de características similares al original. En caso de los aloinjertos el tejido óseo resultante tiene más características histológicas de reparación que de regeneración tisular (Reynolds y cols., 2003). Ahora basado en la literatura actual, no hay evidencia de que el hueso autólogo sea superior a los materiales de sustitución ósea, en términos de supervivencia del injerto en elevaciones del seno vertical o lateral y aumento de la cresta alveolar. Estas conclusiones están limitadas por que en la bibliografía no se describe el tamaño o el volumen del defecto, ni la capacidad regenerativa que sufre una vez colocado el injerto. (Al-Nawas y Schiegnitz, 2014).

### **Hueso artificial o aloplastos:**

La hidroxiapatita (HA) y el beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) son materiales cerámicos utilizados como hueso artificial (Deisinger, 2010.) Debido a que estos materiales de fosfato de calcio no tienen una capacidad osteoinductora, se utilizan conjuntamente con injertos óseos autólogos u otros métodos, como pueden ser la regeneración ósea guiada, el plasma rico en plaquetas o distracción ósea. (Jimi y cols., 2012).

### **Regeneración Ósea Guiada y Plasma rico en plaquetas.**

La regeneración ósea guiada (GBR, por sus siglas en inglés) es un método para la generación de tejido óseo nuevo, utilizando una membrana reabsorbible o no reabsorbible. Esta membrana forma una barrera que protege el área del injerto de la invasión de otros tejidos, en especial del tejido conectivo fibroso. En los años recientes se ha puesto mucha atención en la combinación de estas membranas de polímeros biodegradables con partículas bioactivas o con otros métodos como plasma rico en plaquetas. (Liu y cols., 2010).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un volumen de plasma autólogo, que contiene una cuenta plaquetaria cinco veces mayor que en la sangre. En el campo

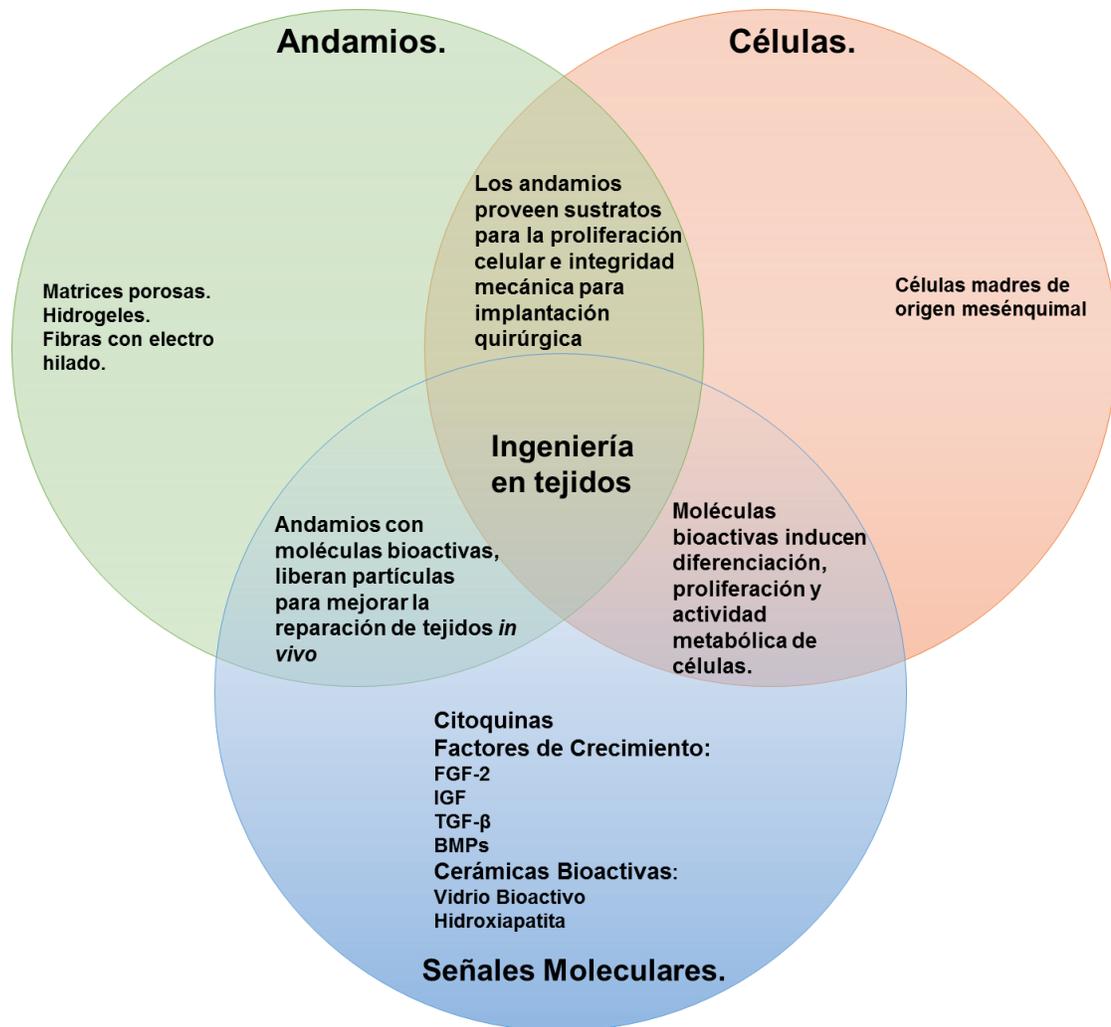
odontológico el PRP ha sido utilizado en una variedad de aplicaciones, como la elevación del piso del seno maxilar, el aumento del hueso alveolar, la reconstrucción mandibular, tratamiento de defectos periodontales, como relleno alveolar, etc. Los factores de crecimiento presentes en PRP son los que contribuyen al proceso de regeneración ósea, siendo este un gran avance por ser un método fácil de ser aplicado (Jimi y cols., 2012).

La combinación de estos métodos representa el mejor avance para la regeneración ósea en odontología, ya que poseen una excelente biocompatibilidad, osteoinducción y características osteogénicas. A pesar que estos métodos (GRB y PRP) inducen la regeneración ósea, en la mayoría de los casos toma un tiempo considerable, para obtener un volumen de hueso suficiente (Jimi y cols., 2012).

En busca de una alternativa para la reconstrucción ósea, que supla los defectos de los métodos nombrados anteriormente, se empiezan a crear diversos biomateriales bajo los conceptos que la ingeniería en tejidos entrega (Wolf, 2000).

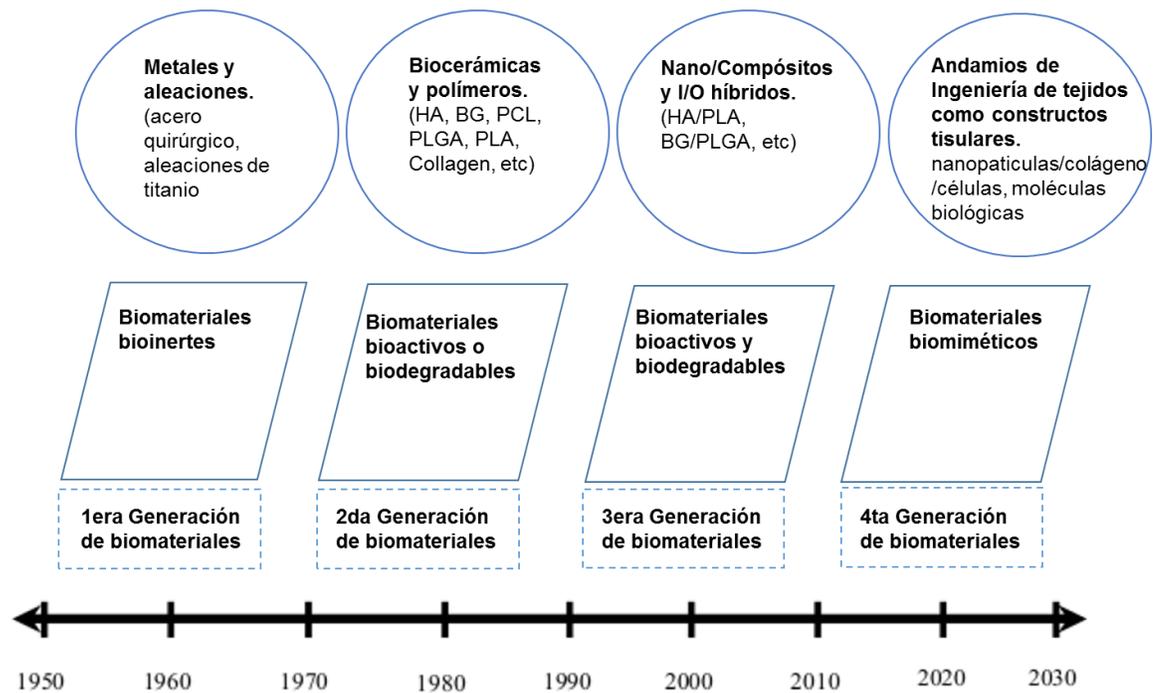
### **Ingeniería en tejido para la regeneración ósea.**

La ingeniería en tejidos o tisular (IT) es una disciplina científica moderna, dedicada a la generación de tejido nuevo usando los principios de la ingeniería en combinación con las ciencias biomédicas (Vacanti, 2006). Este campo surgió por la necesidad de regenerar tejidos en niños y adultos, en órganos que han sufrido algún daño irreversible por enfermedad, trauma o anomalías congénitas. El término de Ingeniería de Tejidos surge a finales de 1980 y sugiere enfoques para la creación de biomateriales sustitutos a los injertos, que tengan la capacidad de regenerar órganos humanos (Vacanti 2009). La ingeniería en tejidos implica el uso de varias combinaciones de células, moléculas bioactivas, factores de crecimiento y / o citoquinas, en matrices biodegradables (andamios (scaffold) y / o hidrogeles) como se demuestra en la **Figura 1** (Langer y Vacanti, 1993).



**Figura 1.** Triada de la ingeniería en tejidos. Andamio, células y señales moleculares.

La evolución de los biomateriales en ingeniería en tejidos para la regeneración ósea, se ha desarrollado de la mano con el aumento de los conocimientos sobre el microambiente, donde se produce la regeneración del tejido óseo, lo que implica un continuo cambio en los requisitos y las propiedades de los materiales utilizados. Esta evolución se puede medir mediante la definición de tres generaciones diferentes, más una cuarta que se proyecta a futuro (Hench y Polak 2002). Estas generaciones de biomateriales para la regeneración ósea no tienen un orden cronológico como tal, pero si van de la mano con las nuevas tecnológicas e investigaciones desarrolladas como se aprecia en la **Figura 2** (Navarro y cols., 2008).

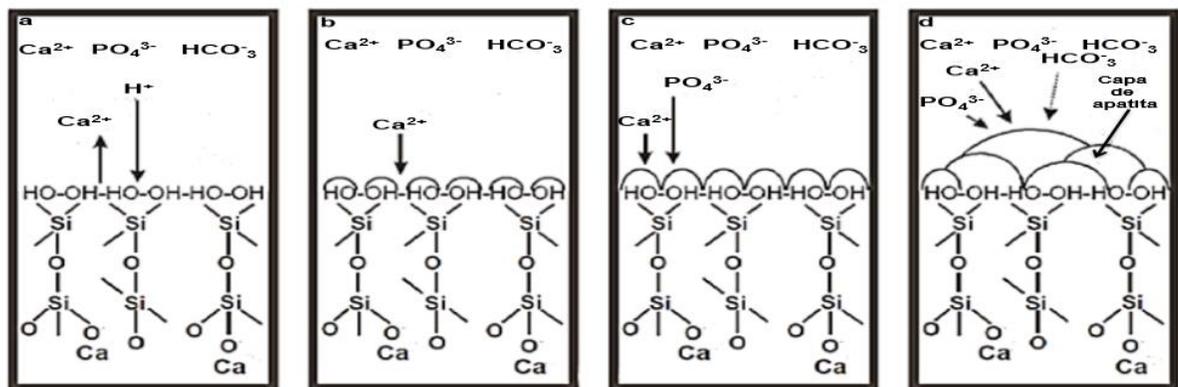


**Figura 2.** Generaciones de biomateriales para la regeneración ósea.

A partir de la segunda generación de materiales para la regeneración ósea, se han desarrollado materiales con matrices biodegradables y/o con interfaces bioactivas que provocan una respuesta biológica específica (es decir, osteogénesis, osteoinducción y osteoconducción). Esta bioactividad es proporcionada por una superficie bioactiva que permite la mineralización a través de la nucleación heterogénea y cristalización de la apatita. La superficie del biomaterial puede estar cubierta por cerámicas bioactivas tales como **hidroxiapatita (HA)**, fosfato  $\beta$ -tricalcico ( $\beta$ -TCP), o **vidrio bioactivo (BG)** (Polo y cols., 2014).

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 BG 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 desprotonación de los grupos de ácido carboxílicos COOH y/o alcoholes OH a pH fisiológico (Oliveira y cols., 2003). Esta carga negativa atrae iones de calcio creando una capa rica en  $\text{Ca}^{2+}$  con potencial de superficie positivo, que atrae a iones negativos tipo fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  en soluciones, llevando a la deposición de otra capa de  $\text{Ca}^{2+}$ . Este proceso se repite generando capas de HA en la superficie del material (**Figura 3**). (Kim y cols., 2005; Landi y cols., 2005).



**Figura 3.** Formación de apatita sobre la superficie de Vidrio Bioactivo.

Con respecto a las matrices o **andamios** (scaffold), estos son polímeros sintéticos o naturales, que deben tener las características de biocompatibilidad y biodegradabilidad. La degradabilidad de los andamios es controlada en condiciones fisiológicas y puede ser química o enzimática, generando productos inertes, que son reabsorbidos por el cuerpo. Entre los polímeros sintéticos están el ácido poliláctico, poli ( $\epsilon$ -caprolactona), poliglicolida y el poliuretano; como polímeros naturales está el quitosano, el alginato y ácido hialurónico, entre otros (Amini y cols., 2012.).

En la actualidad, en la tercera y cuarta generación, las propiedades mecánicas y osteoconductoras de los andamios biodegradables y de las moléculas bioactivas se pueden mejorar mediante la formación de **materiales compuestos o**

**compósitos o biocompósitos.** Es decir la combinación del andamio biodegradable, hecho de un polímero sintético o natural, con las moléculas bioactivas, como hidroxapatita y vidrio bioactivo o factores de crecimiento entre otras (Navarro y cols., 2008).

El uso de factores de crecimiento como señales moleculares para la regeneración ósea, aún está en estudio (Lee y cols., 2011). La dificultad para obtenerlos, aislarlos y su rápida degradación *in vivo* a través de distintas vías (desnaturalización, oxidación o proteólisis), elevarían mucho los costos de la producción para un material compuesto (Krishnamurthy y cols., 2002). Por esta razón las líneas de investigación se han centrado más en la síntesis de biomateriales cerámicos como la HA y el BG, buscando las características de biocompatibilidad, bioactividad, osteoinducción, osteoconducción y osteogénicas (Amini y cols., 2012.).

## **Biomateriales cerámicos.**

### **Hidroxiapatita.**

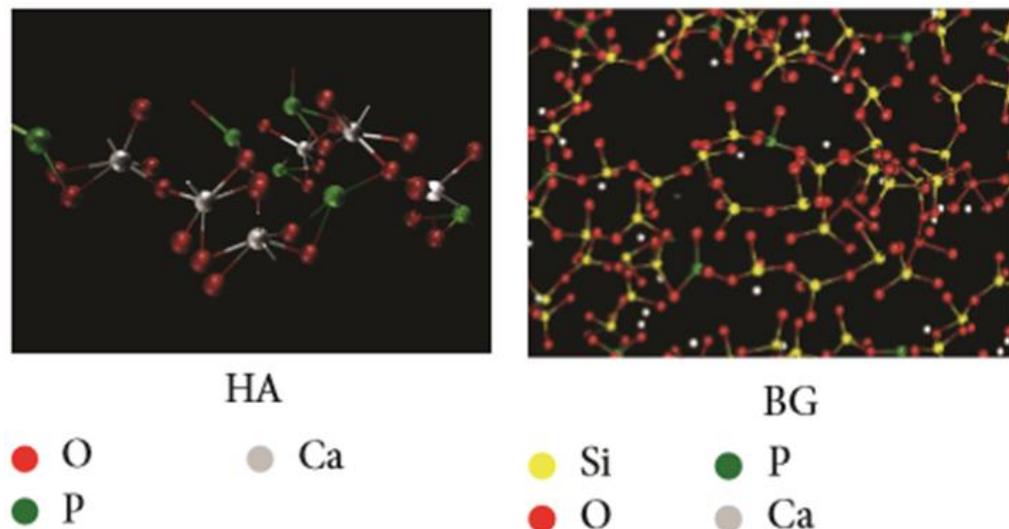
La hidroxapatita (HA), cuya fórmula general es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , es un mineral formado por fosfato de calcio (Zhou y Lee, 2011). Su composición química es similar a la matriz inorgánica del hueso y su estructura se observa en la **Figura 4**. Recientemente, la HA se ha usado para una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo matrices para el control de la liberación del fármaco y materiales de ingeniería de tejido óseo (Sculean y cols 2002; Khan y cols., 2005). La Ha sintética exhibe una fuerte afinidad con los tejidos duros, a través de un enlace químico con el tejido anfitrión, ofreciendo una mayor ventaja en aplicaciones clínicas en comparación con la mayoría de los sustitutos óseos, tales como aloinjertos o implantes metálicos (Henkel y cols.,2006). Las principales ventajas de HA sintética son su biocompatibilidad, biodegradabilidad lenta *in situ* y una buena osteoinducción (Gosain, 2004; Sculean y cols., 2005). Al igual la HA sintética presenta una excelente biocompatibilidad con los tejidos blandos tales como la piel,

el músculo y las encías. Estas capacidades han hecho de la HA un candidato ideal para implantes o componentes de implantes ortopédicos y dentales. Dentro de los usos comunes se incluyen la reparación ósea, aumento de hueso, recubrimiento de implantes, en conjunto con auto injertos, plasma rico en plaquetas y/o en membranas para regeneración ósea guiada (Hing y cols., 2006; Soccol y cols., 2006). Sin embargo, la baja resistencia mecánica de HA convencional restringe su uso en aplicaciones que tengan que soportar cargas, así como la alta cristalinidad de la HA hace que en general sea un material estable y poco reactivo (Zhou y Lee, 2011). La HA sintética 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, a base de HA sintética, actualmente disponibles en el mercado son: OsteoGraf® (Dentsply), Periograf®, Calcitite®(Zimmer), IngeniOS TM (Zimmer).

### **Vidrio Bioactivo.**

El vidrio bioactivo (BG) de nombre comercial Bioglass®, fue descubierto por Hench en 1969, y desarrollado para la utilización en la unión de la interfaz de implantes, la reparación de tejidos y la regeneración ósea (Hench, 2006). El BG 45S5 posee la siguiente composición química: 24.5Na<sub>2</sub>O; 24.5CaO; 45.0SiO<sub>2</sub>; 6.0P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (% masa), siendo un vidrio silicado basado en una red tridimensional de SiO<sub>2</sub> formada por vidrio, en la cual un átomo de silicio (Si) está enlazado con cuatro átomos de oxígeno (O), y además están presentes iones de fosfato (P) y calcio (Ca), como se esquematiza en la **Figura 4**. Este material ha sido estudiado e investigado ampliamente para la regeneración ósea. Se ha demostrado que es capaz de estimular la neoformación de hueso *in vivo* (Wheeler y cols., 1997; Wheeler y cols., 1998), y que promueve la proliferación de células de origen mesenquimal, de forma más rápida que HA sintética (Oonishi y cols., 1999; Deb y cols., 2010). Los productos de disolución iónica (Ca<sup>2+</sup>, Si) liberados durante la degradación de BG influyen y controlan el ciclo celular de las células precursoras osteogénicas y de la población de células diferenciadas (Xynos y cols., 2000; Hench

y Polak, 2002; Valerio, 2004). BG ofrece ventajas tales como, el control de velocidad de degradación, excelente bioactividad, osteoinducción y osteoconducción (Xynos y cols., 2000; Xynos y cols., 2001; Fu y cols., 2011), siendo utilizado en más de 1 millón de pacientes para reparar defectos óseos y para tratamientos ortopédicos (Jones, 2013). En relación a la reparación de tejidos blandos, existe evidencia reciente que muestra la eficiencia del BG para promover la angiogénesis (Gorustovich y cols., 2010). Existen aplicaciones clínicas disponibles en el mercado que contienen BG, entre las cuales se encuentran NovaMin® Bioglass®, Perioglas® (Novabone) y Biogran® (Biomet 3i), algunas son utilizadas como injerto 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, tratamiento de periimplantitis, relleno en exéresis de quistes y apicectomías, entre otros (Hench, 2009).



**Figura 4.** Estructura química de las biocerámicas de HA y BG. (Covarrubias y cols., 2015)

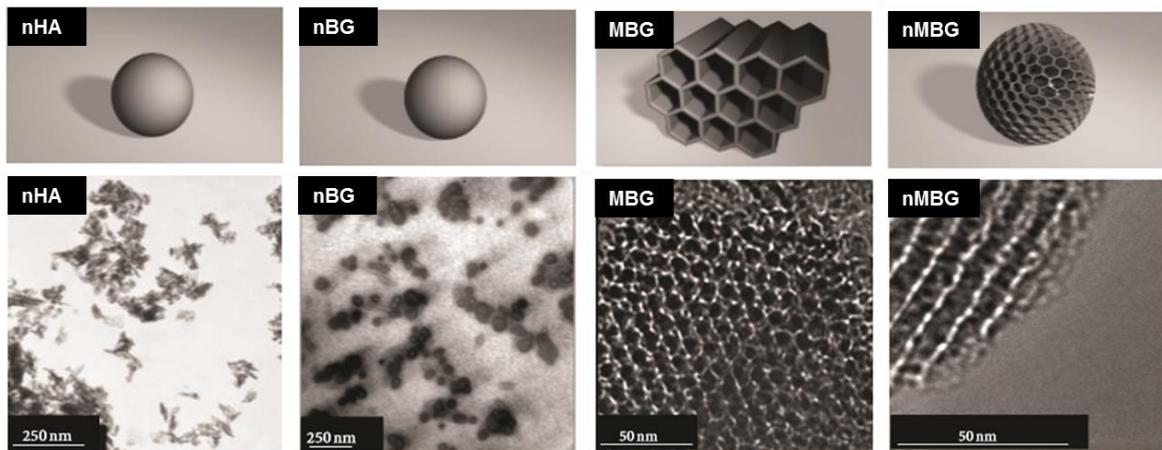
En busca de mejorar las propiedades de BG en 1992 científicos de la Mobil Corporation descubrieron otra estructura del sílice, obteniendo **vidrio bioactivo mesoporoso ordenado (MBG)** (Beck y cols., 1992). MBG posee disposiciones de canales y cavidades de diferente geometría, formados a partir de unidades de  $\text{SiO}_2$

como se aprecia en la **Figura 5**. El tamaño de poro es variable (2 nm - 50 nm), puede ser controlado y modificado, en un rango razonable, utilizando varias estrategias para sintetizarlo. (Beck y cols., 1999; Zhao y cols., 1999; Lopez y cols., 2006). El MBG sintetizado a través de un método de auto-ensamblaje de evaporación inducida (EISA), con el uso de un copolímero tribloque no iónico (EO20PO70EO20), como agente director de estructura (López y cols., 2006), ha demostrado una acelerada bioactividad en SBF, comparada con el BG. (Yan y cols., 2004; Izquierdo y Vallet, 2011). El comportamiento altamente bioactivo de MBG es debido a su composición química, que es similar a BG, pero posee mayor área de superficie y porosidades, así como una estructura de poro ordenado (López y cols., 2006; Izquierdo y cols., 2008). Tanto BG como MBG presentan limitaciones en ciertas propiedades mecánicas, como una baja resistencia, tenacidad, y compresión. Por lo que es recomendado ocuparlas en materiales compósitos (Rezwan y cols., 2006). La investigación actual de todas estas biocerámicas de HA, BG y MBG está centrada en sobrepasar las limitaciones de estas y mejorar sus propiedades biológicas explorando las ventajas que ofrece la nanotecnología (Fathi y cols., 2008).

### **Nanopartículas biocerámicas.**

HA, BG y MBG 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, obteniendo **nanoesferas o nanopartículas de HA (nHA) BG (nBG) y MBG (nMBG)** como se observan en la **Figura 5**. La Nanotecnología se define como “la creación de materiales, dispositivos y sistemas funcionales a través del control de la materia a la escala nanométrica (1-100 nm), explotando nuevos fenómenos y propiedades (físicas, químicas y biológicas) a esa escala (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, comparada con los materiales convencionales o micrométricos. (Covarrubias y cols., 2015)



**Figura 5.** Esquemas e imágenes de microscopio electrónico de transmisión de alta resolución de las partículas de nHA, nBG, MBG y nMBG. Se observa la estructura cristalina de nHA, la estructura amorfa de nBG y la estructura nanoporosa ordenada de MBG y de las nanoesferas de nMBG (Covarrubias y cols., 2015).

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 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 una estructura de apatita carbonatada, de tamaño nanométrico y de baja cristalinidad, semejante a la de la apatita ósea humana, mostrando propiedades deseables *in vitro* como una mayor bioactividad en SBF (Zhou y Lee, 2011).

Como el hueso es un compuesto cerámico, formado por fibras colágenas que contienen naturalmente nanocristales inorgánicos de hidroxiapatita, las proteínas de la matriz ósea son atraídas por gránulos a nanoescala, formándose una red proteica con propiedades angiogénicas. Luego se produce una osteogénesis que se lleva a cabo en esta matriz. La formación de cristales de HA tienen uniones

cristal-cristal débiles, por lo tanto, la reabsorción mediada por osteoclastos es más homogénea. (Nayar y cols., 2011). Las nanopartículas proporcionan un área superficial más grande, la tasa de proteínas adsorbidas se incrementa. Esto permite explicar por qué el uso de nanomateriales puede mejorar la capacidad de regeneración ósea en comparación con las micropartículas. Además, la gran superficie de las nanopartículas hace que tengan una mejor capacidad mecánica, osteoconducción y una mayor bioactividad que las micropartículas (Quinones y Lovelace, 1997). Los cristales de la misma composición química, más pequeños se disuelven más rápidamente que cristales de mayor tamaño, gracias a la exposición de mayor área superficial al ambiente biológico y a un mayor número de defectos presentes en su trama (Suvorova y cols., 1998).

En estudios *in vitro*, la liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  de nHA es similar a la de la apatita ósea y significativamente más rápida que a 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 lo tanto más cercana a la de la apatita biológica (Fathi y cols., 2008). Se descubrió que nHA y nBG presentan una diferente respuesta bioactiva en función de su composición química, tamaño de las nanopartículas, área superficial y porosidad. En general nBG presenta mayor bioactividad en SBF que nHA, debido a la naturaleza menos cristalina y más reactiva de su composición. El tamaño de partícula nanométrico de nBG parece ser más determinante en el control de la concentración de los productos en una disolución iónica y por lo tanto conlleva una mayor bioactividad (Covarrubias y cols., 2015). La superioridad de las nHA y nBG también se ha observado para el tratamiento de defectos óseos. (Schwarz y cols., 2006) (Fathi y cols., 2007).

En el uso de biocompósitos, las nanopartículas pueden formar una interface más estrecha con la matriz del polímero y por lo tanto se puede esperar un alto rendimiento de sus propiedades mecánicas (Padmanabhan, 2001). Estudios informaron que las biocerámicas a nanoescala aumentan la biocompatibilidad de

los bionanocompósitos y al reducir su tamaño necesitan menores cantidades que las partículas micrométricas para producir una bioactividad similar (Aixue y cols; 2008 Kyung-Tae y cols 2010).

### **Poliuretano en la utilización como andamio (scaffold) en biocompósitos.**

Como se mencionó anteriormente los compósitos bioactivos son materiales compuestos, donde las partículas cerámicas bioactivas son incorporadas en matrices o andamios poliméricos biodegradables. De esta forma se combina la bioactividad de partículas inorgánicas, con las propiedades mecánicas de soporte de una matriz polimérica. (Swetha y cols., 2010; Boccaccini y cols., 2010) Los **nanocompósitos** o **bionanocompósitos** son una nueva clase de nanomateriales híbridos, en donde la estructura de las biocerámicas son a escala nanométricas. 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).

Dentro de las posibilidades para la síntesis de los biocompósitos, se encuentra el uso del **poliuretano (PU)** como andamio. Los PU son polímeros fabricados a partir de la reacción de diisocianatos con distintos polioles. Los diisocianatos son compuestos químicos, caracterizados por tener dos grupos funcionales isocianatos ( $-N=C=O$ ) como parte de su estructura química y que se caracterizan por su alta reactividad frente a nucleófilos, combinándose y enlazándose covalentemente con ellos. Los polioles son alcoholes polihídricos con varios grupos hidroxilo, su fórmula química general es  $C_nH_{2n+2}O_n$ . Un polioliol es un carbohidrato que contiene más grupos hidroxilo que el azúcar a la cual está asociada (Hepburn, 1992). Los PU se producen por policondensación de un isocianato, di o polifuncional, con un polioliol y otros reactivos como catalizadores, extensores de cadena, surfactantes, cargas, pigmentos, entre los más importantes. Dentro de PU están los segmentados, en donde en su estructura hay segmentos rígidos producidos por la reacción entre el diisocianato y el extensor de cadena; y segmentos flexibles proporcionados por los polioles (Guelcher y cols., 2005).

En cuanto a los isocianatos, estos pueden ser aromáticos o alifáticos, y también pueden estar modificados; mientras que los polioles pueden ser de tipo poliéter, poliéster o tener estructura hidrocarbonada (Gil Pilonieta y Franklin., 2007). En los poliuretanos que incorporan isocianatos aromáticos en su estructura, se han reportado como subproductos de la degradación, diaminas aromáticas carcinógenas y mutágenas (Szycher y Siciliano, 1991). Sin embargo, aún se encuentra sin resolver, si las concentraciones de estos subproductos de degradación, superan los niveles fisiológicamente relevantes para ser nocivos (Ratner y Cols., 2004). Esta toxicidad de los subproductos del poliuretano se debe al anillo aromático de algunos isocianatos, como el diisocianato de tolueno (TDI) y el diisocianato de 4,4'-difenilmetano (MDI). Es por eso que en aplicaciones biomédicas se comenzó a utilizar isocianatos de anillos alifáticos, tales como el diisocianato de 1,6-hexametileno HDI, el diisocianato de 4,4-diciclohexilmetano (H12MDI), el diisocianato de 1,4-ciclohexano (CDI), o el diisocianato de isoforona (IPDI) (Gogolewski 1989). Los productos de degradación de estos diisocianatos alifáticos son el aminoácido lisina y la putrescina diamina, los cuales no han demostrado efectos tóxicos sobre células endoteliales humanas cultivadas *in vitro* (Guan y cols., 2002; Guan y Cols., 2004).

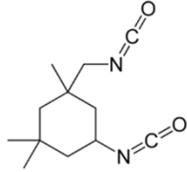
Actualmente existen varios PU comerciales para el uso biomédico como Actifit®, Elasthane™ (Thermoplastic Polyether-urethane) y ChronoFlex AL® ChronoFlex AR® (Reed y cols., 1994). De la misma manera, biocompósitos de PU están siendo sintetizados para diversos estudios en aplicaciones biomédicas, tales como la ingeniería de tejidos blandos (Guan y cols., 2002), tejidos cardíacos, (Rabkin y Schoen, 2002; Alperin y cols., 2005), materiales que tienen contacto con la sangre (Poussard y cols., 2004), implantes de meniscos para rodillas (Spaans y cols., 2000; Bouyarmanea y cols 2014), sistemas con liberación controlada de fármacos (Mahkama y Sanjani, 2003), como también para la regeneración de tejido óseo (Aguilar y cols., 2016; Oliveira y cols., 2012; Ryszkowska y cols., 2010; Li Wang y cols., 2009).

La bibliografía actual relata dos métodos para la síntesis de biocompósitos y bionanocompósitos de PU segmentados para la regeneración ósea. La síntesis de polimerización en 2 pasos del PU o en dispersión acuosa (Aguilar y cols., 2016; Oliveira y cols., 2012; Ryszkowska y cols., 2010); y la síntesis *in situ* de PU. (Li Wang y cols., 2009) En la primera el prepolímero se sintetiza en una dispersión acuosa donde se encuentra los grupos polioles del policaprolactona-diol (PCL), 2,2-bis (hidroximetil) propiónico (DMPA) y el diisocianato de isoforona (IPDI). En esa dispersión se agregan las biocerámicas y el extensor de cadena. Se espera un tiempo a que se polimerice y estabilice el PU en la dispersión, en un segundo paso durante ese transcurso de tiempo, la dispersión se coloca en contenedores de teflón se congela y liofiliza, logrando la esponja de PU. En el segundo método los grupos polioles se encuentran en el aceite de ricino, donde se agregan *in situ* las biocerámicas, que con IPDI formaran el prepolímero, luego se agrega el catalizador y el extensor de cadena.

Durante este proceso de polimerización, al mismo tiempo se formará una matriz porosa tridimensional e interconectada, gracias al gas de CO<sub>2</sub> liberado durante la reacción final, entre los grupos isocianatos de IPDI y el H<sub>2</sub>O, cerrando las cadenas poliméricas con un grupo amina primaria y obteniendo finalmente los biocompósitos con las biocerámicas embebidas en el interior del polímero. **(Figura 6).**

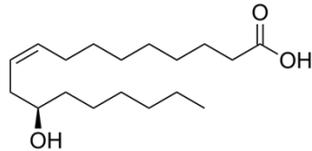
## Poliuretano Segmentado (*in situ*)

Diisocianato  
Alifático:



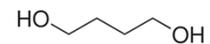
Diisocianato de isoforona (IPDI)

Aceite de ricino (castor oil):



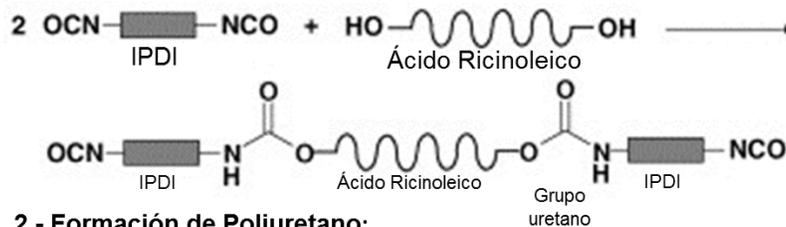
Acido Ricinoleico (Aceite de ricino)

Extensor de Cadena:

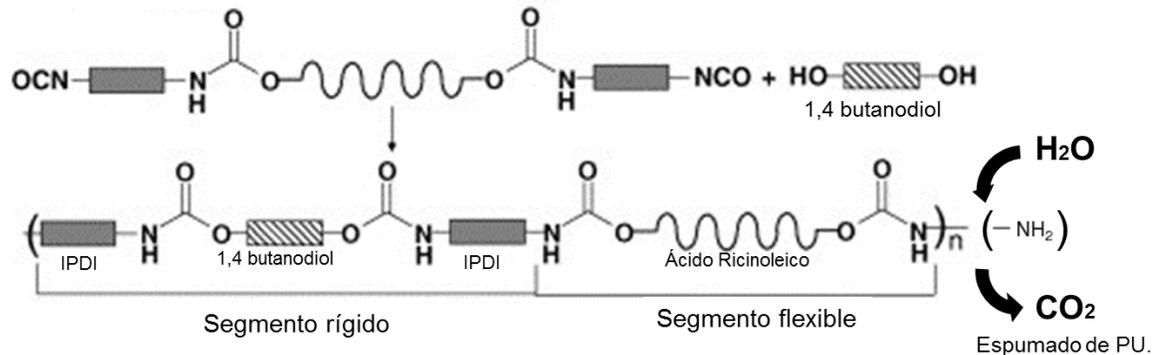


1,4 butanodiol

1.- Formación de Prepolímero:



2.- Formación de Poliuretano:



**Figura 6:** Estructura química de los reactivos y reacción de polimerización de poliuretano.

En estudios de biocompuestos de PU de dispersión acuosa para regeneración ósea, Ryzkowska y cols, obtuvieron biocompuestos de Poliuretano y Bioglass® de porosidad superior al 70%, con poros abiertos e interconectados de 100 a 400  $\mu\text{m}$  de tamaño y en las paredes de estos poros la presencia de una gran cantidad de

microporos (de menos de 10  $\mu\text{m}$ ). Esta estructura de poros satisface los requisitos para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo. También se observó alta bioactividad en SBF que conducen a la formación de hidroxiapatita en la superficie del andamio (Ryszkowska y cols., 2010). En otro estudio, Oliveira y cols. sintetizaron bionanocompuestos de PU con 10% y 25% de nBG del peso total del bionanocompuesto, en donde también se observó una alta bioactividad en SBF y viabilidad celular en 1 hora, que disminuye a las 24 horas (Oliveira y cols., 2012). Aguilar y cols. en una investigación que se hizo de forma paralela a este trabajo, en cooperación bilateral entre México-Chile, se vio que bionanocompuestos de PU y con distintos porcentajes de nBG obtenían una alta bioactividad. De igual manera se observó que PU con 1% y 2,5% de nBG, poseían significativamente una mayor viabilidad celular de células madres de la pulpa dental (DPSCs) a los 10 días, que los porcentajes más altos de nBG, pero en los ensayos preliminares de diferenciación osteogénicas, porcentajes más altos (15% y 25% de nBG) cultivadas con DPSCs a 48 horas, expresaron más Runx2, en ausencia de suplementos osteogénicos. (Aguilar y cols., 2016)

En el estudio de biocompuestos de PU de síntesis *in situ*, se ocuparon diferentes porcentajes de HA, en donde no se realizaron ensayos de SBF pero si de viabilidad celular, demostrando que la proliferación de células MG63 cultivadas con biocompuestos de HA/PU aumentaba con el tiempo de cultivo hasta los 11 días (Li Wang y cols., 2009).

En la literatura no se ha reportado la preparación de andamios biocompuestos combinando PU *in situ* con partículas de MBG, nMBG, nBG y nHA. La incorporación de las nanopartículas a este poliuretano, permitiría otorgarles las características bioactivas deseadas para ser un material que induzca la regeneración ósea.

En este trabajo de tesis se estudió la incorporación de nanopartículas de BG y HA a un matriz porosa de PU mediante el método *in situ*. Posteriormente se evaluaron las propiedades de los bionanocompuestos para inducir la formación de apatita de tipo ósea *in vitro* en fluido fisiológico simulado, así como su citocompatibilidad.

**Hipótesis.**

La incorporación de nanopartículas durante el proceso de polimerización del poliuretano permite generar un material bionanocompósitos con propiedades bioactivas *in vitro*.

**Objetivo General.**

Evaluar el efecto de la incorporación de nanopartículas cerámicas en poliuretano biodegradable sobre sus propiedades bioactivas *in vitro*”

**Objetivos específicos:**

1. Preparar bionanocompósitos de PU con diferentes contenidos de nanopartículas.
2. Caracterizar la estructura de los bionanocompósitos de PU con diferentes contenidos de nanopartículas.
3. Determinar las propiedades mecánicas del andamio de PU y los bionanocompósitos de PU sintetizados.
4. Evaluar la bioactividad de los bionanocompósitos en fluido corporal simulado (FBS).
5. Evaluar la citocompatibilidad de los bionanocompósitos con células madre de pulpa dental humana (DPSCs).

## **METODOLOGÍA**

### **1. Síntesis de nanopartículas bioactivas y bionanocompuestos.**

#### **1.1. Síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (nHA)**

La síntesis de las nanopartículas de HA se realizó a 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, se agregó una solución de amonio acuoso ( $\text{NH}_3$ ) 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, obteniendo un polvo blanco y fino de nHA.

#### **1.2. Síntesis de nano partículas de vidrio bioactivo (nBG)**

Las nanopartículas de BG fueron preparadas a través del método sol-gel reportado por Hong y cols., compuesto por tres etapas (Hong, Liu y cols., 2009). Sin embargo, para obtener mejor bioactividad se utilizó la siguiente composición molar:  $58\text{SiO}_2:40\text{CaO}:5\text{P}_2\text{O}_5$  (Valenzuela, 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 adicionando ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), 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 ( $\text{NH}_4$ ). 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  $-80^\circ\text{C}$  por 12 horas, luego liofilizado por 48 horas y finalmente calcinado a  $700^\circ\text{C}$  por 3 horas, obteniendo un polvo blanco y fino de nBG.

### **1.3. Síntesis de Vidrio bioactivo mesoporoso.**

Vidrio bioactivo de estructura porosa ordenada (MBG)  $85\text{SiO}_2\text{-}10\text{CaO}\text{-}5\text{P}_2\text{O}_5$  (mol%) se sintetizó utilizando la técnica de sol-gel / auto-ensamblaje inducida por evaporación (EISA). La solución de síntesis sol-gel se preparó mediante el uso de ortosilicato de tetraetilo (TEOS), fosfato de trietilo (TEP) y  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , como fuentes de  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  y  $\text{CaO}$  respectivamente. Esta solución sol-gel se formó usando HCl como catalizador en un medio de agua y etanol, más el tensioactivo no iónico Pluronic P123 como agente formador de estructura. El sol incoloro resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h, luego se transfirió en placas de Petri y se evaporó a  $40^\circ\text{C}$  durante unos 7 días. El gel seco se eliminó como una película homogénea y transparente, luego se calcinó a  $700^\circ\text{C}$  durante 3 h logrando obtener el polvo final de vidrio calcinado (Lopez y cols., 2006).

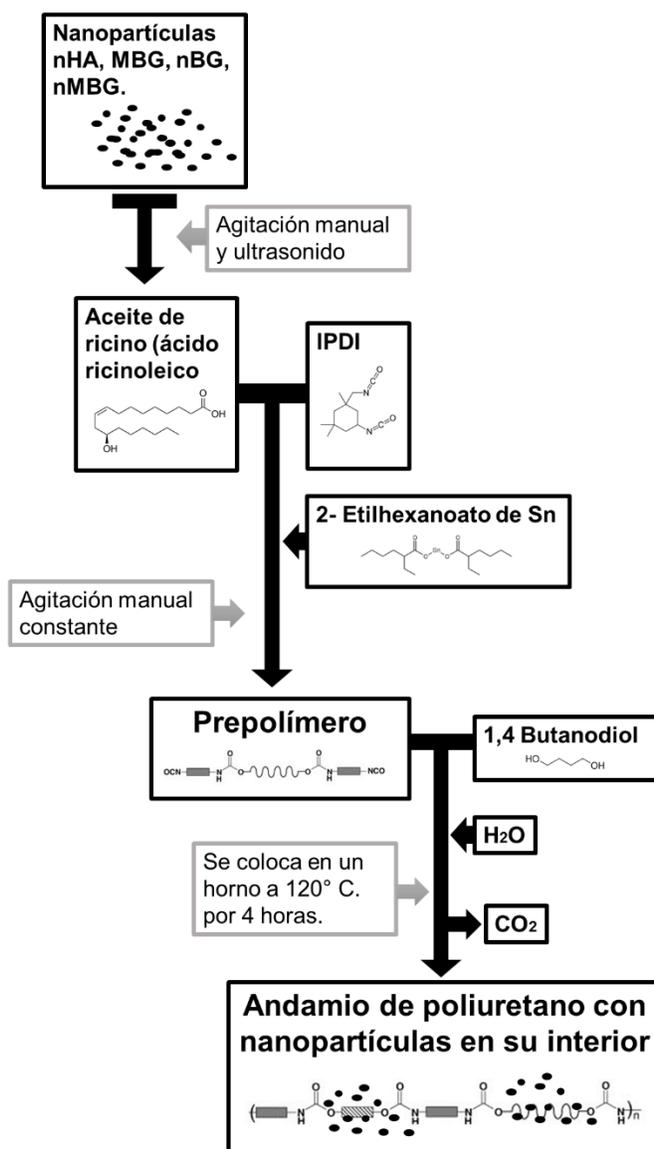
#### **1.4. Síntesis de nanopartículas de vidrio bioactivo mesoporoso.**

Nanoesferas de vidrio bioactivo de estructura porosa ordenada (nMBG) se sintetizaron utilizando bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), en la que 6,6 g de CTAB se disolvieron en 600 ml de agua destilada con 12 ml de hidróxido de amoníaco. Después de agitar durante 1 h a 37 ° C, 30 ml de TEOS y 31,21 g de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  se añadieron a la solución y se agitaron durante 6 h. Los productos se recogieron por filtración al vacío y se lavaron con agua destilada y etanol 3 veces. (El etanol se mezclara con HCl 1% para lavar los polvos y eliminar CTAB). Después se secaron a 60 ° C durante 24 h y los polvos obtenidos se calcinaron a 550 ° C durante 2 h. (Wu y cols., 2013).

#### **1.5. Preparación de bionanocompuestos de poliuretano.**

Los bionanocompuestos de PU se sintetizaron mediante el método *in situ* con formación de espuma simultánea (Li Wang y cols., 2009). Se ocupó aceite de ricino que contiene los grupos polioles o segmento flexible del PU; el diisocianato alifático de isoforona (IPDI) como un agente no tóxico y seguro para producir el segmento rígido de la polimerización de PU; el 1,4 butanodiol como agente extensor de cadena y participe también del segmento rígido del PU; se evaluó el uso de 2-etilhexanoato de estaño como catalizador debido a la poca cinética de reacción de IPDI (Sardon y cols., 2009); y  $\text{H}_2\text{O}$ , que al reaccionar con IPDI liberó  $\text{CO}_2$  permitiendo la expansión del PU, creando una esponja. De manera experimental se ocuparon diferentes proporciones molares para estos reactivos, encontrando la proporción ideal que permita la expansión del PU. La síntesis de PU se llevó a cabo en un reactor de vidrio de 500 ml de fondo redondo bajo una atmósfera de nitrógeno. Se mezclaron el aceite de ricino y las biocerámicas en los porcentajes de 2,5% y 5% del peso total del polímero, agitándose de manera uniforme con un agitador manual vertical y ultrasonido. Una vez que las nanopartículas se dispersaron, se añadió IPDI gota a gota (el IPDI previamente estuvo refrigerado a -10°C) enseguida se adicionó el 2- etilhexanoato de Sn. Se mantuvo la reacción

durante un período de 30 minutos o hasta que se formó el prepolímero que se caracteriza por una agitación se ve más dificultosa. A continuación se agregó a la mezcla 1,4-butanodiol y agua desionizada en constante agitación. La última mezcla se colocó en un horno a 120 ° C durante 4 horas, para completar la polimerización y la formación de la espuma (**Figura 7**), buscando obtener un andamio poroso de PU con diferentes biocerámicas como se observa en la **Tabla 1**.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento utilizado para la síntesis de bionanocompuestos de PU.

**Tabla 1:** Biomateriales sintetizados, andamio de poliuretano puro y diferentes nanocompósitos.

<b>Andamio de poliuretano</b>	<b>PU</b>
Poliuretano con 2,5% partículas de vidrio bioactivo mesoporoso	MBG (2,5%)/PU
Poliuretano con 5% partículas de vidrio bioactivo mesoporoso	MBG (5%)/PU
Poliuretano con 2,5% nanopartículas de hidroxiapatita	nHA (2,5%)/PU
Poliuretano con 5% nanopartículas de hidroxiapatita	nHA (5%)/PU
Poliuretano con 2,5% nanopartículas de vidrio bioactivo	nBG (2,5%)/PU
Poliuretano con 5% nanopartículas de vidrio bioactivo	nBG (5%)/PU
Poliuretano con 2,5% nanopartículas de vidrio bioactivo mesoporoso	nMBG (2,5%)/PU
Poliuretano con 5% nanopartículas de vidrio bioactivo mesoporoso	nMBG (5%)/PU

## 2. Caracterización de bionanocompósitos

### 2.1. Difracción de Rayos X (DRX).

Para identificar la estructura cristalina de PU, los bionanocompósitos y la formación de apatita en SBF, se utilizó el análisis de difracción de rayos X (DRX) con un difractómetro de rayos-X de polvo, SIEMES D 5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$  el cual permite obtener información acerca de las propiedades cristalográficas.

### 2.2. Espectroscopia infrarroja de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR).

El FTIR-ATR permite la identificación de grupos funcionales de la estructura química de los materiales. Mediante FTIR-ATR observó la estructura del PU y de los bionanocompósitos en un espectrofotómetro Bruker modelo Alpha. Se analizó

la posible formación de la capa de apatita de los bionanocompuestos, a través de la combinación de bandas características de la estructura de la HA y BG.

### **2.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM-EDX)**

La estructura porosa de los bionanocompuestos fue analizada mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), equipada con microanálisis elemental de energía dispersiva de rayos X (EDX), para identificar los elementos constituyentes de cada material. Se ocupó un microscopio marca JEOL modelo JSM-IT300LV, (Laboratorio de microscopia, Facultad de Odontología Universidad de Chile)

### **2.4. Ensayos de propiedades mecánicas.**

Se realizaron pruebas mecánicas de compresión con bionanocompuestos cortados en 4 x 4 x 5 mm. Con la máquina de microensayo DEBEN microtest en modo compresión. Los resultados de cada bionanocompuestos fueron comparados entre sí.

### **3. Ensayos de bioactividad en fluido corporal simulado (SBF)**

La capacidad de los bionanocompuestos 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 la solución de SBF bajo la siguiente composición iónica estándar: Na<sup>+</sup>: 142.0 mM; K<sup>+</sup>: 5.0 mM; Ca<sup>2+</sup>: 2.5 mM; Mg<sup>2+</sup>: 1.5 mM; Cl<sup>-</sup>: 148.0 mM; (HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: 4.2 mM; (HPO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 1.0 mM; (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: 0.5 mM. Ocupando los reactivos del **Anexo 1**. Se disolvieron estas sales en un vaso precipitado de 1000 mL, en el mismo orden en el cual se mencionan. 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 ((CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub>) 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. Muestras cubicas de bionanocompósitos fueron sumergidos 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 (24 horas, 3 días y 7 días), los andamios fueron sacados del SBF, lavados con agua destilada y secados a 40°C por 24 horas. La formación de hidroxiapatita en la superficie de los bionanocompósitos se analizó mediante ATR-FTIR, DRX y SEM-EDX.

#### **4. Cultivos celulares**

##### **4.1. Ensayos de proliferación celular.**

La viabilidad y proliferación celular en el andamio de PU y en los bionanocompósitos se evaluaron utilizando el (2-il-4,5-dimetiltiazol) 5- (fenil 3-carboximetil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio (MTS) de ensayo 3- según el protocolo proporcionado por el fabricante. Para ello, células madres de la pulpa dental humana (DPSCs) brindadas por el laboratorio de nanobiomateriales de la facultad de odontología u de Chile, se cultivaron en  $\alpha$ -MEM suplementado con 10% FBS con muestras del bionanocompósitos con dimensiones de 8x8x2 mm, previamente esterilizados con autoclave, usando una densidad de  $5 \times 10^3$  células / cm<sup>2</sup>. Después de un tiempo predeterminado de 1 y 10 días, las células se incubaron durante dos horas con MTS. Luego se midió la absorbancia del sobrenadante a 492 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia observada correspondería al producto de la reducción de la MTS (formazán) por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables presentes en el cultivo. (Buttke y cols., 1993).

## **5.- Análisis estadístico**

Los datos de la proliferación celular MTS se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). Para comprobar la varianza de la distribución de los datos para las pruebas mecánicas y cultivo celulares, se realizó la prueba estadística de 1way ANOVA. Se utilizaron niveles de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS.

### 1. Síntesis de bionanocompuestos de poliuretano.

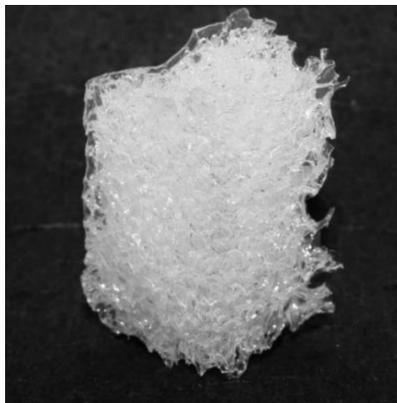
#### 1.1 Optimización de la composición de síntesis de PU.

Previo a la creación de poliuretano (Li Wang y cols., 2009) se realizó una serie de reacciones experimentales previas, optimizando la síntesis de PU, con la utilización de 2-etilhexanoato de estaño para acelerar la reactividad del diisocianato de isoflorona (IPDI) (Sardon y cols., 2009) y mejorar el espumado del poliuretano, dando como resultado las proporciones molares de los reactivos mostrados en la **Tabla 2**. En la síntesis de bionanocompuestos de PU, las partículas biocerámicas fueron agregadas en el aceite de ricino por el método *in situ*, no alterando la macroestructura original del andamio de PU.

**Tabla 2.** Cantidades molares óptimas de reactivos encontradas para la síntesis de espumas de PU.

Reactivo	Cantidad (moles)
Aceite de Ricino	1,0
IPDI	2,5
1-4 Butanediol	1,0
2- etilhexanoato de Sn	0,055
H <sub>2</sub> O	1,5

En la **Figura 8** se presenta una fotografía del andamio de PU puro obtenido con la composición antes indicada.



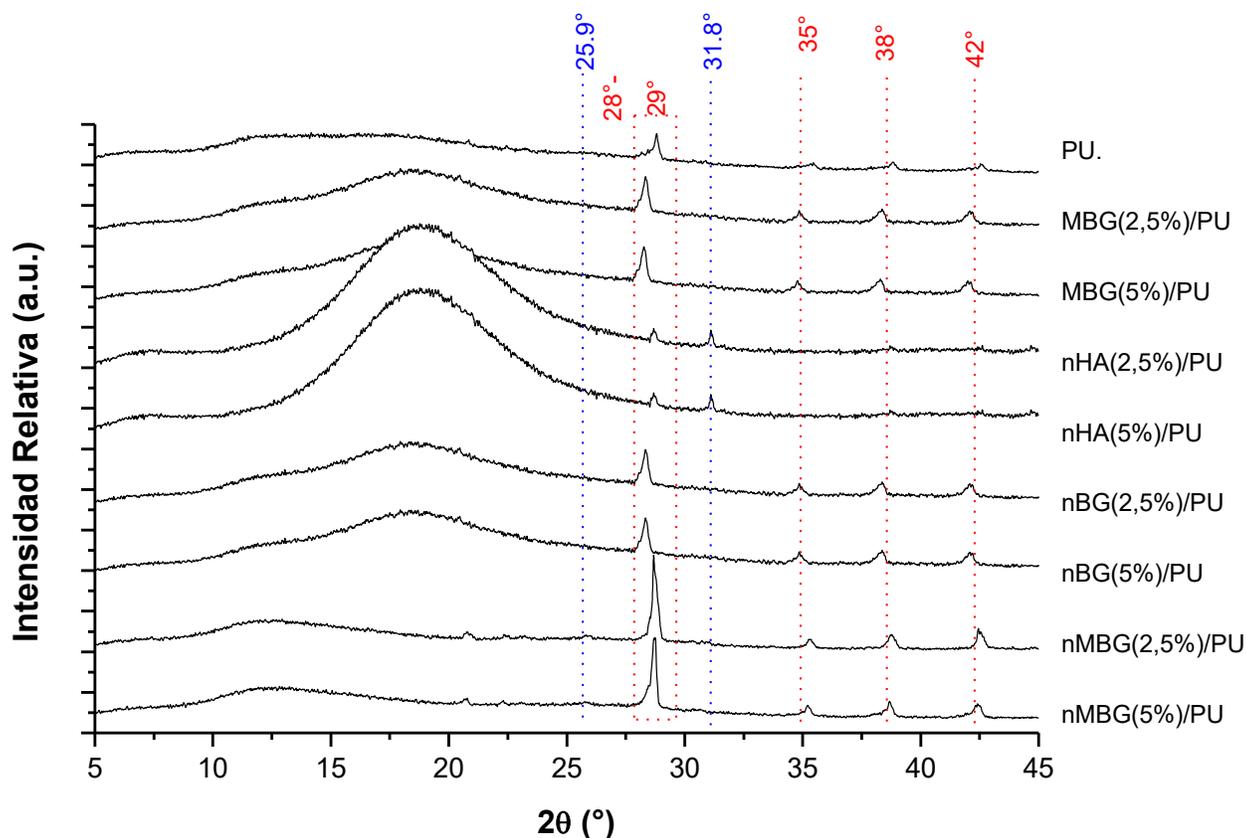
**Figura 8.** Fotografía de la macroestructura de andamio de PU

## **2. Caracterización del andamio de PU y bionanocompuestos.**

### **2.1. Caracterización mediante difracción de rayos X (XRD).**

En la **Figura 9** se observa el análisis XRD de los bionanocompuestos. El patrón obtenido en PU y todos los bionanocompuestos, está de acuerdo con la naturaleza amorfa de la matriz polimérica que se aprecia en una banda amplia entre  $5^{\circ}$ - $27^{\circ}$  (Kim y cols 2003). Los peaks de  $28^{\circ}$ - $29^{\circ}$ ,  $35^{\circ}$ ,  $38^{\circ}$  y  $42^{\circ}$  corresponde a dominios cristalinos que pueden tener los segmentos rígido del poliuretano y que cambian según los reactivos utilizados, en este caso IPDI y 1,4 butanediol (Pergal y cols., 2014).

El BG presenta una banda amplia sin la presencia de señales, entre  $15$ - $35^{\circ}$  ( $2\theta$ ), lo cual que corresponde a la estructura amorfa de este material que se ha reportado previamente (Valenzuela y cols., 2012). Los bionanocompuestos en base a BG no poseen esta banda amplia de la biocerámica, ya que se enmascara con la de PU. Sin embargo, el patrón DRX del bionanocompuestos a base de hidroxiapatita: nHA (2,5%)/PU, nHA (5%)/PU, presentan un peak de difracción característicos de las partículas cristalinas de hidroxiapatita contenidas en la matriz a  $31,8^{\circ}$  ( $2\theta$ ). El otro peak característico de HA de  $25,9^{\circ}$  no aparece porque se enmascara con la difracción del PU (Hughes y cols., 1989).



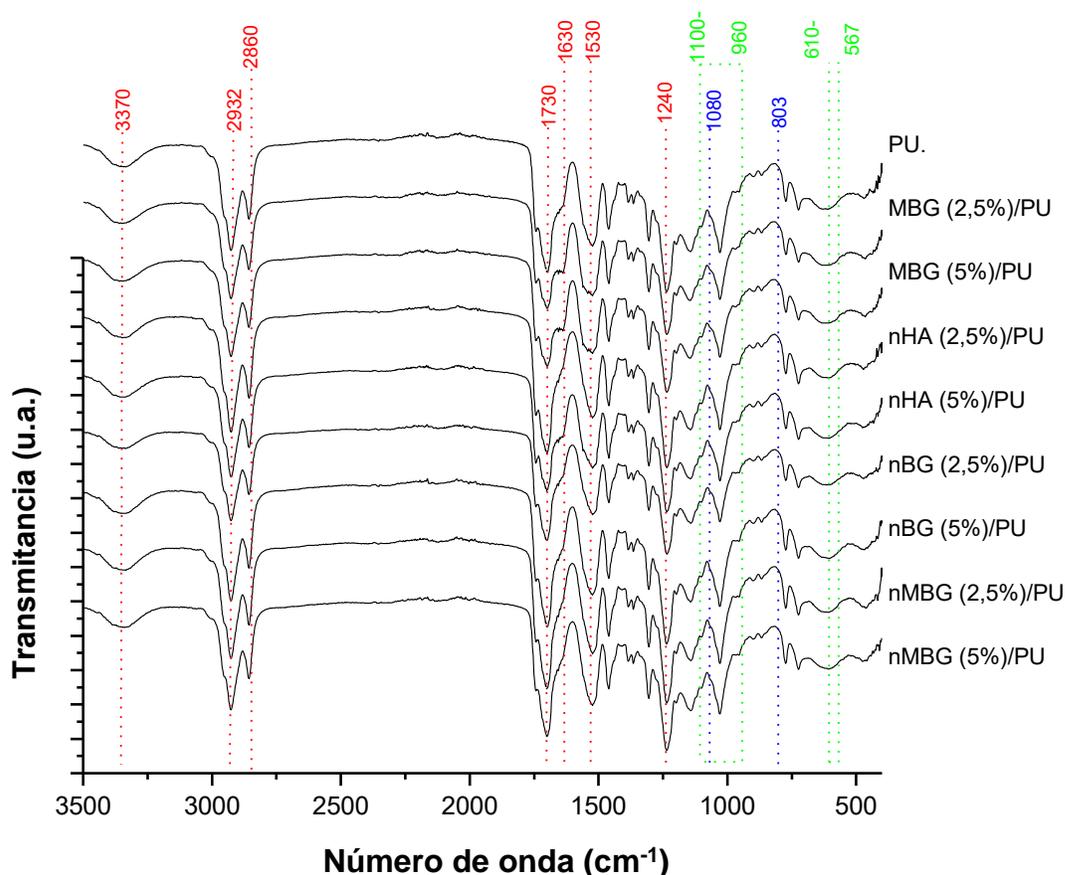
**Figura 9.** Patrón DRX de PU y bionanocompuestos. En rojo los peaks de difracción de dominios cristalinos del segmento rígido de PU. En azul peaks característicos de HA.

### 2.3. Caracterización mediante espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier- Reflexión total atenuada (FTIR-ATR).

La espectroscopia infrarrojo permite analizar la estructura química de una sustancia o material. En la **Figura 10** se presentan los espectros FTIR-ATR de PU y los bionanocompuestos estudiados. El espectro de PU mostró bandas vibratorias características a  $3370\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los enlaces N-H, a  $2932\text{ cm}^{-1}$  que son los estiramientos asimétricos de los grupos C-H y a  $2860\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a los estiramientos simétricos de C-H; ambos correspondientes al grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ). La banda de  $1730\text{ cm}^{-1}$  fue asignada al grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) del poliéster del uretano. A  $1630$  y  $1530\text{ cm}^{-1}$  se observó el enlace amida secundaria ( $\text{NH}-\text{C}$ ) del

enlace uretano y la de  $1240\text{ cm}^{-1}$  los enlaces CO-N. Estas absorciones han sido reportadas previamente (Ryszkowska y cols., 2010).

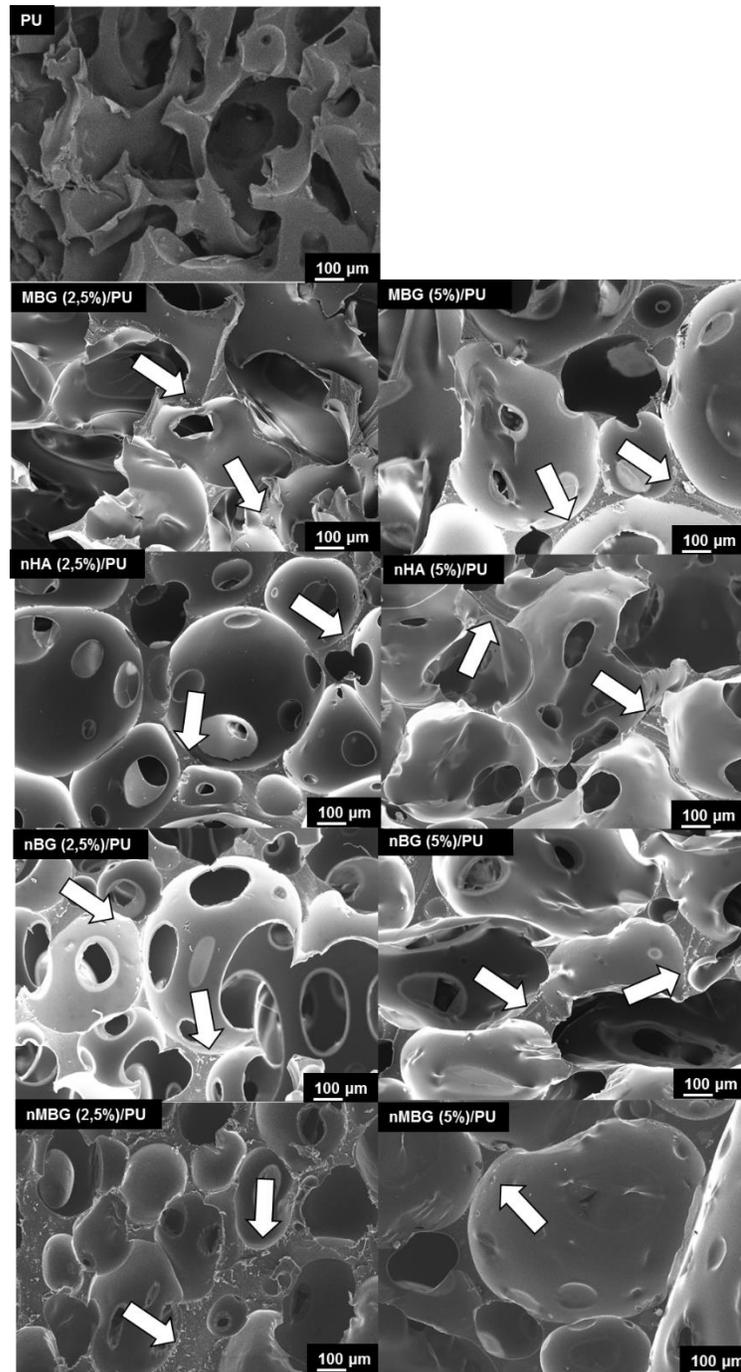
Los bionanocompuestos mostraron las mismas bandas correspondientes al poliuretano segmentado, como se ha mencionado en publicaciones anteriores (Ryszkowska y cols., 2010). En los bionanocompuestos de nHA (2,5%)/PU y nHA (5%)/PU no se observaron bandas vibratorias acentuadas, típicas de hidroxiapatita, entre  $960\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$  y  $610\text{-}567\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a distintos modos vibratorios del grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ). (Xia y Chang, 2007). En el caso de los bionanocompuestos MBG (2,5%)/PU, MBG (5%)/PU, nBG (2,5%)/PU, nBG (5%)/PU, nMBG (2,5%)/PU y nMBG (5%)/PU, tampoco se observaron las bandas vibratorias del vidrio bioactivo (BG) a  $803\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las vibraciones simétricas de Si-O-Si ni a  $1080\text{ cm}^{-1}$  para SiO (Oliveira y cols., 2012).



**Figura 10.** Espectros FTIR-ATR de PU y bionanocompuestos. En rojo las bandas vibratorias correspondientes a PU. En verde la zona donde estarían ondas vibratorias de HA. En azul las bandas vibratorias del vidrio bioactivo (BG).

## 2.4. Caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

La estructura porosa de PU y de los bionanocompuestos fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en la **Figura 11** con magnificación 100x. Se observa la estructura porosa del material y las flechas blancas indican el área donde hay biocerámicas.



**Figura 11.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las flechas blancas indican la presencia de las biocerámicas embebidas en la matriz del polímero.

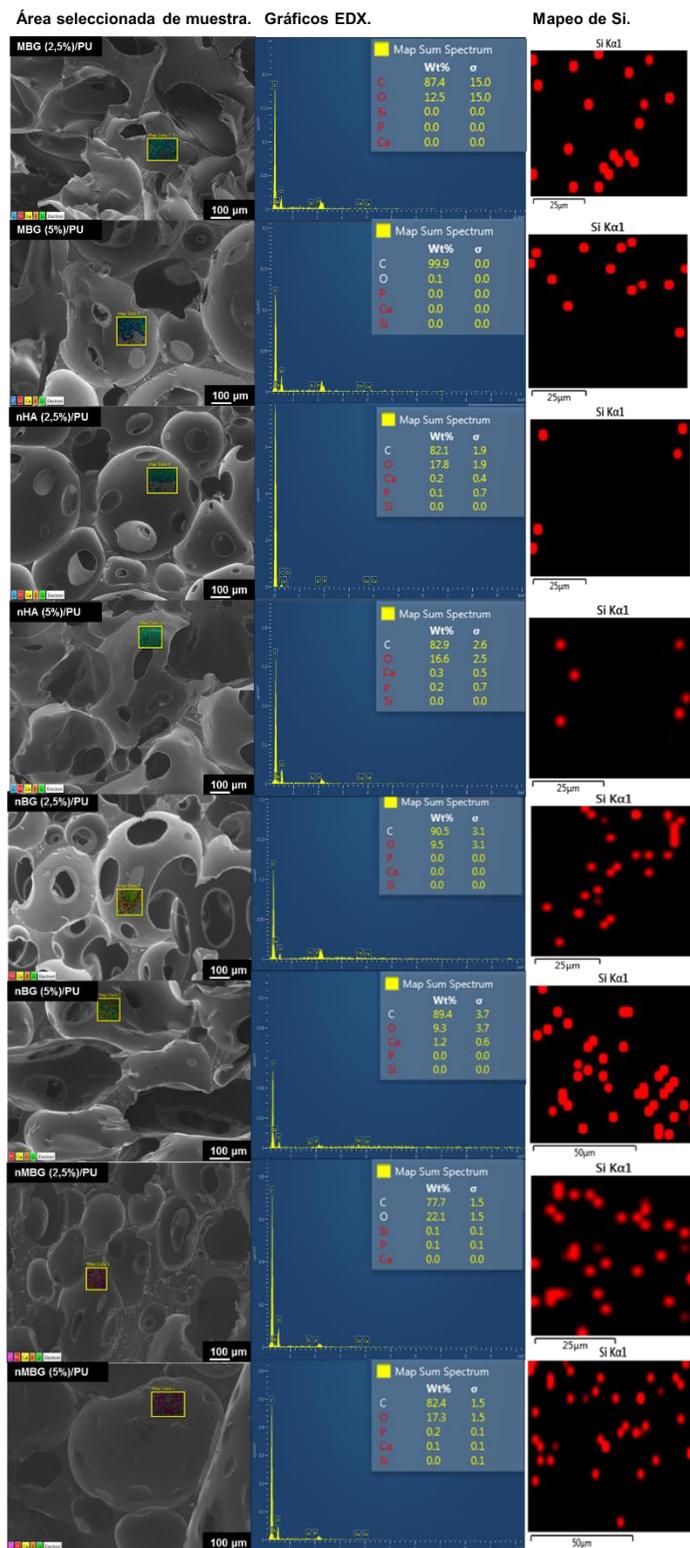
El andamio de PU y los bionanocompósitos, en general presentan poros heterogéneos comprendidos entre los 40-300  $\mu\text{m}$  de tamaño. En los bionanocompósitos con nanoesferas solidas (nHA y nBG) se observa una mayor interconectividad de estos poros y un patrón de porosidad diferente a PU y a los bionanocompósitos con vidrio bioactivo mesoporoso (MBG y nMBG). En forma particular el nMBG (2,5%)/PU y nMBG (5%)/PU, tienen una menor cantidad de poros, más homogéneos, más compactos y con mucha menos interconectividad que los otros nanocompósitos. Las partículas incorporadas en los nanocompósitos se pueden ver en las paredes de los poros del polímero (flechas blancas).

## 2.5. Caracterización mediante espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (SEM-EDX)

El análisis elemental EDX asociado a la observación por microscopía SEM (**Figura 12**), permite conocer la cantidad presente de cada elemento químico en el material estudiado. Los límites de detección de EDX corresponden al 0,5% de Wt% (Goldstein y cols., 2003), por lo tanto valores inferiores podrían no representar fielmente a la muestra examinada. Se realizó EDX con análisis elemental para C, O, Ca, P y Si más un mapeo específico para el elemento de Si (BG). En todos los bionanocompósitos analizados hay un mayor porcentaje en peso (Wt%) de carbono y oxígeno correspondiente a la estructura polimérica del andamio. En menor porcentaje hay Calcio, Fosfato y Silicio que corresponde a la composición química de las biocerámicas que se observa en la **Tabla 3**.

En el caso de nHA (2,5%)/PU, nHA (5%)/PU y en nBG(2,5%) hay mayores porcentajes de peso de la relación (Ca+P), 0,3% Wt 0,5% Wt y 0,5% Wt respectivamente (**Tabla 3**). Con respecto a la razón molar Ca/P, esta 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 teórico de 1,667

(Hughes y cols., 1989). Los valores más cercanos lo tienen nHA (2,5%)/PU y nHA (5%)/PU.



**Figura 12.** Análisis elemental de los bionanocompuestos por espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) acoplado a microscopio SEM. En color rojo el mapeo específico para silicio.

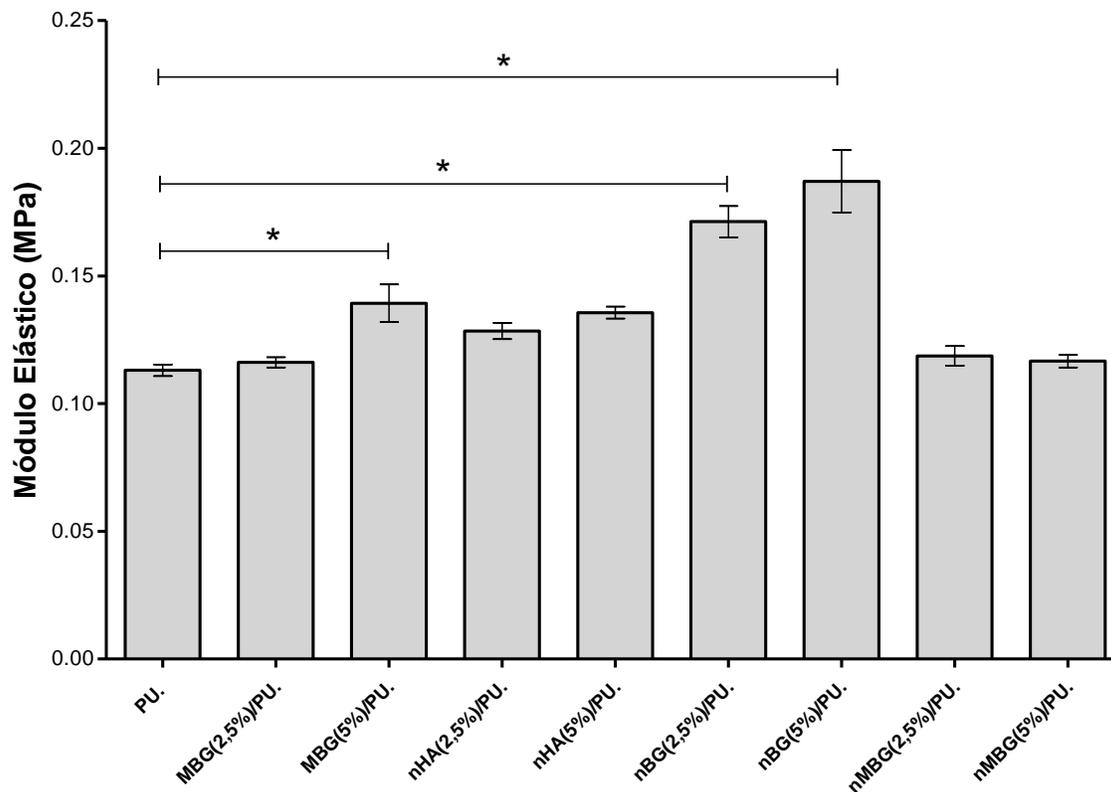
En el mapeo específico de Si los bionanocompuestos en base a HA poseen menos señal de este elemento ya que en su estructura molecular no hay Si ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), a diferencia de los bionanocompuestos en base de BG que sí poseen Si en su estructura. (24.5Na<sub>2</sub>O; 24.5CaO; 45.0SiO<sub>2</sub>; 6.0P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> % masa)

**Tabla 3.** Contenidos de calcio y fósforo en los bionanocompuestos determinado mediante análisis EDX.

<b>Bionanocompuestos</b>	<b>Ca Wt%</b>	<b>P Wt%</b>	<b>(Ca+P) Wt%</b>	<b>Relación molar Ca/P</b>
MBG(2,5%)/PU	0	0	0	s.d.
MBG(5%)/PU	0	0	0	s.d.
nHA(2,5%)/PU	0,2	0,1	<b>0,3</b>	<b>1,5</b>
nHA(5%)/PU	0,3	0,2	<b>0,5</b>	<b>1,125</b>
nBG(2,5%)/PU	0	0	0	s.d.
nBG (5%)/PU	1,2	0	1,2	s.d.
nMBG (2,5%)/PU	0,1	0,2	0,3	0,375
nMBG (5%)/PU	0	0	0	s.d.

## 2.6. Pruebas Mecánicas.

La **Figura 13** representa los módulos elásticos de compresión obtenidos para PU y los bionanocompuestos. En comparación con el andamio de PU los biocompuestos MBG (5%)/PU nBG (2,5%)/PU y nBG (5%)/PU tienen un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) en el módulo elástico de compresión. Respecto a bionanocompuestos con la misma biocerámica pero a diferentes porcentajes, solo en MBG (5%)/PU se observó un aumento significativo comparado con MBG (2,5%)/PU ( $p < 0,05$ ). En relación a los bionanocompuestos con diferente biocerámica, los de nanocompuestos de nBG tenían significativamente mejor módulo elástico de compresión que PU, nHA, MBG y nMBG ( $p < 0,05$ ).

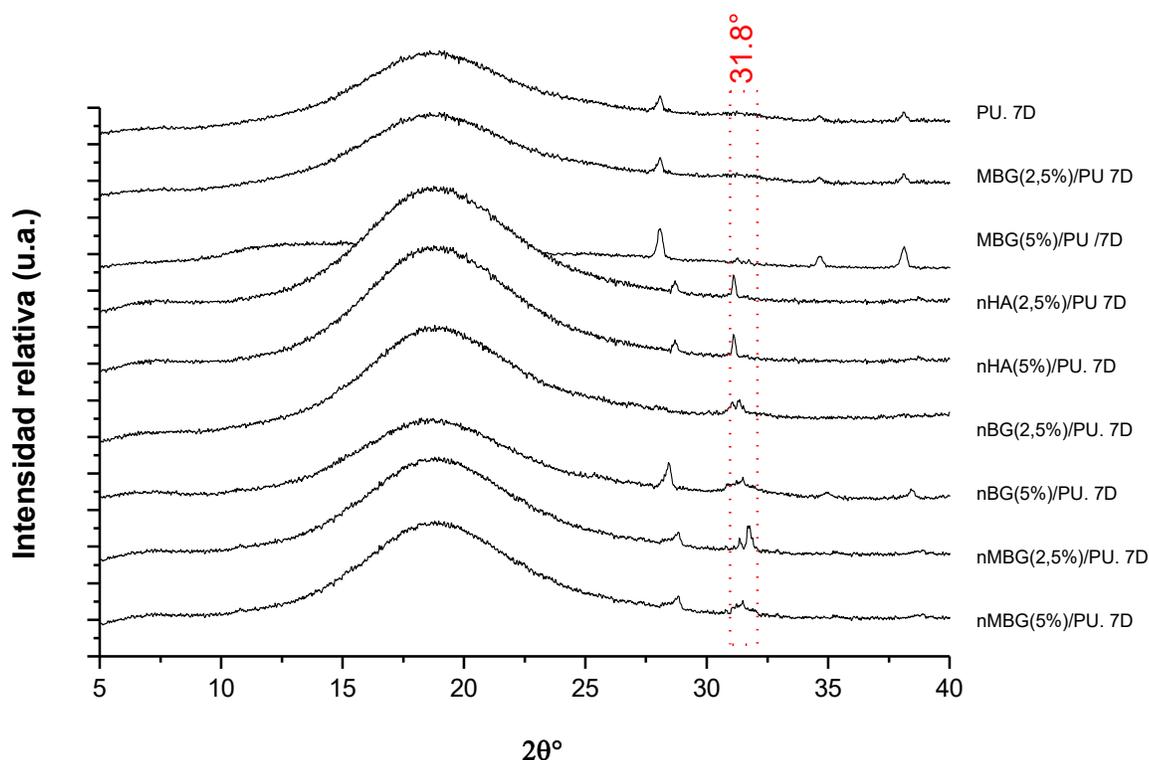


**Figura 13.** Valores de módulo elástico de compresión de PU y bionanocompuestos. Las barras representan el promedio de 4 muestras de cada material. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Los \* sobre las barras corresponden a valores con diferencias significativas en comparación al andamio puro (PU) ( $p < 0.05$ ).

### 3. Ensayos de bioactividad *in vitro* en fluido corporal simulado SBF.

#### 3.1. Difracción de rayos X (XRD).

La formación de apatita en la superficie de PU y los bionanocompuestos luego de 7 días en SBF se muestra en la **Figura 14**. La presencia de apatita se puede identificar por la intensidad del peak más característico de la fase apatita a  $31,8^\circ$ , correspondiente a la reflexión 211 del cristal de hidroxiapatita (Hughes y cols., 1989).



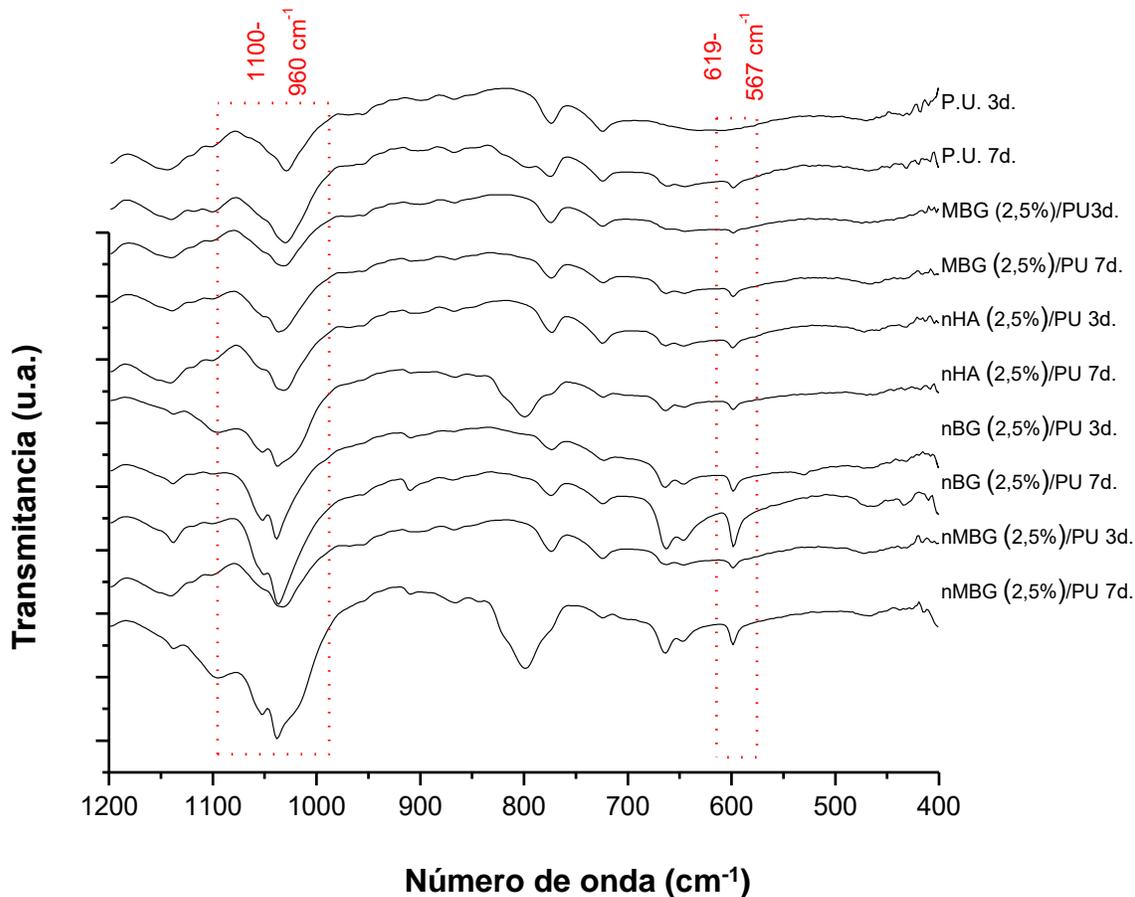
**Figura 14.** Patrón DRX de PU y bionanocompuestos luego de 7 días de inmersión en SBF de. En color rojo el peak de difracción característico de HA.

El peak de apatita a  $31,8^\circ$  se observa en los siguientes biomateriales: nHA (2,5%)/PU, nHA (5%)/PU, nBG (2,5%)/PU, nBG (5%)/PU, nMBG (2,5%)/PU y nMBG (5%)/PU. Los bionanocompositos nBG (2,5%)/PU, nBG (5%)/PU, nMBG (2,5%)/PU y nMBG (5%)/PU obtuvieron un aumento de la intensidad del peak en comparación al DRX inicial de caracterización (**Figura 9**).

### 3.2.- Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier - Reflexión total atenuada (FTIR-ATR).

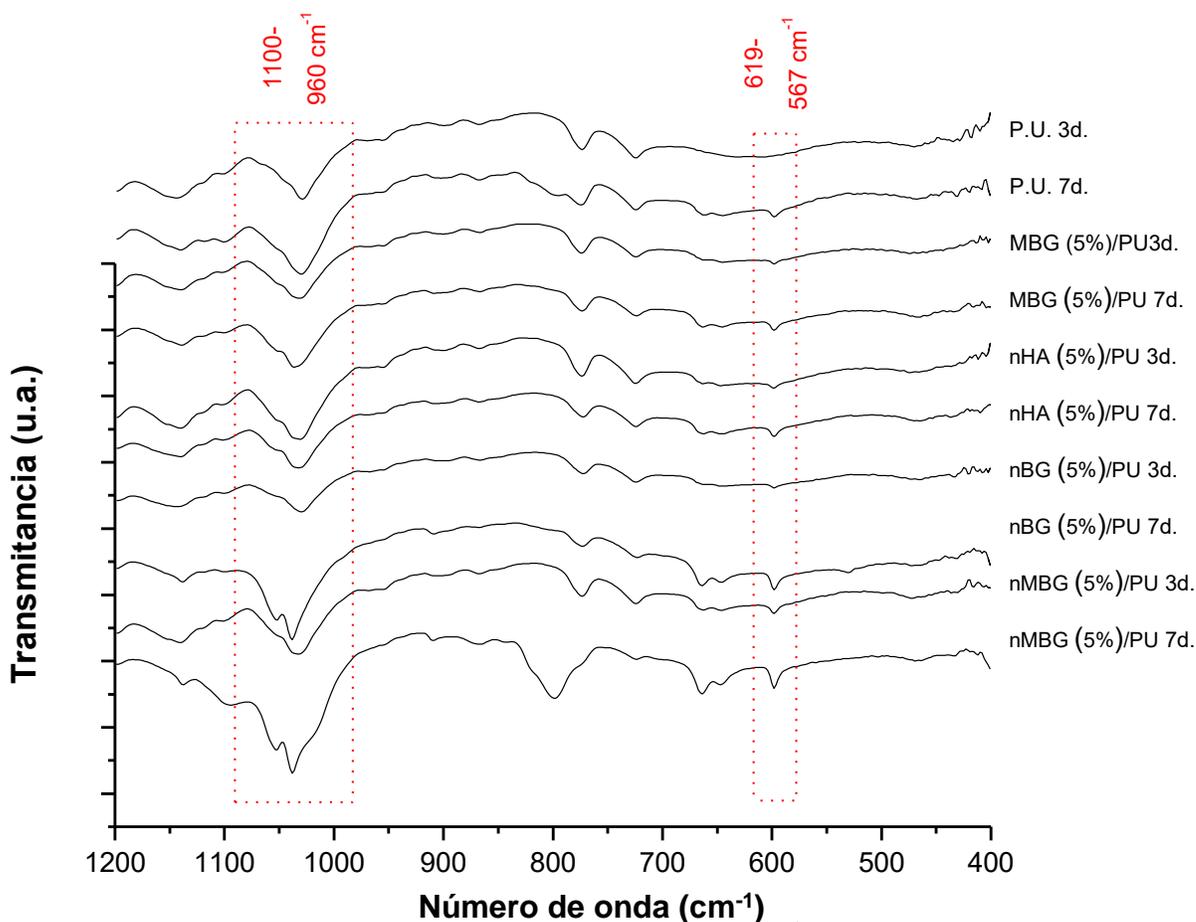
La formación de apatita de los bionanocompuestos con 2,5% y 5% de partículas luego de 3 y 7 días en SBF, fue constatada mediante análisis FTIR-ATR (**Figuras 15 y 16**). En el análisis FTIR se observa la presencia de las bandas características de la hidroxiapatita a  $1100-960\text{ cm}^{-1}$ ,  $610\text{ cm}^{-1}$  y  $567\text{ cm}^{-1}$ ,

correspondientes a distintos modos vibratorios del grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) de la estructura de la hidroxiapatita.



**Figura 15.** Análisis de FTIR-ART de Bionanocompósitos al 2,5% de biocerámicas en SBF de 3 y 7 días. En rojo la zona donde se encuentran modos vibratorios del grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) correspondiente a las bandas de 1100-960  $\text{cm}^{-1}$  y 610-567  $\text{cm}^{-1}$ .

En todos los bionanocompósitos se observa la formación de apatita en SBF a los 3 días, aumentando al día 7, donde incluso PU obtiene un leve peak en la banda de 610-567  $\text{cm}^{-1}$ . A pesar de que en 1100-960  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra una banda propia del PU, esta aumentó en algunos bionanocompósitos cuando hay una mayor formación de apatita.

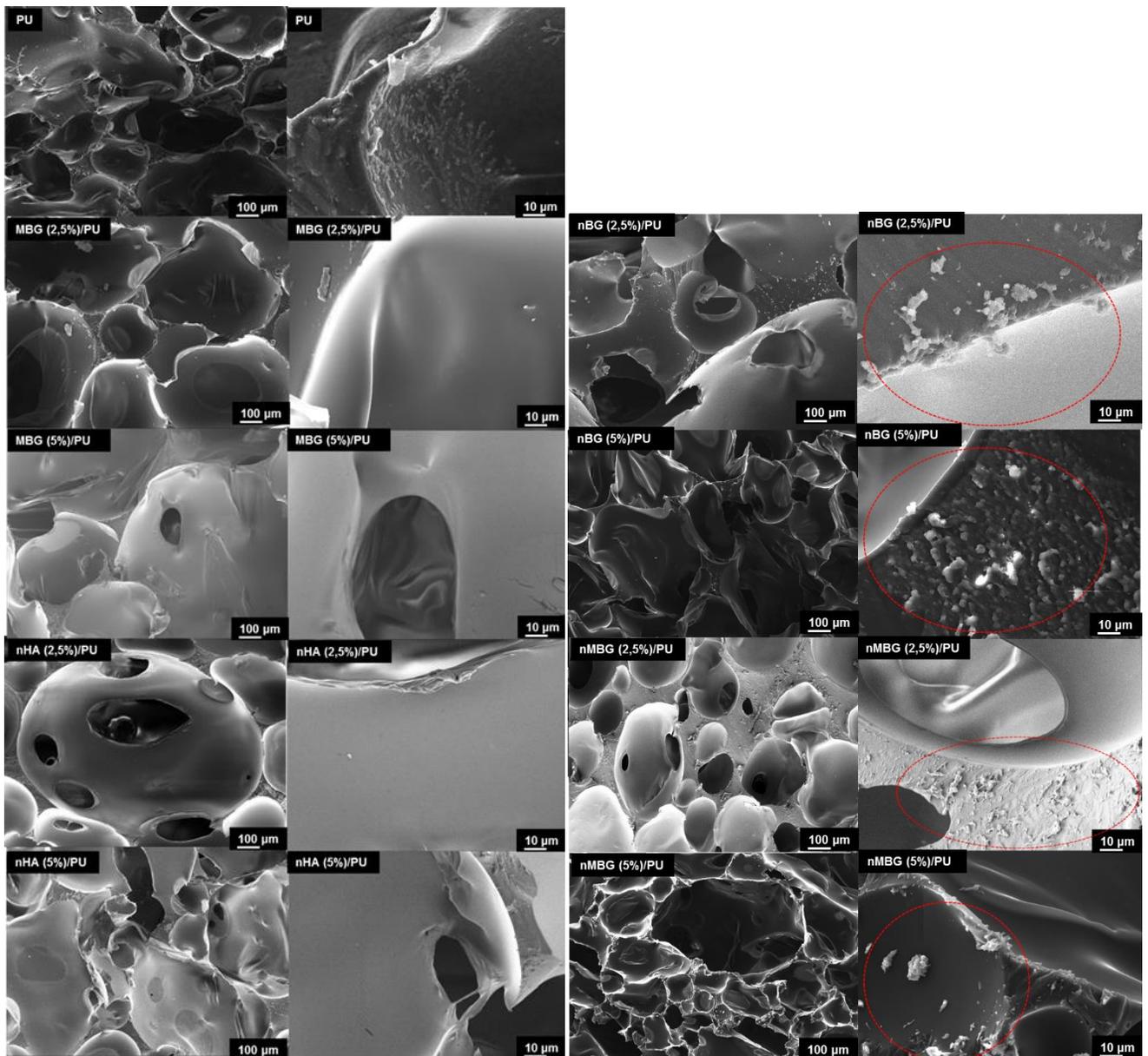


**Figura 16.** Análisis de FTIR-ART de bionanocompuestos al 5% de biocerámicas en SBF de 3 y 7 días. En rojo la zona correspondiente modos vibratorios del grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ), las bandas de 1100-960  $\text{cm}^{-1}$  y 610-567  $\text{cm}^{-1}$ .

De acuerdo al análisis FTIR, la formación de apatía en los bionanocompuestos luego de 7 días en SBF aumentó en el siguiente orden: nBG(2,5%)/PU < nMBG(5%)/PU < nBG(5%)/PU < nMBG(2,5%)/PU. Se encontró una menor cantidad de apatita en los bionanocompuestos a base de nHA y MBG.

### 3.5. Microscopia electrónica de barrido (SEM).

La formación de apatita tipo ósea en PU y en los bionanocompuestos se analizó mediante SEM luego de 7 días en SBF (**Figura 17**). En PU se observan sales depositadas producto del procedimiento de secado después de estar expuestas a SBF que no son necesariamente cristales de apatita.

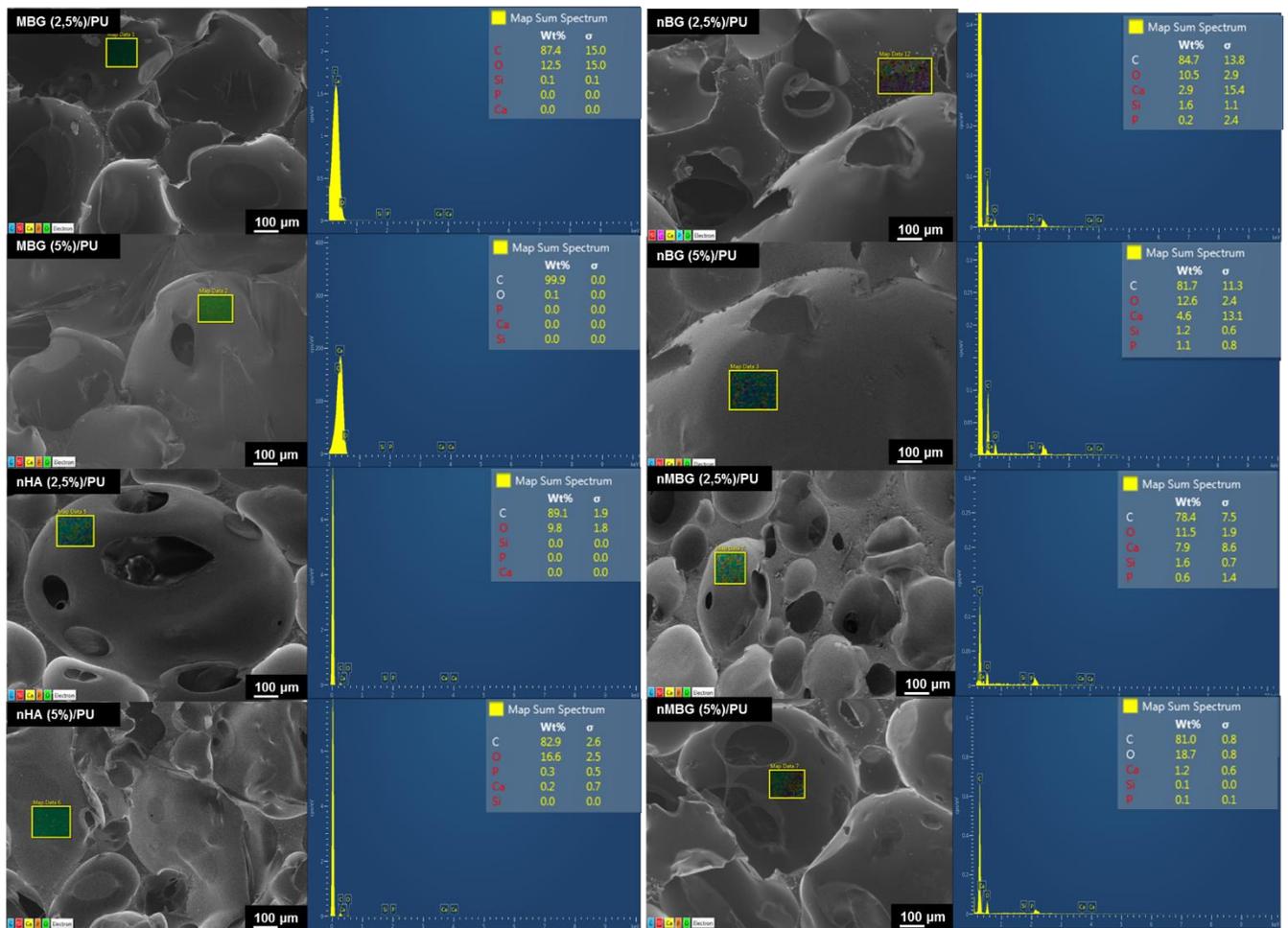


**Figura 17.** Microscopia electrónica de barrido (SEM). En la primera columna zoom a 100X. En la segunda columna zoom a 1000X. En círculos rojos la presencia de depósitos de apatita el interior del andamio de PU.

En las imágenes SEM con magnificación de 1000x se observan que los bionanocompuestos de nBG y nMBG obtuvieron una mayor formación de cristales de apatita que los bionanocompuestos de MBG y nHA. En nBG (5%)/PU se aprecia la formación de una capa uniforme, continua, densa y constituida por un mayor número de cristales al interior del andamio, respecto a los demás materiales estudiados.

### **3.6.- Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (SEM-EDX).**

La composición química de la apatita formada sobre los bionanocompositos, se evaluó de acuerdo al porcentaje en peso de calcio y fósforo (Ca, P) (Wt%). Los mayores porcentajes en peso corresponden a C y O correspondiente a la estructura polimérica de PU. Los valores se observan en la **Figura 18 y Tabla 4**. Con respecto a la relación peso de calcio y fósforo (Ca+P) (Wt%) los bionanocompuestos que más porcentaje obtuvieron fueron nMBG (2,5%)/PU con 9,5% Wt, luego nBG (5%)/PU con 5.7% Wt, nBG (2,5%)/PU con 3.1% Wt% y nMBG (5%)/PU con 1.3% Wt; logrando formar apatita en SBF a los 7 días. En nHA (5%)/PU hay un 0.5% Wt de Ca+P pero en comparación al EDX inicial no es significativo. En los bionanocompuestos de MBG y nHA(2,5%) no se detectó la presencia de Ca y P debido que el contenido de estos elementos estaba por debajo de los límites de detección de EDX (0,5% de Wt) (Goldstein y cols., 2003). 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 teórico de 1.667 (Hughes y cols., 1989). Los valores más cercanos lo tienen nBG(5%)/PU (Ca/P= 3.1) luego nMBG (2,5%)PU. (Ca/P= 3.7)



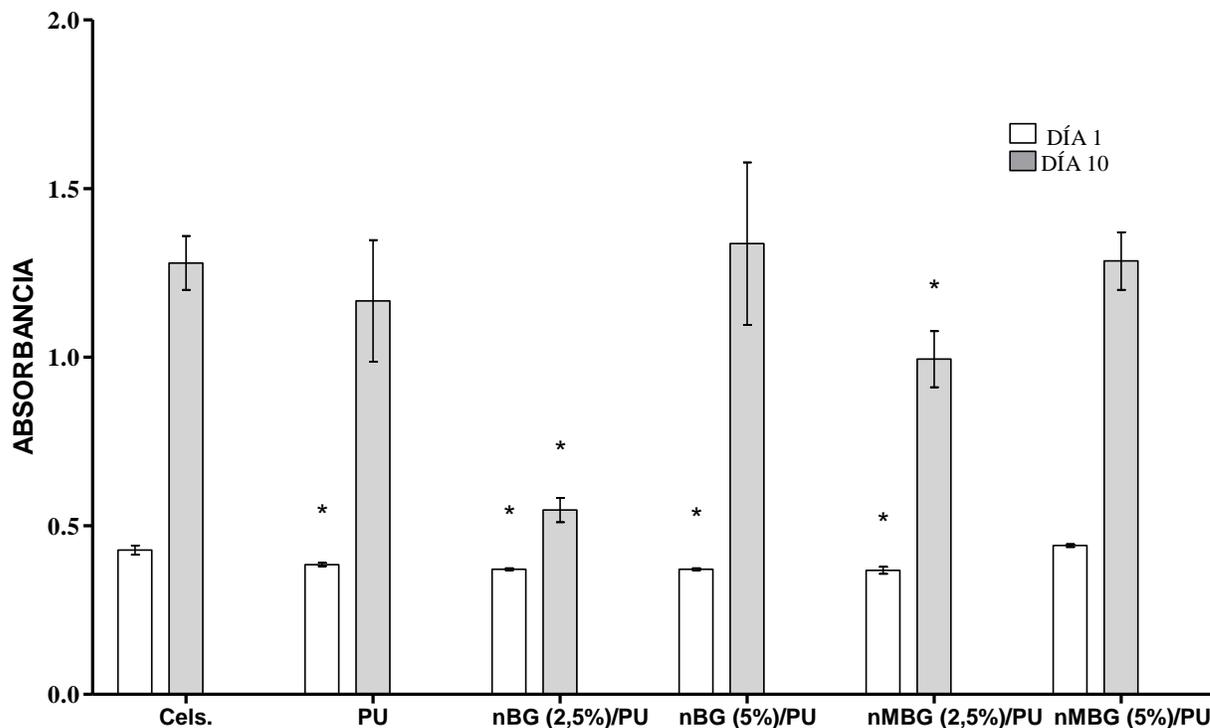
**Figura 18.** Análisis elemental por espectroscopia de rayos X de energía dispersiva o EDX en bionanocompuestos después de 7 días en SBF.

**Tabla 4.** Contenidos de calcio y fosforo de la superficie de los andamios luego de 7 días de inmersión en SBF determinado mediante análisis EDX.

<b>Bionanocompósitos</b>	<b>Ca Wt%</b>	<b>P Wt%</b>	<b>(Ca+P) Wt%</b>	<b>Relación molar Ca/P</b>
MBG(2,5%)/PU	0	0	0	s.d.
MBG(5%)/PU	0	0	0	s.d.
nHA(2,5%)/PU	0	0	0	s.d.
nHA(5%)/PU	0,2	0,3	0,5	0,5
nBG(2,5%)/PU	2,9	0,2	3,1	10,9
nBG(5%)/PU	4,6	1,1	5,7	<b>3,1</b>
nMBG(2,5%)/PU	7,9	1,6	9,5	<b>3,7</b>
nMBG(5%)/PU	1,2	0,1	1,3	9,0

#### **4.- Cultivos celulares.**

Para cultivo celular se seleccionaron los materiales que tuvieron una mayor formación de apatita en SBF a 7 días: nBG (2,5%)/PU, nBG (5%)/PU, nMBG (2,5%)/PU y nMBG (5%)/PU. La viabilidad y proliferación de células madres de la pulpa dental humana (DPSCs) en PU y los bionanocompósitos, se evaluó utilizando el ensayo MTS (**Figura 19**). Al primer día de la medición, en PU, nBG (2,5%)/PU, nBG (5%)/PU y en nMBG (2,5%)/PU hay una disminución de la viabilidad celular comparada con un cultivo celular normal ( $p < 0.05\%$ ) algo que no se observa en nMBG (5%)/PU.



**Figura 19.** Absorbancia de MTS que indica la viabilidad celular en PU, bionanocompuestos de nBG y nMBG. Las barras representan el promedio de 4 muestras de cada material al día 1 y al día 10. Los corchetes simbolizan la desviación estándar. Las barras con \* corresponden a valores con diferencias significativas comparado con un cultivo celular sin material a 1 y 10 días ( $p < 0.05$ ).

A los 10 días de la medición PU, nBG(5%)/PU, nMBG(5%)/PU no presentan cambios significativos en la viabilidad celular comparado entre ellos y con respecto al control de células sin ningún tipo de material. Se observó una disminución del 57% de la viabilidad celular en el caso de nBG (2,5%)/PU y un 22% en el caso de nMBG 2,5% en comparación al control. ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

En la síntesis de PU segmentado, tras una serie de experimentos se modificaron y optimizaron las proporciones molares de los reactivos ocupados en un estudio previo (Li Wang y cols., 2009). También se ocupó el 2-etilhexanoato de estaño para acelerar la reactividad del diisocianato de isoforona (IPDI). Estos catalizadores se ocupan usualmente para la fabricación de PU y en pequeñas cantidades (Sardon y cols., 2009), con el fin de reducir el tiempo de formación del prepolímero y lograr una mayor expansión y porosidad del PU. La forma, tamaño e interconectividad 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. En general, poros interconectados con un diámetro de 100  $\mu\text{m}$  o más y porosidad total 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 (30-40  $\mu\text{m}$ ) en todos los andamios, los cuales se ha demostrado que aportarían con la colonización fibrovascular y transporte de nutrientes (Armentano y cols., 2010), teniendo un rol importante en la osteoconducción (Yuan y cols., 1999). En SEM se pudo evidenciar la característica porosa de los andamios de PU y su interconectividad, apta para la utilización en ingeniería en tejido óseo.

En relación a los bionanocompuestos sintetizados el contenido de nanopartículas fue seleccionado a partir de evidencia obtenida por un trabajo en paralelo (Aguilar y cols., 2016), en el cual se indica que bionanocompuestos de PU con 2,5% y 5% de nanopartículas presentan en general mejores viabilidad celular que porcentajes más altos.

Cuando se sintetizó PU con 2,5% y 5% de biocerámicas, solo en los bionanocompuestos de MBG y nMBG hubo un cambio en la estructura porosa que aprecia en imágenes SEM. Se observa una disminución de la cantidad de poros y se ve un material más compacto. Esta menor cantidad de poros se puede explicar

debido a una mayor área superficial de MBG y de la nanoesfera de nMBG así como por poseer mesoporos en su estructura (Shi y cols., 2014) (Mendonça y cols, 2008). La disposición mesoporosa con cavidades altamente ordenada de estos materiales nanoestructurados permite el confinamiento de diferentes moléculas (Vallet y cols., 2001; Vallet y cols., 2011), pudiendo absorber trazas del catalizador 2-etilhexanoato de Sn afectando la reactividad de IPDI, generando de este modo una menor cantidad de CO<sub>2</sub>, gas que produce la porosidad del PU mientras polimeriza.

En las pruebas mecánicas MBG(5%)PU, nBG(2,5%)PU y nBG(5%)PU fueron los nanocompósitos que presentaron el mayor módulo elástico de compresión. A pesar de que se ha observado que la incorporación de biocerámicas a polímeros naturales refuerzan las propiedades mecánicas (Rezwan y cols., 2006; Ehrlich y cols., 2008), solo en un estudio ocurre el reforzamiento en PU al incorporar nBG a distintos porcentajes (Ryszkowska y cols., 2010), mientras que en otro trabajo no fue significativa su incorporación en pruebas de compresión (Aguilera y cols., 2016). El PU es un material versátil mecánicamente, al tener segmentos rígidos y flexibles. Producto de sus reactivos y de la síntesis, logran una elasticidad, capaz de contraerse y tomar la forma en un espacio contenido (Guelcher y cols., 2005), como puede ser un alveolo o un defecto óseo. Característica que no se encuentra en los polímeros naturales ya que por su proceso de fabricación, al ser liofilizados terminan siendo materiales rígidos y frágiles (Ehrlich y cols., 2008). El efecto de reforzamiento mecánico observado en algunos compósitos del presente estudio, se puede explicar por la presencia de las nanopartículas en la estructura interna del polímero. La presencia de nanopartículas inorgánicas de gran área de superficie como nBG alteraría el estado de tensión local de la matriz polimérica. En donde la movilidad de las cadenas del polímero (lo que determina si es un polímero rígido o flexible) en zonas cercana a la interface con las nanopartículas es sustancialmente menor que en zonas sin partículas. Esta característica particular de la microestructura de los compósitos provoca una mejor ductilidad y tenacidad, aumentando los módulos de tracción, compresión y rigidez. En casos de que se genere mucha tensión en estas zonas de la matriz polimérica a causa de una mayor presencia de nanopartículas puede ocurrir todo lo contrario, una mayor rigidez de

la microestructura del compuesto, traduciéndose en un debilitamiento en el material. (Tjong, 2006). Es el caso de los bionanocompuestos de PU que contienen nMBG, que a pesar de tener una porosidad más compacta, sus características mecánicas de compresión no aumentaron. Esto puede ser debido a que las nanopartículas al poseer una mayor área superficial, tienen una mayor tendencia a aglomerarse al interior de la matriz polimérica (Wu y cols., 2013).

En el análisis SEM-EDX se observó como las biocerámicas estaban embebidas al interior de PU, esto también se corroboró en el análisis de EDX con el mapeo para el elemento de silicio que se encuentra en la composición de BG. Es esencial que los componentes o fases que forman bionanocompuestos para regeneración ósea se degraden gradualmente manteniendo sus propiedades mecánicas, hasta que el nuevo tejido pueda soportar cargas. Se ha visto que BG se degrada más rápido que HA, y que la degradación se ha atribuido a la disolución mediada por el medio, más que por la acción enzimática o celular (Oonishi y cols., 2000; Wheeler y cols., 2000). En compósitos actuales de BG y polímeros naturales, las dos fases se degradan a distintas velocidades (Blaker y cols., 2010), lo que puede causar inestabilidad del andamio y migración de las partículas *in vivo*. Materiales compósitos basados en andamios de polímeros naturales han mostrado una degradación superior en relación al polímero puro (Armentano y cols., 2010). Los andamios de bionanocompuestos de PU al ser un polímero sintético e hidrofóbico, su degradación será más lenta, pues estará mediada por hidrólisis y oxidación enzimática (McBane J y cols., 2011). Esto es una buena característica, ya que mientras haya una proliferación celular, la degradación del andamio de PU liberará paulatinamente las biocerámicas que están al interior del material, provocando una osteoconducción, osteoinducción y osteogénesis continua en el tiempo.

Al analizar los bionanocompuestos de PU 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. La cristalización de la fase de apatita en los biomateriales

depende fuertemente de la concentración iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  del fluido que los rodea (Daculsi y cols., 1989). De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas de SBF, bionanocompuestos mostraron mejores propiedades bioactivas que el andamio de PU, ya que indujeron mayor formación de apatita sobre su superficie. Por lo tanto en la ingeniería en tejido, la presencia de nanopartículas cerámicas en el andamio es relevante, ya que mejora significativamente la bioactividad del material debido a los productos que genera la disolución de las bionanocerámicas.

Los bionanocompuestos compuestos por nBG y nMBG mostraron mayor formación de apatita en comparación a MBG y nHA en todos los análisis realizados (DRX, FTIR-ATR, SEM-EDX), lo que se traduce en mejores propiedades bioactivas para estos materiales. Aunque el patrón DRX de los biocompuestos de nHA también tiene el peak de  $31,8^\circ$ , este peak correspondería a la partículas incorporadas desde un inicio en el compuesto, más que la formación de una nueva fase de apatita luego de SBF. Al analizar FTIR-ART se observó un mayor aumento para los bionanocompuestos de nBG y nMBG tanto para 3 días en SBF como para 7 días, lo que destaca las excelentes propiedades bioactivas de las nanopartículas de BG. El mismo fenómeno se observó a través de imágenes de microscopia SEM-EDX, que muestran mayor tamaño y cantidad de cristales de hidroxiapatita formada. En términos generales, la disolución de las partículas de BG produce iones, los cuales en combinación con iones de la solución de SBF precipitan y forman la fase de apatita. Por otro lado las nanopartículas de HA actúan como centros de nucleación para los iones (presentes en SBF), induciendo la mineralización (Hench, 1998; Valenzuela, 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 (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 (Pedone y cols., 2010). Esto explica por qué el fosfato es perdido rápidamente al exponer el

vidrio a ambientes acuosos (Sepúlveda 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 generalmente aceptado de la bioactividad del BG, es que a través de la disolución de iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{P}$  presentes en el BG, se produce la desintegración de la red de silicio, que es atacada por iones del medio, quedando  $\text{Si}$  libre que se deposita en la superficie del material y crea una capa rica en sílice, que atrae iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  (Brauer y cols., 2010). La hidroxiapatita al contrario, es una biocerámica termodinámicamente más estable a pH fisiológico (Hench, 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 de PU con partículas de BG presentarían propiedades más favorables para el asentamiento de células y conseguir una mayor deposición de matriz extracelular ósea compuesta por apatita, lo cual resulta relevante para aplicaciones de regeneración ósea. Este mecanismo podría explicar la mayor reactividad de los nanocompuestos con nBG, debido al tamaño nanométrico de esta partícula presenta una mayor velocidad de disolución, acelerando el proceso de formación de apatita tipo ósea.

Al evaluar la citocompatibilidad de los biomateriales luego del primer día de incubación disminuyó la viabilidad celular en comparación al control. La inhibición inicial de la proliferación celular puede ser debido a cierta fracción de las DPCSS se adhieren a sitios del andamio con menor difusión de nutrientes desde el medio y que se ha visto en otros estudios (Li Wang y cols., 2009; Olivera y cols., 2012). Sin embargo, se encontró que las células incubadas por 10 días en los materiales PU y los bionanocompuestos de nBG(5%)/PU y nMBG (5%) presentaron una proliferación similar a la observada al del control de células sin material. Los resultados también indicaron que las células tienen mejor viabilidad en los

nanocompósitos con 5% de biocerámica que en el de los 2,5% independiente del tipo de biocerámica. Se ha reportado que una mayor cantidad de Si liberado por BG aumentaría la proliferación celular versus a una mayor cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha descubierto que en presencia de BG, osteoblastos producen una pinocitosis del Si, traduciéndose en un aumento de la síntesis de colágeno 1 y un aumento de la proliferación celular (Valerio y cols., 2004). Por lo tanto bionanocompósitos con mayor cantidad de BG (5%) podrían provocar una mayor proliferación celular. Sin embargo el contenido de BG en los nanobiocompósito debería ser regulado hasta cierto límite, ya que en otros estudios se ha demostrado que los productos de disolución de concentraciones altas de BG, aumentarían la alcalinización del medio, generando citotoxicidad (Rismanchian y cols., 2013). La presencia muy elevada  $\text{Ca}^{2+}$  activaría varios procesos catabólicos mediados por proteasas, fosfolipasas y endonucleasas provocando la apoptosis celular (George y cols., 1999). Por lo tanto el porcentaje o cantidad de biocerámicas ocupadas en un compuesto, debe traducirse en un equilibrio entre bioactividad y citotoxicidad. En este contexto los nanocompósitos con un contenido de 5% nBG y nMBG preparados en el presente trabajo de tesis, cumplirían con la bioactividad para inducir la formación de apatita, manteniendo la citocompatibilidad necesaria.

El desarrollo de la ingeniería de tejidos de la mano con la medicina regenerativa, está orientada a crear materiales que se asemejen cada vez más a los tejidos humanos en su forma y estructura natural. Estas disciplinas buscan nuevas tecnologías tanto en la elaboración como en la experimentación, para la búsqueda de un biomaterial idóneo que cumpla las características del tejido a reemplazar. En ingeniería de tejido óseo, el desarrollo de andamios compuestos por fases orgánicas e inorgánicas intenta simular las características naturales del hueso, al poseer un andamio con propiedades de osteoconductoras y un relleno con propiedades bioactivas, capaz de estimular la formación de apatita tipo ósea. El PU de síntesis *in situ* utilizado en este trabajo, se caracterizó por su citocompatibilidad, facilidad de manipulación y ser relativamente de bajo costo. Por otro lado, el uso de BG 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. Su utilización con partículas de tamaño nanométrico ofrece ventajas comparativas respecto al BG tradicional de tamaño micrométrico, especialmente respecto a acelerar el proceso de formación de HA. Los resultados del presente trabajo demuestran que la incorporación in situ de nanopartículas biocerámicas a andamios poliméricos mejoran considerablemente las propiedades bioactivas de PU, particularmente su capacidad para inducir la mineralización de apatita tipo ósea de este modo el andamio nanocompósitos en base de PU aprovecha las propiedades mecánicas y biodegradables con la bioactividad de las nanopartículas. Estos resultados podrían tener consecuencias en el futuro diseño de biomateriales y constructos tisulares para el desarrollo de terapias de regeneración ósea mediante ingeniería de tejidos.

## CONCLUSIONES

- La incorporación *in situ* de diferentes tipos y contenidos de nanopartículas biocerámicas durante la polimerización de poliuretano biodegradable, permite generar andamios nanocompuestos con porosidad interconectada y con tamaños en el rango requerido para aplicaciones en ingeniería tisular ósea.
- Entre las partículas estudiadas, las nanopartículas de nBG produjeron un efecto de reforzamiento de las propiedades mecánicas de compresión del andamio de PU.
- Los bionanocompuestos presentan mejores propiedades bioactivas *in vitro* en relación a un andamio de PU puro, respecto a la capacidad para inducir la formación de apatita tipo ósea en medio fisiológico simulado.
- Debido a la naturaleza más reactiva del BG y al tamaño de partícula nanométrico del nBG, los nanocompuestos a base de nBG y nMBG exhiben mejores propiedades bioactivas, induciendo una más rápida y completa formación de apatita.
- Entre la serie de bionanocompuestos estudiados, aquellos preparados con 5% de contenido nanopartículas, no alteraron la viabilidad de celular, independiente del tipo de nanopartículas utilizado.
- Los resultados de este estudio podrían tener consecuencias en el futuro diseño de biomateriales más eficientes, particularmente orientados a acelerar el proceso de regeneración ósea en terapias de ingeniería de tejidos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguilar-Pérez FJ, Vargas-Coronado RF, Cervantes-Uc JM, Cauch-Rodríguez JV, Covarrubias C, Pedram-Yazdani M (2016). Preparation and bioactive properties of nano bioactive glass and segmented polyurethane composites. *Journal of Biomaterials Application* (0): 1–11
- Aichelmann-Reidy M, Reynolds M (2008). Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *Journal of Periodontology*. 79(3): 387–393.
- Aixue L, Zhongkui H, Xiuli Z, Xuesi C, Yang C, Yi L, Xiabin J (2008). Surface modification of bioactive glass nanoparticles and the mechanical and biological properties of poly(Llactide) composites. *Acta Biomaterialia* (4):1005–1015.
- Al-Nawas B, Schiegnitz E (2014). Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis. *Europe Journal of Oral Implantology* 7(2): 219-34.
- Alperin C, Zandstra PW, Woodhouse KA (2005). Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. *Biomaterials* (26):7377.
- Amini A, Laurencin C, Nukavarapu S (2012). Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 40(5):363-408.
- Anderson J (2001). Biological response of biomaterials. *Annual Review of Materials Research* (31):81.
- 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.
- Beck J, Vartuli J, Roth W, Leonowicz M, Kresge C, Schmitt K, Chu C, Olson D, Sheppard E, McCullen S, Higgins J, Schlenker J (1992). A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of American Chemical Society* 114(27): 10834–10843
- 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.
- Boccaccini A. (2010) Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology* 70(13):1764–1776.
- Borrell L, Crawford N (2012). Socioeconomic position indicators and periodontitis: examining the evidence. *Periodontology 2000* 58(1):69-83
- Bouyarmanea H, Beaufilsa P, Pujola N, Bellemansc J, Robertsd S, Spaldinge T, Zaffagninif S, Marcaccif M, Verdonkg P, Womackh M, Verdonki R (2014). Polyurethane scaffold in lateral meniscus segmental defects: Clinical outcomes at 24 months follow-up. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* (100): 153–157
- Brauer D, Karpukhina N, O'Donnell M, Law R, Hill R. (2010) Fluoride-containing bioactive glasses: Effect of glass design and structure on degradation, pH and apatite formation in simulated body fluid. *Acta Biomaterialia* (6): 3275–3282.
- Burt B, Greenwell H, Fiorellini J, Giannobile W, Offenbache S, Salkin L (2005). Epidemiology of Periodontal Disease, *Journal of Periodontology* (76) 1406–1419
- Buttke T, McCubrey J, Owen T (1993). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of

- lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunology Methods* 157(1-2):233-40.
- 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.
- 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.
- Covarrubias C, Arroya F, Balanda C, Neira M, Von Martens A, Caviedes P, Urra C (2015). The effect of the nanoscale structure of nanobioceramics on their *in vitro* bioactivity and cell differentiation properties. *Journal of Nanomaterials* doi 526230
- Daculsi G, LeGeros R, Mitre D. (1989). Crystal dissolution of biological and ceramic apatites. *Calcified Tissue International* 45(2): 95–103.
- Deb S, Mandegaran R, Silvio LD. (2010) A porous scaffold for bone tissue engineering/45S5 Bioglass derived porous scaffolds for co-culturing osteoblasts and endothelial cells. *Journal Materials Science: Materials Medicine* 21:893.
- Dorozhkin S. (2010). Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31(7),  
 Ducheyne, P. (1987). Bioceramics: material characteristics versus *in vivo* behavior. *Journal of Biomedical Materials Research*, 21(A2 Suppl), 219– 236.

- Ducheyne P (1987). Bioceramics: material characteristics versus *in vivo* behavior. *Journal Biomed Materials Research* (2): 219-36.
- 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* doi 670235
- 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.
- Fathi M, Mortazavi V, Doostmohammadi A (2007). Bioactive glass nano powder for the treatment of oral bone defects. *Journal of Dentistry of Tehran University of Medical Sciences* (4):115-22.
- 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.
- Fu Q, Saiz E, Rahaman MN, Tomsia AP. (2011) Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Materials Science and Engineering: Materials for Biological Applications* 31:1245.
- Gamonal J, Mendoza C, Espinoza I, Muñoz A, Urzúa I, Aranda W, Carvajal P, Arteaga O (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *Journal of Periodontology*, (10):1403-10.
- García A, Cicuéndez M, Izquierdo-Barba I, Arcos D, Vallet-Regí M (2009). Tailoring the biological response of mesoporous bioactive materials *Journals of Material Chemistry B* (3): 3810-3819
- Genco RJ, Borgnakke WS (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000* 62(1):59-94.
- Gentili C, Cancedda R. (2009). Cartilage and bone extracellular matrix. *Current Pharmaceutical Design* 15:1334.

- George E, Orrenius K, Orrenius S (1999). Calcium Signaling and Cytotoxicity. *Environmental Health Perspectives* (107): 25-36
- Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* 88(5):873–84.
- Giannoudis P, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005). Bone substitutes: an update. *Injury*, 36(4 Suppl): 20S–27S.
- Gil Pilonieta A, Franklin J, Cruz Riaño LJ (2007). Poliuretanos degradables a partir de aceite de higuerilla, *Science Technology* 13(36):1–6.
- Gogolewski, S (1989). Selected topics in biomedical polyurethanes. A review. *Colloid and Polymer Science* 267(9): 757–785.
- Goldstein J, Newbury D , Echlin P, Joy D, Romig A, Lyman C, Fiori C, Lifshin E (2003). Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. 3rd ed 417-462
- 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
- Gosain AK. (2004). Plastic Surgery Educational Foundation DATA Committee. Bioactive glass for bone replacement in craniomaxillofacial reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 114:590-3.
- Guan J, Sacks MS, Beckman E, Wagner WR (2004). Biodegradable poly(ether ester urethane)urea elastomers based on poly(ether ester) triblock copolymers and putrescine: synthesis, characterization and cytocompatibility. *Biomaterials*, (25): 85–96
- Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR Synthesis (2002). characterization and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane) ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *Journal of Biomedical Materials Research* 61:493.

- Guelcher S, Gallagher KM, Didier JE, Klinedinst DB, Docto JS, Goldstein AS. (2005) Synthesis of biocompatible segmented polyurethanes from aliphatic diisocyanates and diurea diol chain extenders. *Acta Biomaterialia* (1): 471–484.
- 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. *Journal of American Ceramics Society*, 81, 1705–28.
- Hench LL, Polak J (2002). Third-generation biomedical materials, *Science* 295:1014.
- Hench LL (2006). The story of bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (17): 967–978.
- Hench LL (2009). Genetic design of bioactive glass. *Journal of the European Ceramic Society*. 29(7), 1257–1265.
- Hepburn, C (1992). Polyurethane Elastomers. *Elsevier* 29-48
- Hing K, Revell P, Smith N, Buckland T (2006). Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 27:5014-26.
- Hinoi E, Takarada T, Yoneda Y (2004). Glutamate signaling system in bone. *Journal of Pharmacological Sciences* 94(3): 215–220.
- Hong Z, Liu A, Chen L, Chen X, Jing X (2009). Preparation of bioactive glass ceramic nanoparticles by combination of sol–gel and coprecipitation method. *Journal of Non-Crystalline Solids* (355): 368–372.
- Huber F, McArthur N, Heimann L, Dingeldein E, Cavey H, Palazzi X, Clermont G, Boutrand JP (2009). Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste Ostim® in comparison to Alpha-BSM® - more bone ingrowth inside the

implanted material with Ostim® compared to Alpha BSM®. *BMC Musculoskeletal Disorders* 10:164

Hughes J, Cameron M, Crowley K (1989). Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites. *American Mineralogist* 74(7-8): 870–876

Izquierdo-Barba I, Arcos D, Sakamoto Y, Terasaki O, López-Noriega A, Vallet-Regí M (2008). High-performance mesoporous bioceramics mimicking bone mineralization. *Chemistry of Materials* (20): 3191–3198.

Izquierdo-Barba I, Vallet-Regí M (2011). Fascinating properties of bioactive templated glasses: a new generation of nanostructured bioceramics. *Solid State Science* (13) 773–783.

Jacob S. Global prevalence of periodontitis: a literature review. *International Arab Journal of Dentistry* (3): 26–30.

Jayakumar P, Silvio LD (2010). Osteoblasts in bone tissue engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers* 224:1415.

Jimi E, Hirata S, Osawa K, M. Terashita M, Kitamura C, Fukushima H (2012). The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects, *International Journal of Dentistry* doi 148261

Jones J (2013). Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterials* 9(1): 4457–4486.

Julien M, Khoshniat S, Lacreusette A, Gatius 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.

Kaigler D, Mooney D (2001). Tissue engineering's impact on dentistry. *Journal of Dental Education* 65(5): 456–462.64

- Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005). The biology of bone grafting. *Journal American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2(13): 77-86.
- Kim H, 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, Kim Y, Park S, Rey C, Lee H, Glimcher M, Ko, J (2000). Thin film of lowcrystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials* 21(11): 1129–1134
- Kim J, Ryba E, Bai J (2003). Grazing incidence X-ray diffraction studies on the structures of polyurethane films and their effects on adhesion to Al substrates, *Polymer*. (44): 6663–6674.
- Kokubo T, Kushitani H, Sakka, S, Kitsugi T, Yamamuro, T (1990). Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic AW. *Journal of Biomedical Materials Research* 24(6): 721–734.
- Kokubo T, Takadama H. (2006). How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity? *Biomaterials* 27(15): 2907–2915.
- Kokubo T. (2005) Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Material Science Engineering C* 25:97–104.
- Krishnamurthy R, Manning MC (2002). The stability factor: importance in formulation development. *Pharmaceutical Biotechnology* (3): 361 –371.
- 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 K, Silva EA, Mooney DJ (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. *Journal of the Royal Society Interface* 8(55):153-70
- Li Wang, Yubao Li, Yi Zuo, Li Zhang, Qin Zou, Lin Cheng, Hong Jiang (2009). Porous bioactive scaffold of aliphatic polyurethane and hydroxyapatite for tissue regeneration, *Biomedical Materials* doi 025003
- Liu H, Zhang L, Li J, Zou Q, Zuo Y, Tian W. (2010) Physicochemical and biological properties of nano-hydroxyapatite-reinforced aliphatic polyurethanes membranes. *Journal of Biomaterials Science-Polymer edition* 21:1619–1636
- López-Noriega A, Arcos D, Izquierdo-Barba I, Sakamoto Y, Terasaki O, Vallet-Regí M (2006). Ordered mesoporous bioactive glasses for bone tissue regeneration. *Chemistry of Materials*. 18(13):3137–3144.
- Mahkama M, Sanjani N (2003). Preparation of new biodegradable polyurethanes as a therapeutic agent. *Polymer Degradation and Stability* (80):199–202
- 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.
- Marsell R, Einhorn TA (2011). The Biology of fracture healing. *Injury* 42(6):551-555.
- Marx RE (1994). Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinic in Plastic Surgery* 21(3), 377–392.
- McBane J, Sharifpoor S, Cai K, Labow R, Santerre JP (2011). Biodegradation and *in vivo* biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications. *Biomaterials* (32) 6034-6044
- Mendonça G, Mendonça DBS, Aragão F, Cooper L. (2008). Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. *Biomaterials* 29(28), 3822–3835
- Murugan R, Ramakrishna S (2004). Coupling of therapeutic molecules onto surface modified coralline hydroxyapatite. *Biomaterials* 25(15), 3073–3080.

- Murugan R, Ramakrishna S. (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Computer Science Technology* (65), 2385–2406.
- Murugan R, Ramakrishna S (2005). Development of nanocomposites for bone grafting. *Journal of Computer Science and Technology* (65), 2385–2406.
- Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J (2008). Biomaterials in orthopaedics. *Journal of the Royal Society Interface* 5:1137.
- Nayar S, Bhuminathan S, Muthuvignesh J. (2011). Upsurge of Nanotechnology in Dentistry and Dental Implants. *Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry* 1(5): 264–268.
- Neovius E, Engstrand T (2010). Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. *Journal of Plastic Reconstructive Aesthetic Surgery* (63): 1615–1623.
- Nkenke E, Stelzle F (2009). Clinical outcomes of sinus floor augmentation for implant placement using autogenous bone or bone substitutes: a systematic review. *Clinic Oral Implants Research* 20:124–133
- Noia CF, Ortega-Lopes R, Olate S, Duque TM, de Moraes M, and Mazzonetto R (2011). Prospective clinical assessment of morbidity after chin bone harvest. *Journal Craniofacial Surgery* (22): 2195–2198
- Oliveira A, de Carvalho SM, de Fatima Leite M, Orefice RL, Pereira MM (2012). Development of biodegradable polyurethane and bioactive glass nanoparticles scaffolds for bone tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B* 100B:1387–1396.
- Oliveira A, Mano J, Reis R (2003). Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 7, 309.
- 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
- Padmanabhan KA (2001). Mechanical properties of nanostructured materials. *Material Science Engineering A304–A306*:200–205.
- 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.
- Peral B, Redondo L, Verrier A, Serrat A, Torres MA, Vaquero C (2008). Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales. *Revista Española Cirugía Oral y Maxilofacial* 30: 313–323
- Pergal M, Stefanović E, Godevac D, Antic V, Milacic V, Ostoljic S, Rogan J, and Djonlagic J (2014). Structural, thermal and surface characterization of thermoplastic polyurethanes based on poly(dimethylsiloxane). *Journal of Serbian Chemical Society* 79(7): 843–866
- Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE (2014). Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 14(1):15-56.
- Poussard L, Burel F, Couvercelle JP, Merhi Y, Tabrizian M, Bunel C (2004). Haemocompatibility of new ionic polyurethanes. Influence of carboxylic group insertion modes. *Biomaterials* (25): 3473-3483.
- Quinones C, Lovelace T (1997). Utilization of a bioactive synthetic particulate for periodontal therapy and bone augmentation techniques. *Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry* 9:1-7.
- Rabkin E, Schoen F (2002). Cardiovascular tissue engineering. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 11(6), 305–317.

- Ratner B, Hoffman A, Schoen F, Lemons J (2004) *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*, Elsevier Academic Press, Boston, 411–430
- Reed AM, Potter J, Szycher M (1994). A solution grade biostable polyurethane elastomer: ChronoFlex AR. *Journal of Biomaterials Applications* (8): 210–236
- 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.
- 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 MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC (2003). The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Annales of Periodontology* 8(1):227-65.
- Rezwan K, Chena QZ, Blakera JJ, Aldo Roberto Boccaccinia. (2006) Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3413–3431.
- Rismanchian M, Khodaeian N, Bahramian L, Fathi M, Sadeghi-Aliabadi H (2013). In-vitro Comparison of Cytotoxicity of Two Bioactive Glasses in Micropowder and Nanopowder forms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12(3):437-443.
- 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.
- Ryszkowska JL, Auguścik M, Sheikh A, Boccaccini AR (2010). Biodegradable polyurethane composite scaffolds containing Bioglass® for bone tissue engineering. *Composites Science and Technology* 70:1894–1908

- 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.
- Sardon H, Irusta L, Fernández-Berridi MJ (2009). Synthesis of isophorone diisocyanate (IPDI) based waterborne polyurethanes: Comparison between zirconium and tin catalysts in polymerization process. *Progress in Organic Coatings* 66 (3): 291–295.
- Schwarz F, Bieling K, Latz T, Nuesry E, Becker J (2006). Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series. *Journal of Clinic Periodontology* 33:491-9.
- Sculean A, Barbé G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Brex M (2002). Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *Journal of Periodontology* 73:401-8.
- 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.
- Shi M, Zhai D, Zhao L, Wu C, Chang J (2014). Nanosized mesoporous bioactive glass/poly(lactic-co-glycolic acid) composite-coated CaSiO<sub>3</sub> scaffolds with multifunctional properties for bone tissue engineering. *BioMed Research International*. doi:323046.
- Soccol AT, Bettiga S, Noronha L, Sass S, Soccol VT, Scholz MR (2006). Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 72:195-9
- Spaans CJ, Belgraver VW, Rienstra O, Groot JH, Veth RP (2000). Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea

- scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials*, 21:2453
- 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.
- Szycher M, Siciliano A. (1991) An assessment of 2,4-TDA formation from Surgitek polyurethane foam under stimulated physiological conditions. *Journals of Biomaterials Applications* (5): 323–336
- Tabata Y, (2003) Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Engineering* 9(Suppl 1): 5S-15S.
- 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* 53: 73–197
- 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.

- Vacanti A (2006). The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (10): 3. 569-576
- Vacanti J (2009). Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art *Journal of Pediatric Surgery*. 18-20
- 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* :100B:1672–1682.
- 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
- 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.
- Vallet-Regí M, Colilla M, González B (2011). Medical applications of organic–inorganic hybrid materials within the field of silica-based bioceramics. *Chemical Society Review* (40): 596–607
- Vallet-Regí, M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J (2001). A new property of MCM-41: drug delivery system. *Chemicals of Materials* 13: 308–311
- Warren G, Bunnell B, Martin E, Frazier T, Hung B, Gimble J (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology* 11: 140–150.
- 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.
- Wolf L (2000). New clinical materials and techniques in guided tissue regeneration. *International Dental Journal* 50: 235-244
- Wu C, Fan W, Chang J (2013). Functional mesoporous bioactive glass nanospheres: synthesis, high loading efficiency, controllable delivery of doxorubicin and inhibitory effect on bone cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*1(21): 2710–2718
- 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): 321–32
- 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.
- Yan X, Yu C, Zhou X, Tang J, Zhao D. (2004). Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior *in vitro* bone-formation bioactivities. *Angewandte Chemie International Edition* (43) 5980–5984.

- Zhang J, Huang J, Xu S, Wang K, Yu S (2003). Effects of Cu<sup>2+</sup> and pH on osteoclastic bone resorption *in vitro*. *Progress in Natural Science* 13(4): 266–270.
- Zhao X, Lu G, Hu X. (1999) A novel method for tailoring the pore-opening size of MCM-41 materials. *Chemical Communications*: 1391-1392
- 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.

**ANEXOS**

**Anexo 1.** Cantidades de reactivos utilizadas en la preparación de 1000 mL de SBF.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agua destilada	750 mL
NaCl	7,996 g
NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
KCl	0,224 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,179 g
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0,305 g
HCl 1M	40 mL
CaCl <sub>2</sub>	0,278 g
NA <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6,057 g
HCl ( para ajuste a pH 7.4)	...