Biomateriales

Diseño, producción y caracterización

Pío González (Coord.)

Rede Galega de Biomateriais

Biomateriales: Diseño, producción y caracterización

Rede Galega de Biomateriais

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA

Biomateriales: Diseño, producción y caracterización

Edición: Red Gallega de Biomateriales

Coordinación: Pío González Fernández

Coordinación técnica: Javier M. González Costas

Diseño y producción: Biblos Clube de Lectores, S. L.

© 2015 autoría: las personas que firman cada capítulo incluido en el libro

© 2015 del prólogo: Pío González Fernández

Depósito legal: C 1714-2015

ISBN: 978-84-15086-50-5

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

Prólogo

La Red Gallega de Biomateriales (RGB) surge de la necesidad de sus integrantes de aunar esfuerzos y establecer colaboraciones fluidas entre los grupos de investigación, con el propósito de alcanzar mayores cotas científicas y desarrollar nuevas aplicaciones biomédicas, cada vez más exigentes y sofisticadas.

La Red pretende ser un instrumento dinamizador del sector, por lo que trata de ampliar sus horizontes e incrementar su masa crítica, promoviendo la adhesión de nuevos grupos y empresas afines. Así mismo, entre los principales objetivos de esta Red se encuentra la transferencia de tecnología y la búsqueda de sinergias con el tejido empresarial, tendiendo puentes que favorezcan el desarrollo tecnológico y económico del entorno próximo.

Este libro pretende ser un reflejo de esta vocación de cooperación e interdisciplinaridad que se requiere en este ámbito para alcanzar los fines que se persiguen. Así en este texto se aglutinan los conocimientos y aportaciones de áreas tan diversas como la medicina, ingeniería, veterinaria, biología y otras ciencias básicas (física, química, ciencia de materiales), siendo conscientes que el alto grado de desarrollo alcanzado solo es posible gracias al esfuerzo de equipos multidisciplinares, agrupados en torno a la ingeniería biomédica.

A lo largo del contenido de este libro se desgranan, en tono divulgativo, diversos aspectos relacionados con el diseño, producción y caracterización de biomateriales, en su acepción más amplia. En los primeros capítulos se exponen procesos de fabricación novedosos basados en disciplinas emergentes como la nanotecnología y la tecnología láser. En los capítulos 3 y 4, especialistas y expertos en técnicas de análisis singulares, como la espectroscopia Raman o microtomografía computarizada, muestran su aplicación en la caracterización de biomateriales. Las aportaciones de tecnologías emergentes como la terapia celular y la ingeniería de tejidos también están presentes y se plasman en el capítulo 5, abriendo un nuevo escenario hacia la medicina regenerativa. Los últimos capítulos nos acercan más a las aplicaciones clínicas de los biomateriales, mostrando un estudio de las propiedades antibacterianas de los biovidrios y, por último, se exponen las técnicas de evaluación y ensayos in vivo, imprescindibles para validar su utilización en ensayos clínicos.

Nuestro sincero agradecimiento a los autores y autoras que con su esfuerzo y dedicación han contribuido a la elaboración de este texto que, sin duda, aportará una visión actualizada y enriquecedora de la investigación en biomateriales.

Pío González
Coordinador RGB

Índice

1. Aplicacións biomédicas das nanocápsulas de sílice como administradoras de medicamentos
E. González-Domínguez, J. Pérez-Piñeiro, A. Sousa-Castillo, M. Pérez-Lorenzo e M. Á. Correa-Duarte 9

2. Procesamiento de nanofibras de vidrios bioactivos con técnicas láser
F. Quintero, J. Penide, A. Riveiro, J. del Val, R. Comesaña, F. Lusquiños, J. Pou 20

3. Espectroscopia Raman para el análisis de tejido vivo y biocerámicas de origen biológico y sintético
H. Aguiar, M. Rodríguez-Domínguez, B. Coello, J.R. Caeiro-Rey, S. Stefanov, C. Rodríguez-Valencia, E. López, M. López-Álvarez, S. Chiussi, J. Serra, P. González 33

4. Caracterización no destructiva de biomateriales mediante microtomografía computarizada
J.R. Caeiro, J. Serra, P. González, F. Muñoz, A. González-Cantalapiedra 53

5. Cell Therapy and Tissue Engineering Strategies in Rheumatic Diseases
E. F. Burguera, F. J. Blanco-García, J. C. Silva-Magalhães 65

6. Propiedades antibacterianas de los vidrios bioactivos
M.M. Echezarreta-López, M. Landin 77

7. Evaluación histológica de materiales
F. M.ª Muñoz-Guzón, M. Permuy-Mendaña, M. López-Peña, A. González-Cantalapiedra. 89

1. Aplicacións biomédicas das nanocápsulas de sílice como administradoras de medicamentos

E. González-Domínguez, J. Pérez-Piñeiro, A. Sousa-Castillo,
M. Pérez-Lorenzo* e M. Á. Correa-Duarte*

Departamento de Química Física, Centro de Investigacións Biomédicas (CINBIO),
Instituto de Investigacións Biomédicas (IBI), Universidade de Vigo, 36310 Vigo

moisespl@uvigo.es; macorrea@uvigo.es

Resumo

A administración de axentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos, proteínas, vacinas ou anticanceríxenos presenta importantes desvantaxes á hora da súa aplicación. Así, a súa baixa bioavaliabilidade, a súa rápida eliminación do organismo ou a súa pouca especificidade imposibilitan en gran maneira que leven a cabo a súa acción de xeito eficiente. Por isto, existe un interese crecente en desenvolver novas estratexias que permitan subministrar estes compostos minimizando por un lado estes obstáculos e polo outro potenciando o seu efecto terapéutico. Neste sentido, a implementación de nanotransportadores suscitou unha grande atención nos últimos tempos grazas á súa capacidade para solubilizar os fármacos no organismo, prolongar o seu tempo de circulación, e liberar a droga de forma controlada no tempo e no espazo, o que finalmente leva a unha mellora do seu índice terapéutico. O presente capítulo céntrase en salientar a importancia da nanotecnoloxía na biomedicina facendo especial fincapé no emprego das nanocápsulas de sílice como vehiculizadores de fármacos.

Hoxe en día, e en paralelo á busca de novos compostos con actividade farmacolóxica, os científicos dedican grandes esforzos á optimización dos índices terapéuticos dos medicamentos xa existentes. Este afán investigador vén xustificado polos numerosos obstáculos que presenta a aplicación das formulacións clínicas tradicionais. Un destes problemas é a baixa solubilidade de moitos principios activos no interior do organismo. Esta insolubilidade frea ou mesmo imposibilita a circulación da droga polo torrente sanguíneo evitando en último termo que alcance a súa diana terapéutica. Así mesmo, a biodispoñibilidade destas formulacións, é dicir, a fracción de fármaco que chega inalterada ao sistema circulatorio, é un factor a ter presente. Neste sentido, e moi especialmente cando o medicamento é administrado por vía oral, a cantidade de principio activo presente na dose inicial pode verse tamén reducida polo metabolismo que sofre a droga antes de chegar ao seu destino. Unha das consecuencias directas desta degradación é a necesidade de empregar sobredoses de fármaco co fin de contrarrestar este efecto, o que se pode traducir na aparición de efectos secundarios sobre a saúde. Outro problema intrínseco á administración de drogas farmacéuticas é a súa eliminación ou excreción, como por exemplo, por vía renal. Unha eliminación temperá do fármaco pode impedir que este alcance de forma axeitada o lugar do organismo onde debe exercer a súa acción e, polo tanto, reducir en grande medida a súa eficacia. Outra das dificultades que se pode atopar na aplicación das for-

mulacións clínicas clásicas é a súa falta de especificidade, é dicir, a capacidade da droga para identificar e interactuar de forma prioritaria sobre determinados órganos, tecidos ou células. Neste caso, un baixo grao de recoñecemento por parte do principio activo pode ocasionar que este realice a súa acción onde non é necesario producindo así efectos non desexados.

Á vista dos problemas descritos anteriormente, nos últimos anos puxéronse en práctica un gran número de estratexias para desenvolver novas e máis eficientes formulacións clínicas que permitan eludir ou minimizar os obstáculos máis habituais á hora de subministrar medicamentos (Etheridge et al., 2013). Estas metodoloxías están baseadas comunmente nun enfoque interdisciplinario que combina a química, a medicina e a farmacia. O que se pretende con esta nova xeración de formulacións é mellorar a efectividade e a seguridade na administración dos fármacos mediante un estrito control espazo-temporal da droga no organismo. Así, o obxectivo principal destas actuacións consiste en facer chegar o medicamento á súa correspondente diana terapéutica nun período de tempo axeitado, mantendo unha alta concentración do principio activo no tecido afectado e a máis baixa posíbel no san.

Entre as estratexias empregadas para mellorar a especificidade e a posoloxía dos fármacos, a nanotecnoloxía erízese coma unha das máis prometedoras (Farokhzad e Langer, 2009). Esta disciplina permite manipular a materia a nivel atómico e molecular para crear materiais con dimensións na escala do nanómetro, é dicir, millonésimas de milímetro (figura 1.1). Este reducido tamaño permite a estas estruturas cruzar a membrana plasmática das células dun determinado órgano ou tecido dun xeito moi eficiente, o que facilita finalmente que leven ao cabo a súa acción. Máis aínda, as propiedades físicas e químicas da superficie e/ou do interior destes materiais poden ser modificadas de tal xeito que poidan transportar fármacos, ben encapsulados, adsorbidos ou quimicamente unidos á súa estrutura, recoñecer cun alto grao de especificade diferentes dianas terapéuticas e liberar de xeito controlado o principio activo (Torchilin, 2006).

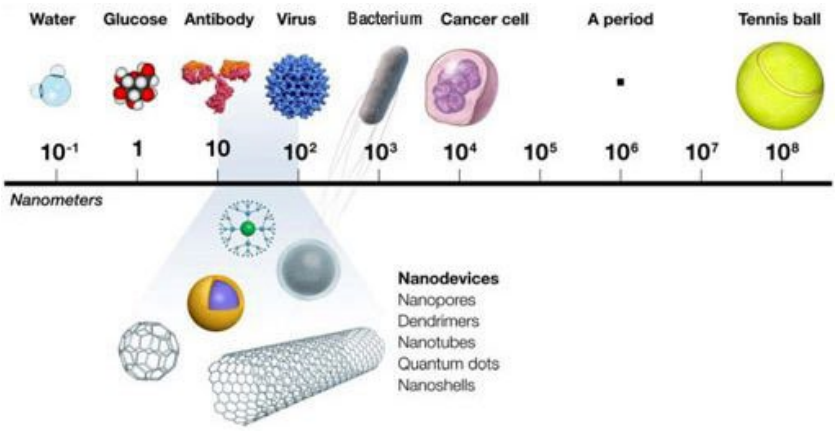


Figura 1.1. A Nanotecnoloxía ocúpase de desenvolver materiais ou dispositivos nun rango de tamaños entre 1 e 100 nm con propiedades específicas dependendo da aplicación buscada.

Un grande número dos fármacos que actualmente se utilizan para a loita contra o cancro son citotóxicos, isto é, nocivos para as células. Dado que en moitos casos estas substancias mostran unha distribución non específica cando son introducidas no organismo, isto pode chegar a afectar aos tecidos normais, o que ao cabo limita as aplicacións clínicas destes medicamentos. Co fin de superar este pro-

blema, hai anos se adoptou o emprego de transportadores nanométricos na quimioterapia (Brigger et al., 2002). O paradigma destes vehículos nanoestruturados foi ben establecido na última década tanto na investigación clínica como na farmacéutica. Estes contedores de axentes terapéuticos deben permanecer por longos períodos no sangue e amorearse de forma preferente nos lugares coas patoloxías a tratar. Entre as metodoloxías existentes á hora de realizar unha terapia dirixida existen dúas estratexias principais, as pasivas e as activas (Danhier et al., 2010). As estratexias activas son operadas polo chamado efecto de permeabilidade e retención aumentada (EPR nas súas siglas en inglés) que é o responsábel da tendencia das estruturas de tamaño reducido tales como as nanopartículas a acumularse nos tecidos tumorais en maior medida que nos sans (Maeda et al., 2009). Isto é debido á arquitectura vascular asociada aos tumores sólidos. Neste caso, os vasos sanguíneos encargados de proporcionar nutrientes e osíxeno ao tecido afectado presentan anormalidades morfolóxicas tales como un aliñamento defectuoso das células que o conforman. Isto dá lugar a formación de aperturas nas súas paredes o que modifica en último termo a dinámica do transporte de substancias na zona afectada (figura 1.2). Así mesmo, a reducida drenaxe linfática característica destas rexións favorece a retención das nanoestruturas. Por outra banda, as estratexias activas radican na incorporación adicional de diferentes ligandos na superficie do vehículo transportador, tales como anticorpos ou péptidos. Estes ligandos son quen de recoñecer e unirse aos distintos receptores expresados polas células tumorais, o que fai que a estrutura nanométrica se acumule de xeito selectivo sobre elas (Wang e Thanou, 2010) (recadro figura 1.2).

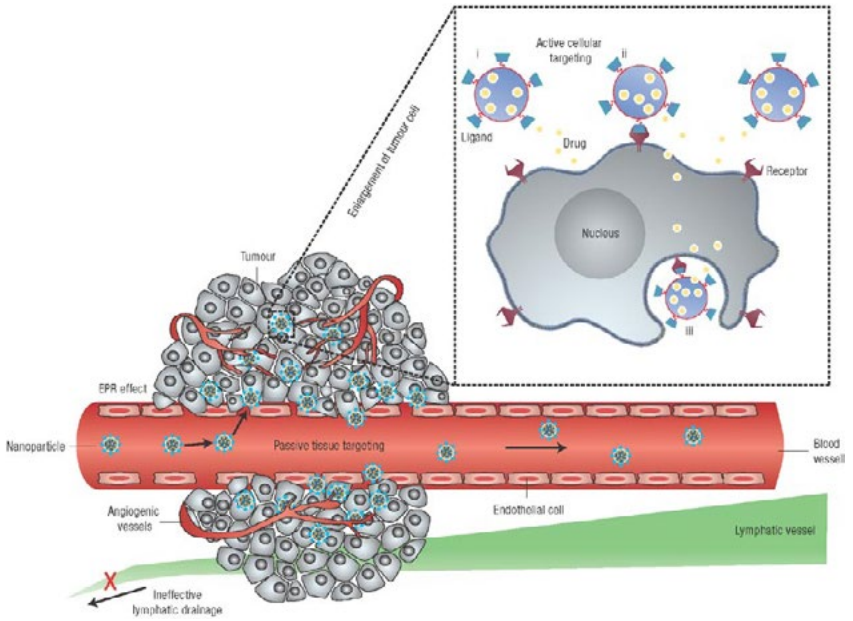


Figura 1.2. A administración pasiva de fármacos é acadada mediante a extravasación das nanopartículas ao través da vasculatura defectuosa do tumor e a drenaxe linfática ineficiente (efecto EPR). A administración activa (recadro) pode alcanzarse dotando a superficie da nanopartícula de ligandos que promovan un recoñecemento específico entre a célula e o nanotransportador así como a súa unión. Deste xeito, as nanopartículas poden (i) liberar os seus contidos nas proximidades da diana terapéutica; (ii) unirse á membrana plasmática e actuar como un depósito extracelular para unha liberación sostida do fármaco; ou (iii) internarse na célula. Reproducido de Peer et al., 2007 con permiso de Nature Publishing Group, copyright 2007.

Á importancia do control espacial na administración dos fármacos no organismo hai que engadir a transcendencia da súa modulación temporal. Neste sentido, a nanotecnoloxía abriulle a porta ao deseño de novas estruturas e dispositivos con fin de subministrar axentes terapéuticos de forma controlada no tempo (figura 1.3). Un dos obxectivos deste tipo de metodoloxías é o subministro en diferido dos fármacos. Unha liberación retardada da droga ten como finalidade (i) postergar a acción do fármaco e polo tanto o lugar onde esta terá lugar e (ii) aumentar a biodispoñibilidade do axente terapéutico. Así mesmo, son tamén de grande interese os sistemas que permiten liberar os fármacos de forma sostida no tempo, aumentando así o seu efecto e diminuíndo a aparición de picos de concentración que poden dar lugar a efectos adversos. Outras formulacións de especial interese nos últimos anos son aquelas que consisten na liberación pulsátil da droga (Bussemer et al., 2001). Este tipo de enfoque baséase na liberación do fármaco en dúas ou máis fases de tal xeito que coincida ben con determinados ritmos circadianos ou momentos onde sexa necesario acadar unha determinada concentración de principio activo no organismo.

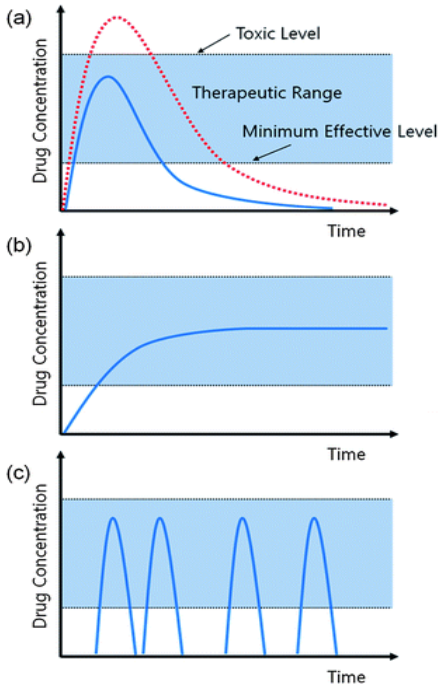


Figura 1.3. O perfil farmacocinético dunha droga depende do mecanismo ao través do cal se produce a súa liberación. (a) típico perfil de liberación en administración de fármacos vía oral; (b) perfil de liberación sostida no tempo; e (c) liberación secuencial. Reproducido de Jeon et al., 2012 con permiso da Royal Society of Chemistry, copyright 2012.

Esta liberación secuencial pode acadarse mediante a incorporación á estrutura do nanotransportador de elementos que respondan a diferentes estímulos químicos ou físicos. Neste sentido, os grandes avances acadados nos últimos anos na síntese de nanomateriais permiten deseñar dispositivos que reaccionen de forma precisa a estes estímulos, dando lugar a unha liberación facilmente regulábel da droga (Sun et al., 2014).

Entre os sistemas administradores de fármacos máis versátiles ao nivel da nanoescala atópanse as nanoesferas, os nanotubos, os dendrímeros ou os liposomas (Rawat et al., 2006). Estas diferentes configuracións poden empregarse para subministrar ben moléculas pequenas, ou varios tipos de biomacromoléculas más complexas como péptidos, proteínas, ADN plasmídico ou oligodesoxinucleótidos sintéticos. Entre os sistemas existentes as cápsulas inorgánicas de tamaño nanométrico, comunmente denominadas como nanocápsulas, merecen especial atención (Hu et al., 2011). A capacidade dos sistemas capsulares para cargar, transportar, protexer e liberar fármacos fai destas arquitecturas unha ferramenta clave para o tratamento de diversas enfermidades tales como o cancro ou as desordes xenéticas. Así, a modificación superficial destes sistemas é un factor crítico (figura 1.4). Unha definición axeitada das propiedades da superficie externa pode previr que o organismo recoñeza as cápsulas coma un material estraño evitando deste xeito a acción do sistema inmune sobre elas. Así mesmo, a funcionalización da superficie pode permitir que as cápsulas recoñezan de maneira específica a célula obxectivo.

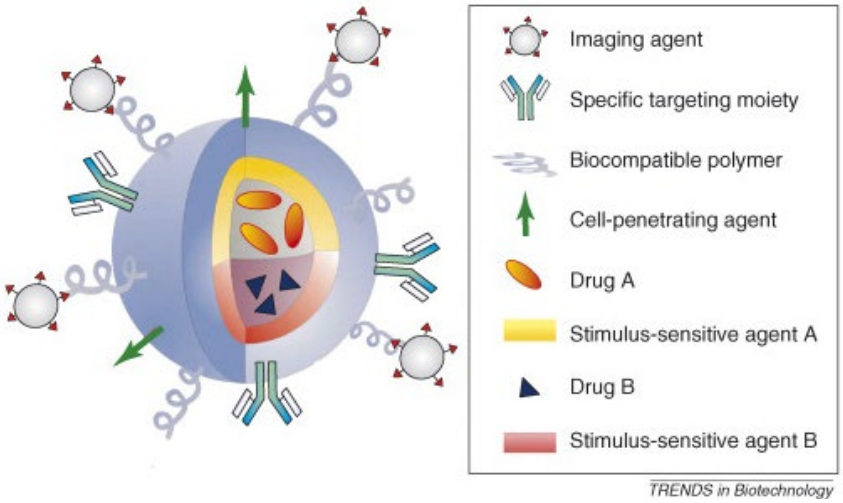


Figura 1.4. As nanocápsulas multifuncionais son de grande utilidade á hora de administrar fármacos. Estes nanotransportadores poden combinar a incorporación de receptores específicos (por exemplo, anticorpos ou péptidos) que recoñezan dianas terapéuticas concretas, axentes de imaxe (como puntos cuánticos ou partículas magnéticas), axentes de penetración celular (péptidos poliArg ou TAT), elementos sensíbeis a estímulos que dean lugar á liberación da droga, polímeros estabilizantes para asegurar a biocompatiblidade (habitualmente polietilenglicol) e un ou máis axentes terapéuticos. Reproducido de Sanvicens e Marco, 2008 con permiso da Royal Society of Chemistry, copyright 2008.

As nanocápsulas de sílice constitúen un importante exemplo do grande potencial das nanoestruturas inorgánicas ocas na biomedicina (Zhang et al., 2015). Isto é debido a que estes sistemas combinan as vantaxes tanto dos seus aspectos composicionais como morfolóxicos. Neste sentido, este material é considerado non tóxico e biocompatíbel. Así, a Axencia de Alimentos e Medicamentos (FDA) recoñece como "seguro" o seu emprego como aditivo alimentario ou en suplementos vitamínicos. Outros beneficios da súa utilización son o seu baixo custe de produción, a súa estabilidade química e mecánica e a súa transparencia óptica. Así mesmo, a superficie da sílice é rica en grupos hidroxilo o que dota este material do necesario carácter hidrófilo (afín á auga) para a súa administración.

Unha vantaxe adicional que supón a utilización da sílice como material derívase do amplo coñecemento que se posúe sobre a súa química preparatoria e a dos seus derivados. Esta experiencia acumulada permite entre outras cousas modificar a porosidade da membrana das cápsulas, e polo tanto a área superficial destas estruturas, o que en último termo deixa paso a modular a súa capacidade de almacenamento e liberación (Vivero-Escoto et al., 2010). Neste punto debe terse en consideración que ditas capacidades se contrapoñen en certa medida. Así, modificacións da sílice poden inducir alteracións nas interaccións electrostáticas e/ou hidrófobas co fármaco o que pode levar a unha maior retención da carga farmacolóxica pero tamén a unha liberación menos eficiente. Da mesma maneira, interaccións demasiado débiles entre a cápsula e a droga poden dar lugar a unha liberación repentina, o que pode ser perigoso dende un punto de vista farmacolóxico e ineficiente dende unha perspectiva económica. En calquera caso debe alcanzarse un equilibrio entre ámbalas dúas capacidades. Outro aspecto importante no que concirne á morfoloxía destas estruturas é o seu tamaño. Neste sentido, aquelas nanocápsulas con dimensións menores de 100 nm de diámetro presentan importantes vantaxes (figura 1.5). Isto débese a que por debaixo deste valor se pode evitar a captura destes materiais por parte do sistema fagocitario mononuclear e polo tanto, prolongar o seu tempo de circulación no sangue. Así mesmo, grazas ao seu limitado volume estes nanovehículos acadan unha mellor extravasación ao través do efecto EPR, o que finalmente dá lugar a un maior grao de absorción a nivel celular e, polo tanto, a un mellor índice terapéutico.

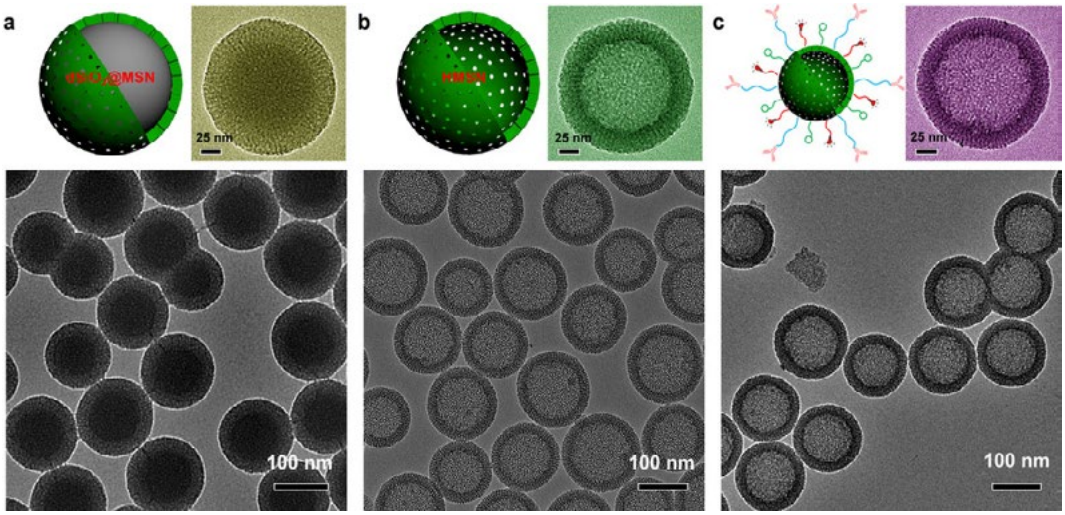


Figura 1.5. Os avances acadados no deseño e síntese das nanocápsulas de sílice expandiron o rango de tamaños, formas e propiedades superficiais e internas coas que este tipo de estruturas poden ser sintetizadas. Nos últimos anos, esta versatilidade promoveu a investigación aplicada neste tipo de sistemas e a súa implementación como dispositivos de administración de fármacos. Reproducido de Chen et al., 2014 baixo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

Porén, a importancia das nanocápsulas de sílice como excipientes vehiculizadores non só se limita á súa excelente capacidade de almacenaxe, xunto coa súa estabilidade e biocompatibilidade. Un aspecto fundamental na fabricación destes nanodispositivos capsulares é a versatilidade sintética da sílice, a cal permite dotar estas estruturas de novas e mellores funcionalidades (Yang et al., 2012). Ditas

funcionalidades poden ser empregadas para promover o recoñecemento de dianas terapéuticas específicas por parte destes materiais, así como proporcionarlles a estes vehículos un alto grao de penetración en determinados tecidos. Máis aínda, unha escolla precisa no deseño das cápsulas mediante a incorporación de diferentes moléculas, supramoléculas ou nanomateriais, pode permitir sintetizar transportadores que respondan de forma rápida e controlada a diferentes estímulos endóxenos (tales como variacións de pH, presenza de enzimas, ou gradientes redox) ou exóxenos (variacións de temperatura, campos magnéticos, ultrasóns ou pulsos de luz) (Mura et al., 2013). A posibilidade de inducir unha reposta concreta por parte da cápsula cando esta se atopa baixo unhas determinadas condicións pode utilizarse para producir unha liberación da droga controlada no tempo, ben sexa de xeito diferido, prolongado ou pulsátil. É por iso que nos últimos anos se puxeron en práctica diferentes metodoloxías coa fin de manipular a administración dos fármacos transportados en cápsulas mediante estímulos do propio organismo ou de xeito remoto.

Un modelo de estratexias de liberación por estímulos internos é a fabricación de sistemas que respondan a cambios no pH. Como é sabido, o pH extracelular dos tecidos tumorais é normalmente ácido (Tannock e Rotin, 1989). Polo tanto, deseñar arquitecturas que administren o fármaco de xeito exclusivo baixo estas condicións é de vital importancia. Un exemplo é o descrito por Du e colaboradores (Du et al. 2009). Neste estudo, introducíronse moléculas fluorescentes no interior de cápsulas de sílice modificadas para favorecer a asociación de oligosacáridos cíclicos á súa superficie baixo un pH neutro. Dita unión bloquea as entradas dos poros da cápsula impedindo a saída das moléculas que se atopan na cavidade interna. A afinidade entre estes compostos cíclicos e a cápsula decrece a pH ácido o que propicia o desacoplamento destes ciclos e como consecuencia a liberación das moléculas aloxadas no interior da estrutura oca (figura 1.6).

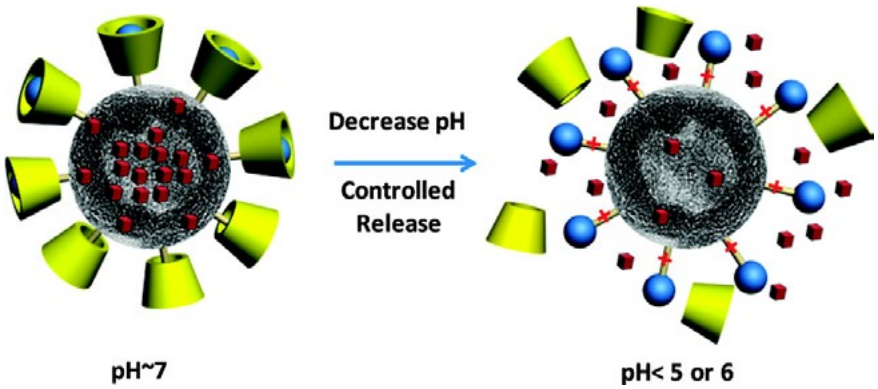


Figura 1.6. Representación do funcionamento de nanoválvulas sensíbeis ao pH. Ao aumentar a acidez desfaise a unión entre a superficie modificada da sílice e os compostos cíclicos o que desbloquea a entrada dos poros e permite a liberación do cargo contido na nanocápsula. Reproducido de Du et al., 2009 con permiso da American Chemical Society, copyright 2009.

Os modelos de liberación controlada mediante estímulos externos teñen tamén unha importancia primordial dado que permiten unha administración do fármaco cun alto grao de control temporal. Deste xeito pódense fabricar sistemas de liberación pulsátil ou secuenciada imitando a liberación natural de moitas moléculas bioactivas no organismo. Un control da magnitude da dose no tempo pode axudar a desenvolver formulacións clínicas cun efecto terapéutico mellorado e unha menor toxici-

dade. Un exemplo deste tipo de enfoques foi achegado recentemente (Lu et al., 2013). Neste traballo aloxouse doxorrubicina, un fármaco amplamente empregado na quimioterapia do cancro, no interior dunha cápsula de sílice que contiña nanopartículas de óxido de ferro. Estes materiais ao estar baixo a influencia dun campo magnético oscilan producindo calor na cavidade e promovendo a liberación do medicamento ao través dos poros (figura 1.7).

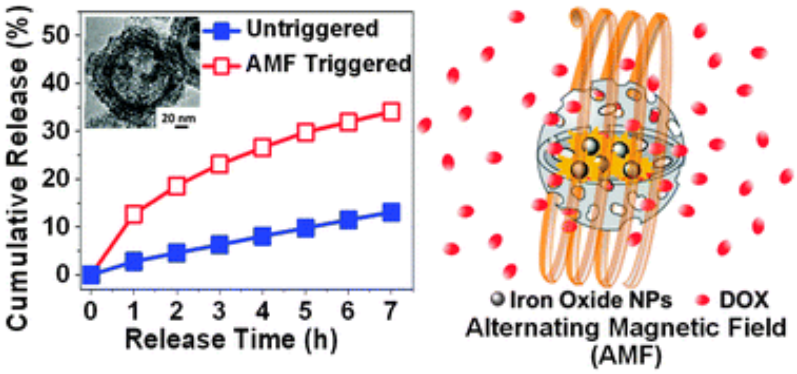


Figura 1.7. A liberación de fármacos contidos en cápsulas de sílice pode favorecerse mediante a aplicación de campos magnéticos externos que dan lugar a un quecemento da cavidade. Así mesmo, este tipo de plataformas poden ser empregadas para combinar quimioterapia con hipertermia. Reproducido de Lu et al., 2013 con permiso da Royal Society of Chemistry, copyright 2013.

Estratexias de liberación análogas a esta poden ser levadas ao cabo incorporando ás cápsulas de sílice nanopartículas de ouro. Grazas ás súas propiedades fototérmicas, estes nanomateriais poden transformar a luz en calor, a cal é rapidamente disipada dando lugar a un importante quecemento ao seu redor, o que finalmente pode dar lugar á liberación da droga. Este comportamento pode inducirse irradiando as partículas cun feixe de luz no rango do infravermello próximo (800 nm). Neste sentido, hai que ter presente que os tecidos orgánicos son practicamente transparentes a esta radiación, polo que a aplicación deste tipo de metodoloxías se erixe como unha alternativa prometedora no campo da biomedicina (Timko et al., 2014). Así mesmo, arquitecturas capsulares que integren de forma conxunta nanopartículas de ouro e moléculas ou supramoléculas termosensíbeis poden dar lugar a sistemas de administración de fármacos cun alto grao de control. Exemplos recentes deste tipo de procedementos foron descritos por Wan e colaboradores, e Li e colaboradores mediante o emprego de polímeros e nanoválvulas sensíbeis á temperatura (Wan et al., 2014; Li et al., 2014).

Máis aló das innumerábeis posibilidades das nanocápsulas de sílice como sistemas de subministro de fármacos controlábeis de forma remota, cabe tamén destacar o seu papel como nanofábricas dos propios medicamentos. Un exemplo ilustrativo desta funcionalidade foi descrito recentemente (Chang et al., 2014). Neste traballo, sintetizáronse cápsulas de sílice en cuxo interior se introduciron enzimas específicas (figura 1.8). Deste xeito, realizouse a conversión intracelular catalizada dunha prodroga (isto é, o precursor dun fármaco) no principio activo (neste caso unha citotoxina). Nesta arquitectura, a membrana porosa de sílice protexe as enzimas da degradación proteolítica, atenúa a resposta inmunolóxica e permite a liberación do principio activo xerado na cavidade. Mediante esta estratexia poden evitarse os potenciais inconvenientes derivados dunha administración directa da citotoxina.

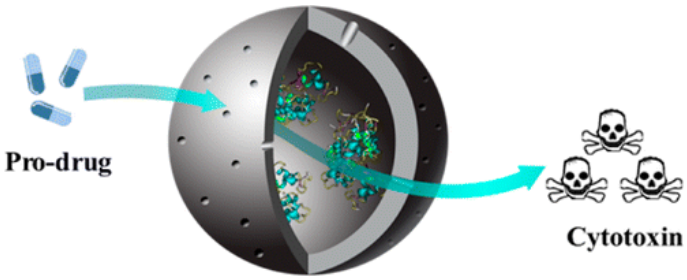


Figura 1.8. As nanocápsulas de sílice mesoporosa permiten aloxar enzimas no seu interior coa fin de realizar procesos de biocatálise intracelular. Nesta situación, os poros da membrana que delimita a cavidade permiten o transporte de moléculas pequenas ao seu través ao mesmo tempo que impide a interacción entre as enzimas e diferentes proteínas presentes no medio, o que en último caso daría lugar á súa degradación e por tanto, á desactivación do nanorreactor. Reproducido de Chang et al., 2014 con permiso da American Chemical Society, copyright 2014.

Nos últimos anos, a versatilidade estrutural e composicional acadada nos procesos de fabricación das nanocápsulas de sílice abriu un amplo espectro de aplicacións a este tipo de arquitecturas. Así, estes sistemas pode ser empregados para transportar a zonas específicas do organismo medicamentos con baixa solubilidade e/ou pouca estabilidade no medio biolóxico. Ademais, as múltiples funcionalidades coas que se dotan as cápsulas pode ser explotada co obxectivo de inducir unha liberación controlada do fármaco mediante diferentes estímulos endóxenos ou exóxenos. Dende un punto de vista biomédico, estes factores xunto coa consistencia e biocompatibilidade propia dos nanomateriais derivados da sílice, fan das nanocápsulas uns excelentes sistemas de subministración de fármacos.

Referencias bibliográficas

Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Advanced Drug Delivery Reviews, 54(5): 631–651.

Bussemer, T., Otto, I., Bodmeier, R. (2001) Pulsatile drug-delivery systems. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 18(5): 433–458.

Chang, F.-P., Hung, Y., Chang, J.-H., Lin, C.-H., Mou, C.-Y. (2014) Enzyme encapsulated hollow silica nanospheres for intracellular biocatalysis. ACS Applied Materials & Interfaces, 6(9): 6883–6890.

Chen, F., Hong, H., Shi, S., Goel, S., Valdovinos, H. F., Hernandez, R., Cai, W. (2014) Engineering of hollow mesoporous silica nanoparticles for remarkably enhanced tumor active targeting efficacy. Scientific Reports, 4(5080):1-10.

Danhier, F., Feron, O., Préat, V. (2010) To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. Journal of Controlled Release, 148(2): 135–146.

Du, L., Liao, S., Khatib, H. A., Stoddart, J. F., Zink, J. I. (2009) Controlled-access hollow mechanized silica nanocontainers. Journal of the American Chemical Society, 131(42): 15136–15142.

Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., McCullough, J. (2013) The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 9(1): 1–14.

Farokhzad, O. C., Langer, R. (2009) Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS Nano, 3(1): 16–20.

Hu, J., Chen, M., Fang, X., Wu, L. (2011) Fabrication and application of inorganic hollow spheres. Chemical Society Reviews, 40(11): 5472–5491.

Jeon, G., Yang, S. Y., Kim, J. K. (2012) Functional nanoporous membranes for drug delivery. Journal of Materials Chemistry, 22(30): 14814–14834.

Li, H., Tan, L.-L., Jia, P., Li, Q.-L., Sun, Y.-L., Zhang, J., Yang, Y.W. (2014) Near-infrared light-responsive supramolecular nanovalve based on mesoporous silica-coated gold nanorods. Chemical Science, 5(7): 2804–2808.

Lu, F., Popa, A., Zhou, S., Zhu, J.J., Samia, A. C. S. (2013) Iron oxide-loaded hollow mesoporous silica nanocapsules for controlled drug release and hyperthermia. Chemical Communications, 49(97): 11436–11438.

Maeda, H., Bharate, G. Y., Daruwalla, J. (2009) Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 71(3): 409–419.

Mura, S., Nicolas, J., Couvreur, P. (2013) Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. Nature Materials, 12(11): 991–1003.

Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., Langer, R. (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nature Nanotechnology, 2(12): 751–760.

Rawat, M., Singh, D., Saraf, S., Saraf, S. (2006) Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29(9): 1790–1798.

Sanvicens, N., Marco, M. P. (2008) Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. Trends in Biotechnology, 26(8): 425–433.

Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., Xia, Y. (2014) Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. Angewandte Chemie International Edition, 53(46), 12320–12364.

Tannock, I. F., Rotin, D. (1989) Acid pH in tumors and its potential for therpeutic exploitation. Cancer Research, 49(16): 4373–4384.

Timko, B. P., Arruebo, M., Shankarappa, S. A., McAlvin, J. B., Okonkwo, O. S., Mizrahi, B., Kohane, D. S. (2014). Near-infrared–actuated devices for remotely controlled drug delivery. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(4): 1349–1354.

Torchilin, V. P. (2006) Multifunctional nanocarriers. Advanced Drug Delivery Reviews, 58(14): 1532–1555.

Vivero-Escoto, J. L., Slowing, I. I., Lin, V. S.-Y., Trewyn, B. G. (2010) Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery. Small, 6(18): 1952–1967.

Wan, H., Zhang, Y., Liu, Z., Xu, G., Huang, G., Ji, Y., Zou, H. (2014) Facile fabrication of a near-infrared responsive nanocarrier for spatiotemporally controlled chemo-photothermal synergistic cancer therapy. Nanoscale, 6(15): 8743–8753.

Wang, M., Thanou, M. (2010) Targeting nanoparticles to cancer. Pharmacological Research, 62(2): 90–99.

Yang, P., Gai, S., Lin, J. (2012) Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. Chemical Society Reviews, 41(9): 3679–3698.

Zhang, Y., Hsu, B. Y. W., Ren, C., Li, X., Wang, J. (2015) Silica-based nanocapsules: synthesis, structure control and biomedical applications. Chemical Society Reviews, 44(1): 315–335.

2. Procesamiento de nanofibras de vidrios bioactivos con técnicas láser

F. Quintero, J. Penide, A. Riveiro, J. del Val, R. Comesaña, F. Lusquiños, J. Pou
Departamento de Física Aplicada, Universidade de Vigo,
Escola de Enxeñeiros Industriais, Lagoas-Marcosende, 36310 Vigo, España.
fquintero@uvigo.es

Resumen

Las redes de nanofibras de vidrios bioactivos son las estructuras más adecuadas para regeneración de tejidos duros como huesos. En este capítulo se aborda la importancia de estas estructuras. Asimismo, se tratan los métodos convencionales de producción de fibras y nanofibras. Finalmente se detalla la producción de nanofibras de vidrios bioactivos mediante la técnica de Laser Spinning y la caracterización de estas fibras.

2.1. Introducción.

El desarrollo de materiales avanzados ha revolucionado la ingeniería biomédica, en concreto en el campo de los implantes. En el caso concreto de los implantes óseos, se requieren materiales con unas propiedades y características muy específicas. En concreto, algunas de las propiedades más relevantes son la capacidad de promover la osteointegración del implante o la posibilidad de liberar componentes activos dentro del hueso.

A pesar de las altas prestaciones que ofrecen muchos de los materiales disponibles hoy en día, no todos son completamente válidos para ser aplicados en ingeniería de tejidos, puesto que en este campo, la exigencia es incluso mayor. Un material es adecuado cuando muestra una elevada biocompatibilidad, pero además también se le exigen propiedades mecánicas y estructurales (Kim y Mooney, 1998, Yang et al., 2001, Hutmacher, 2005, Hollister, 2005). Para ello, es crucial el desarrollo de sustratos tridimensionales o MECs (Matrices Extra-Célulares) adecuados para realizar los cultivos de manera eficiente (Kim y Mooney, 1998). En particular, el biomaterial debe ser capaz de actuar como una estructura de soporte para el tejido mientras éste se regenera. Para ello, debe tener unas propiedades mecánicas similares a las del tejido que va a sustituir, esto es: combinar rigidez y flexibilidad, lo cual incluye la capacidad de distribuir los esfuerzos de manera adecuada para evitar acumulación de tensiones. Por otro lado, deben tener una morfología tal que favorezca tanto la adhesión de las nuevas células como la aparición de canales de conexión en todo el volumen para el más que necesario transporte de nutrientes, que, posteriormente, den lugar a la necesaria vascularización del nuevo tejido. Es decir, deben presentar una estructura porosa con una distribución y tamaño de poros adecuada.

Los materiales más utilizados para regenerar tejidos blandos son los polímeros reabsorbibles o los materiales biológicos como el colágeno (componente más abundante de la piel y los huesos) puesto que son fácilmente conformables para obtener las geometrías requeridas. Por otra parte, cuando lo que se persigue es la regeneración de tejidos mineralizados (como por ejemplo los huesos), las cerámicas bioactivas son las más adecuadas. La selección final del material se hace en función del tipo de células, la respuesta inflamatoria, velocidad de absorción, etc.

Son varias las estructuras y técnicas de fabricación que se han propuesto con el objetivo de cumplir los requisitos estructurales de las MECs. Obviamente, estas soluciones están íntimamente relacionadas con el tipo de material al que van dirigidos, puesto que la técnica de fabricación de una MEC polimérica difiere bastante de la de una MEC cerámica. Las estructuras que mejores resultados han dado para actuar como MECs son las esponjas de alta porosidad y las mallas de fibras (Stevens, 2008). Esto es debido a que un diseño ideal debe combinar una red de macroporos (mayores de 100 micras) con otra de nanoporos (menor que 50 nm). La primera hace posible el crecimiento de tejidos en su interior y el suministro de nutrientes. Mientras que la de nanoporos favorece la adhesión de las células e incrementa la bioactividad de los soportes (Jones y Hench, 2004). En efecto, estas nanoestructuras aumentan exponencialmente el ratio de superficie respecto a volumen lo cual, entre otros factores, mejora ostensiblemente el comportamiento de las MECs (Stevens y George, 2005). Por otra parte, los componentes de los tejidos biológicos así como las interacciones entre células y biomateriales se encuentran en la escala nanométrica (Fisher et al., 2007; Hajiali et al., 2010). A pesar de las altas prestaciones que ofrecen estas esponjas de alta porosidad, las nanofibras han demostrado mayor eficiencia en la regeneración de tejidos. En particular, las MECs compuestas de nanofibras mejoran la adsorción de proteínas y mejoran la adhesión y proliferación de células respecto a sus homólogas en forma de esponjas porosas (Woo et al., 2003). Además, las nanofibras de vidrios bioactivos, gracias a su altísima superficie específica y su elevada solubilidad y reactividad son estructuras muy adecuadas para constituir MECs (Erol-Taygun et al., 2013). Este resultado se debe probablemente a un estímulo más eficaz de los receptores celulares. Por tanto, las estructuras de nanofibras tienen un potencial superior para ser utilizados como soportes para el cultivo de tejido vivo.

2.2. Técnicas para hacer fibras o nanofibras de vidrio

Existen varias técnicas destinadas a la producción de nanofibras (Kuchibhatla et al., 2007). En particular, este apartado se centra en las técnicas de producción de nanofibras de vidrio, puesto que es la principal aplicación de la técnica descrita en este capítulo.

En general, los métodos de producción de nanofibras se basan en calentar un material hasta su temperatura de fusión, o al menos a una temperatura mayor que la de transición vítrea y luego estirarlos para formar fibras. La dificultad reside en controlar adecuadamente la temperatura de trabajo de manera que conduzca a una viscosidad apta para que sea posible estirar el material pero sin que se rompa durante el proceso. En particular, para viscosidades relativamente altas, el material es demasiado duro para ser estirado, sin embargo si la viscosidad es demasiado baja, el material romperá debido a las fuerzas capilares formando pequeñas esferas (gotas). Convencionalmente, se suele aceptar el rango óptimo de viscosidades para el fibrado de vidrios entre 300 y 1000 Pa·s aproximadamente (en escala logarítmica entre 2,5 y 3 Log(Poise)) (Wallenberger, 2000).

En el caso particular de los vidrios inorgánicos el comportamiento de la viscosidad respecto a la temperatura se rige, en la mayoría de los casos, mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\mu = \mu_0 \cdot exp\left(\frac{Q}{RT}\right)$$

Siendo μ_0 una constante inherente al material, Q la energía de activación, R la constante de los gases ideales y T la temperatura a la que se quiere calcular la viscosidad. Se dice que las cerámicas cuya viscosidad se ajusta mejor a la ecuación de Arrhenius a lo largo de un amplio rango de temperaturas presentan un fundido duro. En particular, en estos materiales las viscosidades varían lentamente cuando la temperatura está cerca de la temperatura de transición vítrea. Por otro lado, existen cerámicas cuya viscosidad solo se ajusta a la ecuación de Arrhenius en un pequeño intervalo de temperaturas. Concretamente, a partir de la transición vítrea su viscosidad varía bruscamente, y por ello se les llama cerámicas de fundido frágil (Ojovan, 2008).

Por último, también existen ciertas cerámicas en las cuales la transición de sólido a líquido es muy rápida. Se puede decir que al aumentar la temperatura pasan súbitamente a tener una viscosidad prácticamente despreciable (Wallenberger, 2000). Estas cerámicas suelen denominarse de fundido no viscoso y es muy difícil obtener fibras a partir de ellos mediante técnicas convencionales.

En resumen, es muy importante controlar la viscosidad de los materiales a través de su temperatura para una correcta formación de las fibras. En los fundidos duros no existen cambios bruscos de viscosidad con la temperatura, con lo cual es más sencillo producir fibras a partir de estos materiales. Sin embargo, en los fundidos frágiles y sobre todo en los no viscosos, la viscosidad es muy sensible al cambio de temperaturas, lo cual hace que haya que tener un control más preciso de esta última para tener éxito en la formación de fibras.

Existen 5 métodos que se podrían llamar "tradicionales", para obtener fibras de diámetros macro y micrométricos a partir de diferentes cerámicas o de vidrio (figura 2.1). A continuación se hace una breve descripción de cada uno.

A. Estirar el material mediante un tambor giratorio que se encuentra en la parte inferior de un recipiente, el cual tiene un pequeño orificio por donde cae el material fundido.

B. Extruir el material fundido por una pequeña abertura y dirigirlo hacia un lugar con una atmósfera reactiva.

C. Tirar del material fundido y subenfriado hacia arriba.

D. Fundir el material mediante láser en atmósfera inerte y tirar mediante un tambor para estirarlo.

E. Partir de una preforma del material, calentarlo en un punto determinado y tirar de él de manera controlada para estilarlo.

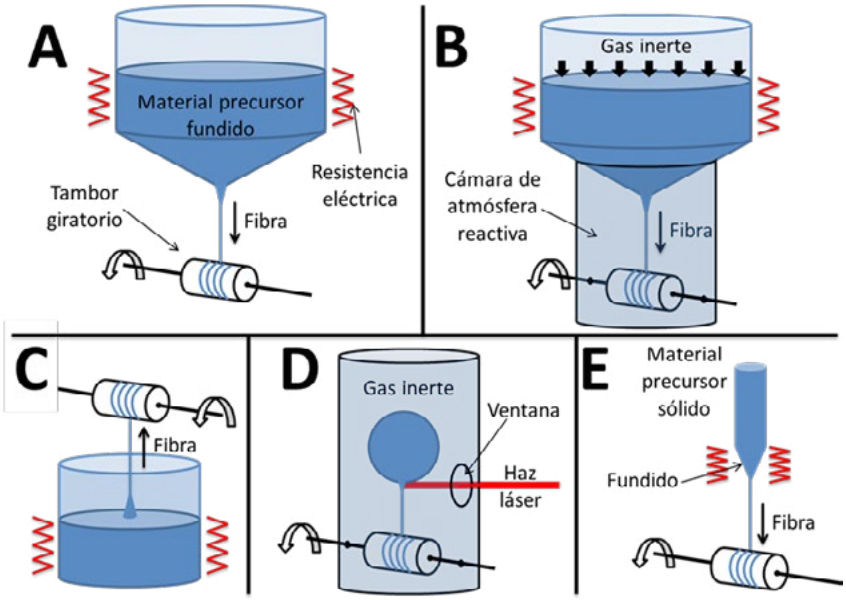


Figura 2.1. Ilustración de las técnicas tradicionales de producción de fibras.

Las cerámicas con viscosidades relativamente elevadas, las cuales se pueden estirar a temperaturas superiores a 1500 ºC se suelen fibrar mediante el método A. Las fibras ópticas y fibras estructurales, las cuales tienen altas viscosidades se suelen fibrar mediante el método E. Los aluminosilicatos, que en este caso son materiales de fundido frágil, se pueden fibrar también mediante el método E, pero se necesita un control mucho mayor sobre las condiciones de trabajo. En cuanto al método B, es útil para producir fibras de alúmina o metales puesto que pertenecen a los fundidos no viscosos y se puede estabilizar químicamente el material mediante la atmósfera controlada. Para materiales de fundido frágil, como el YAG (Ytrium Aluminium Garnet) y producir fibras amorfas es necesario emplear el método D, en el caso concreto del YAG, utilizando una atmósfera de argón (Weber et al., 1998).

En cuanto a los métodos para la obtención de fibras de tamaño nanométrico, nanofibras, se clasifican principalmente en dos grupos: arriba-abajo o abajo-arriba. Esto define el tamaño de los materiales precursores utilizados en cada caso (Zhang, 2003). En el primero, se parte de materiales con tamaños mayores que los nanométricos para producir esos nanomateriales, mientras que en los métodos abajo-arriba se parte de tamaños menores que los nanométricos para, mediante algún método de agregación, llegar a formar nanomateriales.

2.2.1. Métodos abajo – arriba

2.2.1.1. Fase líquida

El material precursor se encuentra en forma de suspensión. Mediante procesos físico-químicos, las estructuras subnanométricas se unen para formar una mayor.

Uno de los métodos más usados es el basado en la utilización de un molde con la forma deseada, en el cual se introduce el material directamente en fase líquida, o por deposición desde una solución (Xu y Guo, 2003). Para la producción de nanofibras, es típico utilizar un material poroso, donde las fibras se van formando en los conductos internos de ese material. Este método ha demostrado su gran utilidad para la obtención de fibras de polímeros conductores, metales, semiconductores y otros materiales.

2.2.1.2. Fase vapor

En este caso se parte de un material en fase gaseosa. Existen fundamentalmente dos técnicas que se basan en el empleo de las siguientes mecánicas de crecimiento para producir las fibras: vapor-líquido-sólido y vapor-sólido.

La primera fue propuesta por Wagner y Ellis (Wagner y Ellis, 1964) para producir nanoagujas (fibras unidas a un sustrato). Utiliza una gota de aleación de sílice y oro como catalítico, y desde la fase gaseosa promueve un crecimiento de la fibra por deposición de Si (figura 2.2). Este método tiene la ventaja de que se puede realizar con un bajo consumo de energía, además se puede controlar la red de nanoagujas con solo colocar el catalítico en los lugares adecuados. Se pueden realizar nanoagujas de otros óxidos como In_2O_3, Ga_2O_3 o TiO_2. Las desventajas son la lenta velocidad de crecimiento, la exigencia de una atmósfera controlada y el corto tamaño de estas nanoagujas.

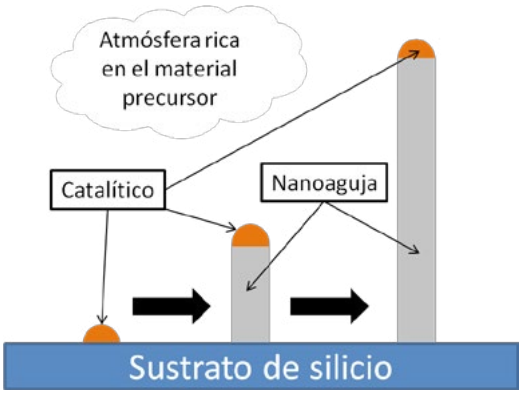


Figura 2.2 Ilustración del funcionamiento del método abajo-arriba vapor-líquido-sólido para la obtención de nanofibras.

En cuanto al método vapor-sólido, se trata de un proceso parecido, pero sin catalizador. El material precursor, que está a alta temperatura, se condensa directamente sobre el sustrato puesto que está a menor temperatura. Las moléculas inicialmente condensadas actúan como punto de nucleación, facilitando el crecimiento direccional para formar las nanoagujas.

2.2.1.3. Fase sólida

El método se basa en preparar una solución coloidal (suspensión de partículas nanométricas en un líquido) de varios compuestos. Esta solución se somete a un proceso de condensación para obtener un gel, el cual tiene una viscosidad mayor. Gracias a ello, se puede modelar mediante extrusión o arras-

tre mecánico. Finalmente el material se calcina para eliminar cualquier resto del solvente y obtener el material final.

Esta técnica se suele utilizar para obtener nanofibras poliméricas y nanofibras cerámicas como alúmina, circonatos, YAG y otras. El resultado son fibras de diámetros relativamente grandes, pero de gran resistencia mecánica.

2.2.2. Métodos arriba – abajo

En este apartado se engloban los métodos que parten de materiales de tamaños micro o incluso macroscópico para llegan a tamaños nanométricos mediante algún proceso que permita reducir alguna de sus dimensiones. En general, estos métodos se basan en fundir el material y estirarlo para formar las fibras. Se puede decir que son la evolución natural de los métodos convencionales vistos al principio de este apartado.

2.2.2.1. Fibrado por rotación

También se le conoce como Rotary Jet-Spinning (RJS). El sistema está básicamente formado por un rotor con un depósito en el interior para el material precursor fundido. Este material fluye hacia la parte externa del rotor y, debido a la centrifugación, el material sale por unos orificios en el exterior del rotor. Así, las fibras se van formando y se recogen ya subenfriadas en el colector (figura 2.3). Con este método es posible la producción de microfibras de materiales poliméricos y cerámicos, y en algunos casos se llega incluso a la producción de nanofibras.

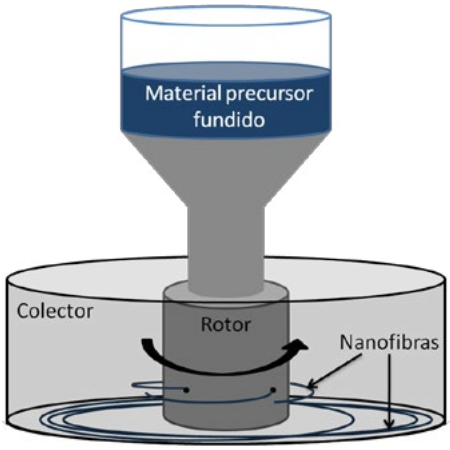


Figura 2.3. Ilustración del funcionamiento del método arriba-abajo Rotary Jet-Spinning.

2.2.2.2. Fibrado electroestático

El fibrado electroestático (Electrospinning en inglés) es la técnica más utilizada en la actualidad para la producción de nanofibras de varios materiales. La gran ventaja es que permite la producción de fibras continuas y con diámetros realmente pequeños (Bhardwaj y Kundu, 2010). En la figura 2.4 se ilustra el funcionamiento de este método. El material precursor ya fundido se coloca en una jerin-

ga y se mantiene suspendido en la boca de la aguja (capilar metálico) gracias a una presión controlada. A continuación, se aplica una tensión eléctrica entre el capilar metálico y el colector. Cuando la tensión alcanza un nivel adecuado, el material fundido se carga eléctricamente, creando una repulsión con el capilar metálico que, finalmente produce el estiramiento del material fundido y las fibras (Doshi y Reneker, 1995).

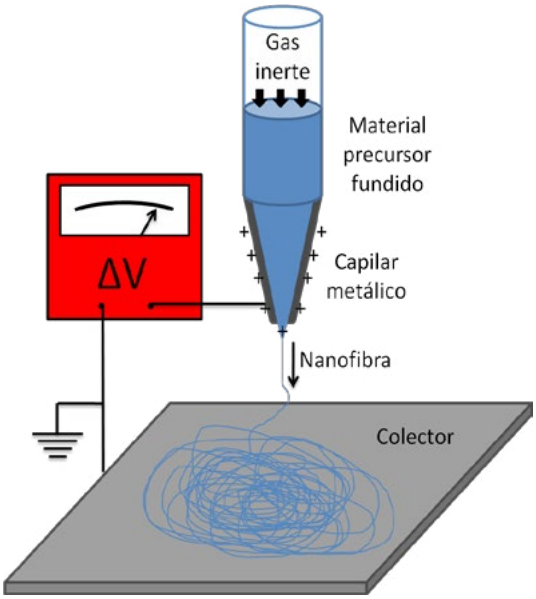


Figura 2.4 Ilustración del funcionamiento del método arriba-abajo Electrospinning para la producción de nanofibras.

La principal ventaja de este método es su bajo coste comparado con los métodos abajo-arriba y su mayor tasa de producción (Dzenis, 2004). Las fibras producidas tienen diámetros desde 50 nm a 5 micras dependiendo del material precursor utilizado y son extremadamente largas (Doshi y Reneker, 1995). Los materiales fibrables por este método son fundamentalmente compuestos orgánicos como la seda de araña, polímeros y colágenos, aunque también es posible fibrar algunas cerámicas. Por otro lado, la desventaja que presenta este método es la necesidad de que el material a fibrar presente una relación entre viscosidad y temperatura adecuada, es decir, que exista un amplio rango de temperaturas en el cual la viscosidad del material permita estirarlo debido a la acción del campo eléctrico. El problema radica principalmente en las cerámicas. Su temperatura de fusión es muy elevada, lo cual hace que sea técnicamente muy complicado implementar este sistema para obtener nanofibras cerámicas.

En resumen, existe una gran variedad de métodos y tecnologías que permiten producir nanofibras de todo tipo: cristalinas o amorfas, continuas o de longitud limitada, de geometría cilíndrica o no y de una gran variedad de materiales. No obstante, todas las técnicas que se han explicado presentan ventajas e inconvenientes. En general, aquellas que permiten realizar nanofibras de gran variedad de materiales presentan necesidades que aumentan su coste de producción: cámaras de alto vacío, condiciones atmosféricas muy controladas, etc; y además, no permiten la producción de grandes cantidades de nanofibras. Por otro lado, las que no tienen este inconveniente solo permiten la producción de nanofibras con ciertos materiales puesto que estos deben cumplir ciertas condiciones para su viabilidad.

Si lo que se pretende es obtener nanofibras amorfas de gran longitud, el fibrado electroestático es el único método capaz de producirlas. Sin embargo, el gran problema radica a la hora de obtener nanofibras de materiales con elevada temperatura de fusión, como los cerámicos. En el siguiente apartado se aborda un método nuevo, llamado Fibrado Láser (Laser Spinning), que permite fibrar materiales con una temperatura de fusión elevada e incluso materiales de fundido frágil. Además, este método presenta una alta capacidad de producción y permite obtener nanofibras de manera sencilla y sin necesidad de control atmosférico.

2.3. La técnica de Laser Spinning

El Fibrado Láser o Laser Spinning es una técnica capaz de producir nanofibras muy largas y amorfas a partir de materiales cerámicos con una gran variedad de composiciones (Quintero et al., 2007a, 2007b, 2009). Esta técnica ha sido desarrollada en los laboratorios de aplicaciones de los láseres de la Escuela de Ingeniería Industrial de la Universidad de Vigo y patentada por los autores de este trabajo. En la figura 2.5 se puede ver una ilustración del proceso. El material precursor se encuentra inicialmente en estado sólido y en forma de placa. La técnica se basa en calentar y fundir un pequeño volumen de este material mediante un haz láser de alta potencia mientras que un chorro de gas supersónico estira y enfría rápidamente el material para formar las nanofibras. Todo esto ocurre en tiempos del orden de los milisegundos, puesto que el láser tiene una densidad de energía tal que es capaz de calentar un pequeño volumen de material desde temperatura ambiente hasta su temperatura de fusión (que en algunos casos es de más de 2000 °C) a velocidades altísimas, creando además un gradiente de temperatura de más de 1000 °C/mm. El gas supersónico es capaz de estirar y enfriar muy rápidamente el material de manera que mantiene su forma alargada.

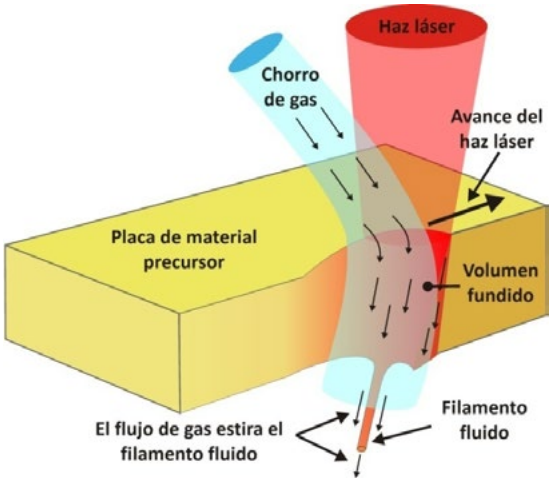


Figura 2.5. Ilustración del funcionamiento de la técnica de Laser Spinning para la producción de nanofibras.

Para que la producción de nanofibras se haga efectiva, debe haber un buen control de la temperatura del material fundido y de la velocidad de estiramiento. En particular, la viscosidad del material debe ser lo suficientemente baja como para permitir su estiramiento por el chorro de aire supersónico, pero también lo suficientemente alta para que el hilo que se está formando no rompa y forme pe-

queñas gotas. En este aspecto, la técnica de fibrado láser tiene una gran ventaja sobre otras técnicas de fibrado convencionales y sobre técnicas como el fibrado electrostático. Pues el rango de viscosidades en el que la técnica de fibrado láser es efectiva, es más amplio que para las técnicas mencionadas. Ello es debido, fundamentalmente, a la elevada velocidad de los procesos de fusión, elongación y enfriamiento del material precursor. Esto hace posible procesar con éxito materiales que producen fundidos frágiles e incluso composiciones con alta tendencia a devitrificar. Otra de las ventajas de este método es que no es necesario crear condiciones ambientales controladas ni es necesario emplear un crisol. El Laser Spinning es un proceso que se realiza en el ambiente. Además, tiene una elevada tasa de producción de fibras.

El tipo de láser que se emplea depende sobre todo del material que se desea fibrar. Existen una gran variedad de equipos láser que emiten en diferentes longitudes de onda. La naturaleza del material es la que define qué longitud de onda es absorbida de manera más eficiente. En el caso de las cerámicas oxídicas, por ejemplo, el láser de CO_2 es una buena elección. El láser se debe configurar para trabajar en modo de operación continuo, y el sistema óptico es tal que se obtiene la densidad de potencia óptima en la superficie del material precursor para optimizar la tasa de producción y diámetro de las fibras obtenidas según los estudios de productividad ya realizados (Quintero et al., 2014).

En la práctica, el Laser Spinning produce una red desordenada de fibras muy largas, las cuales pueden alcanzar algunos decímetros. Su apariencia macroscópica es muy parecida a la del algodón convencional tal como se puede observar en la figura 2.6. Sin embargo, estas fibras tienen la ventaja de que son totalmente independientes, con lo cual se pueden extraer para ser hiladas.

Figura 2.6. Imagen tomada de una red de nanofibras en la cual se comparan con una moneda de 1 euro.

El microscopio electrónico revela que las fibras presentan una morfología cilíndrica bien definida, con un diámetro que prácticamente no varía a lo largo de toda su longitud. Las fibras son flexibles y no están unidas unas a otras, con lo cual se pueden alinear, ordenar, separar en fibras individuales e incluso tejer. Los diámetros de las fibras presentan una distribución que típicamente va desde las decenas de nanómetros a varias micras. En la figura 2.7 se pueden ver las fibras en detalle mediante el microscopio electrónico de barrido (figura 2.7a) y el microscopio electrónico de transmisión (figura 2.7b). Todas estas fibras son amorfas sin importar la naturaleza del material del que provengan, incluso aunque este material sea originariamente cristalino. Esto es debido a la rápida velocidad de enfriamiento que impide que el material cristalice.

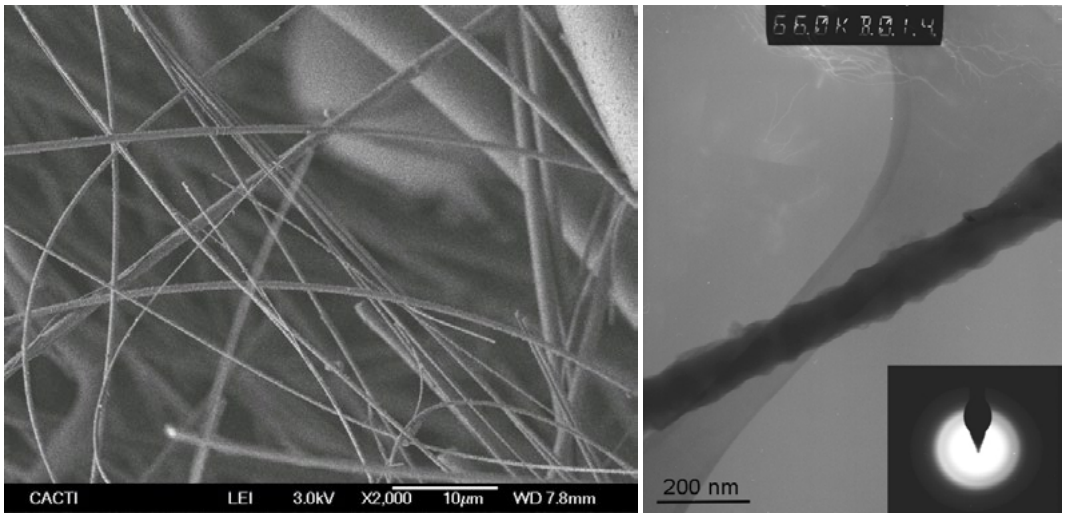


Figura 2.7. Imágenes de las fibras de vidrio con la composición del Bioglass® 45S5 producidas mediante la técnica de Laser Spinning. (a) La micrografía obtenida con el microscopio electrónico de barrido de efecto campo (FESEM) muestra la geometría cilíndrica y uniforme de las fibras y un ejemplo de la variación de diámetros entre ellas. (b) La micrografía obtenida con el microscopio electrónico de transmisión muestra un detalle de una nanofibra de la misma composición. El patrón de difracción inserto revela su estructura amorfa.

Los estudios experimentales llevados a cabo (Dieste et al., 2011; Quintero et al., 2014) demostraron que la distribución de los diámetros finales de las fibras en cada ensayo se ajusta perfectamente a la distribución log normal. Esta distribución de diámetros se puede variar mediante el adecuado ajuste de las condiciones de trabajo (potencia del haz láser, velocidad de movimiento del material precursor, etc.

2.4. Producción de nanofibras de vidrio bioactivo mediante Laser Spinning

Otra gran ventaja del sistema de Fibrado Láser es que las nanofibras tienen prácticamente la misma composición química que la del material precursor. De hecho, se han producido mediante esta técnica una gran cantidad de fibras de diferentes materiales (Quintero et al., 2007a, 2007b, 2009). En particular, la técnica de Fibrado Láser fue la primera capaz de producir nanofibras de Bioglass 45S5 y 52S4.6 (Quintero et al., 2009) entre otras composiciones. La dificultad de producirlas con otras técnicas reside en que estas composiciones producen un fundido frágil y con elevada tendencia a devitrificar. La técnica de Fibrado Láser permite obtener nanofibras de este material gracias a la elevada velocidad del proceso tal como se mencionó anteriormente. Para ello, mediante técnicas convencionales de fusión en un horno se prepararon placas del material precursor con la composición deseada y el espesor adecuado. A continuación, las placas se procesaron directamente mediante la técnica de laser spinning para obtener una densa red de micro y nano fibras. En la tabla 2.1 se muestra una comparación entre las composiciones de las placas de material precursor y de las fibras obtenidas a partir de ellas, analizadas mediante Fluorescencia de Rayos-X. Se puede apreciar que en ambos casos las fibras y los materiales precursores tienen composiciones muy similares. Las mayores diferencias se encuentran en este caso en los componentes más volátiles, como son Na_2O y P_2O_5. El aumento en el porcentaje relativo de los demás componentes se debe únicamente a la disminución de los anteriormente citados. Este excelente resultado se debe, de nuevo, a la alta velocidad del proceso. El ma-

terial se funde y solidifica en tiempos del orden de las milésimas de segundo, por ello los componentes más volátiles no tienen prácticamente tiempo a vaporizarse.

Muestra		SiO_2	Na_2O	CaO	P_2O_5
45S5	Precursor	45.54	23,87	27,42	2,55
	Fibras	46.00	23,19	27,68	2,43
52S4,6	Precursor	51.47	21,09	24,13	2,53
	Fibras	52,27	20,00	24,71	2,30

Tabla 2.1. Composición química en % en peso de dos placas de sendos vidrios bioactivos empleadas como material precursor y de las fibras obtenidas a partir de ellos.

Los ensayos de bioactividad permiten comprobar la utilidad como biomaterial de las nanofibras bioactivas producidas mediante el método de Laser Spinning. Estos ensayos se basan en sumergir las nanofibras en un líquido que simula el fluido corporal (SBF) durante diferentes periodos de tiempo, para posteriormente analizar el estado de las fibras en cada uno de ellos y determinar su evolución. Tras 12 horas, las fibras aparecen completamente cubiertas de fosfato cálcico amorfo. Este compuesto, en su forma cristalina, constituye el setenta por cierto del hueso humano, concretamente en su forma de hidroxiapatita. A continuación, tras uno o dos días de incubación, muchas de las fibras aparecen huecas, debido a que a medida que la capa externa de fosfato cálcico se va formando, la fibra de vidrio bioactivo se va disolviendo. Por último, a partir del día 5 de incubación la capa de fosfato cálcico cristaliza en forma de hidroxiapatita (Quintero et al., 2009). Esto quiere decir que las nanofibras de vidrio bioactivo presentan elevada bioactividad y bioreabsorción, puesto que la formación de la hidroxiapatita favorece la proliferación y diferenciación de los osteoblastos y favorece la osteointegración.

En resumen, la técnica de Laser Spinning se puede utilizar para la producción de nanofibras biocompatibles de diversas composiciones. La elevada velocidad en la que se funde y resolidifica el material, permite producir incluso fibras amorfas a partir de composiciones que presentan fundidos no viscosos y alta tendencia a la devitrificación. Por otra parte, no se presenta difícil variar la composición de estas nanofibras con el objetivo de mejorar sus propiedades. En particular, ya se ha demostrado la capacidad de esta técnica para producir fibras con elementos bactericidas, por ejemplo, nanopartículas de plata (Cabal et al., 2013).

Agradecimientos
Este trabajo ha sido financiado parcialmente por la Xunta de Galicia (10DPI303014PR, CN2012/292, POS-A/2013/161).

Referencias bibliográficas

Bhardwaj, N., Kundu, S.C. (2010) Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. Biotechnology Advances, 28: 325–347.

Cabal, B., Quintero, F., Díaz, L.A., Rojo, F., Dieste, O., Pou, J., Torrecillas, R., Moya, J.S. (2013) Nanocomposites of silver nanoparticles embedded in glass nanofibres obtained by laser spinning. Nanoscale, 5: 3948–3953.

Dieste, O., Quintero, F., Pou, J., Lusquiños, F., Riveiro, A. (2011) Influence of the working conditions on nanofiber diameters obtained by Laser Spinning. Applied Physics A: Materials Science and Processing, 104: 1217–1222.

Doshi, J., Reneker, D.H. (1995). Electrospinning process and applications of electrospun fibers. Journal of Electrostatics, 35: 151–160.

Dzenis, Y. (2004) Spinning continuous fibers for nanotechnology. Science, 304: 1917–1919.

Erol-Taygun, M., Zheng, K., Boccaccini, A.R. (2013) Nanoscale bioactive glasses in medical spplications. International Journal of Applied Glass Science, 4: 136–148.

Fisher, J.P., Mikos, A.G., Bronzino, G.D. (2007) Nanocomposite scaffolds for tissue engineering. En tissue engineering. CRC Press, Boca Raton, Florida, EE.UU, p. 11.

Hajiali, H., Karbasi, S., Hosseinalipour, M., Rezaie, H.R. (2010) Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 21: 2125–2132.

Hollister, S.J. (2005) Porous scaffold design for tissue engineering. Nature Materials, 4: 518–524.

Hutmacher D.W. (2005) Design and fabrication of scaffolds via solid free-form fabrication. In: Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine. Reis R.L and San Román J. (ed.), CRC Press, Boca Raton, EE.UU, pp. 67-90.

Jones, J.R., Hench, L.L. (2004) Factors affecting the structure and properties of bioactive foam scaffolds for tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials, 68: 36–44.

Kim, B.S., Mooney, D.J. (1998) Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. Trends in Biotechnology, 16: 224–229.

Kuchibhatla, S.V.N.T., Karakoti, A.S., Bera, D., Seal, S. (2007) One dimensional nanostructured materials. Progress in Materials Science, 52: 699–913.

Ojovan, M.I. (2008) Viscosity and glass transition in amorphous oxides. Advances in Condensed Matter Physics, 2008: 817829.

Quintero, F., Pou, J., Lusquiños, F., Riveiro, A. (2007a) Experimental analysis of the production of micro- and nanofibres by Laser Spinning. Applied Surface Science, 254: 1042–1047.

Quintero, F., Mann, A.B., Pou, J., Lusquiños, F., Riveiro, A. (2007b) Rapid production of ultralong amorphous ceramic nanofibers by laser spinning. Applied Physics Letters, 90 (15): 153109.

Quintero, F., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., Riveiro, A., Mann, A.B., Hill, R.G., Wu, Z.Y., Jones, J.R. (2009) Laser spinning of bioactive glass nanofibers. Advanced Functional Materials, 19: 3084–3090.

Quintero, F., Dieste, O., Penide, J., Lusquiños, F., Riveiro, A., Pou, J. (2014) Nonconventional production of glass nanofibers by laser spinning. Journal of the American Ceramic Society, 97: 3116–3121.

Stevens, M.M. (2008) Biomaterials for bone tissue engineering. Materials Today, 11: 18–25.

Stevens, M.M., George, J.H. (2005) Exploring and engineering the cell surface interface. Science, 310: 1135–1138.

Wagner, R., Ellis, W. (1964), Vapor-liquid-solid mechanism of single crystal growth. Applied Physics Letters, 4 (5): 89-90.

Wallenberger, F.T. (2000) Continuous melt spinning processes. In: Advanced inorganic fibers: processes, structures, properties, applications. Naslain, R., Macchesney, J.B, Ackler, H.D., Wallenberger, F.T. (ed.). Springer US, pp. 79–112.

Weber, J.K.R., Felten, J.J., Cho, B, Nordine, P.C. (1998) Glass fibres of pure and erbium- or neodymium-doped yttria-alumina compositions. Nature, 393: 769–771.

Woo, K.M., Chen, V.J., Ma, P.X. (2003) Nano-fibrous scaffolding architecture selectively enhances protein adsorption contributing to cell attachment. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, 67: 531–537.

Xu, D., Guo, G. (2003) Template assisted synthesis of semiconductor nanowires. In: Nanowires and nanobelts. Wang, Z.L. (ed.), Springer US, pp. 317–341.

Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K. (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Engineering, 7: 679–689.

Zhang, S. (2003) Building from the bottom up. Materials Today, 6: 20–27.

3. Espectroscopia Raman para el análisis de tejido vivo y biocerámicas de origen biológico y sintético

H. Aguiar, M. Rodríguez-Domínguez, B. Coello, J.R. Caeiro-Rey, S. Stefanov, C. Rodríguez-Valencia, E. López, M. López-Álvarez, S. Chiussi, J. Serra*, P. González*

Grupo Nuevos Materiales, Dpto. Física Aplicada, Escuela de Ingeniería Industrial, Instituto de Investigación Biomédica (IBI), Universidad de Vigo, 36310 Vigo

haguiar@uvigo.es; jserra@uvigo; pglez@uvigo.es

Resumen

La espectroscopia Raman es una técnica versátil, no invasiva y no destructiva que es capaz de aportar información vibracional muy específica sobre los enlaces químicos y su entorno. Asimismo, proporciona una huella dactilar de la molécula que puede ser identificada incluso a partir de los cambios en la simetría local del enlace químico, extremo que la sitúa en un lugar preferente para el estudio de materiales de muy diverso origen. En el presente capítulo se aborda el estudio mediante espectroscopia Raman de biocerámicas en su acepción más amplia, que abarca desde tejidos vivos con diferente grado de mineralización, hasta biomateriales de origen biológico y sintético. Además, se incorporan análisis mediante difracción de rayos x como técnica complementaria para el estudio estructural de los materiales y como método de validación de los resultados obtenidos mediante la espectroscopia Raman.

3.1. Introducción

Como es bien conocido, las biocerámicas se han consolidado como materiales de gran utilidad en el campo de la regeneración ósea (Vallet-Regí, 2001, Pelletier, 1999). Esto es así por la simple razón de que el tejido óseo de los vertebrados es un material híbrido formado por una fase mineral (70% de su peso), matriz orgánica (24%) y agua (el restante 6%). La fase mineral es un material cerámico compuesto de alta dureza y bajo peso, formado mayoritariamente por fosfatos de calcio estructurados químicamente en forma de hidroxiapatita carbonatada cristalina y con un 10% de deficiencia de calcio. Su estructura cristalizada en prismas hexagonales de tamaño nanométrico y su composición deficiente en calcio, favorecen su alto nivel de solubilidad lo que promueve una regeneración ósea constante por medio de una continua disolución y ciclos de cristalización (Estrada et al., 2006). Intentando mimetizar esta estructura y composición tan bien diseñada por la naturaleza a lo largo de la evolución de los organismos vivos, una gran parte del esfuerzo investigador ha estado orientado al desarrollo de biocerámicas y materiales compuestos lo más similares posibles a los biológicos.

El fino control de la composición y estructura de estos nuevos materiales requiere de técnicas analíticas que permitan ajustar los parámetros de procesamiento para obtener un abanico de propiedades según la aplicación final. Por otro lado, también resulta de muchísimo interés disponer de técnicas de diagnóstico, a través del estudio del propio tejido vivo, que permitan una mejor prevención y tratamiento de las dolencias asociadas. Un caso típico es el del tejido óseo, donde la fase mineral del mismo puede verse afectado por patologías clínicas tan conocidas como la osteoporosis.

En este marco, cobra cada vez más interés el poder disponer de una técnica versátil y no destructiva que nos permita el estudio de un amplio tipo de muestras y materiales. En este contexto, emerge la espectroscopia Raman la cual aporta singularidades que la sitúa en un lugar preferente para este cometido.

La espectroscopia Raman se basa en el efecto del mismo nombre y tiene lugar cuando un haz de luz monocromática incide en una molécula, produciendo así dispersión inelástica del fotón incidente. Ese fenómeno permite el estudio de los movimientos rotacionales y vibracionales de la molécula en cuestión (Pelletier, 2003). Fue descrito por primera vez por el físico C. V. Raman en 1928 (Bhagavantam, 1971), lo que le supuso el premio Nobel de física en 1930. Ya en los años 60, la espectroscopia Raman experimentó un espectacular avance debido a la aparición del láser que sustituyó a la lámpara de mercurio y, más tarde, en la década de los 90, la utilización de los detectores de acoplamiento de carga (CCD), filtros, *gratings* o redes de difracción, mejoraron mucho sus prestaciones y la convirtieron en una técnica potente y fácil de usar (Diem, 1994, Pitt et al., 2005).

La espectroscopia Raman es una técnica de análisis que se realiza directamente sobre la muestra en estudio a partir de un volumen muy pequeño de material sin necesidad de ningún tipo de preparación previa y no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva. Como el agua no interfiere de manera apreciable, la espectroscopia Raman es adecuada para el examen microscópico de minerales, materiales como compuestos inorgánicos u orgánicos, cerámicas, polímeros, células y proteínas. Otras ventajas destacables son la ausencia de contacto con la muestra, la posibilidad de analizar una gran diversidad de muestras ya sean sólidas, líquidas o gaseosas, opacas o transparentes, amorfas o cristalinas; la rapidez en la adquisición de espectros (10-12 segundos) y la posibilidad de usar fibra óptica de hasta 100 metros para realizar mediciones en zonas de difícil acceso (Smith y Rehman, 1995, Richards-Kortum y Sevick-Muraca, 1996). Teniendo en cuenta todas estas posibilidades no sorprende que, en los últimos años, la espectroscopia Raman se haya convertido en una herramienta muy útil en un amplio campo de aplicaciones, como se muestra en la tabla 3.1.

En este marco, el presente capítulo aborda el estudio de biocerámicas mediante espectroscopia Raman en su acepción más amplia, que abarca desde tejidos vivos con diferente grado de mineralización hasta biomateriales de origen natural y sintético.

Ámbito	Aplicación
Ciencias básicas (Biología, Química y Física)	Monitorización no invasiva del tejido vivo y análisis *in situ* de cultivos acuosos. Determinación de la estructura molecular en química sintética. Caracterización estructural de los materiales y determinación de orientación cristalográfica de muestras tanto en *bulk* como en capas delgadas. Estudio de la orientación macromolecular en entramados cristalinos, cristales líquidos o muestras de polímeros. Investigación y determinación del grado de orden-desorden estructural en sustancias poco ordenadas como vidrios.

Médico (Oftalmología, Dermatología Cardiología, Cirugía, Farmacología e Investigación forense)	Prevención y diagnóstico de distintas enfermedades como alteraciones del cristalino ocular, cutáneas como la psoriasis, calcificación de la aorta y los tejidos que la componen. Seguimiento en tiempo real de mezclas de gases respiratorios y la anestesia durante la cirugía. Identificación no destructiva de medicamentos y materiales. Análisis remotos para identificar y caracterizar trazas de material superficial sin destrucción de pruebas en causas criminales.
Patrimonio, Arte y Arqueología	Identificación de la composición química de documentos históricos para conocimiento de las condiciones sociales y económicas en el momento en que los documentos fueron producidos. Por la sensibilidad a los cromóforos o moléculas causantes del color como clorofila, licopeno, β-caroteno, etc., se utiliza en el estudio de obras antiguas, análisis de pigmentos anteriores a la pintura, detección de falsificaciones o restauración de mínimos daños.
Industria alimentaria	Determinación de la presencia de macro-componentes como proteínas, lípidos, carbohidratos y agua.
Electrónica	Estudio estructural y monitorización industrial de las propiedades térmicas y mecánicas de los semiconductores.
Medio ambiente, Geología y Geobarometría	Análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos en suelos y aguas y determinación de la contaminación por complejos metálicos, fenoles, ácidos poliorgánicos e hidrocarbonos. Análisis de la estructura, textura y reconocimiento de rocas metamórficas. Análisis de piedras preciosas y estudio de minerales en condiciones de alta y ultra-alta temperatura y presión.
Industria petroquímica	Control de calidad en polímeros y emulsiones y desactivación de catalizadores.
Seguridad	Detección de artefactos explosivos en puertos, aeropuertos, estaciones de trenes y de metro, tanto en muestras intactas como en residuos de explosión.

Tabla 3.1 Ejemplos de algunos campos de aplicación de la espectroscopia Raman (Pitt et al., 2005, Posset et al., 1998, Milhály et al., 2009, Penel et al., 2005, Cazabou et al., 2004).

3.2. Fundamentos de la espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman se basa en la incidencia de un haz de luz monocromática de una cierta longitud de onda sobre una muestra y el análisis de la luz dispersada. La mayor parte de la luz incidente es dispersada elásticamente por lo que el estado final de energía de la molécula es el mismo que el inicial. Este fenómeno se conoce como dispersión Rayleigh y no aporta información relevante sobre la muestra. Como puede observarse en el esquema de la figura 3.1, durante la interacción, una pequeña fracción de la luz incidente presenta un cambio en la frecuencia como consecuencia de la dispersión inelástica de la luz en interacción con la nube electrónica de los átomos constituyentes de la muestra. Este fenómeno es conocido como dispersión Raman Stokes si el fotón dispersado tiene una energía menor que el incidente o Raman anti-Stokes si, por el contrario, la energía del fotón disper-

sado es mayor. Son estos últimos fotones dispersados inelásticamente los que proporcionan información sobre la configuración de enlaces químicos en la muestra ya que la frecuencia final es característica del material e independiente de la radiación incidente (Pelletier, 1999, Bhagavantam, 1971). Además, según la ley de distribución de energías de Maxwell-Boltzmann, como la mayoría de moléculas se encuentran en el estado de menor energía, es mucho más probable que se produzca la dispersión Stokes que la anti-Stokes. Este hecho conlleva a que la intensidad Stokes sea mayor que la anti-Stokes y por ende la más utilizada.

Para que la molécula responda al efecto Raman, es necesario que presente un desplazamiento en la polarizabilidad molecular o cantidad de deformación de la nube electrónica con respecto a la coordenada vibracional. La cantidad del desplazamiento de polarizabilidad determinará la intensidad de la dispersión Raman, siempre que el desplazamiento Raman sea igual al nivel vibracional que está involucrado.

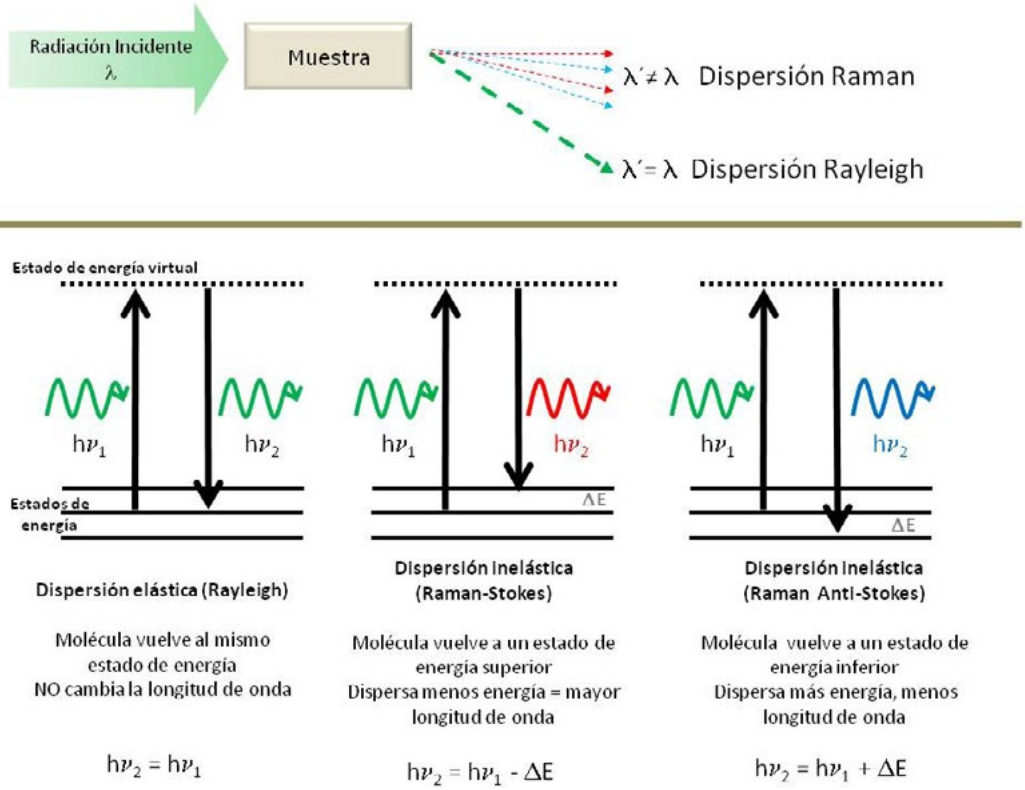


Figura 3.1: Esquema ilustrativo del efecto Raman.

3.3. Equipamiento básico de la espectroscopia Raman

Existen diversos equipos comerciales, tanto portables como fijos, que pueden ser adquiridos para disponer de la técnica de espectroscopia Raman. Entre ellos podremos observar ligeras diferencias, pero de forma general puede considerarse que un dispositivo Raman consta de los siguientes elementos básicos y que se aprecian en el esquema general de la figura 3.2:

- El láser, fuente de luz monocromática y que permite tener suficiente dispersión Raman para ser detectada.
- Un filtro de paso banda que elimina cualquier luz de otra longitud de onda.
- Un conjunto de filtros para ajustar la intensidad de la luz láser y evitar daños en la muestra por la radiación laser.
- Un filtro especial, llamado "Notch filter" que refleja solamente la luz del láser y por lo tanto la dispersión Rayleigh, pero deja pasar las otras longitudes de onda, es decir, la dispersión Raman.
- Una red de difracción, que separa la señal Raman según su longitud de onda y finalmente.
- Una cámara CCD que detecta estos rayos separados y les asigna una frecuencia asociada a cada pixel de la cámara.

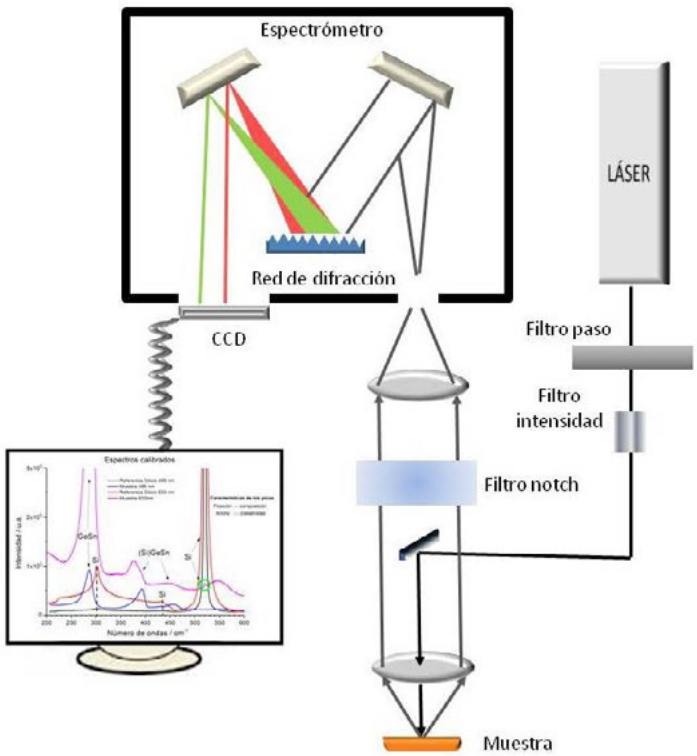


Figura 3.2. Esquema general de un dispositivo para Espectroscopia Raman.

Como ya se ha referido, el impulso experimentado por la espectroscopia Raman a partir de la década de los 90 ha permitido extender su uso a multitud de campos de la ciencia, con particular incidencia en el sector de la biomedicina. En nuestro caso, teniendo en cuenta su gran sensibilidad al estado de orden estructural, la utilizaremos para analizar la estructura del tejido vivo, de biocerámicas de origen biológico y finalmente biocerámicas sintéticas.

3.4. Análisis Raman de tejido vivo

En este trabajo vamos a abordar dos tipos de tejido vivo, uno altamente mineralizado como es el tejido dental (tanto humano como animal) y otro, el tejido óseo (tanto sano como osteoporótico) que, aunque mineralizado, lo es en menor grado que el anterior.

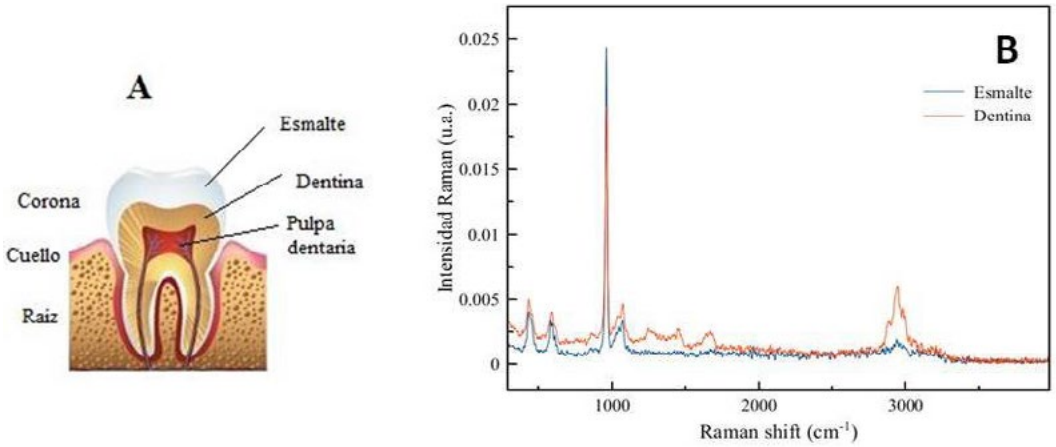
3.4.1. Tejido dental

Vamos a empezar por el análisis Raman de dos dientes humanos, un diente de leche y un molar permanente, y dientes de tiburón de especies tintorera (*Prionace glauca*) y marrajo (*Isurus oxyrinchus*).

Diente humano

Los dientes de los mamíferos, incluyendo los de los seres humanos, son los tejidos más altamente mineralizados y presentan unas extraordinarias propiedades mecánicas debidas a la disposición de los cristales de hidroxiapatita carbonatada, $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-y}(CO_3)_{x+y}$, que lo componen. Como se puede observar en la figura 3.3A, el esmalte (en inglés *enamel*) forma la parte exterior y más compacta de los dientes. Esta consta de prismas hexagonales de apatita con tamaños de entre 100 y 500 nm, en una disposición especial con un bajo contenido de matriz orgánica (alrededor de 1% en peso). En la parte interior del esmalte se encuentra la dentina que presenta una estructura porosa formada por túbulos dentinarios cuya composición básica es fosfato cálcico carbonatado con un 20% en peso de matriz orgánica, principalmente colágeno.

En la figura 3.3B hemos representado el espectro Raman (dispersión Raman-Stokes) para el esmalte y la dentina de un diente molar (permanente) humano sano. Como se puede observar, la región espectral estudiada se extiende desde 400 a 4000 cm^{-1} siendo especialmente activo el intervalo 400 – 1200 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de moléculas inorgánicas (Richards-Kortum y Sevick-Muraca, 1996). En base a la literatura consultada (Smith y Rehman, 1995, Posset et al., 1998, Milhály et al., 2009, Penel et al., 2005), las bandas Raman situadas a 428 y 445 cm^{-1} corresponden a los modos de vibración simétrica de flexión del grupo PO_4^{3-}, mientras la flexión asimétrica se localiza en 578, 582 y 606 cm^{-1}. A 960 cm^{-1} emerge un pico dominante asociado a los modos de vibración simétrica de tensión del grupo PO_4^{3-}. En la región entre 1000 y 1100 cm^{-1} se observa la presencia de una banda constituida por tres vibraciones situadas a 1020, 1042 y 1070 cm^{-1} asociadas a la tensión asimétrica del grupo PO_4^{3-} de la hidroxiapatita. Algunos autores también asignan la banda situada a 1070 cm^{-1} a la tensión asimétrica del grupo carbonato tipo B mientras la de los iones carbonato tipo A se sitúa a 1099 cm^{-1}. Como se puede constatar, además de las vibraciones correspondientes a las principales moléculas inorgánicas se detecta la presencia de las bandas atribuidas a los modos vibracionales asociados a moléculas orgánicas, estando situadas entre 1200 y 3050 cm^{-1}. En base a la literatura (Smith y Rehman, 1995, Posset et al., 1998, Milhály et al., 2009, Penel et al., 2005), se pueden asignar las bandas situadas a 1270, 1449 y 1667 cm^{-1} a: (i) la tensión del grupo funcional C-N en la Amida III, (ii) a los estados vibracionales de balanceo del enlace C-H en los grupos funcionales CH_2 y CH_3 pertenecientes a aminoácidos de las proteínas del esmalte (enamelinas) y, por último, (iii) la banda más intensa de las atribuidas a las proteínas (enamelina) asociada principalmente con la vibración de tensión del grupo funcional C=O de la Amida I, respectivamente. Entre 2850 y 3050 cm^{-1} se sitúan las vibraciones correspondientes a la tensión C-H del grupo Amida III de las proteínas y lípidos.



Parámetro	Esmalte		Dentina	
	Diente de leche	Molar permanente	Diente de leche	Molar permanente
ν_1 (cm^{-1})	965	965	960	960
FWHM (cm^{-1})	9.8	9.2	19.7	10.3

Figura 3.3: Esquema de un molar humano en corte (A), espectros Raman de diente molar humano sano (B) y parámetros Raman (tabla): ν_1, representa la posición de la banda PO_4^{3-} y el ancho a media altura de la banda (FWHM).

Un análisis más profundo de dicho espectro permite constatar que la intensidad relativa del pico situado a 960 cm^{-1}, correspondiente a la parte mineral, es mayor en el esmalte. En cambio, la banda correspondiente a la parte orgánica situada entre 2850 y 3050 cm^{-1} tiene mayor prominencia en la dentina. Estos resultados están de acuerdo con la composición química de ambos tejidos ya comentada anteriormente, habida cuenta que el esmalte presenta en su composición un muy elevado porcentaje de materia inorgánica comparado con la dentina (Cazabou et al., 2004). Las diferencias en el contenido de la parte mineral y la parte orgánica entre ambas zonas también se reflejan en la intensidad relativa de las bandas atribuidas a las vibraciones de flexión asimétrica de PO_4^{3-}, tensión asimétrica de PO_4^{3-}, tensión del grupo C-N en la Amida III, flexión simétrica del grupo CH_3 en las proteínas y flexión simétrica de C=O en la Amida I.

Un parámetro de gran importancia para la evaluación de la calidad del diente es su contenido en flúor. La presencia de este elemento químico constituye uno de los mejores indicadores en la prevención del deterioro y desgaste de los dientes (Wei et al., 2011). El flúor es un mineral u oligoelemento que sirve para mejorar la calidad del esmalte dental, consiguiendo así que los dientes sean más resistentes a las caries. En la tabla de la figura 3.3 se muestra la evolución de la posición de la vibración de tensión simétrica del grupo PO_4^{3-} tanto para el esmalte como para la dentina de dientes humanos. Como puede observarse, en general, el máximo de dicha vibración se encuentra ligeramente desplazado en la dentina. Según la literatura consultada (Williams y Knittle, 1996) la incorporación de flúor en la matriz apatítica de los dientes induce en los espectros Raman un desplazamiento hacia valores por encima de 960 cm^{-1} en la frecuencia de la banda asociada a la vibración simétrica de tensión del grupo PO_4^{3-}. Ese desplazamiento viene motivado por el aumento de la repulsión electrostática anión-anión PO_4^{3-} debido al cambio del radio iónico como consecuencia de las sustituciones producidas en

la matriz dental de OH^- por F^-, PO_4^{3-} por CO_3F^{3-}, etc. En cuanto al ancho a media altura (FWHM) de la referida banda podemos observar cómo, en general, la misma se ve incrementada cuando la zona analizada es la dentina en comparación con el esmalte, muestra de una estructura menos organizada y con presencia de materia orgánica.

Como es bien conocido, determinadas enfermedades dentales producen cambios en la ultraestructura del diente y en las proporciones entre los distintos componentes de la parte orgánica y parte mineral. Así, para valorar el grado de actividad de este tipo de patologías se suelen definir unos índices que permiten estimar de forma cualitativa y cuantitativa el alcance de estas lesiones. Dichos índices presentan un comportamiento invariante con los principales parámetros de diseño del espectrómetro, y se perfilan como un método de información y comparación normalizado para distintos grupos de investigación y/o profesionales del ámbito (Milhály et al., 2009, Penel et al., 2005, Caeiro-Rey et al., 2006). Es el caso del Grado de Mineralización que se calcula mediante la relación entre el área o intensidad de la banda de fosfato situada a 960 cm^{-1} y del contenido en materia orgánica, observada mediante la banda atribuida a amida III localizada entre 2850 y 3050 cm^{-1} ($GM = I_{PO_4^{3-}}/I_{Amida\ III}$) y el Grado de Sustitución definido por la relación entre la intensidad de la banda situada cerca de 1099 cm^{-1} que se asocia con el carbonato tipo A, más abundante en el esmalte, y la de 1070 cm^{-1} asociada con el carbonato tipo B, más abundante en la dentina y el hueso, y el pico atribuido al grupo PO_4^{3-} presente en 960 cm^{-1} ($GS= I_{CO_3^{2-}}/ I_{PO_4^{3-}}$) (Coello et al., 2015).

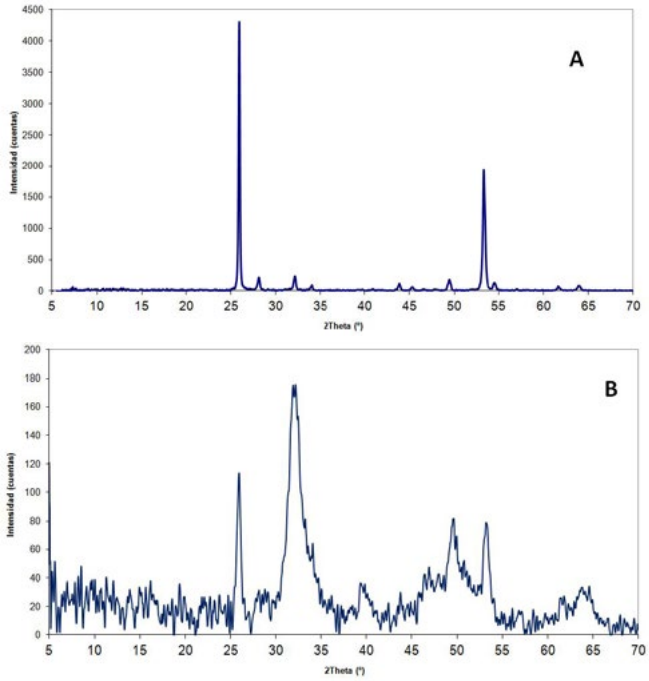
En la tabla siguiente se presenta el ancho a media altura, FWHM, de la banda asociada a la vibración ν_1 del grupo PO_4^{3-} así como los valores de GM y GS obtenidos para dientes molares permanentes humanos sanos y afectados por caries. De nuevo se confirma el carácter mineralizado del esmalte comparado con el de la dentina reflejado por los valores más elevados del índice GM y un menor FWHM. Podemos observar como ante la presencia de caries el grado de mineralización se reduce de forma drástica tanto en el esmalte como en la dentina, mientras que el ancho a media altura de la vibración simétrica de tensión del grupo PO_4^{3-} aumenta, siendo más pronunciado en la dentina que en el esmalte. Por otra parte, el índice GS experimenta un incremento cuando el diente se ve afectado por las caries, confirmando la sensibilidad Raman a las modificaciones estructurales ocurridas durante el proceso de desmineralización del material.

Parámetro	Esmalte		Dentina	
	Molar sano	Molar careado	Molar sano	Molar careado
GM	4.735	1.196	0.738	0.079
GS	0.088	0.110	0.106	0.183
FWHM (cm^{-1})	9.0	9.2	18.3	27.4

Tabla 3.2: Parámetros Raman de dientes molares permanentes humanos sanos y careados. Grado de mineralización (GM), grado de sustitución (GS) y ancho de banda a media altura (FWHM) del modo de tensión simétrica de la banda PO_4^{3-}.

Con el objetivo de profundizar en el estudio estructural del diente humano se procedió al análisis mediante XRD. En la figura 3.4 se muestran los patrones de difracción para el esmalte (A) y la dentina (B). En ambos casos se observa la presencia de difracciones bien definidas, correspondientes a la presencia de una estructura cristalina. No obstante, en el caso del esmalte, los patrones de difracción son más estrechos y mejor definidos que en la dentina. Además, en el espectro A se observa una destacadísima presencia de la reflexión [200] situada a 25.8º la cual reduce a la mínima expresión la activi-

dad de la reflexión [112] situada a 32.1º. Estos hechos, que se pueden considerar anómalos, podrían estar relacionados con la estructura histológica del esmalte la cual permite reflexiones en los cristales del cemento interprismático o la porción menos calcificada del esmalte y, por tanto, donde reside un escaso contenido en sustancia orgánica, posiblemente debido a las reacciones de sustitución iónica. Por otro lado, la presencia de bandas anchas y peor definidas para las diferentes difracciones pone de manifiesto una estructura menos organizada y la presencia de una parte amorfa íntimamente asociada a la matriz orgánica, que como vimos anteriormente en el caso de la dentina alcanza hasta un 20% y en el esmalte se encuentra en tan sólo 1%. Entrando en más detalle, las difracciones observadas son atribuidas a la estructura cristalina apatítica y en especial a la hidroxiapatita (Wei et al., 2011, Williams y Knittle, 1996, León y Jansen, 2009, Bermúdez–Polonio, 1981). En particular, las observadas a 25.8, 28.1, 31.7, 32.1, 33.1 y 34.1°, corresponden a las reflexiones [002], [102], [211], [112], [300] y [202], respectivamente. Focalizando la atención en la reflexión [112] por ser una de las más características en las apatitas de fosfato cálcico, podemos observar que la posición de esta reflexión no presenta diferencias significativas entre ambas zonas, mientras que el ancho a media altura se ve incrementado cinco veces en el caso de la dentina respecto al esmalte. Estos resultados se encuentran en buena concordancia con los análisis Raman.



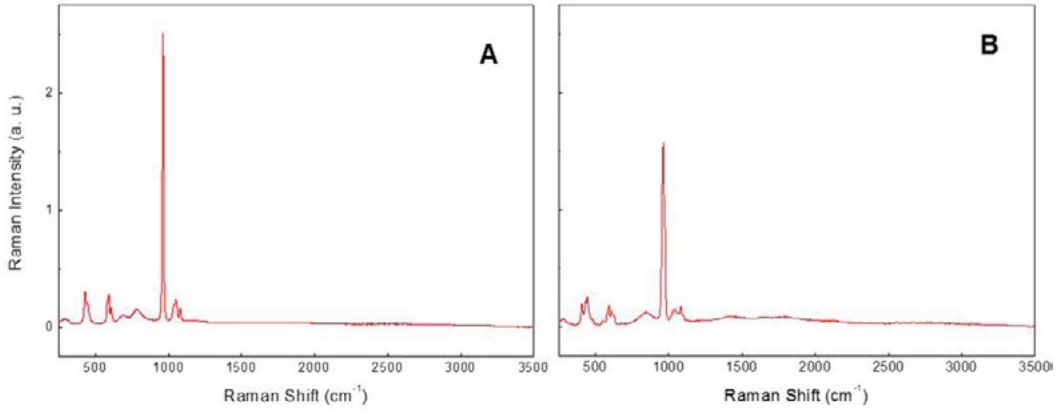
Parámetro		Esmalte	Dentina
[112]	2θ (°)	32.1	32.2
	FWHM(°)	0.37	1.59

Figura 3.4. Patrones de difracción XRD para esmalte (A) y dentina (B) correspondiente al diente humano. Parámetros XRD evaluados: posición (2θ) y ancho a media altura (FWHM) de la difracción [112] característica de las apatitas de fosfato cálcico.

Diente de tiburón

La parte exterior de los dientes de tiburón se presenta como pseudo-esmalte o *enameloid* debido a que se encuentra hipermineralizado y denota una gran dureza, al compararlo con el esmalte de los dientes de los mamíferos. En el interior de los dientes se encuentra también la dentina que es más blanda y menos mineralizada que el pseudo- esmalte. Es sabido que la fase mineral de los dientes de tiburón está constituida por hidroxiapatita y en menor proporción por fluorapatita, $Ca_5(PO_4)F$, con sustituciones parciales de fosfato por carbonato y de fluoruro por hidróxido.

En la figura 3.5 se muestra el espectro Raman para el esmalte y la dentina del diente de tiburón de la especie tintorera (P*rionace glauca*). Se puede observar la presencia de las vibraciones ya identificadas en el espectro Raman del esmalte y dentina de diente humano. De forma similar al diente humano, en el esmalte la posición característica de la banda de tensión simétrica del grupo PO_4^{3-} (965-967 cm^{-1}) está relacionado con el elevado contenido en flúor. Los valores del FWHM para ambas especies están en buen acuerdo a los anteriormente calculados en el esmalte y dentina de diente humano y vuelven a demostrar el alto grado de mineralización y orden estructural del esmalte del diente de tiburón, coincidiendo con otros estudios donde se demuestra que está formado por cristales nanométricos de fluorapatita dispuestos de forma ordenada (López-Álvarez et al., 2014).

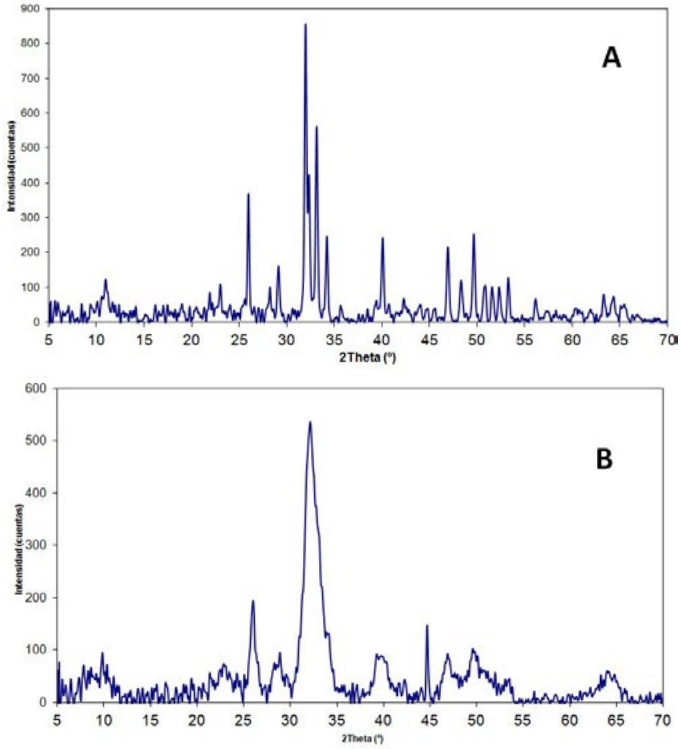


Parámetro	Esmalte de Tiburón		Dentina de Tiburón	
	Marrajo	Tintorera	Marrajo	Tintorera
ν_1 (cm^{-1})	967	965	960	963
FWHM (cm^{-1})	9.8	10.9	29.5	18.3

Figura 3.5. Espectros Raman de esmalte (A) y dentina (B) de diente de tiburón de la especie tintorera (*Prionace glauca*). Parámetros Raman evaluados: posición (ν_1) y ancho de banda a media altura (FWHM) de la banda de tensión simétrica PO_4^{3-}.

A continuación se abordan los resultados del análisis por difracción de rayos x. En la figura 3.6 se muestran los patrones de difracción para el esmalte (A) y la dentina (B) de diente de tiburón de la especie tintorera. En ambos casos se observa la presencia de difracciones bien definidas, correspondientes a la presencia de una estructura cristalina. No obstante, en el caso del esmalte son más estrechas y mejor definidas que en la dentina, de modo similar al caso del diente humano (figura 3.4).

Además, los análisis por rayos x nos permiten identificar la estructura cristalina, que en el caso del esmalte corresponde a una fluorapatita mientras que para la dentina es una hidroxiapatita carbonatada y con presencia de Na y Mg. El análisis en más detalle del comportamiento de la difracción del plano [112] en cuanto a la posición y ancho de banda, permite corroborar el carácter más mineralizado del esmalte en comparación a la dentina, especialmente por su FWHM. Estos resultados están en buen acuerdo con lo observado por la espectroscopia Raman.



Parámetro		Esmalte	Dentina
[112]	2θ (°)	32.3	32.1
	FWHM(°)	0.15	0.36

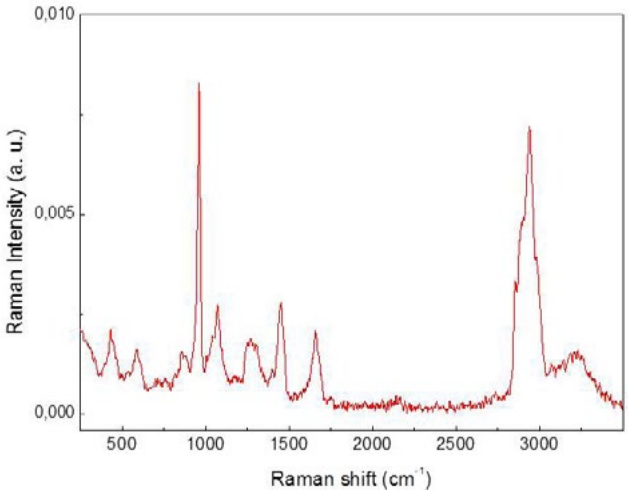
Figura 3.6. Patrones de difracción XRD de esmalte (A) y dentina (B) correspondientes a diente de tiburón de la especie tintorera (*Prionace glauca*). Parámetros XRD evaluados: posición (2θ) y ancho de banda a media altura (FWHM) de la difracción [112] características de las apatitas de fosfato de calcio.

3.4.2. Tejido óseo

Como es bien conocido, el componente mineral más característico del tejido óseo se encuentra en la matriz extracelular y está formada por cristales de hidroxiapatita parcialmente carbonatada. Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de su estructura, en la figura 3.7 se presenta a modo de ejemplo el espectro Raman de hueso humano afectado con osteoporosis. Como se puede observar, la

región espectral estudiada se extiende desde 250 a 3500 cm^{-1} siendo especialmente activos los intervalos 250 – 1200 cm^{-1} y 1200 – 3500 cm^{-1}, correspondientes a las vibraciones de moléculas inorgánicas y orgánicas, respectivamente (Richards-Kortum y Sevick-Muraca, 1996).

Además de poder interpretar las bandas Raman características de un tejido vivo, en este caso también se puede observar como el espectro está dominado por la banda situada a 960 cm^{-1}, asociada al grupo PO_4^{3-}, y otro pico prominente que emerge alrededor de los 2941 cm^{-1}, asociado a las vibraciones de los enlaces C-H en los grupos CH_3 atribuido a la vibración de proteínas y lípidos, y CH_2 a proteínas, como ya se ha apuntado anteriormente.



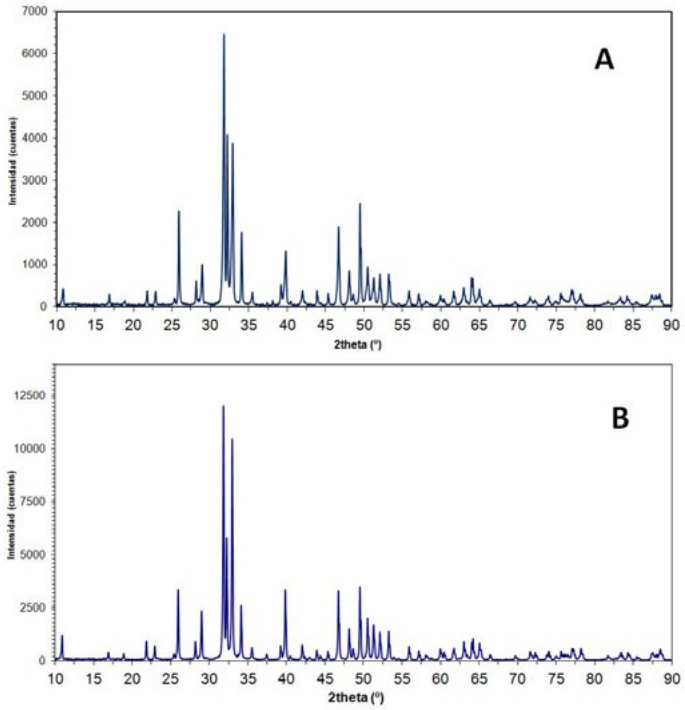
Parámetro	Hueso de rata	
	Sano	Osteoporótico
GM	2.45	2.39
FWHM (cm^{-1})	15.2	18.0

Figura 3.7: Espectro Raman de hueso humano afectado con osteoporosis. En la tabla se muestran los parámetros Raman evaluados a partir de huesos de rata, tanto para rata sana como afectada de osteoporosis: Grado de mineralización (GM) y ancho de banda a media altura (FWHM) de la banda de tensión simétrica PO_4^{3-}.

En la tabla de la figura 3.7 se incluyen los datos obtenidos a partir del estudio realizado en modelo animal de rata, utilizando un grupo de control sano y otro afectado por osteoporosis secundaria a ovariectomía. En ambos casos, se muestran los parámetros Raman (ancho a media altura de la vibración de tensión simétrica del grupo PO_4^{3-} y el índice de mineralización GM) donde se observan diferencias entre ambos tejidos, lo cual ratifica la sensibilidad de la técnica a los cambios estructurales asociados al grado de mineralización del tejido óseo afectado de osteoporosis en comparación al sano (Caeiro-Rey et al., 2006).

Por otra parte, es conocido que el tamaño de partícula es una vía simple para caracterizar la microestructura del hueso toda vez que refleja en alguna medida el grado de cristalinidad de la estructura (Smith y Rehman, 1995, Posset et al., 1998). Cristales grandes indican que el hueso está muy mineralizado mientras los cristales pequeños indican huesos con bajo grado de mineralización. A par-

tir de los valores de FWHM se puede inferir sobre el diámetro de los cristales de hidroxiapatita de la parte mineral del hueso y así corroborar su grado de mineralización. En esta línea, los análisis XRD son una herramienta de interés para intentar completar los resultados obtenidos por la espectroscopia Raman. En la figura 3.8 se presentan los patrones de difracción de hueso de varón con osteoporosis primaria (A) y otro de mujer afectada con osteoporosis avanzada (B), con previa calcinación de las muestras para eliminar la parte orgánica. En ambos casos se observa la presencia de difracciones bien definidas, correspondientes a la presencia de una estructura cristalina apatítica y en especial a la hidroxiapatita (León y Jansen, 2009, Bermúdez–Polonio, 1981).



Plano de difracción [112]	Hueso humano	
	Sano	Osteoporótico
2θ (°)	32.3	32.2
FWHM(°)	0.15	0.19

Figura 3.8. Patrones de difracción XRD de hueso de varón con osteoporosis primaria (A) y de mujer afectada con osteoporosis avanzada (B), con previa calcinación de las muestras para eliminar la parte orgánica. Parámetros XRD evaluados: posición (2θ) y ancho a media altura (FWHM) de la difracción [112] característica de las apatitas de fosfato cálcico.

Con el objeto de profundizar en el estudio, fue analizada en más detalle la reflexión [112]. Como se puede observar la posición de esta reflexión no presenta diferencias significativas entre ambos tejidos, mientras que el ancho de banda a media altura, FWHM, presenta un ligero incremento en el caso (B). Estos resultados se encuentran en buena concordancia con los análisis Raman y ponen de mani-

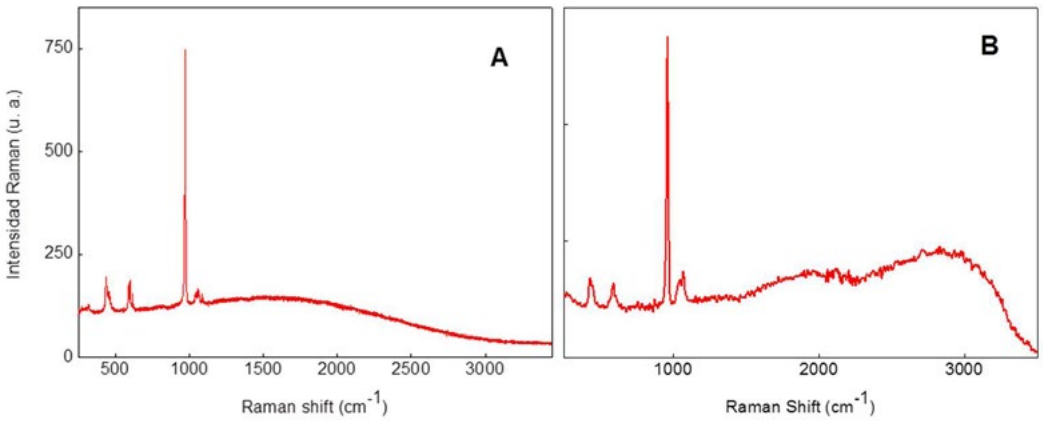
fiesto la disminución del grado de mineralización de la estructura del hueso afectado con osteoporosis avanzada, posiblemente debido a la sustitución parcial de iones PO_4^{3-} y OH^- por CO_3^{2-}. En ese proceso, la celda unitaria de la hidroxiapatita sufre una contracción de los ejes *a* y *b* y expansión del eje *c* el cual puede inducir cambios en las posiciones atómicas y variaciones en la morfología de los nanocristales (Bermúdez–Polonio, 1981). Tanto la espectroscopia Raman como la difracción de los rayos x se han mostrado sensibles a esas modificaciones en la ultraestructura ósea.

3.5. Análisis de biocerámicas biológicas y sintéticas

Entre los biomateriales más extensamente utilizados en el ámbito clínico destacan las biocerámicas con aplicación como relleno óseo. Estas biocerámicas pueden ser de origen sintético o biológico y dentro de éstas los fosfatos cálcicos, en general, y la hidroxiapatita, en particular, destacan por sus interesantes propiedades.

3.5.1. Biocerámicas de origen biológico

En el caso de las biocerámicas biológicas hemos seleccionado dos productos, uno comercial, Bio-Oss®, y otro en investigación denotado por Biofast. Mientras que el Bio-Oss® corresponde a una matriz mineral obtenida de hueso bovino, el Biofast es un granulado mineral de hidroxiapatita y fluorapatita, obtenido de la valorización de un sub-producto pesquero, en particular, del diente de tiburón (López-Álvarez et al., 2014). En la figura 3.9 se presenta el espectro Raman de ambas biocerámicas. Podemos observar la presencia de bandas asociadas a los grupos minerales, que como ya vimos en el caso del tejido vivo están representados básicamente por los grupos fosfato y carbonato.

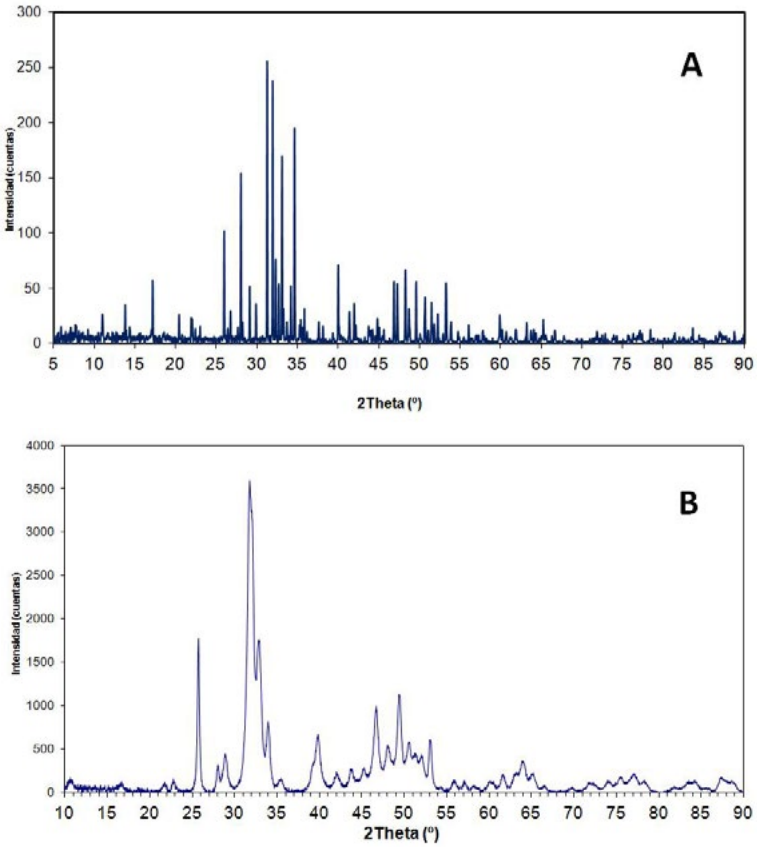


Parámetro	Biofast	Bios-Oss®
v_1 (cm^{-1})	968	965
FWHM (cm^{-1})	9.0	9.3

Figura 3.9. Espectros Raman para Biofast (A) y Bio-Oss® (B). Parámetros Raman evaluados: posición (v_1) y ancho a media altura (FWHM) de la banda de tensión simétrica PO_4^{3-}.

Un análisis más profundo de dichos espectros permite observar como en el caso del Biofast la banda del grupo PO_4^{3-} tensión simétrica está desplazada hacia valores superiores de número de onda, origi-

nado por la elevada presencia de fluorapatita en su composición, comportamiento similar al observado tanto en el esmalte de diente humano, rata y tiburón aunque en este caso sea mucho más acentuado. Por otra parte, el valor de FWHM para ambas biocerámicas es similar al que presentan los tejidos vivos, aunque ligeramente mayor para el caso del Bio-Oss®. Este hecho fue confirmado mediante el análisis por difracción de rayos X. En la figura 3.10 se muestran los patrones de difracción para ambos productos, Biofast (espectro A) y Bio-Oss® (espectro B). En el caso del Bio-Oss® se puede observar como las bandas de difracción son más anchas y en algún caso menos definidas que para el Biofast.



Parámetro		Biofast	Bios-Oss®
[112]	2θ (°)	32.3	32.1
	FWHM(°)	0.13	0.22

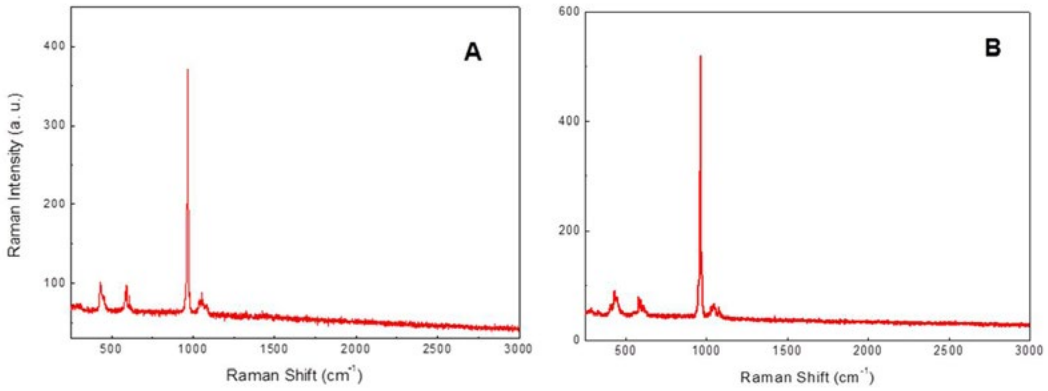
Figura 3.10. Patrones de difracción XRD para las biocerámicas biológicas: Biofast (A) y Bio-Oss® (B). Parámetros XRD evaluados: posición (2θ) y ancho a media altura (FWHM) de la difracción [112] característica de las apatitas de fosfato cálcico.

En el Biofast se puede observar la presencia de picos estrechos y bien definidos cuya posición en número de onda es atribuida a la estructura cristalina de la HA y FHA. El análisis cuantitativo para la reflexión [112] muestra como la posición de esta reflexión es similar en ambos materiales mientras que

el ancho de banda a media altura se eleva al doble para el Bio-Oss® respecto al Biofast. Estos resultados dejan de manifiesto las diferencias respecto al grado de mineralización de ambos materiales y refuerzan los obtenidos por espectroscopia Raman.

3.5.2. Biocerámicas de origen sintético

En este caso, se han seleccionado dos productos comerciales que se utilizan actualmente en aplicaciones clínicas, Algipore® y Bi-Ostetic®. En la figura 3.11 se presentan los espectros Raman de estas dos biocerámicas. El primer espectro (A) corresponde al Algipore® [$Ca_5(PO_4)_3OH_xF_{1-x}$] que es una hidroxiapatita con flúor derivada de procesos químicos realizados a algas de la especie *corallina officinalis*. El segundo, espectro B, se refiere al Bi-Ostetic® que es una cerámica mixta compuesta de un 60% de hidroxiapatita y 40% de β-fosfato tricálcico (β -TCP). Como se puede observar, en este caso para ambos materiales la región espectral activa es el intervalo 400 – 1200 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de moléculas inorgánicas. La ausencia de actividad Raman más allá de los 1200 cm^{-1} (región cuyas vibraciones se atribuyen a moléculas orgánicas) confirma el carácter mineralizado de ambas biocerámicas sintéticas.

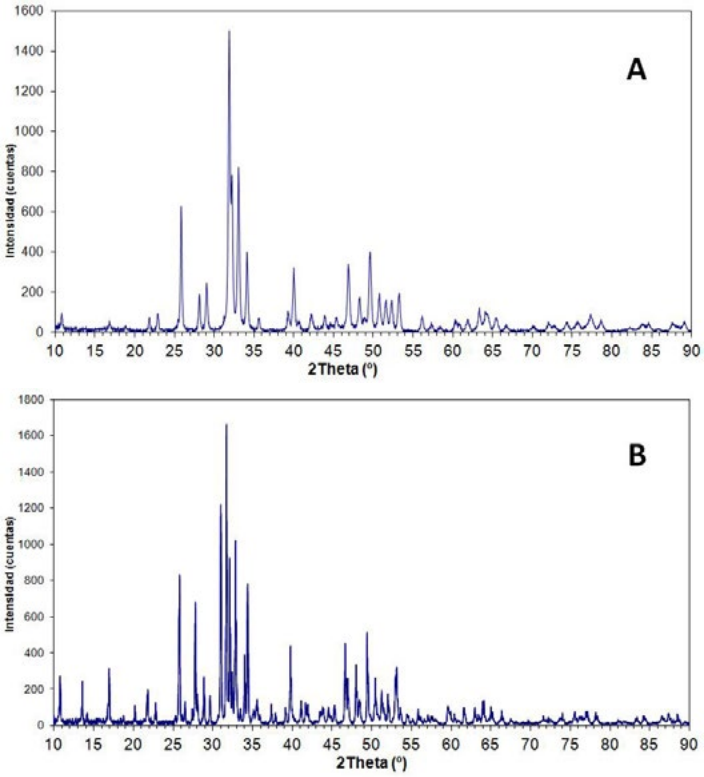


Parámetro	Algipore®	Bi-Ostetic®
v_1 (cm^{-1})	967	964
FWHM (cm^{-1})	7.7	7.7

Figura 3.11. Espectros para las biocerámicas sintéticas Algipore® (A) y Bi-Ostetic® (B). Parámetros Raman evaluados: posición (v1) y ancho a media altura (FWHM) de la banda de tensión simétrica PO_4^{3-}.

Como en casos anteriores, pasamos a valorar los espectros Raman de forma cuantitativa a través del ancho a media altura de la banda tensión simétrica PO_4^{3-} y su posición. En el caso del Algipore® la posición del máximo de la banda está desplazada hacia valores superiores de número de onda, en comparación con el Bi-Ostetic®, posiblemente originado por la presencia de flúor en su composición y en buen acuerdo con lo ya encontrado para esmalte de diente humano, rata, tiburón y la biocerámica biológica Biofast. Por otro lado, para ambos materiales esta banda es estrecha y se encuentra bien definida lo cual queda confirmado por el valor del FWHM. Para profundizar en estos resultados se procedió a realizar el análisis por difracción de rayos x. En la figura 3.12 se muestran los patrones de difracción para los productos Algipore®(A) y Bi-Ostetic® (B). De forma general podemos observar

la presencia de picos estrechos y cuya posición en número de onda es atribuida a la estructura cristalina de la HA. En el caso del Bi-Ostetic® aparecen otras reflexiones adicionales atribuidas a β-TCP [β-$Ca_3(PO_4)_2$] y que corresponden a las reflexiones situadas a 26.0, 31.6, 34.1 y 34.3º. El comportamiento de la reflexión [112] fue analizado en más detalle y los valores para la posición del máximo (2θ) y el ancho de banda a media altura (FWHM) de dicha reflexión muestran un cierto desplazamiento hacia valores superiores en el caso del Algipore®, lo que podría estar relacionado con la presencia de flúor en su composición y en buen acuerdo con los análisis Raman. Los resultados demuestran el carácter muy mineralizado y cristalino de ambas biocerámicas sintéticas.



Parámetro	Algipore®	Bi-Ostetic®
2θ (°)	32.24	32.15
FWHM(°)	0.17	0.14

Figura 3.12. Patrones de difracción XRD para las biocerámicas sintéticas: Algipore® (A) y Bi-Ostetic® (B). Parámetros XRD evaluados: posición (2θ) y ancho a media altura (FWHM) de la difracción [112] características de las apatitas de fosfato cálcico.

3.6. Precauciones necesarias en un análisis Raman

Pese a todas las bondades anunciadas respecto a la espectroscopia Raman, existen algunos factores que pueden dificultar la obtención de espectros. Entre ellos se encuentran la luminiscencia, la opa-

cidad de metales y aleaciones y la dispersión de la radiación monocromática por las heterogeneidades del material en análisis. Algunas de estas desventajas fueron superadas en los últimos años mediante la utilización del método FT-Raman con fuente láser en la región de infrarrojo cercano (Pelletier, 2003). Sin embargo, persisten otras que justifican algunas precauciones a tener en cuenta a la hora de realizar un análisis Raman. Una de ellas es el fenómeno de la luminiscencia, que se entiende como uno de los factores que puede dificultar más la obtención y/o interpretación de espectros Raman. Dentro de las distintas formas de luminiscencia, la fluorescencia es un caso particular en el cual las moléculas emiten luz desde un estado electrónico excitado alcanzado mediante mecanismos físicos como por ejemplo absorción de luz, procesos mecánicos o químicos. La fluorescencia se manifiesta en un espectro Raman como una curva ancha que se añade al espectro. Además, como proceso radiactivo, genera un ruido *shot* que puede llegar a enmascarar total o parcialmente las bandas Raman que contienen información útil. Por su elevada intensidad, muchas veces llega incluso a saturar la CCD (Tsuda et al., 1998).

A pesar de no poderse eliminar completamente el efecto de la fluorescencia sobre un espectro Raman, existen algunos procesos y técnicas que lo minimizan. Son los casos del fenómeno de *photobleaching* y el cambio de la fuente de excitación. Se denomina *photobleaching* o fotoblanqueo al fenómeno de destrucción fotoquímica de un fluoróforo que se produce cuando el láser incide de forma continuada sobre una molécula. Una vez excitadas, las moléculas fluorescentes vuelven a un estado energético permitido mediante la emisión de un fotón. Puede suceder que dichas moléculas fluorescentes no sean capaces de desprenderse de la energía mediante la emisión de un fotón y generen calor como mecanismo para liberar ese exceso de energía. En esa situación, el calor puede causar la destrucción total de la molécula fluorescente y ya no podrá aportar esa contaminación en forma de fluorescencia. Se trata, por tanto, de un cambio irreversible y se manifiesta sobre un espectro Raman en forma de reducción gradual de la línea base o incluso en un cambio de la forma de ésta (Macdonald y Wyeth, 2005).

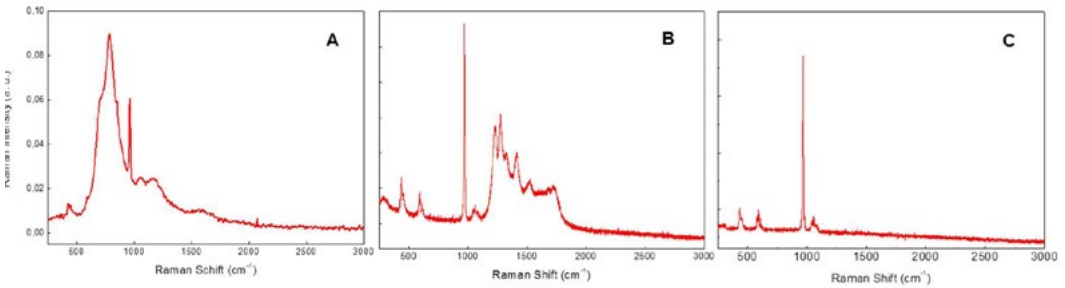


Figura 3.13. Espectros Raman de Algipore® con fuente láser de (A) 1064, (B) 785 y (C) 633 nm.

Por otro lado, como cada material emite fluorescencia para un rango de longitudes de onda (λ) de excitación determinados, cambiando la fuente de excitación como por ejemplo del láser rojo al verde o infrarrojo, la fluorescencia puede pasar a ser casi insignificante, ya que este efecto disminuye con λ, en buen acuerdo con la ley del desplazamiento de Wien. Es por eso que la utilización del láser verde en lugar del láser rojo o infrarrojo, reduce considerablemente el efecto de fluorescencia en algunos casos. Es lo que se observa en la figura 3.13, donde los espectros Raman de la biocerámica sintética Algipore® realizados con fuente láser de 1064 y 735nm están dominados por una banda ancha atribuida a un artefacto que ya no está presente en el espectro obtenido con láser de 633 nm. Por otra

parte, la ausencia de esa banda en el correspondiente espectro anti-Stokes de Algipore® (espectro no presentado) confirma que efectivamente se trata de emisión fluorescente.

3.7. Conclusiones

Los tejidos mineralizados *vivos* o *ex vivos,* sanos o en estado patológico, sufren cambios en su estructura molecular o química los cuales afectan a su grado de mineralización. La espectroscopia Raman se ha mostrado sensible a esos cambios por lo que el espectro resultante puede ser utilizado como método de análisis o diagnóstico con un alto grado de fiabilidad. Además, ha revelado tratarse de una herramienta versátil, no invasiva y no destructiva para el estudio de tejidos vivos, con diferente grado de mineralización, y biocerámicas, tanto de origen biológico como sintético. Por otro lado, los análisis por difracción de rayos x confirmaron, en todos los casos, las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos por Raman, perfilándose así como un método eficaz para la ratificación del estudio estructural de estos materiales.

Agradecimientos

Este estudio está parcialmente financiado por FP7/REGPOT-2012-2013.1-316265BIOCAPS, UE-INTERREG2011-1/164MARMED, Xunta de Galicia-FEDER GRC2013-008 y R2014/033 (Rede Galega de Biomateriais), Fundación Mutua Madrileña. M. López-Álvarez agradece la financiación de la European Commission FP7/REGPOT-2012–2013.1 (n316265BIOCAPS). También se agradece el soporte técnico del CACTI (Universidad de Vigo).

Referencias bibliográficas

Bermúdez–Polonio J. (1981) Métodos de difracción de Rayos-X: Principio y aplicaciones. Ediciones Pirámide S. A. (ed.), Madrid.

Bhagavantam S. (1971) Chandrasekhara Venkata Raman. Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society (London: Royal Society) 17: 565-592.

Caeiro-Rey JR., Dapía-Robleda S., Vázquez Fernández E., García Castellanos JM. (2006) Aplicación de la espectroscopia Raman al estudio de la ultraestructura ósea en hueso osteoporótico. Acta Ortopédica Gallega, 2: 3-6.

Cazabou S., Combes C., Eichert D., Rey C. (2004) Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates. Journal of Materials Chemistry, 14: 2148-2153.

Coello B., Rodríguez-Domínguez M., López-Álvarez M., Stefanov S., Chiussi S., Serra J., González P. (2015) Evaluación cuantitativa del grado de mineralización del tejido dental por espectroscopía Raman" BIOINTEGRASAUDE 2015, Vigo, España.

Diem M. (1994) Introduction to Modern Vibrational Spectroscopy. Wiley Interscience, New York, pp. 93-130.

Estrada B., Choe S.E., Gisselbrecht, S., Michaud S., Raj L., Busser B., Halfon M.S., Church G.M., Michelson A.M. (2006) An integrated strategy for analyzing the unique developmental programs of different myoblast subtypes. PLoS Genetics, 133: 117-127.

León B., Jansen J.A. (2009) Thin calcium phosphate coatings for medical implants. Springer (ed.), New York, pp. 101-155.

López-Álvarez M., Vigo E., Rodríguez-Valencia C., Outeiriño-Iglesias V., Balboa E., Coladas P., Serra J., González P. (2014). Bioapatitas de orixe mariña para enxeñaría de tecidos, BIOINTEGRASAUDE 2014, Vigo, España.

Macdonald A. M., Wyeth P. (2005) On the use of photobleaching to reduce fluorescence background in Raman spectroscopy to improve the reliability of painting identification on painted textiles. Journal of Raman Spectroscopy, 36 (3): 185-191.

Milhály J., Gombás V., Afishah A., Mink J. (2009) FT-Raman investigation of human dental enamel surfaces. Journal of Raman Spectroscopy, 40: 898-902.

Pelletier M. J. (1999) Analytical applications of Raman spectroscopy. Blackwell Science, Oxford, pp. 127–92.

Pelletier M. J. (2003) Quantitative analysis using Raman spectrometry. Applied Spectroscopy, 57(1): 20A-42A.

Penel G., Delfosse C., Descamps M., Leroy G. (2005) Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. Bone, 36: 893-901.

Pitt G. P. , Batchelder R., Bormett R. W., Smith B. J., Williams R. P., Yamg Y. Y., Baldwin K. J., Webster S. (2005) Engineering aspects and applications of the new Raman instrumentation. IEE proceedings-Science, Measurement and Technology, 6: 241-318.

Posset U., Locklin E., Thull R., Kiefer W. (1998) Vibrational spectroscopic study of tetracalcium phosphate in pure polycrystalline form and as a constituent of a self-setting bone cement. J. Biomed. Mater. Res., 40: 640-645.

Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. (1996) Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis. Annual Review of Physical Chemistry, 47: 555-606.

Smith R., Rehman I (1995) Transform Raman spectroscopic studies of human bone. J. Mat. Sci.: Mat. Med., 5: 775-778.

Tsuda H., Arias J., Leon B., Arends J. (1998) Necessary precautions in the Raman analysis of calcium phosphate minerals using 1.06 μm YAG laser excitation. Applied Spectroscopy, 52(8): 1122-1125.

Vallet-Regí M. (2001) Ceramics for medical applications. Perspective article. En J. Chem. Soc. Dalton Trans, 02: 97-108.

Wei J., Wang J., Shan W., Liu X., Ma J., Liu C., Fang J., Wei S. (2011) Development of fluorapatite cement for dental enamel defects repair. Journal of Mat. Sci.: Mat. Med., 22, 6: 1607-1614.

Williams Q., Knittle E. (1996) Infrared and Raman spectra of $Ca_5(PO_4)_3F$-fluorapatite at high pressures: Compression-induced changes in phosphate site and Davydov splittings. Journal of Phys. Chem. Sol., 57(4): 417–422.

4. Caracterización no destructiva de biomateriales mediante microtomografía computarizada

J.R. Caeiro[1], J. Serra[2], P. González[2], F. Muñoz[3], A. González-Cantalapiedra[3]

[1]Servicio de COT, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

[1]Departamento de Cirugía, Universidad de Santiago de Compostela. Red Temática para la Investigación en Envejecimiento y Fragilidad (RETICEF), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación.

[2]Grupo Nuevos Materiales, Departamento de Física Aplicada, Universidad de Vigo

[3]Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo

jrcaeiro@telefonica.net

4.1. Introducción

La *tomografía computarizada* (TC) es una técnica de diagnóstico por imagen basada en rayos-X que permite obtener imágenes bi (2D) y tridimensionales (3D) de diferentes estructuras y regiones anatómicas humanas. Tiene una amplia gama de aplicaciones clínicas, tanto desde el punto de vista diagnóstico como de seguimiento en pacientes de áreas médicas (neurología, cardiología, radiología intervencionista, oncología médica y radioterápica, etc.) y quirúrgicas (neurocirugía, otorrinolaringología, cirugía cardiaca, cirugía general y del aparato digestivo, cirugía ortopédica, etc.).

El principio básico de funcionamiento de la TC radica en la medición de la intensidad del haz de rayos-X inicial y final, de manera que los valores que se asignan a cada píxel de la imagen están relacionados con la atenuación de rayos-X del tejido correspondiente, o más concretamente con su coeficiente de atenuación lineal (Calzado y Geleijns, 2010). Este coeficiente es dependiente de la composición, de la densidad del material y de la energía de los fotones. Por ello, desde el punto de vista de técnica de análisis de imagen, un examen de TC puede considerarse como una relación matricial de diferentes coeficientes de atenuación lineal.

En la TC, posteriormente, la matriz de coeficientes de atenuación es transformada computacionalmente en una matriz de Unidades Hounsfield (UH), expresando este escalado la relación existente entre los distintos coeficientes de atenuación obtenidos en el estudio y el coeficiente de atenuación lineal del agua a temperatura ambiente (CEP, 2009).

Para la visualización de las imágenes de TC es muy importante definir los valores de gris que corresponden a un determinado tejido, lo que se consigue de modo óptimo ajustando adecuadamente los valores del nivel y del ancho de la ventana de la imagen a la tarea diagnóstica a realizar. Una profundidad de 12 bits en la escala de grises (que determina una escala de valores desde -1024 a 3071 UH) permite la evaluación de la mayoría de tejidos del organismo. La ampliación de la escala de grises a 14 bits (-1024 a 15359 UH) permite una mejor visualización de materiales de alta densidad y alto coeficiente de atenuación lineal (implantes y biomateriales metálicos) (Calzado y Geleijns, 2010).

La *microtomografía computarizada* (micro-TC) no es más que una versión miniaturizada de la TC que permite la adquisición de imágenes de alta resolución en 2D y 3D de diferentes tipos de estructuras, tejidos mineralizados, biomateriales, etc., de forma no invasiva y no destructiva y sin necesidad de pretratamientos de la muestra.

Utiliza para ello un tubo microfocal y un detector de rayos-X con una distribución espacial que abarca la totalidad del campo de visión en dos direcciones. El sistema de microtomografía permite obtener así múltiples imágenes radiológicas de gran precisión desde diferentes ángulos de visión. A partir de estas imágenes se obtiene inicialmente una serie de secciones transversales consecutivas de la muestra, para posteriormente, y mediante diferentes algoritmos de reconstrucción de imagen que reagrupan la información radiográfica de las secciones, la visualización en 3D de un determinado volumen de interés (VOI) (figura 4.1).

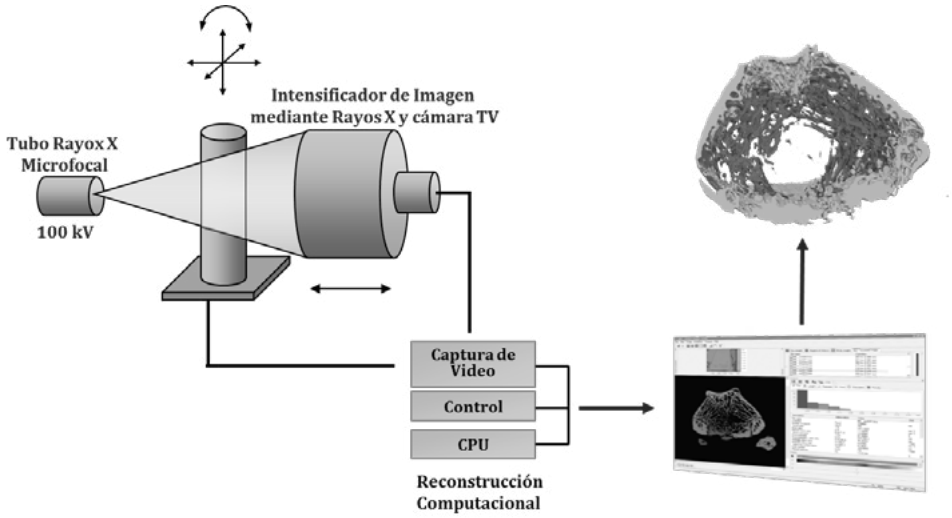


Figura 4.1. Micro-TC: Técnica de análisis.

La micro-TC ha venido siendo utilizada con éxito en diferentes ramas de la ciencia para el estudio de estructuras porosas o cavitadas, tanto biológicas como no biológicas: hueso, dientes, minerales, maderas, metales trabeculares, polímeros, etc.

De forma general en el ámbito de la biología y las ciencias de la salud, y de forma particular en el de la investigación ortopédica preclínica, esta técnica se ha venido utilizando básicamente para la obtención de imágenes 3D de huesos de pequeños animales (conejos, ratas y ratones), el estudio microestructural de tejidos calcificados (sobre todo hueso y dientes debido al alto coeficiente de atenuación del tejido óseo y de las matrices dentales), y el estudio, caracterización y valoración de la integración de diferentes tipos de biomateriales naturales y sintéticos.

Sea cual sea el ámbito de sus posibles aplicaciones, se considera que los parámetros cuantitativos evaluables con la micro-TC en estudios experimentales preclínicos o clínicos han de cumplir tres requerimientos principales: ser reproducibles (utilizando protocolos y VOIs estandarizados para el análi-

sis), precisos y razonablemente factibles (no excesivamente complejos o demandantes de tiempo y adecuados para un rendimiento experimental alto).

En la evaluación del tejido óseo calcificado, las altas resoluciones que alcanza la micro-TC (menos de 5 μm) facilitan la visualización tanto de la microestructura del tejido óseo cortical como de la fina estructura del tejido óseo trabecular, lo que permite la determinación de distintas variables histomorfométricas óseas (relación volumen trabecular-volumen total, número de trabéculas, grosor de las trabéculas, etc.) de una manera mucho más precisa y conexa que la histología clásica. Además, la micro-TC permite el análisis de otros parámetros no métricos óseos como la porosidad cortical, el índice de fragmentación y el número de Euler, el grado de anisotropía, el índice de estructura del modelo, etc. Los parámetros histomorfométricos obtenidos mediante micro-TC se correlacionan muy bien con los parámetros estructurales obtenidos por histomorfometría clásica (Bouxsein *et al.*, 2010). La determinación de estos parámetros de forma computacional automática y en 3D para cada región de interés minimiza los errores subjetivos inherentes al operario (Kazakia y Majumdar, 2006).

Además, la micro-CT, mediante el uso de diferentes patrones minerales, permite obtener también una estimación indirecta de la densidad mineral ósea (DMO) del VOI a estudio.

Por otra parte, la micro-CT permite también el desarrollo de modelos micromecánicos a partir de las variables morfométricas obtenidas, mediante la conversión directa de los VOIs que contienen hueso a elementos mecánicos analizables por elementos finitos. A partir de este tipo de análisis se ha podido demostrar que las variables histomorfométricas del hueso trabecular están íntimamente relacionadas con sus propiedades biomecánicas (Jaecques et al., 2004).

Por todo ello la micro-CT, al permitir el análisis cuantitativo, cualitativo y biomecánico del tejido óseo (figura 4.2), facilita de manera muy especial analizar los efectos que sobre el hueso tienen la edad, la menopausia, la osteoporosis y demás enfermedades osteometabólicas fragilizantes, así como los distintos fármacos prescritos para su tratamiento, lo que hace de ella una herramienta muy poderosa para la investigación del metabolismo óseo-mineral.

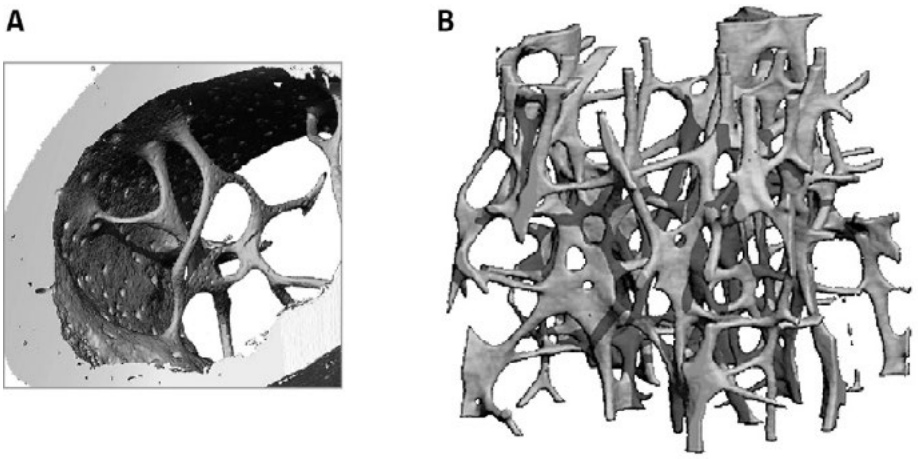


Figura 4.2. Las altas resoluciones que se alcanzan con micro-CT permiten analizar cuantitativa y cualitativamente las alteraciones microestructurales del hueso cortical (A) y del hueso trabecular (B).

La micro-TC puede ser utilizada también para el estudio *ex vivo* de la microanatomía dental y sus alteraciones estructurales. Por un lado, las secciones dentales 2D permiten identificar con claridad los diferentes grados de mineralización del esmalte, de la dentina y del cemento dental (Wong *et al*., 2004). Además, en animales de experimentación, algunos trabajos han demostrado el valor de esta técnica para la evaluación de la pérdida ósea alveolar inducida por la deprivación hormonal climatérica. Por otro, el uso de modelos 3D semitransparentes permite diferenciar perfectamente la pulpa dentaria y los canalículos radiculares de los altamente calcificados dentina y esmalte, por lo que este modelo viene siendo utilizado en investigación endodóncica para calcular el volumen de los canales de la raíz (Bergmans et al., 2001).

Desde el punto de la aplicabilidad clínica de la micro-CT, las limitaciones actuales continúan estando relacionadas tanto con la necesidad de efectuar una toma de biopsia como en el tamaño de la misma. Por esta razón, se están desarrollando sistemas de micro-CT para el análisis in vivo del hueso cortical y trabecular en el esqueleto periférico, que posiblemente permitan evaluar igualmente la formación ósea en el interior de los biomateriales implantados. No obstante, las altas dosis de radiación necesarias para este tipo de estudios limitan claramente por ahora su aplicabilidad en humanos (Kazakia y Majumdar, 2006; Lespessailles et al., 2006).

4.2. Microtomografía computarizada y biomateriales

4.2.1. Biomateriales

Denominamos *biomateriales* a todos aquellos productos empleados para reproducir la función de los tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura, mecánicamente funcional y fisiológicamente aceptable, de forma que una vez implantados, ya sea de forma temporal o permanente en el cuerpo, traten de restaurar el defecto existente y, en su caso, conseguir la regeneración tisular (Lizarbe, 2007).

Desde el punto de vista de su origen, existen básicamente dos tipos de biomateriales, los sintéticos y los biológicos. Entre los de origen sintético destacan los metales, las cerámicas, los polímeros sintéticos y los semiconductores, y entre los de origen biológico, el colágeno y las cerámicas de origen natural (cerámicas porosas reabsorbibles derivadas de corales, exoesqueleto de crustáceos, algas, maderas, etc.). Pero sea cual sea el origen, su composición o estructura, cualquier biomaterial para poder ser implantado debe cumplir una serie de requisitos básicos que se engloban dentro de los conceptos generales de biocompatibilidad y bioactividad.

Tolerancia, bioestabilidad a corto y largo plazo y capacidad de mantener sus propiedades y estructura químico-física en el entorno biológico durante el tiempo que permanezca en el organismo, definen la biocompatilidad de un material. Osteoconductividad y/o osteoinductividad para lograr la incorporación sustitutiva y la posibilidad óptima de estimular la respuesta reparadora en el ambiente receptor, caracterizan la bioactividad del mismo (Ballester, 2011; Fernández-Fairén, 2011).

4.2.2. Biomateriales como sustitutivos óseos

La curación de los defectos óseos sigue siendo actualmente uno de los problemas más importantes de la Cirugía Ortopédica, de la Cirugía Oral y Maxilofacial y de la Implantología.

Aunque clásicamente se considera al hueso autólogo como el mejor sustitutivo óseo por sus características osteogénicas, osteoinductoras, osteoconductoras y por ser completamente biocompatible (Giannoudis *et al*., 2005), la morbilidad intrínseca al proceso de su obtención, su disponibilidad li-

mitada y el posible desarrollo de reabsorciones focales limitan de una u otra manera su utilización en la práctica clínica cotidiana.

El injerto óseo alogénico (procedente de dos individuos genéticamente diferentes pero de la misma especie) podría a priori solucionar los problemas relacionados con la morbilidad intrínseca y la disponibilidad limitada del injerto autólogo. Pero sin embargo, sus problemas de inmunogenicidad, la posibilidad de transmitir infecciones, la alteración de sus propiedades estructurales y biomecánicas con la esterilización y su alto coste, hacen de este sustitutivo una alternativa sólo parcialmente eficiente.

Por ello, se han venido desarrollando una serie de sustitutivos óseos de origen natural o sintético que, utilizados bien de forma aislada o combinada con el hueso autólogo, han demostrado ser capaces de suplir las necesidades del mismo y de disminuir la incidencia de ese tipo de problemas. Por esta razón, el empleo de biomateriales para el tratamiento de los defectos de stock óseo, supone, a día de hoy, una práctica habitual en estas especialidades.

Los biomateriales sustitutivos óseos, se pueden clasificar en dos grandes grupos, los osteoconductores y los osteoinductores, dependiendo de su capacidad de promover o inducir la formación de hueso nuevo.

Los *sustitutivos óseos osteoconductores* promueven la migración, proliferación y diferenciación de las células óseas para mejorar la regeneración del hueso (Ballester, 2011). En la actualidad se utilizan como andamiajes osteoconductores el colágeno, la hidroxiapatita (HA), el fosfato β-tricálcico, los cementos de fosfato cálcico, los biovidrios, las cerámicas, algunos tipos de polímeros reabsorbibles, espumas metálicas porosas y otros materiales híbridos o compuestos (Giannoudis, 2005; Hak, 2007).

Los *sustitutivos óseos osteoinductores* favorecen la mitogénesis de células mesenquimales indiferenciadas hacia la formación de células osteoprogenitoras con capacidad para formar hueso nuevo (Ballester, 2011). La matriz ósea desmineralizada (MOD) y los factores de crecimiento osteoinductivos (proteínas morfogenéticas óseas o BMPs y otros factores) son biomateriales pertenecientes a este grupo.

Todos los biomateriales sustitutivos del hueso deben de tener una serie de propiedades y características que aseguren un comportamiento biológico adecuado.

De forma general, se consideran propiedades fundamentales de un sustitutivo óseo el ser (Fernández-Fairén, 2011):

a. Biocompatible tanto en su forma general como en la de sus productos de degradación.
b. Bioactivo para conseguir gradualmente (biodegradación progresiva) una osteointegración directa (sin interfaces fibrosas interpuestas) y completa. La bioactividad osteoconductora está íntimamente relacionada con los fenómenos de superficie, la morfología (estructural y microestructural) y la porosidad (superficial y del cuerpo del sustrato), al ser los garantes de la invasión a su través de células y vasos sanguíneos. La bioactividad osteoinductora está relacionada, sin embargo, con la capacidad del sustitutivo para estimular la respuesta celular y tisular.

De forma particular, son consideradas características ideales de un sustitutivo óseo el hecho de (Fernández-Fairén, 2011):

a. Tener una microtopografía superficial adecuada, rugosa con crestas de altura mayor de 0,2 mm y una separación menor de 10 mm que garantice la respuesta osteoblástica.
b. Tener una morfología y una porosidad (superficial y del cuerpo del sustrato) que permita la invasión de células y vasos, con una porosidad interconectada que suponga el 50% o más del volumen del sustrato, de forma que garantice una amplia superficie de intercambio e interacción con las sustancias y los elementos vivos circundantes. El diámetro del poro y de las in-

terconexiones ha de ser igual o superior a 100 mm y a 50 mm respectivamente, dado que con tamaños más pequeños no es posible su penetración por dichos elementos.

c. Tener una resistencia y estabilidad mecánica suficiente que asegure su pervivencia en el tejido donde ha sido implantado (resistencia en compresión por encima de 50 MPa).

d. Tener una degradación paulatina (entre el 2% y 3% del volumen del material implantado por semana).

4.2.3. Micro-TC y sustitutivos óseos

El diseño, desarrollo y evaluación de la biocompatibilidad y bioactividad de los distintos tipos de biomateriales sustitutivos óseos, tanto en animales de experimentación como en humanos, requiere de un abordaje multidisciplinar (ingeniería de materiales, ingeniería mecánica, física, bioquímica, biología molecular y celular, veterinaria, medicina, diagnóstico por la imagen, etc.) que permita analizar de forma general su capacidad de interacción con el sistema biológico en el que se va a implantar. La posibilidad de analizar, por diferentes métodos, las características morfométricas y las reacciones biológicas e inmunocitológicas de los sustitutivos óseos permite determinar la predictibilidad del proceso regenerativo (Meleo, 2012).

A día de hoy, la histología sigue siendo el método estándar para dicho análisis, así como para determinar la formación de matriz extracelular dentro de los poros interconectados del biomaterial, y para evaluar la cantidad de células, vasos sanguíneos y de tejido que crece hacia el interior del andamiaje o "scaffold" (*tissue ingrowth*).

Pero la evaluación de la interfaz biomaterial-tejido receptor mediante estudios histológicos consume tiempo (2-3 semanas) y es a menudo difícil, debido sobre todo a desajustes físicos y químicos que pueden provocar artefactos de distorsión o separación del tejido durante el procesamiento. Además, las secciones 2D que proporcionan los estudios histológicos son representaciones incompletas y potencialmente engañosas de la formación tridimensional de tejido dentro de los "scaffolds" porosos. Por ello, el análisis histológico no proporciona un método absolutamente fiable a la hora de cuantificar tridimensionalmente la formación de tejido dentro de secciones múltiples de un biomaterial, no siendo por tanto ideal para la comparación estadística entre distintos grupos experimentales (Guldberg, 2008).

Sin embargo, las técnicas de imagen de alta resolución (1-30 μm) están asumiendo un papel cada vez más importante en la caracterización de las funciones y propiedades de los biomateriales.

Dentro de ellas, la micro-TC está considerada hoy en día una herramienta de alto potencial tanto para el diseño y caracterización no destructiva de los sustitutivos óseos (biomateriales y bioscaffolds) como para el estudio de su interacción con el tejido receptor (Chappard, 2005; Ho y Hutmacher, 2006; Guldberg, 2008).

Mediante esta técnica de análisis de imagen se pueden realizar, en relativo poco tiempo (3-4 horas) evaluaciones cualitativas y cuantitativas de la interfaz hueso-sustitutivo óseo, analizar la porosidad superficial y profunda del mismo, evaluar su potencial osteoconductor y de integración tisular, y evaluar su tasa de degradación (Chappard, 2005).

Desde el punto de vista técnico, los algoritmos que permiten este tipo de análisis están generalmente bien adaptados para los sustitutivos óseos osteoconductores de tipo fosfocálcico (HA, el fosfato β-tricálcico o β-TCP, cementos de fosfato cálcico), algunos biovidrios, ciertas cerámicas y algún tipo de compuestos polímeros reabsorbibles como el ácido poliláctico y el poliglicólico.

Sin embargo, el análisis mediante micro-TC de los biomateriales metálicos, presenta un mayor grado de dificultad técnica debido a la elevada absorción de rayos X de los mismos, lo que provoca la aparición de artefactos en las reconstrucciones tomográficas. Sin embargo, mediante el uso de haces microfocales y de ciertos tipos de algoritmos de filtrado de ruido se puede analizar con bastante exactitud la interfaz hueso-metal y la integración ósea, especialmente del titanio.

4.2.3.1. Micro-TC y sustitutivos óseos ostoconductores

La micro-TC suele utilizarse de forma dual para caracterizar, en un primer tiempo, la microestructura de los sustitutivos óseos osteoconductortes, para en segundo tiempo, y en relación con los parámetros anteriores, determinar la cantidad y distribución de la matriz extracelular mineralizada formada. Estos estudios pueden realizarse tanto *in vitro*, en sistemas de biorreactor, como *in vivo* después de la implantación del biomaterial en sitios ectópicos o en defectos óseos de tamaño crítico (Guldberg, 2008).

Desde el punto de vista de caracterización microestructural, se pueden obtener a partir del análisis microtomográfico una serie de variables relacionadas con diferentes aspectos del biomaterial: grosor estructural, interconectividad, anisotropía, rugosidad, porosidad, permeabilidad, etc. (Jones, 2007).

La variable *Structure Thickness (St.Th)* determina el grosor medio 3D de las estructuras del "scaffold", medido de forma independiente al modelo, mientras que la *Structure Separation* (*St.Sp)* determina el grosor de los espacios huecos definidos tras la binarización del VOI.

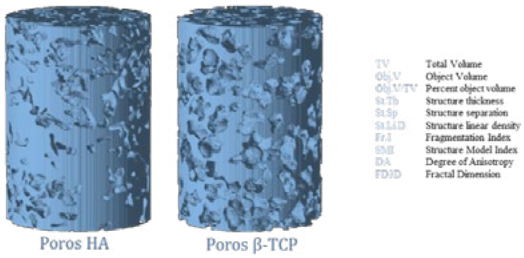
La variable *Structure Linear Density* (*St.Li.D)* cuantifica, por unidad de longitud, el número de veces que se atraviesa la estructura sólida a lo largo una vía arbitraria a través del VOI, siendo por tanto una variable relacionada con la interconectividad estructural del biomaterial. El *Fragmentation Index (Fr.I)*, por el contrario, es un índice de conectividad inverso, de forma que cuanto más alto sea el valor de esta variable menos interconectividad existe en la estructura.

El *Structure Model Index (SMI)* indica la prevalencia relativa de estructuras en forma de placa o en forma de tubo tanto en el hueso trabecular como en biomateriales cerámicos. Se define en un intervalo de valores de 0 a 3, donde 0 es una estructura en forma de placa y 3 de un cilindro. El *Degree of Anisotropy* (*DA)* es una medida de la simetría del objeto, o de la presencia/ausencia de estructuras alineadas en una determinada dirección.

La *Fractal Dimension* (*FD3D)* es un indicador de la complejidad textural de la superficie de un objeto, que cuantifica indirectamente la rugosidad de la superficie del objeto que rellena el VOI.

Pero uno de los aspectos más importantes desde el punto de vista de caracterización de un sustitutivo óseo, es la determinación de la porosidad y permeabilidad estructural del mismo, ya que de ella depende en gran parte la capacidad de respuesta biológica del mismo.

La porosidad de los diferentes tipos de "scaffold" puede determinarse de varias maneras. La forma más directa de hacerlo es mediante el cálculo de la *fracción volumétrica de material o porcentaje de volumen del objeto (Percent object volume o Obj.V/TV),* que no es más que la relación existente entre el volumen total de la región de interés analizada (*Total Volumen o TV*) y el espacio ocupado por el biomaterial (*Object Volume* o *Obj.V.*) (Figura 4.3).



	TV	Obj.V	Obj.V/TV	St.Th	St.Sp	St.LI.D	Fr.I	SMI	DA	DF3D
Unit	mm^3	mm^3	%	mm	mm	mm^{-1}	mm^{-1}	-	-	-
Poros HA	196,35	126,06	64,20	0,3970	0,2244	1,6173	-5,1629	-0,9161	1,7493	2,3117
Poros β-TCP	192,97	101,66	52,68	0,3476	0,3222	1,5154	-2,7875	0,7270	1,6672	2,2460

Figura 4.3. Análisis cuantitativo 3D de la porosidad de muestras de hidroxiapatita (HA) y fosfato de calcio (β-TCP). Imágenes cedidas por Trabeculae EBT S.L.

Sin embargo, desde el punto de vista de predictibilidad de respuesta biológica, la mayor parte de las veces no llega con determinar la porosidad general del biomaterial, sino que es necesario determinar el denominado *grado de interconectividad del espacio poroso* (cuánto espacio poroso interior se conecta con el exterior), es decir, su grado de permeabilidad hacia el exterior (Lin, 2003).

Este estudio de la permeabilidad puede realizarse de una forma más potente e informativa añadiendo el criterio de *diámetro esférico virtual*, concepto cualitativo que nos permite evaluar la permeabilidad como un subconjunto del espacio poroso de un biomaterial accesible desde la periferia (del exterior al interior) en relación con una esfera virtual de un diámetro dado en vóxeles de la imagen.

Este análisis de *Permeabilidad a esferas virtuales* (*Permeability to virtual spheres* o *PVS*) utiliza una técnica basada en transformadas de la distancia, que en esencia permite acercar los límites de la región de interés seleccionada a la superficie de la imagen binarizada del material. La región de interés seleccionada se "encoge" desde el exterior, de forma que esa superficie puede penetrar dentro de los objetos binarizados hasta que encuentre una superficie sólida. Esta penetración virtual se puede condicionar, además, mediante una subrutina que permite elegir un determinado diámetro de vóxel, de forma que la región de interés que comienza a encogerse alrededor de los elementos sólidos no pueda atravesar ninguna región que tenga un diámetro superior a esa cifra (figura 4.4).

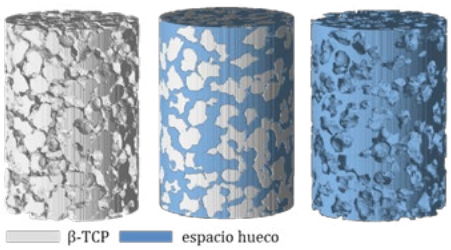


Figura 4.4. Análisis cuantitativo 3D de la permeabilidad de muestras de fosfato de calcio (β-TCP). Imágenes cedidas por Trabeculae EBT S.L.

Desde el punto de vista técnico, para el cálculo de todas estas variables es necesario realizar una correcta binarización y segmentación de la imagen.

La selección del umbral binario global, sobre todo para el estudio de la porosidad y permeabilidad de una determinado biomaterial, es crítica, puede ser compleja, y suele requerir de la utilización de diferentes métodos (comparación visual de las imágenes basales y binarizadas, algoritmo de Otsu de identificación de valores límite globales, *local thresholding*, técnica BLOB3D, etc.).

La resolución espacial del micro-TC es un factor crítico para la segmentación de los datos de la imagen. Una resolución espacial alta, con menores tamaños de vóxel, facilita la determinación de los umbrales globales límite, haciendo a los resultados del análisis menos sensible a la variación de los valores binarios límite. Por lo tanto, el estudio de la porosidad y permeabilidad de los biomateriales se beneficia de altas resoluciones espaciales, especialmente cuando el tamaño de los elementos estructurales o de los poros es muy pequeño.

La **cuantificación y análisis de la distribución de la matriz ósea mineralizada** puede determinarse mediante el análisis diferencial de la imagen de diferentes VOIs. Para ello, se requiere también de una alta resolución y una muy precisa segmentación del tejido mineralizado, ya que la densidad de la matriz mineralizada recién formada es sustancialmente menor y más variable que la de hueso laminar maduro, siendo de nuevo fundamental determinar el valor del umbral binario global. Si bien este enfoque suele funcionar bien para la detección de la matriz mineralizada formada dentro de biomateriales con bajo coeficeinte de atenuación como los "scaffolds" poliméricos, cuando se trata de biomateriales de alto coeficiente de atenuación o cuando es preciso diferenciar varios biomateriales, este proceso resulta mucho más complejo debido a la superposición de distribuciones de distintas densidades, siendo necesario utilizar rn estos casos sofisticados algoritmos de segmentación (Guldberg, 2008).

A modo de ejemplo, en un trabajo de investigación realizado por varios autores pertenecientes a la Red Gallega de Biomateriales, en el que se evaluaba mediante micro-TC el crecimiento de la matriz ósea y la osteointegración de implantes de carburo de silicio bioinspirado (bioSiC) (una cerámica biomimética producida a partir de madera que presenta una estructura similar al hueso con la propiedad única de una porosidad interconectada que facilita el crecimiento óseo interno y la angiogénesis), fue necesario utilizar resoluciones nominales de 7,90 μm y un filtro de Al de 1 mm de grosor para obtener un intervalo restringido de longitudes de onda que facilitaran la discriminación de densidades y la segmentación (figura 4.5).

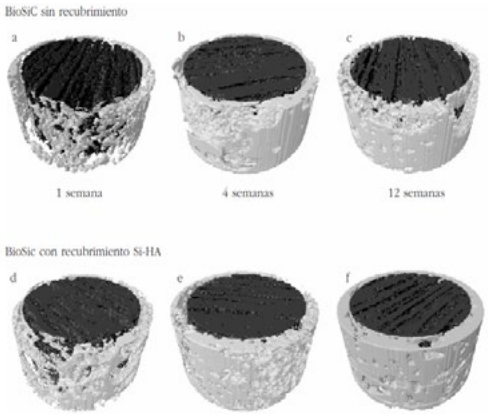


Figura 4.5. Modelos 3D de las cerámicas de bioSiC a las 1, 4 y 12 semanas (a, b y c) y de bioSiC con recubrimiento bioactivo de Si-HA (d, e y f). Los cilindros cerámicos se representan en gris oscuro el hueso neoformado en la periferia del implante en gris claro.

Mediante esta técnica se pudo demostrar, que los implantes de bioSiC presentan una buena osteointegración a las 4 semanas de su implantación, con crecimiento óseo tanto hacia fuera *(ongrowth)* como hacia dentro *(ingrowth)*, no requiriendo de la bioactividad de un revestimiento para mejorar la aposición de hueso neoformado (Guede *et al*., 2012)

4.2.3.2. Micro-TC y biomateriales metálicos

Como se ha mencionado anteriormente, la alta densidad de los metales hace que para el estudio de biomateriales metálicos el escáner de micro-TC deba ser configurado de forma que pueda discriminar esa alta densidad de la media-baja del hueso y la matriz ósea neoformada.

Para ello, desde el punto de vista técnico, resulta fundamental utilizar el máximo voltaje de aplicación y el filtro más denso para obtener la máxima energía de rayos-X, escanear a 360º y suprimir el ruido mediante el empleo de haces microfocales y algoritmos de filtrado en cada etapa de rotación (figura 4.6).

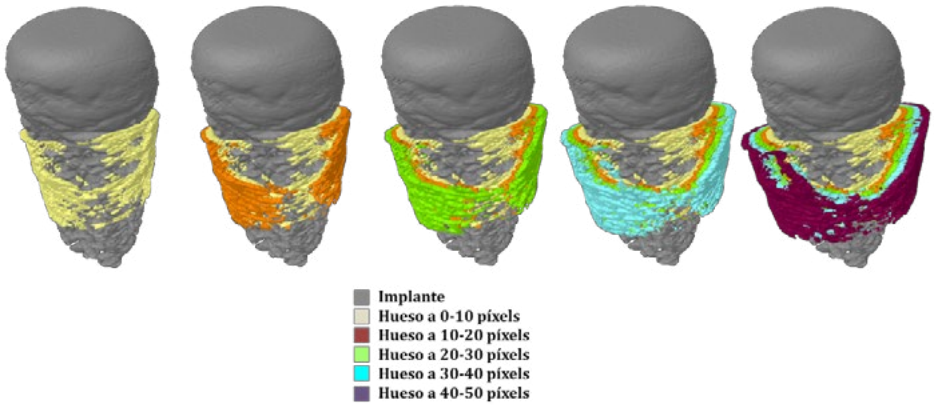


Figura 4.6. Modelos 3D de análisis de matriz ósea neoformada alrededor de implantes de titano en tibia de conejo. Imágenes cedidas por Trabeculae EBT S.L.

4.3. Conclusiones

La *microtomografía computarizada* permite la adquisición de imágenes de alta resolución en 2D y 3D de diferentes tipos de estructuras, tejidos mineralizados (sobre todo hueso y dientes), biomateriales, etc., de forma no invasiva y no destructiva y sin necesidad de pretratamientos de la muestra.

La posibilidad de analizar mediante micro-TC las características morfométricas y la biocompatibilidad y bioactividad de los biomateriales sustitutivos óseos permite determinar la predictibilidad del proceso regenerativo que inducen.

Los estudios de caracterización microestructural (grosor estructural, interconectividad, anisotropía, rugosidad, porosidad, permeabilidad, etc.) y de valoración de la osteointegración con micro-TC, proporcionan al investigador ortopédico básico un amplio abanico de herramientas para la evaluación, *in vitro* e *in vivo*, de la aplicabilidad clínica de los biomateriales naturales y sintéticos.

Referencias bibliográficas

Ballester JJ, Sueiro J, Goberna R, Domínguez JF, Valero J. (2011) Regeneración ósea. Biomateriales, sustitutos óseos y sustitutos del injerto óseo. En: Biomateriales y sustitutos óseos en traumatología y cirugía ortopédica. Juan José Ballester Alfaro y José Sueiro Fernández (Editores). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, España, pp. 11-26.

Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Wevers M, Lambrechts P. (2001) A methodology for quantitative evaluation of root canal instrumentation using microcomputed tomography. Int Endod J., 34(5):390-8.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro–computed tomography. Journal of Bone and Mineral Research, 25:1468–1486.

Calzado A, Geleijns J. (2010) Tomografía computarizada. Evolución, principios técnicos y aplicaciones. Rev Fis Med, 11(3):163-180.

Centre for Evidence-based purchasing (CEP). Wide bore CT scanners. Comparative specifications: CEP 08029; NH PASA March 2009.

Chappard D, Blouin S, Libouban H, Baslé MF, Audran M. (2005) Microcomputed Tomography for the study of hard tissues and bone biomaterials. Microscopy and Analysis, 19 (3): 17-19.

Fernández-Fairén M, Gil FJ. (2011). Sustitutos del hueso: Generalidades. En: Biomateriales y sustitutos óseos en traumatología y cirugía ortopédica. Juan José Ballester Alfaro y José Sueiro Fernández (Editores). Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, España, pp. 27-42

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. (2005) Bone substitutes: An update. Injury, 36 (supl.3):S20-7.

Guede D, Pereiro I, Solla E, Serra J, López-Peña M, Muñoz F, González-Cantalapiedra A, Caeiro JR, González (2012) P. Osteointegración y biocompatibilidad in vivo de cerámicas bioinspiradas de carburo de silicio en un modelo experimental en conejo. Rev Osteoporos Metab Miner, 4:127-132.

Guldberg RE, Duvall CL, Peister A, Oest ME, Lin AS, Palmer AW, Levenston ME. (2008) 3D imaging of tissue integration with porous biomaterials. Biomaterials, 29(28):3757-61.

Hak DJ. (2007) The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. J Am Acad Orthop Surg., 15: 525-536.

Ho ST, Hutmacher DW. (2006) A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. Biomaterials, 27(8):1362-76.

Jaecques SV, Van Oosterwyck H, Muraru L, Van Cleynenbreugel T, De Smet E,

Wevers M, Naert I, Vander Sloten J. (2004) Individualised, micro CT-based finite element modelling as a tool for biomechanical analysis related to tissue engineering of bone. Biomaterials, 25(9):1683-96.

Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. (2007) Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using Micro-CT. Biomaterials, 28(15):2491–2504.

Kazakia GJ, Majumdar S. (2006) New imaging technologies in the diagnosis of osteoporosis. Rev Endocr Metab Disord, 7(1-2): 67-74.

Lespessailles E, Chappard C, Bonnet N, Benhamou C. (2006) Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. Joint Bone Spine, 73(3): 254-61.

Lin AS, Barrows TH, Cartmell SH, Guldberg RE. (2003) Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. Biomaterials, 24(3):481–489

Lizarbe MA. (2007) Sustitutivos de tejidos: De los biomateriales a la ingeniería tisular. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)., 101 (1): 227-249.

Meleo D, Bedini R, Pecci R, Mangione F, Pacifici L. (2012) Microtomographic and morphometric characterization of a bioceramic bone substitute in dental implantology. Ann Ist Super Sanita, 48(1):59-64.

Wong FS, Anderson P, Fan H, Davis GR. (2004) X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. Arch Oral Biol, 49(11):937-44.

5. Cell Therapy and Tissue Engineering Strategies in Rheumatic Diseases

E. F. Burguera[1, 2], F. J. Blanco-García[2], J. C. Silva-Magalhães[1,2*]

[1]Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España.

[2]Grupo de Bioingeniería Tisular y Terapia Celular (GBTTC-CHUAC). Servicio de Reumatología. Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC). Sergas. Universidad de A Coruña (UDC). C/ As Xubias, 84. 15006, A Coruña

joana.cristina.silva.magalhaes@sergas.es

Summary

Tissue engineering (TE) has long been considered a promising option to regenerate cartilage lost due to the progression of osteoarthritis. Next generation TE approaches need to reproduce cartilage characteristic zonal architecture and TE studies should employ conditions similar to those in OA cartilage, i.e. an inflammatory, hypoxic environment and physical stimulation. New emerging technologies, such as high throughput screening (HTS) or novel proteomic techniques will allow the identification of novel molecules with chondrogenic potential and a better characterisation of the TE construct. On the other hand, a consensus score system that allows direct comparison among different approaches is still needed.

5.1. Introduction

5.1.1. Articular cartilage tissue

Articular cartilage is a highly organized tissue located at the ends of long bones. It enables proper joint movement by providing a lubricated, load-bearing, and energy dissipation environment. These well known mechanical and lubrication properties are attributed to cartilage's tissue macromolecular extracellular matrix (ECM). This matrix is composed by charged molecules organized in complex fibrillar networks, that are also responsible for the transduction of chemical and mechanical signals from the surrounding tissue to the unique cellular component of the cartilage tissue, the chondrocyte (Mobasheri et al., 2014, Han et al., 2011).

In human adult articular cartilage, the matrix composition, cell morphology, density and expression of specific markers is influenced by its zonal architecture: superficial, middle, deep, and calcified zones. In the superficial zone (SZ), flattened chondrocytes at high density, are surrounded by an ECM rich in collagen fibrils, predominantly of type II collagen, which are oriented parallel to the surface. SZ cells synthesize and secrete a specialized protein named lubricin or proteoglycan 4 (PRG4) which plays a critical role in lubrication and wear protection. Although initially thought to be located uniquely in the cartilage superficial zone and in the synovial fluid, a few PRG4 positive cells can be

found in the middle (MZ) and deep zones (DZ). On the other hand, clusterin can be found exclusively in SZ chondrocytes (Goldring, 2012, Rocha et al., 2014).

Mid-zone chondrocytes are round, synthesize a large amount of aggrecan and the ECM is rich in hyaluronan (HA), dermatan sulfate and type II collagen fibrils that become more randomly distributed. Cartilage intermediate layer protein (CILP) is uniquely expressed in MZ and may be involved in mediating interactions among ECM components (Grogan et al., 2014, Klein et al., 2009). Deep zone chondrocytes are spherical and larger; they present lower density and are organized in columns. Collagen fibrils become thicker and they distributed perpendicular to the joint. The lowest part of the DZ is partially calcified and a tidemark represents the interface between nonmineralized articular cartilage and calcified tissue. Osteopontin (OPN) is expressed in DZ chondrocytes and interacts with integrin receptors to promote signal transduction. Additionally, type X collagen, a hypertrophy marker and indicator of endochondral ossification can also be found in ECM of deep zone layers (Tchetina, 2011).

Adult articular cartilage has a low turnover rate and a very limited ability for self-repair, so any alteration of the ECM or degradation of its components, can lead to chondrocyte dedifferentiation, affecting cartilage homeostasis. These alterations make this tissue particularly vulnerable to degenerative processes and the development of pathological conditions such as osteoarthritis.

5.1.2. Rheumatic diseases and cartilage damage

Osteoarthritis (OA) is a rheumatic disease with a prevalence that reaches up to 40% of people over the age of 70 and is expected to become the world's fourth leading cause of disability by 2020. The pain and physical disability that accompany this condition mean that a quarter of OA patients will be unable to perform major activities of daily life, severely affecting their life quality and expectancy (Cooper et al., 2014). A new standardized definition of the OA disease has been recently proposed by the OA Research Society International (OARSI) "Osteoarthritis is a disorder involving movable joints characterized by cell stress and extracellular matrix degradation initiated by micro- and macro-injury that activates maladaptive repair responses including pro-inflammatory pathways of innate immunity. The disease manifests first as a molecular derangement (abnormal joint tissue metabolism) followed by anatomic, and/or physiologic derangements (characterized by cartilage degradation, bone remodeling, osteophyte formation, joint inflammation and loss of normal joint function), that can culminate in illness." (Kraus et al., 2015).

There are three main types of cartilage injury which can initiate a degenerative condition and lead to an OA disorder: superficial matrix disruption, partial and full thickness defects. Superficial matrix disruption arises from blunt trauma in which the ECM is damaged but viable chondrocytes can aggregate into clusters and are capable of synthesizing new matrix. Partial thickness defects disrupt the cartilage surface but do not extend into the subchondral bone. These defects, unlike superficial matrix disruption, are unable of self-repair. Then full thickness defects arise from damage that penetrates deep into the subchondral bone and results in the recruitment of cells from the bone-marrow inducing the formation of a fibrocartilaginous repair tissue (Khan et al., 2008).

Existing surgical treatments focused on pre-OA cartilage defects are limited and so far none has accomplished the formation of a neo-cartilage tissue that is fully integrated, hyaline-like in composition and presents a zonal architecture (Marcacci et al., 2013). Eventually, the ultimate solution for these patients is a joint replacement. On the other hand, only very few approaches have attempted to treat the osteoarthritic joint, facing the challenge to repair larger defects or resurfacing the entire OA joint (Johnstone et al., 2013). As OA-affected population is estimated to be much higher than that affected

by focal lesions, there is an urgent unmet need for scalable regenerative solutions that could face the raising human burden and economic cost of this disease.

5.2. Current strategies for cartilage repair and regeneration

5.2.1. Cell-based

Most of the tissue-engineered approaches that attempt to repair or regenerate articular cartilage are cell-based. Since 1994, chondrocytes have been used for cartilage defects, through autologous chondrocyte implantation (ACI) (Brittberg et al., 1994). A 20 year follow-up has demonstrated its efficacy and durability, although several limitations arise from the use of chondrocytes, such as reduced availability, low proliferative capacity and dedifferentiation in vitro (Roelfols et al., 2013).

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have clear therapeutic potential for joint tissues as they constitute an abundant cell source, possess multipotent differentiation capacity and secrete a variety of cytokines and growth factors that confer them anti-fibrotic, anti-apoptotic, pro-angiogenic and immunosuppressive properties (Becerra et al., 2011, Nöth et al., 2008). MSC-based therapy may act via different ways, preventing cartilage degradation through secretion of bioactive factors or by differentiating into chondrocytes thus contributing to cartilage repair. MSCs can be transitioned into chondroprogenitor-like cells, mimicking *in vivo* chondrogenesis, which represents a stage-specific sequence of events similar to the earlier skeletal development, through activated molecules. However, the requirements and conditions for effective induction of MSCs chondrogenesis and the production of a stable cartilaginous tissue are far from being understood (Diekman et al., 2013).

Well-established full inducers include the transforming growth factor family (TGF-β1, 2 and 3) (Andrades et al., 2012, Cicione et al., 2015). Other growth factors such as bone morphogenetic proteins (BMP2, 4 and 6) and the insulin-like growth factor (IGF1) have been regarded as promoters of chondrogenesis, when combined with TGF-β, rather than inducers, as their action has not yet been confirmed (Boeuf and Ritcher, 2010). Recent studies have also focused on the use of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) or matrix Gla Protein (MGP) which are thought to act as inhibitors of bone formation and cartilage calcification (Weiss et al., 2010, Cancela et al., 2012).

Human induced pluripotent stem cells (iPSC) have distinct abilities to self-renew indefinitely in culture and to differentiate into any cell-type in the organism, including chondrocytes (Takahashi, 2007). iPSC-derived MSC-like cells appear as a valuable cell source to be explored as an alternative to patient-derived MSC in cases for which their chondrogenic potential may be compromised due to donor age or condition. In addition, iPSC provide a powerful and flexible platform for dissecting *in vitro* the molecular mechanisms that regulate chondrogenic differentiation under normal or pathological (i.e. using patient-specific iPSC) conditions (Matsumoto et al., 2013).

5.2.2. Scaffold-based

In recent years, natural and synthetic biomaterials with biomimetic clues have been used to create niches or microenvironments to control stem cell behavior and differentiation towards cartilage formation by simply tailoring cell-matrix interactions. Yet classical cartilage tissue engineering strategies do not mimic the structural organization or the zonal properties of articular cartilage and instead are focused on generating homogenous tissues with bulk properties that resemble those of native cartilage (Johnstone et al., 2013).

Different authors have described how manipulating material composition, structure and degradability, using different combinations of synthetic (poly(ethylene glycol) (PEG), poly (L-lactic acid) (PLLA)) with natural origin materials (chitosan (CHT) or chondroitin sulphate (CS)) can provide unique cues or create niches that influenced cell morphology, spreading and migration and chondrogenic differentiation (Nguyen et al., 2011, Magalhães et al., 2015). Thus, appropriate control of the culture conditions and environmental signals through material compositions could provide guided differentiation of MSCs into the various zonal phenotypes of articular chondrocytes mimicking its organized architecture, as in normal articular cartilage (Klein et al., 2009).

Another challenge associated to cartilage regenerative strategies is the lack of optimal integration between the neo-tissue formed and native cartilage. Ideally, an adhesive would, at least temporarily, be part of the reconstructive scaffold and share properties of the host tissue. A multifunctional modified CS has been proposed by Elisseeff and co-workers, by chemically functionalizing both methacrylate and aldehyde groups of the CS molecule to form two functional arms that can chemically bridge biomaterials and tissue proteins present at the cartilage surface, via Schiff's base linkage (Wang et al., 2007). Finally, it is important to highlight the need to test tissue-engineered constructs in relevant experimental conditions that better resemble those of the osteoarthritic joint, such as an inflammatory environment, hypoxic conditions and under physical stimulation (Diekman et al., 2013).

5.2.3. Drug screening

Despite the fact that considerable advances have been made in MSC-derived chondrogenesis, the signal transduction and molecular mechanisms involved in this process are still not fully understood. New technology such as high throughput screening (HTS) has emerged allowing to discover unexpected signaling pathways as well as identifying novel compounds for the modulation of the MSCs chondrogenic differentiation process. HTS is a process that allows the screening of thousands of chemicals to identify potential interesting compounds for a specific application. Basically, it involves a primary screening for the selection of compounds (HTS), a dose-response analysis and validation, after which a compound is usually considered as a lead and then can be further tested as potential drug candidate (Alves et al., 2011).

Although most HTS published studies have been performed in two-dimensional (2D) systems, for chondrogenesis studies it is preferable to use three-dimensional (3D) systems, resembling mesenchymal condensation that ocurrs in the first steps of MSCs differentiation. This can be performed using conventional pellet-systems although the potential of novel superhydrophobic chips for this application might also be explored (Huang et al., 2008, Oliveira et al., 2014).

Recently, kartogenin and TD-198946 have been identified as stimulators of the chondrogenic process of bone marrow derived-MSCs (Johnson et al., 2012, Yano et al., 2013). Kartogenin acts via a novel biological pathway involving binding to filamin A and disrupting its interaction with the transcription factor core-binding factor b subunit (CBFb) which modulates Runx1. It was suggested that kartogenin may modulate endogenous stem cells to confer a regenerative/repair effect and/or a protective effect (Johnson et al., 2012). On the other hand, TD-198946 was the first small molecule compound to have both reparative and preventive effects in a mouse degenerative articular cartilage model. The authors propose that this compound exerts its effect by regulating Runx1 expression, a known inducer of chondrogenic differentiation and a suppressor of hypertrophy (Yano et al., 2013). Both studies show the potential of HTS to identify new biological pathaways and small molecules that could be used to promote the repair of degenerative articular joint.

5.3. Characterization of *in vitro/ex vivo* neoformed cartilage

This section summarises the most common assays employed to characterise the quality and extent of neocartilage formed. A combination of them, as complete as possible can estimate the potential of the cellular or TE approaches for translation to *in vivo* applications.

5.3.1. Cell attachment, viability and proliferation

Cellular attachment, viability and proliferation assays are conducted to prove that a particular cell differentiation model or combination of cells and biomaterials is viable, before performing further testing and characterization. Cell attachment and morphology on scaffolds is usually verified with fluorescent confocal laser scanning microscopy (CLSM) or alternatively with scanning electron microscopy (SEM). In the first case, cells are labelled with a fluorescent dye and viewed through the microscope, while for SEM, specimens are fixed, dried and metallized to facilitate observation (Tayebi et al., 2012, Meinel et al., 2004, Aigner et al., 1998, Kim et al., 2003). Adhesivity is sometimes quantified by moving the scaffolds to a new culture plate, 24 h after seeding and counting the remaining cells that did not attach to the biomaterial. Ultrastructure of the attached cells can be viewed through transmission electron microscopy.

Viability and proliferation can be evaluated through a variety of techniques. Amongst the most common are the Live/Dead Calcein-AM/Ethidium Homodimer kit (Bryant et al., 2001), the MTT (or one of its varieties MTS, XTT or WST-1) assay (Berridge et al., 2005), or with the alamarBlue™ method (Wang et al., 2005). Often results are normalized to total DNA content measured with a PicoGreen assay (Park et al., 2010, Meinel et al., 2004) or other methods.

All biomaterials currently in use to develop cartilage TE approaches have been proven to sustain chondrocyte and MSC attachment and proliferation using some version of the above assays.

5.3.2. Histological and immunohistochemical analysis

When examining the neotissue formed a simple hematoxylin-eosin (H-E) stain will allow the examination of gross morphology, and overall cellularity (number, localization and state, i.e. the presence of apoptotic or necrotic cells, etc). Then, cartilage specific components might be evaluated. As mentioned, cartilage's most abundant proteins are collagen type II, proteoglycans (PGs), such as aggrecan (Agg) or versican, and glycosaminoglycans (GAGs), such as keratan sulfate (KS), chondroitin sulfate (CS) and hyaluronic acid (HA). Therefore, most *in vitro/ex vivo* experimental cellular or TE models to repair cartilage aim to achieve a significant synthesis of these molecules. Histology and immunohistochemistry (IHC), through the use of specific stains and antibodies, respectively, are the gold standard to detect them and evidence their synthesis (Rutgers et al., 2010). At least one standardised grading scale has been developed for TE cartilage (Grogan et al., 2006).

These assays are performed on optimal cutting temperature compound (OCT), paraffin or even acrylic embedded samples. Some of the best stains to detect PGs and GAGs associated to cartilage are safranin-orange (SO) or SO-Fast green, toluidine blue (TB), and alcian blue-Schiff's peryodic acid (AB--PAS). SO detects sulfated GAGs (such as KS or CS), TB reacts primarily with non-sulfated GAGs, such as HA, and AB will react with acid GAGs, both sulfated or non-sulfated, whilst the PAS will reveal simple polysaccharides, such as glycogen. Collagen detection through histology is less specific. Using the Masson's trichrome (MT) stain, collagen in the sample acquires an intense blue colour

while cellular nuclei appear dark blueish-to-black, and cytoplasms become pink. However, MT detects all types of collagen, and therefore it does not discriminate between type II and type I collagen.

Immunohistochemistry with antibodies against collagen type II, KS or CS is much more specific since they are directed specifically against their corresponding antigens. Nevertheless not all antibodies are born equal and care must be taken to select monoclonal specific antibodies and always use positive and negative controls, for example, if detecting collagen type II, include a section of normal cartilage, as a positive control and one with another tissue, for instance kidney or liver (where type II collagen is known to be absent) (Bryant et al., 2003). Stains can be combined to improve the fidelity of the results; for instance performing SO plus KS and CS IHC to identify sulfated GAGs, or TM plus collagen II for collagen type II IHC.

In addition, it is recommended that all authors report the antibodies used, just like PCR primers are reported, to allow comparison of different approaches with the same techniques.

5.3.3. Gene expression

Combined tissue histology and immunohistochemistry can be sufficiently specific when collagen type II and PGs/GAGs are present in enough quantity, and the techniques are executed with care. However, an even more accurate and specific method that detects the synthesis of cartilage specific proteins, even in the initial steps of neotissue formation, is the polymerase chain reaction (PCR). This method, however more expensive, is now commonplace in virtually all cell laboratories. PCR and, in particular, quantitative real time (qRT) PCR can detect small numbers of RNA fragments providing information about the relative, or even absolute, expression of the genes of interest in the experimental conditions.

This technique requires following strict and carefully executed protocols, to isolate and preserve RNA from the TE constructs. This can be troublesome in some instances because many polymers interfere with the usual reagents used to isolate RNA from tissues, leaving residues that might misrepresenting the true results. Contamination with genetic material from other tissues or cells present in the lab is also frequent. Genes of interest, most commonly include Col2a1, ACAN or SOX9, as markers of chondrogenesis, Col1a1, as a marker of fibrocartilage formation and Col10a1, MMP13 or RUNX2 as markers of hypertrophy.

Usual overlooks include: 1) the use of reference genes previously published for similar conditions, without identifying the most stable ones in the specific experimental conditions; 2) using previously reported primers, without checking their correctness or their specificity; and 3) neglecting to check if the amplification product is specific to the gene of interest, when using fluorescent probes such as Sybr Green.

Due to their advantages many groups make use of molecular biology tools to detect molecules of interest in the earliest possible stages of differentiation and to follow it overtime.

5.3.4. Biochemical and proteomic analysis

Molecular biology tools are quite established techniques to follow MSCs differentiation or chondrocyte phenotype maintenance in cartilage regeneration strategies. However, not all mRNA that is transcribed is translated into protein, and gene expression levels do not necessarily predict protein abundance because of alternative transcriptional and translational steps and the occurrence of protein degradation processes. Proteins also undergo posttranslational modifications before they can perform their intended functions. On the other hand, histology and IHC provide qualitative estimates of syn-

thesized protein, but are not very reliable as quantification methods. They can be used to compare intra-experiment conditions, but not to quantify absolute abundance. Because of this, biochemical assays that quantify newly synthesized protein are also widely performed.

Proteoglycan and collagen type II synthesis have been commonly determined by radiolabelling pellets/constructs with $^{35}SO_4$, L-[2,3-^{3}H]proline and [^{3}H]hydroxyproline, which were respectively assumed to be proteoglycan, total protein and collagenous protein (hydroxyproline concentration is estimated to be 10% of collagen) (Freed et al., 1998, Bryant et al., 2003). Total GAGs content can be determined using a variety of commercial kit that employ the dimethyl methylene blue dye (DMMB), which can be detected spectrophotometrically. Then, GAGs are quantified by comparison to a calibration curve with CS standards (Magalhães et al., 2014).

Proteomic analyses are emerging as a relevant tool-set to follow protein interactions that are often essential to their biological activity and to elucidate the true picture of what is happening inside the newly formed tissue (Ruiz-Romero et al., 2009). This is a fairly recent approach and therefore literature in this area is scarce. Double-stable isotope labelling by amino acids in cell culture (SILAC) is one example of these techniques. Labelled peptides are detected and quantified through mass spectrometry techniques such as MALDI-MS/MS. It allows evaluating quantitative modulation of the secretome of stem cells during their differentiation (Rocha et al., 2014).

5.3.5. Biomechanical

In vivo, cartilage is subjected to cyclic, medium to high intensity strain, supporting much of the load applied to joints, and transferring part of it to the underlying bone, especially in load-bearing joints such as the knee or the hip. This determines the highly organised protein orientation and abundance distribution in the distinct cartilage zones described in the introduction. Yet only a few studies pay attention to this crucial aspect of cartilage regeneration. This means that neocartilage, besides having the same protein composition (aggrecan, collagen type II, etc) to native cartilage, must have similar protein zonal distribution and mechanical properties, in order to replace it satisfactorily overtime.

This in practice involves applying cyclic loads during the *in vitro* scaffold development plus mechanical testing as a characterization endpoint (Waldman et al., 2003). Both things can be performed by using, for instance a universal testing machine (UTM), a dynamic mechanical analyser (DMA), or a rheometer (Freed et al., 1998, Moutos, et al., 2007). However, these equipments are not very common in a cellular biology laboratory. Additionally, *in vivo*-like hydrodynamic forces can be applied by culturing the TE constructs in bioreactors (Vunjak-Novakovic et al., 1999) or similar systems.

In summary, the best way to characterize the neoformed cartilage, regardless of the regeneration approach, would be to use a combination, as complete as possible, of the above mentioned techniques. An excellent example of a paper accomplishing this was published by Estes et al., 2010.

Finally, although there is a plethora of methodologies and techniques to characterise in vitro neoformed cartilage, there is still a need for a consensus score system that includes the evaluation of the key required neotissue properties and that allows objective comparison between different cartilage regeneration approaches.

5.4. Clinical overview of cell therapy and TE products for cartilage

Several clinical trials (Phase 1-3) are being conducted to test the application of stem cells for regenerating cartilage. Most of them are focused in repairing cartilage defects or treat degenerative da-

mage in OA knee, ankle, or hip. Different approaches are being tested: 1) The most frequent consist of intra-articular injection of adult MSCs, either directly after collection or after expansion and culture during 2–4 weeks. Three sources of stem cells are used: bone marrow-, adipose-, and umbilical cord blood-derived MSCs. 2) MSCs with scaffolds for implantation. Different biomaterials have been described based on collagen I, collagen hydroxylapatite or decellularized human donor scaffolds.

Preliminary results have been published and their application to resolve different cartilage lesions such as, intra-articular injection of MSC to treat OA joint and MSC with scaffolds to treat traumatic focal cartilage defects are promising (Bauge and Boumediene, 2015).

5.5. Conclusion

Regenerative medicine approaches offer great promise to achieve regeneration of hyaline cartilage. The emergence of novel tools such as high throughput screening and proteomic techniques will improve our understanding of the molecular mechanisms, and their inducers, to accomplish stable chondrogenesis and matrix formation. Clinical trials are underway to test the safety and efficacy of some of these approaches before they can be translated to the patients.

Acknowledgments

Authors would like to thank CIBER-BBN for HR funding. Authors acknowledge the support of the Galician Network of Biomaterials (R2014/033, Xunta de Galicia), and projects "Chondronanonet" (CIBER-BBN) and PI12/00329 (MINECO, ISCIII). CIBER-BBN is a national initiative by ISCIII.

References:

Aigner, J., Tegeler, J., Hutzler, P., Campoccia D., Pavesio A., Hammer, C., Kastenbauer E., Naumann, A. (1998) Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. Journal of Biomedical Materials Research, 42(2): 172-181.

Alves, H., Dechering, K., Van Blitterswijk, C., De Boer, J. (2011) High-Throughput Assay for the Identification of Compounds Regulating Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. PloS One, 6(10): 1-10.

Andrades, JA., Motaung, SC., Jiménez-Palomo, P., Claros, S., López-Puerta, JM., Becerra, J., Schmid, TM., Reddi, AH. (2012) Induction of superficial zone protein (SZP)/lubricin/PRG 4 in muscle-derived mesenchymal stem/progenitor cells by transforming growth factor-β1 and bone morphogenetic protein-7. Arthritis Research and Therapy, 14(1): 1-7.

Bauge C. and Boumediene K. (2015) Use of adult stem cells for cartilage tissue engineering: Current status and future developments. Stem Cell International, ID 438026.

Becerra, J., Santos-Ruiz, L., Andrades, JA., Marí-Beffa, M. (2011) The stem cell niche should be a key issue for cell therapy in regenerative medicine. Stem Cell Reviews, 7(2): 248-255.

Berridge, MV., Herst, PM., Tan, AS. (2005) Tetrazolium dues as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review, 11:127-152.

Boeuf, S., and Richter, W. (2010) Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. Stem Cell Research Therapy, 1(4): 31-40.

Bryant S.J. and Anseth, KS. (2001) The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels. Biomaterials, 22(6): 619-26.

Bryant S.J. and Anseth, KS. (2003) Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 64A(1): 70-79.

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. New England Journal of Medicine, 331(14): 889-895.

Cancela, ML., Conceição, N., Laizé, V. (2012) Gla-Rich protein, a new player in tissue calcification? Advanced Nutrition, 3(2): 174-81.

Cicione, C., Muiños-López, E., Hermida-Gómez, T., Fuentes-Boquete, I., Díaz-Prado, S., Blanco, FJ. (2015) Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: transforming growth factor-β superfamily. Cell Tissue Bank, 16(2): 195-207.

Cooper, C., Javaid, K., Arden, N. (2014) Epidemiology of Osteoarthritis. In: Atlas of Osteoarthritis (ed.), Springer Healthcare Ltd., London, United Kingdom, pp. 19-31.

Diekman, BO, Guilak, F. (2013) Stem cell-based therapies for osteoarthritis: challenges and opportunities. Current Opinion Rheumatology, 25(1): 119-126.

Estes, BT. Diekman, BO., Gimble, JM, Guilak, F. (2010) Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. Nature Protocols, 5(7): 1294-311.

Goldring, MB. (2012) Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 4(4): 269-285.

Freed, LE., Hollander, AP., Martin, I., Barry, JR., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G. (1998) Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. Experimental Cell Research, 240(1): 58-65.

Grogan, SP., Barbero, A., Winkelmann, V., Rieser, F., Fitzsimmons, JS, O'Driscoll, S., Martin, I., Mainil-Varlet, P. (2006) Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage. Tissue Engineering, 12: 2141-2149.

Grogan, SP., Chen, X., Sovani, S., Taniguvhi, N., Colwell, CW Jr., Lotz, MK, D'Lima, DD. (2014) Influence of cartilage extracellular matrix molecules on cell phenotype and neocartilage formation. Tissue Engineering Part A, 20(1-2): 264-274.

Han, L., Grodzinsky, AJ., Ortiz, C. (2011) Nanomechanics of the cartilage extracellular matrix. Annual Review Materials, 41: 133-68.

Huang, AH., Motlekar, NA., Stein, A., Diamond, SL., Shore, EM., Mauck, RL. (2008) High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis. Annals of Biomedical Engineering, 36(11): 1909-1921.

Johnson, K., Zhu, S., Tremblay, MS., Payette, JN., Wang, J., Bouchez, LC., Meeusen, S., Althage, A., Cho, CY., Wu, X., Schultz, PG. (2012) A stem cell-based approach for cartilage repair. Science, 336(6082): 717-721.

Johnstone, B., Alini, M., Cucchiarini, M., Dodge, GR., Eglin, D., Guilak, F., Madry, H., Mata, A., Mauck, RL., Semino, CE., Stoddart, MJ. (2013) Tissue engineering for articular cartilage repair the state of the art. European Cells and Materials, 25: 248-267.

Kim, SE., Park, JH., Cho, YW., Chung, H., Jeong, SY., Lee, EB., Kwon, IC. (2003) Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta 1: Implications for cartilage tissue engineering. Journal of Controlled Release, 91(3): 365-374.

Klein, TJ., Malda, J., Sah, RL., Hutmacher, DW. (2009) tissue engineering of articular cartilage with biomimetic zones. Tissue Engineering Part B Reviews, 15(2): 143-157.

Khan, IM., Gilbert, SJ., Singhrao, SK., Duance, VC., Archer, CW. (2008) Cartilage Integration: Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. European Cells and Materials, 16: 26-39.

Kraus, VB., Blanco, FJ., Englund, M., Karsdal, MA., Lohmander, LS. (2015) Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. Osteoarthritis and Cartilage, 23: 1233-1241.

Magalhães, J., Crawford, A., Hatton, PV., Blanco, FJ, San Roman, J. (2014) Poly[2-ethyl-(2-pyrrolidone) methacrylate] and hyaluronic-acid-based hydrogels for the engineering of a cartilage like tissue using bovine articular chondrocytes. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 29(6): 545-559.

Magalhães, J., Lebourg, M., Deplaine, H., Gómze-Ribelles, JL., Blanco, FJ. (2015) Effect of the physicochemical properties of pure or chitosan-coated poly(L-lactid acid) scaffolds on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteoarthritic patients. Tissue Engineering Part A, 21(3-4): 716-28.

Marcacci, M., Filardo, G., Kon, E. (2013) Treatment of cartilage lesions: What works and why? Injury, 44 (1): S11-5.

Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Schlieve, CR:, Ikeya, M., Kim, H., Nguyen, TD., Sami, S., Baba, S., Barruet, E., Nasu, A., Asaka, I., Otsuka, T., Yamanaka, S., Conklin, BR., Toguchida, J., Hsiao, EC. (2013) Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia officansprogressiva show increased mineralization and cartilage formation. Orphanet Journal of Rare Diseases, 8(190): 1-14.

Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., Zichner, L., Langer, R., Kaplan, D., Vunjak-Novakovic, G. (2004) Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. Biotechnology and Bioengineering, 88(3): 379-391.

Mobasheri, A., Kalamegam, G., Musumeci, G., Batt, ME. (2014) Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. Maturitas, 78(3): 188-198.

Moutos, FT., Freed, LE., Guilak, F. (2007) A biomimetic three-dimensional woven composite scaffold for functional tissue engineering of cartilage. Nature Materials, 6(2): 162-167.

Nguyen, LH., Kudva, AK., Guckert, NL., Linse, KD., Roy, K. (2011) Unique biomaterial compositions direct bone marrow stem cells into specific chondrocytic phenotypes corresponding to the various zones of articular cartilage. Biomaterials, 32(5): 1327-38.

Nöth, U., Steinert, AF., Tuan, RS. (2008) Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. Nature Clinical Practice Rheumatology, 4(7): 371-80.

Oliveira, MB., Neto, AL., Correia, CR., Rial-Hermida, MI., Alvarez-Lorenzo, C., Mano, JF. (2014) Superhydrophobic chips for cell spheroids high-throughput generation and drug screening. ACS Applied Materials and Interfaces, 6(12): 9488-9495.

Rocha, B., Calamia, V., Casas, V., Carrascal, M., Blanco, FJ., Ruiz-Romero, C. (2014) Secretome analysis of human mesenchymal stem cells undergoing chondrogenic differentiation. Journal of Proteomic Research, 13(2):1045-54.

Ruiz-Romero, C., Blanco, FJ. (2009) The role of proteomics in osteoarthritis pathogenesis research. Current Drug Targets, 10(6): 1-14.

Rutgers, M., van Pelt, MJ., Dhert, WJ., Creemers, LB., Saris, DB. (2010) Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis and Cartilage, 18: 12-23.

Park, H., Temenoff, JS., Tabata, Y., Caplan, AI., Mikos, AG. (2010) Injectable biodegradable hydrogel composites for rabbit marrow mesenchymal stem cell and growth factor delivery for cartilage tissue engineering. Biomaterials, 28(21): 3217-3227.

Roelfols, AJ., Rocke, JP., De Bari, C. (2013) Cell-based approaches to joint surface repair: a research perspective. Osteoarthritis and Cartilage, 21(7): 892-900.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131(5):861-72.

Tayebi, L. Nozari, A., Vashaee, D. Mozafari, M. (2012) Current opinion in tissue engineering microscopy techniques. In: Current microscopy contributions to advances in science and technology, A. Méndez-Vilas (ed.), Formatex Research Center, Badajoz, Spain, vol 1, pp. 591-601.

Tchetina, EV. (2011) Developmental mechanisms in articular cartilage degradation in osteoarthritis. Arthritis, 2011(683970):1-16.

Tomlins, P. (2013) Standards and Protocols in cells and tissue engineering. In: Standardisation in cell and tissue engineering. Methods and protocols, V. Salih (ed.), Woodhead Publishing, Cambridge, UK, part II, chapter 6, pp. 107-127.

Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, AJ., Langer, R., Freed, LE. (1999) Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. Journal of Orthopaedic Research, 17(1): 130-138.

Waldman, SD., Spiteri, CG., Grynpas, MD., Pilliar, RM., Kandel, RA. (2003) Long-term intermittent shear deformation improves the quality of cartilaginous tissue formed in vitro. Journal of Orthopaedic Research, 21(4): 590-596.

Wang, DA., Varghese, S., Sharma, B., Strehin, I., Fermanian, S., Gorham., Fairbrother, DH., Cascio, B., Elisseeff, JH. (2007) Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. Nature Materials, 6(5): 385-92.

Weiss, S., Hennig, T., Bock, R., Steck, E., Richter, W. (2010) Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Journal of Cell Physiology, 223(1): 84-93.

Yano, F., Hojo, H., Ohba, S., Fukai, A., Hosaka, Y., Ikeda, T., Saito, T., Hirata, M., Chikuda, H., Takato, T., Kawaguchi, H., Chung, UI. (2013) A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. Annal Rheumatic Diseases, 72(5): 748-753.

6. Propiedades antibacterianas de los vidrios bioactivos

M.M. Echezarreta-López, M. Landin
Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia,
Campus Vida, 15782, Santiago de Compostela
mmagdalena.echezarreta@usc.es

Resumen

Desde la introducción del Bioglass® por Hench en 1970, los vidrios bioactivos han sido ampliamente investigados. Estos sistemas de vidrio amorfos muestran un comportamiento bioactivo, con gran capacidad de unión a tejidos, tanto duros como blandos, a través de reacciones complejas que dan lugar a interfaces fuertes y compatibles. Su excelente biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoestimulación han permitido su utilización clínica en gran variedad de aplicaciones médicas. En este capítulo se revisan diferentes aspectos relacionados con estos biomateriales, y en particular, sus propiedades antibacterianas, potencialmente beneficiosas para sus aplicaciones clínicas.

6.1. Introducción

Es un hecho constatable que, como consecuencia del creciente uso de implantes médicos, se ha suscitado un intenso interés por los biomateriales que minimicen o prevengan las infecciones derivadas de la cirugía. Prueba de ello es el importante incremento en el número publicaciones relacionadas con esta temática (figura 6.1).

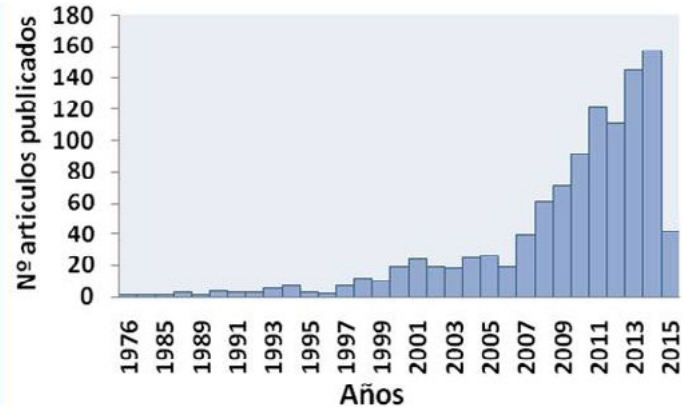


Figura 6.1. Evolución de estudios publicados relacionados con biomateriales con propiedades antibacterianas.

En estos estudios, la producción de biomateriales con propiedades antibacterianas es, en general, planteada desde un procedimiento básico de caracterización del "biomaterial" que se preestable utilizar, o bien, desde uno más complejo como es la optimización del proceso de obtención de un biomaterial con esta aplicación. En base al planteamiento inicial, en estos estudios son evaluados variables tales como, la composición y estructura del "biomaterial", el tamaño y/o morfología que éste presenta o bien se proyecta obtener, así como, las propiedades y consecuencias que están ligados a estos parámetros tal como son la bioactividad y disolución del biomaterial en medios biológicos o la toxicidad con los tejidos y microorganismos vivos con los que interaccionará.

Actualmente, la prevención de las potenciales infecciones asociadas a la cirugía de implante se basan en dos aproximaciones; la combinación de implante-fármaco antibacteriano o la fabricación de los implantes utilizando biomateriales con propiedades antibacterianas (Moriarty et al., 2012). Dentro de este segundo grupo se incluyen un tipo de sistemas de vidrios especiales conocidos como vidrios bioactivos, los cuales han sido señalados por diversos autores como biomateriales con propiedades antibacterianas, eficaces en aplicaciones odontológicas, ortopédicas y regenerativas (Hoppe et al., 2011, Jones, 2013).

6.2. Infecciones ocasionadas con los biomateriales

La mejora de la biocompatibilidad, la funcionalidad y la durabilidad de los materiales implantables ha incrementado la importancia de los dispositivos médicos, algunos de los cuales pueden funcionar correctamente durante décadas. Uno de los principales problemas asociados al uso de estos procedimientos clínicos es la aparición de infecciones bacterianas que se originan durante el proceso quirúrgico. Aunque cuantitativamente la incidencia de este tipo de infecciones es baja, la morbilidad y la mortalidad que provocan, son significativas lo que resulta en un serio problema clínico.

Las interacciones de un biomaterial con los componentes de la sangre conducen a la alteración de mecanismos fisiopatológicos asociados al proceso clínico tratado. En particular, la respuesta y la inflamación que se originan a consecuencia del material implantado, favorecen la intensidad de estas interacciones e incrementan la probabilidad de colonización bacteriana y la formación de un biofilm, lo que deriva al establecimiento de la infección. En general, el crecimiento de los biofilms es el responsable de las infecciones asociadas a implantes. Los biofilms pueden definirse como "ciudades" de bacterias de diferentes especies que viven en comunidad. Se forman por adherencia de las bacterias a una superficie y la producción de una matriz protectora de naturaleza polisacarídica, que localiza la infección y protege a las bacterias de agentes externos. Aunque la bacteria a tratar sea susceptible al efecto de los fármacos (antibacterianos), la creación de esta capa protectora dificulta el acceso de sustancias al interior y limita la eficacia de los tratamientos antimicrobianos. En este sentido, es de vital importancia atajar la colonización bacteriana antes de la formación del biofilm.

6.2.1. Rutas de infección

Entre las rutas de infección posible, se encuentran en primer término las originadas por la contaminación del implante antes o durante el proceso quirúrgico (contaminación peri-operatoria), por exposición del implante y/o del lugar de su alojamiento a las bacterias ambientales y a las portadas por los profesionales sanitarios (Subbiahdoss et al., 2012). Una segunda ruta de infección es la producida durante el periodo de hospitalización postoperatoria (contaminación post-operatoria). En este caso, la causa es la contaminación directa de las heridas abiertas, o bien, el uso de dispositivos invasivos como tubos de perfusión, catéteres o drenajes. Ambas pueden ser causantes infecciones asociadas que pue-

den cronificarse debido a que existen muchas cepas bacterianas capaces de permanecer en la superficie de los implantes en un bajo estado metabólico. Una tercera ruta es la de infecciones derivadas por la propagación hematógena de bacterias desde otras partes del cuerpo con infección (infecciones de la piel, dentarias, neumonía, abscesos o bacteriemias temporales o crónicas) al biomaterial implantado.

6.2.2. Microorganismos implicados

Los microorganismos patógenos que, mayoritariamente, provocan infecciones asociadas a los implantes o a los dispositivos médicos son el *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus aureus*. Los estudios recogen que el 50% de las infecciones asociadas al uso de catéteres, articulaciones artificiales o válvulas cardiacas se deben a *S. epidermidis* mientras que el 23% de las infecciones asociadas a las partes metálicas de articulaciones protésicas, se deben a *S. aureus*. Por otra parte, la *P. aeruginosa* es responsable de las infecciones de un 7% de las articulaciones de cadera y rodilla. También han sido aislados en este tipo de infecciones, microorganismos gram negativo como, *Escherichia coli* y *Pseudomomas auruginosa.*

En la patología de las infecciones asociadas a implantes uno de los factores de mayor relevancia es la virulencia de la bacteria. La virulencia de las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* y *S. aureus* es mayor que la producida por *S. epidermidis*. Ello se justifica en base a que la virulencia de las infecciones por *S. epidermidis* radica fundamentalmente, en su capacidad de formar biofilm, mientras que en la de *S. aureus* es debida a los genes productores de toxinas o exoenzimas perjudiciales para los tejidos lo que hace que sus infecciones sean normalmente, sub-agudas o crónicas. La virulencia de la *P. aeruginosa* está asociada a una endotoxina de su estructura. (Subbiahdoss et al. 2012).

6.2.3. Proceso de infección

En general, la adhesión bacteriana a un biomaterial está precedida por la adsorción de componentes macromoleculares de los fluidos corporales (fluido lacrimal, saliva, suero, plasma) sobre su superficie, dando lugar a la denominada "película acondicionante". Estos fenómenos de adherencia se fundamentan en la elevada afinidad de las interacciones entre las estructuras superficiales de las células y ciertos grupos moleculares específicos en la superficie de un sustrato, o de las fuerzas globales de interacción (interacciones tipo Lifsthitz - Van der Waals, electroestáticas y/o ácido-base). Se ha demostrado que la adsorción de proteínas sobre los materiales reduce la adhesión bacteriana en algunos casos, mientras que en otros como en el de la fibronectina o el fibrinógeno, favorecen el establecimiento de ciertas cepas de *S. epidermis* y *S. aureus* (Wang et al., 2012).

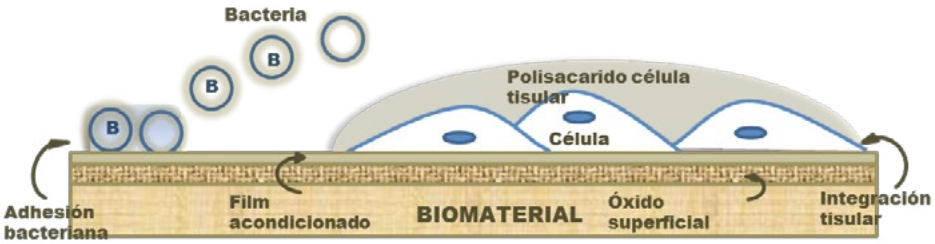


Figura 6.2. Competición entre las células tisulares y las bacterias por la superficie del biomaterial.

El éxito de un biomaterial implantado se fundamenta en un proceso competitivo de las bacterias invasoras, que han de adherirse y formar el biofilm protector sobre la superficie de un implante, y el or-

ganismo receptor que ha de promover la unión e integración tisular. Cuando la competición es ganada por las células tisulares, la superficie se recubre de tejido, que la hace menos vulnerable a la colonización bacteriana. Por el contrario, si esta fase tiene como vencedor a la bacteria, esta se instalará y su eliminación resultará dificultosa (figura 6.2) (Subbiahdoss et al., 2009).

6.3. Características generales de los vidrios bioactivos

6.3.1. Composición y métodos de fabricación

El vidrio bioactivo original fue desarrollado por Hench y registrado con el nombre de Bioglass® 45S5. Se fabrica mediante la fusión en horno a alta temperatura (1370ºC) de óxidos de gran pureza. Es importante señalar que, en este proceso, es fundamental evitar la contaminación del material empleado para preservar eficazmente la reactividad del producto obtenido. Para que el material producido tenga una adecuada unión a los huesos el contenido de sílice en su composición debe ser igual o inferior al 60% M. A principios de los años 90, Li y colaboradores (Li et al., 1991) sintetizaron vidrios bioactivos mediante la técnica sol-gel. Con este procedimiento se obtuvieron vidrios de elevada bioactividad con composiciones muy variadas. Se comprobó que incluso aquellos que presentaban elevados contenidos de silicio (>90% M) deban lugar a la formación de una capa de hidroxiapatita (HA).

En la actualidad, el empleo de los diversos procedimientos de fabricación permite la elaboración de vidrios bioactivos de composición variable, con diferente morfología (partículas, fibras, scaffolds, nanofibras) y/o tamaño de partícula (micro- y nanométricos).

Nombre	SiO_2	Na_2O	CaO	CaF_2	P_2O_5	B_2O_3	Al_2O_3
45S5	46.1	24.4	26.9	0	2.6	0	0
S63.5P6	65.7	15.0	15.5	0	2.6	0.4	0.6
S53P4	53.9	22.6	21.8	0	1.7	0	0
S45P7	46.6	24.1	24.4	0	3.0	1.8	0
52S4.6	52.1	21.5	23.8	0	2.6	-	-
60S3.8	60.1	17.7	19.6	0	2.6	-	-
46SF	46.1	24.4	16.14	10.76	2.6	-	-
60SF	60.1	17.7	11.76	7.84	2.6	-	-
49Sgg	50	0	46	0	4	-	-
58Sgg	60	0	36	0	4	-	-
68Sgg	70	0	26	0	4	-	-
77Sgg	80	0	16	0	4	-	-

Tabla 6.1. Composición de vidrios (% molar)

La composición específica del vidrio bioactivo de Hench, el Bioglass® 45S5 (Tabla 6.1) corresponde con uno de la serie de vidrios elaborados mediante la fusión de cuatro componentes, con contenido constante de P_2O_5, desarrollados para evaluar las cinéticas de reacción superficial de estos biomateriales. Sin embargo, en la actualidad se conoce que es posible la obtención de vidrios bioactivos sin este elemento (Andersson et al., 1990).

Los vidrios bioactivos son una familia de biomateriales sintéticos, a base de sílice, biológicamente activos, compuestos por diferentes combinaciones de óxidos SiO_2, CaO, NaO y P_2O_5, a los que se pueden incorporar otros óxidos (Tabla 6.1). Como se muestra en el diagrama composicional representado en la figura 6.3, la combinación de los óxidos incorporados en un vidrio bioactivo determina sus propiedades biológicas, pudiendo dar lugar a vidrios reabsorbibles, inertes y de mayor o menor reactividad (Ogino et al.1980). Kokubo y colaboradores (Kokubo, 1990, Kokubo et al., 1990) mostraron que el sistema composicional más simple de un vidrio bioactivo es el formado por SiO_2-CaO hasta una composición límite de aproximadamente del 60% del total de compuestos (Ylänen, 2011).

En estos sistemas la variabilidad en la composición afecta sus características. Por ejemplo, la sustitución de CaO por CaF_2 no altera significativamente la reactividad del vidrio, sin embargo, la presencia del ion flúor reduce la velocidad de disolución y modifica la localización de las uniones A-C (figura 6.3). La sustitución de MgO por CaO o K_2O por NaO tiene, además, un pequeño efecto sobre la unión al hueso. Los óxidos B_2O_3 y Al_2O_3 se emplean para modificar los tiempos de procesamiento y la velocidad superficial de reacción (Hench y Andersson et al., 1993).

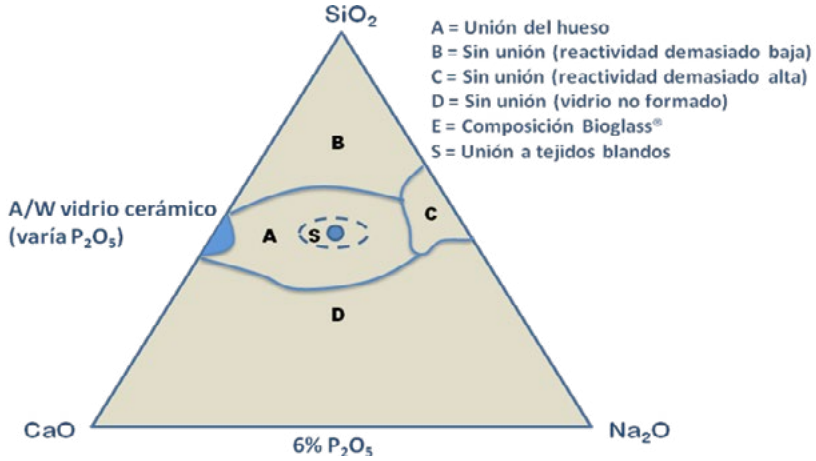


Figura 6.3. Diagrama composicional de unión al hueso (Kokubo et al., 2008). Regiones A, B, C y D. La región S es una región de bioactividad Clase A, donde los vidrios bioactivos se unen tanto a hueso como a tejidos blandos y producen la activación de genes relacionados.

En un sistema multicomponente como SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5-Al_2O_5-B_2O_3, no es posible encontrar una relación simple entre la composición y la unión a los tejidos que pueda ser expresada en un diagrama 2D. Andersson y colaboradores (Andersson et al., 1990) describieron el comportamiento in vivo de estos sistemas complejos mediante un análisis de regresión. El método predice el comportamiento in vivo de estos biomateriales en un espacio de diseño. La predicción basada en factores empíricos que realizan estos autores permite seleccionar vidrios para aplicaciones específicas sin tener que ser evaluados en los animales. Este método funciona porque el vidrio es un material amorfo y sus propiedades son aditivas entre ciertos límites composicionales.

6.3.2. Reacciones químicas en la superficie de los vidrios bioactivos

Tras la implantación de los vidrios bioactivos, se desencadenan una serie de reacciones debido al contacto con los fluidos biológicos (Tabla 6.2) (Hench y Wilson, 1993) que culminan con la unión del

material al hueso a través de una capa de hidroxicarbonato apatita (HCA) formada en su superficie. La alta reactividad de los vidrios en medio acuoso propicia un rápido intercambio de iones entre la superficie del vidrio y los fluidos circundantes, que da lugar a una variación de la concentración iónica del fluido y, simultáneamente, a la formación de una capa de gel de sílice en la superficie del vidrio, lo que favorece la cristalización de HCA. La HCA es similar a las apatitas biológicas, esto es nanocristalina y no estequiométrica, con presencia de carbonato (Valle-Regí et al., 2003).

1.	Intercambio rápido de Na^+ o K^+ con H^+ o H_3O^+ de la solución
2.	Pérdida de sílice en forma de $Si(OH)_4$ a la solución debido ala rotura de las uniones de Si-O-Si y la formación de Si-OH (silanoles) en la interfaz disuelta del vidrio
3.	Condensación y repolimeración de una capa rica de SiO_2 sobre la superficie empobrecida de cationes alcalinos y alcalinotérreos
4.	Migración de los iones Calcio y los grupos PO_4^{3-} a la superficie a través de la capa rica de SiO_2 y formación de un film rico en $CaO-P_2O_5$ por la incorporación de fosfato y calcio de la solución
5.	Cristalización del film amorfo de $CaO-P_2O_5$ por la incorporación de OH^-, CO_3^{2-} o iones F^- de la solución para formar una capa mixta de hydroxil, carbonato y fluoroapatita.

Tabla 6.2. Etapas de reacción de un implante bioactivo en medio acuoso.

La cinética de las reacciones entre los vidrios y el medio dependen de la composición del vidrio. Esta condiciona fundamentalmente el tiempo necesario para que se produzca la cristalización de HCA. El estudio de estas cinéticas ha permitido establecer la relación entre la velocidad de formación de la capa de HCA y el comportamiento in vivo de los vidrios bioactivos.

6.3.3. Propiedades de los vidrios bioactivos

Como ya se señaló, las propiedades de los vidrios bioactivos están directamente relacionadas con su composición. En particular, la velocidad de disolución en medio acuoso que condiciona, fundamentalmente, su bioactividad, es muy variable. Existen composiciones que se disuelven en un periodo de pocos días y otras que requieren varios meses. En los biomateriales en los que la sílice (SiO_2) es la red formadora y los metales alcalinos (sodio y potasio) o metales alcalinotérreos (calcio y magnesio) son los modificadores de la red, el calcio, el fósforo y el silicio desempeñan un papel principal en la bioactividad del vidrio. De hecho, el aumento de la solubilidad y bioactividad está asociado a la disminución de la concentración del formador de red (Si) en el vidrio. Los vidrios bioactivos que contienen 45-52% en peso de sílice se unen más rápidamente al hueso, y son capaces de formar enlaces químicos con los tejidos blandos. Sin embargo, los vidrios que contienen 55-60% en peso de sílice reaccionan lentamente durante un periodo prolongado y no se unen a los tejidos blandos (Hench y West. 1996).

La presencia de otros iones modifica sus propiedades. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de aluminio en la composición (Lindfords y Aho, 2003) disminuye la bioactividad de los vidrios, mientras que el estroncio y magnesio la aumentan (Gentleman et al., 2010).

Se ha comprobado también que el silicio participa en los procesos metabólicos durante la formación y calcificación del tejido óseo. El ortosilicato de ácido $Si(OH)_4$, estimula la diferenciación osteoblástica y la formación de colágeno tipo I en los osteoblastos humanos (Reffitt et al., 2003). Así, se ha demostrado que el Bioglass 45S5®, que contiene 45% en peso de sílice, tiene el mayor efecto estimulante sobre la función de la célula ósea (El-Ghannam et al., 1999). El efecto osteogénico del vidrio bioac-

tivo está mediado por las características de su superficie y la disolución de iones (Radin et al., 2005). Se ha demostrado que los vidrios bioactivos tienen propiedades de activación de genes (Xynos et al., 2001, Jell et al., 2008) y un efecto estimulante sobre la secreción de factores de crecimiento angiogénicos y la angiogénesis (Day, 2005).

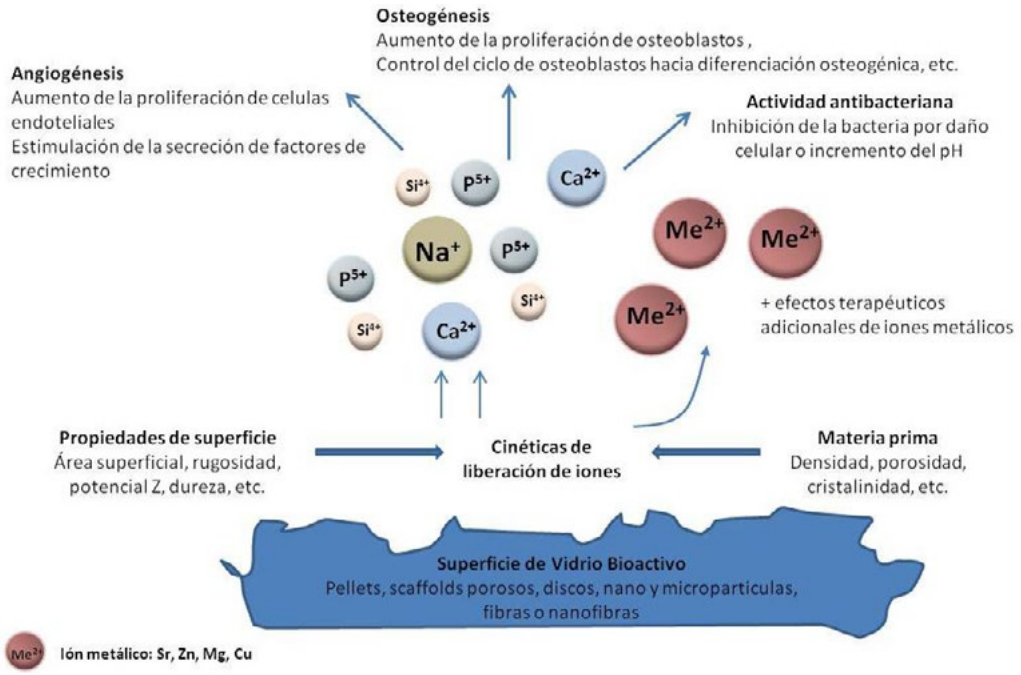


Figura 6.4. Propiedades de los vidrios bioactivos según su composición (Hoppe et al., 2011).

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto actividad antibacteriana asociada a los vidrios bioactivos que se justifica en función de los cambios del pH que se producen en el medio como consecuencia de la gran liberación de iones que se produce cuando se disuelven (Gubler et al., 2008, Zhang et al., 2010).

6.4. Propiedades antibacterianas de los vidrios bioactivos

Desde que Stoor y colaboradores (Stoor et al., 1996) describieron propiedades antibacterianas para los vidrios bioactivos, se ha llevado a cabo un importante número de trabajos de investigación dirigidos a establecer los factores que la explican y condicionan. Así, se ha puesto de manifiesto la importancia de variables relacionadas con su composición y sus características físicas, así como con los métodos de obtención utilizados en su elaboración y con los procesos y condiciones empleados cuando se evalúa su efecto sobre los microorganismos. Establecer generalizaciones sobre los efectos de las variables analizadas y la actividad antibacteriana no es fácil, ya que las metodologías empleadas por los diferentes investigadores son muy diversas y poco representativas de las condiciones fisiológicas que corresponderían a la práctica clínica.

En una revisión reciente sobre este tema, los autores recopilaron y analizaron de forma conjunta una serie de factores descritos por diversos autores en las investigaciones llevadas a cabo para estable-

cer la capacidad antibacteriana de los vidrios bioactivos. La figura 6.5, presenta una relación de variables seleccionadas con efecto sobre sobre la actividad antibacteriana de los vidrios bioactivos extraída de la bibliografía.

El empleo de técnicas de inteligencia artificial, en particular sistemas híbridos que integran redes neuronales artificiales y lógica difusa permitió modelizar la base de datos generada y extraer algunas interesantes conclusiones generales (Echezarreta-López y Landin, 2013).

Figura 6.5. Relación de variables implicadas en la actividad de los vidrios bioactivos

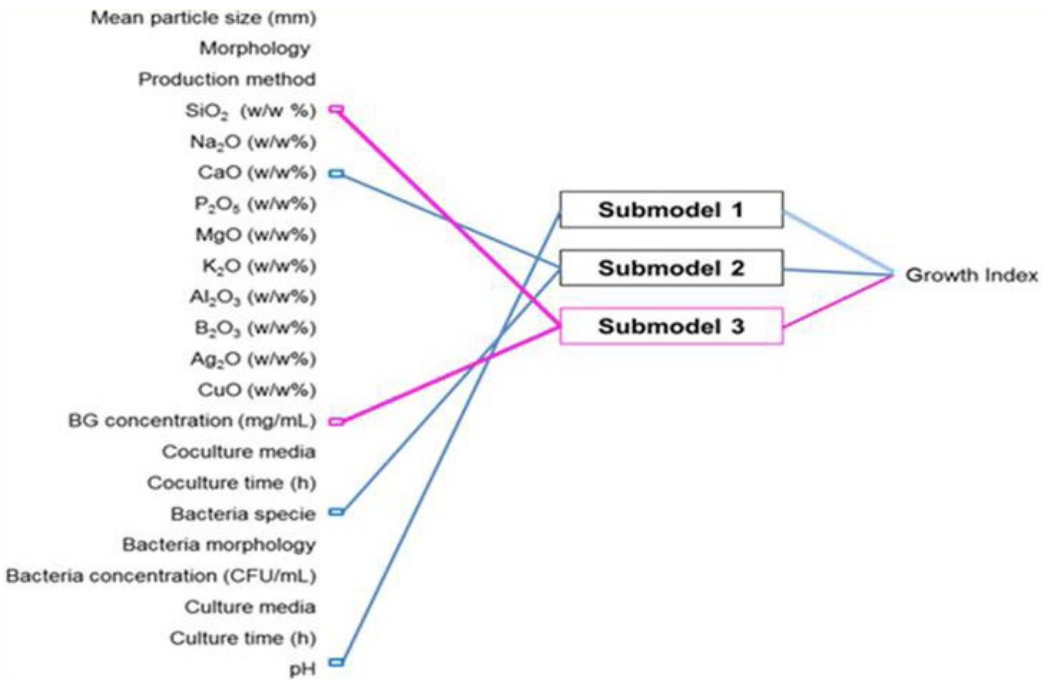


Figura 6.6. Estructuración del modelo desarrollado mediante Neurofuzzy logic para predecir el valor del parámetro índice de crecimiento en experimentos de evaluación de la actividad antibacteriana de los vidrios bioactivos (Echezarreta-López y Landin, 2013).

La figura 6.6 presenta gráficamente la selección de variables, entre las 22 estudiadas, que explican el 82% de la variabilidad del parámetro "índice de crecimiento" que se emplea habitualmente para evaluar la actividad antibacteriana. Como puede observarse, los porcentajes de Si y Ca, junto con la concentración de vidrio bioactivo (BG) son los que muestran mayor incidencia sobre el índice de crecimiento (señalados en color rosa). Además, el pH que se genera en el medio debido a la solubilización del BG y la susceptibilidad del microorganismo, condicionan extremadamente el efecto antibacteriano del vidrio.

Un aspecto menos estudiado relativo a las propiedades antibacterianas de los vidrios bioactivos es, el efecto físico que los vidrios muestran sobre las paredes celulares de las bacterias. En recientes estudios, algunos autores (Hu et al., 2009; Echezarreta et al., 2014) han demostrado este efecto con cepas de *E.coli* como *S. aureus* siendo en ambos casos, básicamente, asociado a la disolución de las partículas o nanofibras de BG de composiciones definidas (figura 6.7).

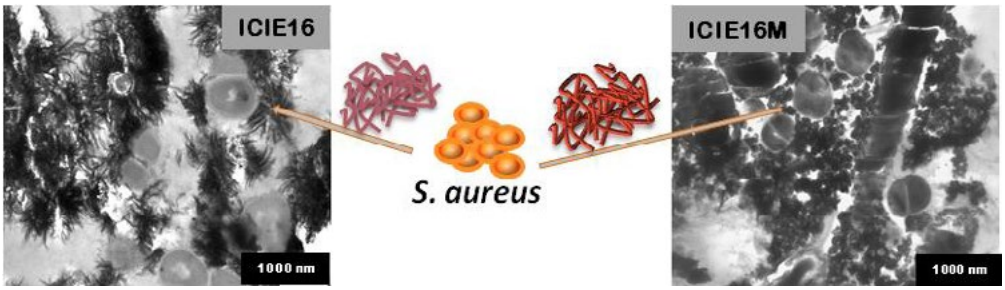


Figura 6.7. Efecto antibacteriano producido por el daño físico de la pared bacteriana de S, aureus (Echezarreta et al., 2014).

Los diferentes métodos de fabricación desarrollados (fusión, sol-gel, etc.) permiten la obtención de vidrios con un amplio rango de combinaciones de óxidos y de morfologías (partículas, scaffolds), de diversa bioactividad y capacidad para modificar la adherencia de las bacterias a su superficie. Todo ello permite generar condiciones adversas locales para el desarrollo de los microorganismos infectantes. Además, es posible también la incorporación, a nivel interno y externo, de iones con propiedades antibacterianas demostradas (Ag, B, F, Zn, etc.). Hay que considerar cuidadosamente la incorporación de iones activos adicionales en la estructura del vidrio ya que es posible que su presencia modifique la cinética de disolución y por lo tanto la bioactividad de la composición de partida de manera que en contacto con los fluidos biológicos se produzcan cambios (pH, presión osmotica, concentración de Ca^{+2} liberada, etc) que alteren los efectos previstos sobre las bacterias, incrementándolos o ralentizándolos.

Todas las estrategias desarrolladas para la fabricación de vidrios bioactivos con propiedades antibacterianas están basadas en la modificación de su composición y en la transformación de su morfología y/o su microestructura. Estos factores afectan cinética de disolución y por lo tanto a su reactividad con los medios fisiológicos y su bioactividad y su manipulación.

6.5. Aplicaciones clínicas de los vidrios bioactivos con propiedades antibacterianas

La mayoría de los estudios con BG en aplicaciones dentales se han hecho con el vidrio 45S5 y S53P4. El potencial de los vidrios bioactivos en odontología se basa en su capacidad para regenerar el hue-

so, la dentina y la apatita del esmalte, así como a su efecto sobre los microorganismos orales debido a su disolución en los fluidos corporales (Allan et al., 2001). De hecho se ha descrito que el Bioglass® puede inhibir la colonización bacteriana en el espacio quirúrgico (Allan et al., 2002). Por otro lado, los vidrios bioactivos pueden servir como desinfectantes dentales tópicos o en endodoncia, sin presentar efectos sobre la estabilidad de la dentina (Doyon et al., 2005). El hidróxido de calcio se puede emplear como un apósito intracanal para formar una dura barrera apical en dientes traumatizados en la población más joven pero su naturaleza alcalina puede debilitar la estructura de la dentina disolviendo los agentes ácidos de unión en la matriz orgánica de la dentina (Andreasen et al., 2002). A pesar de la activa y continua investigación en el campo de los vidrios bioactivos, su utilización en odontología es aún muy limitada. (Jones, 2013).

En el ámbito biomédico se emplean en cirugías maxilofaciales como implantes preformados para pequeños dispositivos que se instalan en lugares sujetos a cargas mecánicas mínimas (Ylänen, 2011). Estos biomateriales son relativamente blandos por lo que son apropiados para técnicas de perforación de microcirugía. Actualmente los Bioglass® disponibles son PerioGlass® y BioGran®, y la composición S53P4 comercializada como BonAlive™.

Los descubrimientos más recientes han demostrado que ciertos vidrios bioactivos, como el S53P4, son de utilidad para el tratamiento de osteomielitis crónicas en ortopedia mediante su introducción como relleno en la cavidad ósea, tras un desbridamiento suficiente de los tejidos necróticos. Se ha observado en estos casos un efecto combinado sobre el crecimiento del hueso y su actividad antibacteriana (McAndrew et al., 2013).

También se ha puesto de manifiesto su utilidad para el tratamiento de heridas crónicas. Se ha estudiado el potencial de nanofibras de vidrio funcionalizadas para el desarrollo de apósitos y vendajes. El diseño de esteras de nanofibras de vidrio bioactivo de borato permite el tratamiento de heridas sangrantes de manera que la microestructura del apósito actúa como un tamiz celular que separa la fracción líquida de la sangre, de la fracción sólida. Ello permite la rápida formación de coágulos y facilita la recuperación completa de la herida en muy cortos periodos de tratamiento (Jones, 2013).

Referencias bibliográficas

Allan, I., Newman, H., Wilson, M. (2001) Antibacterial activity of particulate Bioglass® against supra- and subgingival bacteria. Biomaterials, 22:1683-1687.

Allan, I., Wilson, M., Newman, H. (2002) Particulate Bioglass® reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an in vitro model. Clin. Oral Implants Res., 13:53-58.

Andersson, Ö., Liu, G., Karlsson, K., Niemi, L., Miettinen, J., Juhanoja, J. (1990) In vivo behaviour of glasses in the SiO_2-Na_2O-CaO-P_2O_5-Al_2O_3-B_2O_3 system. J. Mater. Sci. Mater. Med., 1:219-227.

Andreasen, J.O., Farik, B., Munksgaard, E.C. (2002) Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. Dental Traumatology, 18:134-137.

Day, R.M. (2005) Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. Tissue Eng., 11:768-777.

Doyon, G.E., Dumsha, T., von Fraunhofer, J.A. (2005) Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. J. Endod., 31:895-897.

Echezarreta-López, M., Landin, M. (2013). Using machine learning for improving knowledge on antibacterial effect of bioactive glass. Int. J. Pharm., 453:641-647.

Echezarreta, M., De Miguel, T., Quintero, F., Pou, J., Landin, M. (2014) Antibacterial properties of laser spinning glass nanofibers. Int. J. Pharm., 477:113-121.

El-Ghannam, A., Ducheyne, P., Shapiro, I. (1999). Effect of serum proteins on osteoblast adhesion to surface-modified bioactive glass and hydroxyapatite. Journal of Orthopaedic Research, 17:340-345.

Gentleman, E., Fredholm, Y.C., Jell, G., Lotfibakhshaiesh, N., O'Donnell, M.D., Hill, R.G., Stevens, M.M. (2010) The effects of strontium-substituted bioactive glasses on osteoblasts and osteoclasts in vitro. Biomaterials, 31:3949-3956.

Gubler, M., Brunner, T., Zehnder, M., Waltimo, T., Sener, B., Stark, W. (2008) Do bioactive glasses convey a disinfecting mechanism beyond a mere increase in pH? Int. Endod. J., 41:670-678.

Hench, L.L., Andersson, O. (1993) Bioactive glasses. Advanced series in ceramics, 1:41-62.

Hench, L.L., Wilson, J. (1993) An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapure, pp. 1-381.

Hench, L.L., West, J.K. (1996) Biological applications of bioactive glasses. Life Chem Rep, 13: 187-241.

Hoppe, A., Güldal, N.S., Boccaccini, A.R. (2011) A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. Biomaterials, 32: 2757-2774.

Hu, S., Chang, J., Liu, M., Ning, C. (2009) Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass®. J. Mater. Sci. Mater. Med., 20: 281-286.

Jell, G., Notingher, I., Tsigkou, O., Notingher, P., Polak, J., Hench, L., Stevens, M. (2008) Bioactive glass-induced osteoblast differentiation: A noninvasive spectroscopic study. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 86:31-40.

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

Kokubo, T. (1990) Surface chemistry of bioactive glass-ceramics. J. Non Cryst. Solids, 120: 138-151.

Kokubo, T., Ito, S., Huang, Z., Hayashi, T., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T. (1990) Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. J. Biomed. Mater. Res., 24: 331-343.

Kokubo, T. (2008) Bioceramics and their Clinical Applications (ed), Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Boca Raton, USA.

Li, R., Clark, A., Hench, L. (1991) An investigation of bioactive glass powders by sol-gel processing. Journal of Applied Biomaterials, 2: 231-239.

Lindfors, N., Aho, A. (2003) Granule size and composition of bioactive glasses affect osteoconduction in rabbit. J. Mater. Sci. Mater. Med., 14: 365-372.

McAndrew, J., Efrimescu, C., Sheehan, E., Niall, D. (2013) Through the looking glass; bioactive glass S53P4 (BonAlive®) in the treatment of chronic osteomyelitis. Ir. J. Med. Sci., 182: 509-511.

Moriarty, T.F., Zaat, S.A., Busscher, H.J. (2012) Biomaterials Associated Infection: Immunological Aspects and Antimicrobial Strategies (ed), Springer Science & Business Media, New York.

Ogino, M., Ohuchi, F., Hench, L.L. (1980). Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. J. Biomed. Mater. Res., 14: 55-64.

Radin, S., Reilly, G., Bhargave, G., Leboy, P., Ducheyne, P. (2005) Osteogenic effects of bioactive glass on bone marrow stromal cells. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 73:21-29.

Reffitt, D., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H., Evans, B., Thompson, R., Powell, J., Hampson, G. (2003) Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. Bone, 32:127-135.

Stoor, P., Kirstilä, V., Söderling, E., Kangasniemi, I., Herbst, K., Yli-Urpo, A. (1996) Interactions between bioactive glass and periodontal pathogens. Microb. Ecol. Health Dis., 9:109-114.

Subbiahdoss, G., Kuijer, R., Grijpma, D.W., van der Mei, Henny C, Busscher, H.J. (2009) Microbial biofilm growth vs. tissue integration:"The race for the surface" experimentally studied. Acta biomaterialia, 5:1399-1404.

Subbiahdoss, G., da Silva Domingues, Joana F, Kuijer, R., van der Mei, Henny C, Busscher, H.J. (2012). Bridging the gap between in vitro and in vivo evaluation of biomaterial-associated infections. Springer Science, New York, pp. 109.

Vallet-Regí, M., Ragel, C., Salinas, A.J. (2003) Glasses with medical applications. European Journal of Inorganic Chemistry, 6:1029-1042.

Wang, Y., Subbiahdoss, G., de Vries, J., Libera, M., van der Mei, H., Busscher, H. (2012) Effect of adsorbed fibronectin on the differential adhesion of osteoblast-like cells and Staphylococcus aureus with and without fibronectin-binding proteins. Biofouling, 28:1011-1021.

Xynos, I.D., Edgar, A.J., Buttery, L.D., Hench, L.L., Polak, J.M. (2001) Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. J. Biomed. Mater. Res., 55:151-157.

Yländen, H.O. (2011) Bioactive glasses: materials, properties and applications (Ed) Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, New Delhi, India.

Zhang, D., Leppäranta, O., Munukka, E., Ylänen, H., Viljanen, M.K., Eerola, E., Hupa, M., Hupa, L. (2010) Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 93:475-483.

7. Evaluación histológica de materiales

F. M.ª Muñoz-Guzón, M. Permuy-Mendaña, M. López-Peña, A. González-Cantalapiedra.
Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria.
Campus Universitario, s/n, 27002 Lugo
antonio.cantalapiedra@usc.es

Resumen

En el siguiente texto se define el concepto de material desde un punto de vista biológico y se describen las técnicas de evaluación in vivo, haciendo hincapié en las posibilidades quirúrgicas y el análisis histológico de las muestras.

7.1. Introducción

Para discutir el concepto de implantación de un material protésico dentro del cuerpo humano, primero debemos definir los términos biomaterial y biocompatibilidad. Actualmente se define a los biomateriales como materiales de origen natural o fabricados por el hombre que se utilizan para dirigir, complementar o reemplazar las funciones de los tejidos vivos. Entre los materiales naturales se pueden incluir células y tejidos diseñados y creados para su implantación.

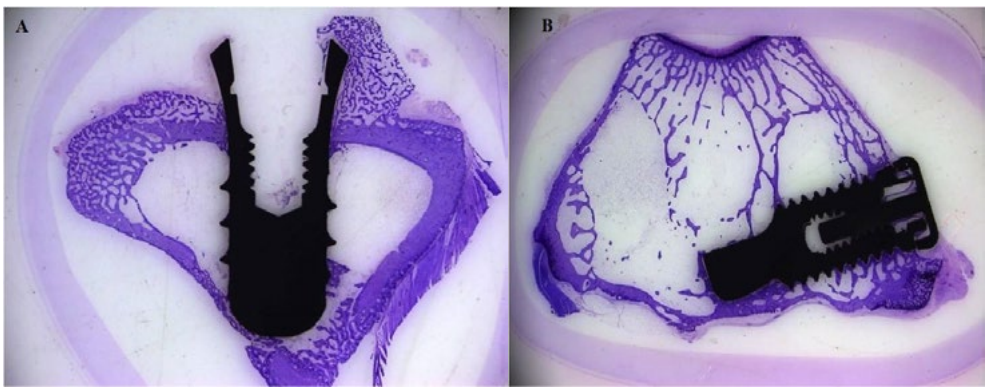


Figura 7.1. Implantes metálicos en conejo: A) tibia y B) fémur distal.

El objetivo de los ensayos de evaluación de la compatibilidad en los tejidos es determinar la seguridad de los materiales en un entorno biológico. Los biomateriales deben ser evaluados mediante una serie de test que van aumentando de complejidad para establecer su seguridad y eficacia, también llamada biocompatibilidad.

El término biocompatibilidad es mucho más difícil de definir, puesto que depende de muchos factores como pueden ser la corrosión del material, la estabilidad mecánica, la adsorción de proteínas, la detección de cambios inflamatorios o la medición de moléculas biológicas o enzimas que rodean al biomaterial. Es por ello que el término biocompatibilidad no es absoluto, sino casi siempre comparado con un control que es aquel que reúna las mejores condiciones de compatibilidad con los tejidos.

Cualquiera que sea el origen del material utilizado, una vez que ha sido implantado en el cuerpo va a interactuar con los tejidos vivos. Es en esta interfase donde se realiza el estudio de su biocompatibilidad.

El biomaterial se encontrará con un entorno fisiológico con fuerzas capaces de dañar o destruir el material implantado. Sobre el material actuarán factores mecánicos y químicos, capaces de interactuar, pudiendo provocar cambios en sus propiedades tanto químicas como mecánicas. Así mismo, los movimientos del material pueden llegar a provocar una inflamación crónica que haga aún más agresivo químicamente su entorno. Por último, la fatiga a las fuerzas aplicadas sobre él puede llegar a inducir su rotura o fracaso.

Desde un punto de vista biológico, el primer hecho que se produce tras la implantación de un material en un organismo vivo son los intentos de las células de volver al equilibrio u homeostasis, ya que para colocar este material se ha producido una primera lesión sobre el tejido. Esta primera respuesta está relacionada con el proceso de curación de una herida donde el implante se ha añadido como un factor adicional.

La respuesta típica sería que, en primer lugar, los leucocitos polimorfonucleares aparecerán cerca del implante seguidos por los macrófagos o células gigantes de cuerpo extraño (si el implante es química y físicamente inerte pueden no aparecer) y posteriormente se formaría una fina capa de tejido conectivo encapsulando al material implantado. Si el implante irrita de alguna manera al tejido que lo rodea se producirá inflamación, retrasando el proceso de curación y produciendo un tejido de granulación. En este caso aumentará el pH a nivel local, pudiendo dañar a los tejidos circundantes o incluso al material. Algunos implantes pueden llegar a producir necrosis de los tejidos que los rodean y como consecuencia se va a obtener un material rodeado de un tejido que intenta aislarlo del resto del organismo, fin que no queríamos alcanzar cuando lo colocamos.

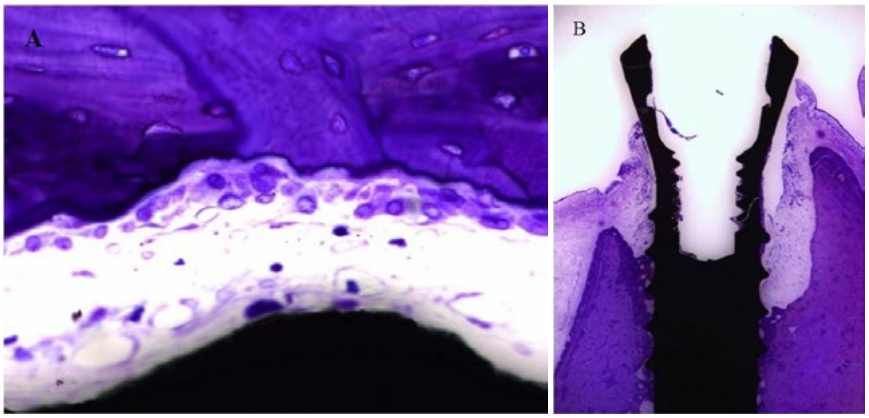


Figura 7.2. Imagen de osteoblastos rodeando un implante (A) e infección alrededor de un implante (B).

En los estudios de biocompatibilidad se debería evaluar siempre la respuesta al material a nivel local y sistémico. Un punto muy importante de esta evaluación es la relación del material con la células que le rodean y que debe ser revisada utilizando métodos histológicos; sin embargo siempre ha de seguir a la evaluación in vitro tanto mediante métodos que simulen las condiciones corporales como con ensayos sobre cultivos celulares. Otro punto importante a tener en cuenta es que antes de realizar cualquier otro ensayo, siempre se ha de comprobar que todo el proceso de fabricación y esterilización del material no afecten a su seguridad y eficacia.

Debido a la tendencia en la estandarización de los sistemas de medida, se han normalizado los datos que se han de evaluar a la hora de comercializar a nivel internacional un dispositivo médico implantable. Estos han sido recogidos por la Organización Internacional de Estandarización (ISO) en el documento titulado "Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 1: Evaluación y ensayos". Los principales parámetros a la hora de la evaluación son: citotoxicidad, sensibilización, irritación o inyección intracutánea, toxicidad sistémica aguda, toxicidad subcrónica, genotoxicidad, hemocompatibilidad, toxicidad crónica, carcinogenicidad o toxicidad reproductiva así como la implantación en un modelo animal. En este último sistema de evaluación es donde nos vamos a centrar a partir de este momento.

7.2. Implantación.

7.2.1. Normativas aplicables

Como es de esperar, cualquier implante médico va a necesitar antes de realizar cualquier ensayo clínico en humanos de su evaluación mediante su implantación en un modelo animal. Si los resultados en el modelo animal son positivos no van a demostrar la biocompatibilidad con los humanos, pero si son negativos no se va a continuar con la evaluación del material. Los requisitos más importantes para evaluar estos efectos han sido recogidos en la norma ISO 10993 parte 6 (Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación).

Esta norma hace hincapié en primer lugar en la necesidad de aplicar normas previas relativas a la selección de ensayos a realizar (parte 1 de la norma ISO 10993) y al manejo y cuidado de los animales de experimentación (parte 2 de la norma ISO 10993). Así mismo los estados miembros de la Unión Europea están obligados al cumplimiento de la normativa comunitaria relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (Directiva 2010/63/UE) y en el caso de España del Real Decreto 53/2013, que incorpora dicha normativa al ordenamiento jurídico español. Dicha normativa normaliza los tipos de procedimientos que se pueden realizar, las condiciones de alojamiento de los animales, los métodos de eutanasia, las características de los centros donde se alojan y crían este tipo de animales, así como la documentación a presentar para su aprobación antes de realizar cualquier estudio. Por primera vez se establece que cualquier procedimiento ha de seguir el principio de las 3Rs: reemplazo, refinamiento y reducción.

El término reemplazo considera que cualquier procedimiento que tenga un método alternativo sin el empleo de animales no se debería realizar. El refinamiento consiste en evitar al máximo el dolor y sufrimiento de los animales utilizados. Por último, la reducción sería emplear el mínimo número de animales para obtener resultados extrapolables.

7.2.2. Tipos de muestras

Los ensayos se pueden hacer sobre muestras sólidas (tales como implantes metálicos), o en polvo (cementos óseos). Lo que es muy importante es siempre comparar los resultados obtenidos con un con-

trol conocido, del que se sabe su actividad biológica y en estos casos el material a ensayar ha de tener un tamaño y forma semejante al del control. Se ha de indicar siempre el método de esterilización utilizado por si este pudiera influir en el resultado de la evaluación.

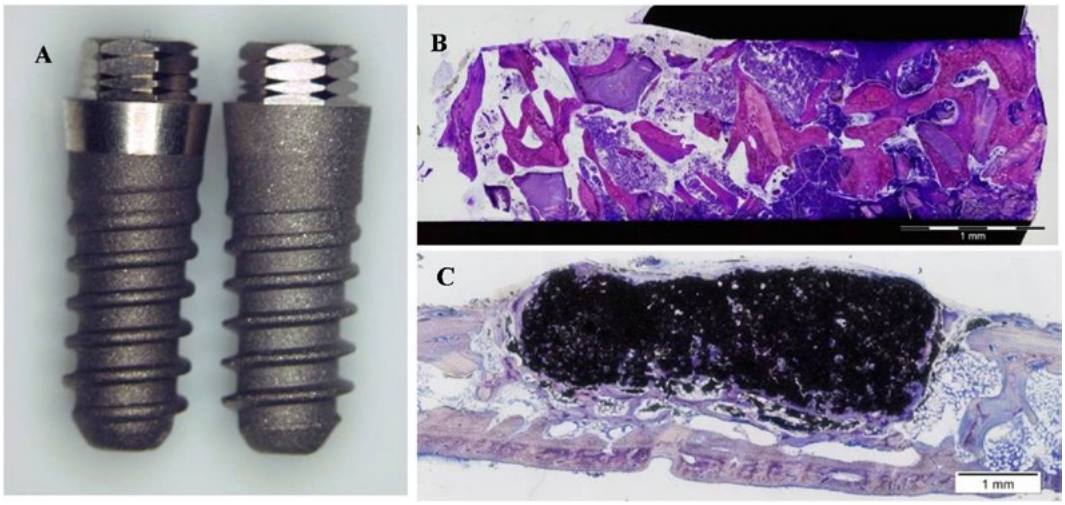


Figura 7.3. (A) Implantes dentales. (B) Gránulos de biomaterial en una biopsia de hueso obtenido por trépano. (C) Material poroso en forma de disco.

Sobre la selección de la especie y el lugar de implantación la normativa considera conveniente utilizar la especie más adecuada al material a ensayar en función del tamaño de este y del periodo de ensayo aconsejado. En ensayos a corto plazo se pueden utilizar especies con una esperanza de vida más corta; mientras que en ensayos a largo plazo la selección de la especie ha de estar acorde con la duración esperada del experimento. Los ensayos a corto plazo se suelen realizar en tejido subcutáneo o músculo; en cambio, los ensayos a largo plazo se realizan más habitualmente sobre músculo y hueso. Los periodos de ensayo han sido normalizados y, según la especie y el tipo de ensayo, pueden durar entre 1 y 104 semanas. En el caso de los biomateriales los tiempos que se suelen emplear son 1, 4 y 12 semanas, ya que es necesario evaluar la respuesta del organismo hasta que se considera que el material ha llegado a un estado estacionario donde se habría conseguido la curación.

En el caso de materiales biodegradables se considera necesario hacer un ensayo preliminar en roedores para determinar la velocidad esperada de degradación del material antes de empezar estudios en animales más grandes.

7.2.3. Técnica quirúrgica

El procedimiento quirúrgico ha de realizarse con una asepsia estricta y una técnica quirúrgica cuidadosa y precisa para reducir al mínimo el traumatismo en la zona del implante. Se ha de prestar especial atención a que los animales tengan una anestesia equilibrada alcanzando un plano anestésico adecuado, al uso de analgesia durante la intervención y a que esta se mantenga el tiempo que sea necesario después de la implantación.

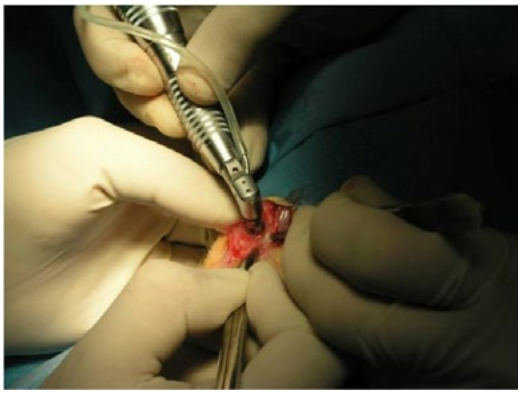


Figura 7.4. Perforación en el cóndilo femoral lateral de un conejo para el ensayo de un biomaterial en polvo.

Al final del periodo de ensayo se practica la eutanasia a los animales mediante una sobredosis de un anestésico tras una tranquilización previa, evitando al máximo el estrés para evitar sufrimientos innecesarios al animal.

7.3. Evaluación de la respuesta biológica

Se considerará la respuesta biológica como la respuesta macroscópica e histopatológica al ensayo en función del tiempo y siempre se comparará la respuesta del ensayo con el control.

La evaluación macroscópica se realizará observando a bajo aumento las muestras ensayo y control y registrando cualquier alteración que se observe, tal como la presencia de hematoma, edema, encapsulación o manifestaciones de otro tipo. Si el animal presentó síntomas sistémicos se debería hacer una necropsia seriada.

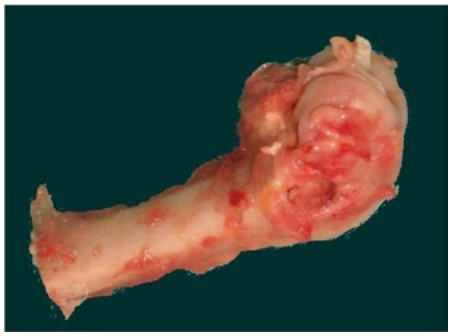


Figura 7.5. Espécimen con la muestra implantada. Evaluación macroscópica

7.4. Evaluación histológica

Para la evaluación histológica se han de preparar las muestras previamente. El primer paso será el tallado de los tejidos donde se encuentra el implante y su fijación en una solución de formaldehido tamponado al 10% durante 7 días a 4º C.

Cuando se estudia la superficie de contacto implante/tejido se utilizan técnicas de inclusión en plásticos duros. Esta técnica fue descrita por Donath en 1985 y básicamente consiste en la inclusión de los tejidos en una resina fotopolimerizable tras su deshidratación en una batería de alcoholes de concentración creciente, obteniendo un bloque polimerizado de glicolmetacrilato en cuyo interior está el tejido con el implante. Tras un proceso de corte y desbaste se obtendrá una lámina delgada de unas 30 micras de espesor, que posteriormente se teñirá para su observación al microscopio.

Los parámetros de la respuesta biológica que deberán evaluarse son los siguientes:

- La extensión de la fibrosis/cápsula fibrosa (expresada en mm) y de la inflamación.
- La degeneración determinada por cambios en la morfología del tejido.
- Número y distribución de células inflamatorias (neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos, macrófagos y células gigantes multinucleadas).
- La presencia de necrosis.
- Residuos de material, infiltraciones adiposas, granuloma, formación ósea.
- En materiales porosos la calidad y cantidad de tejido que ha crecido dentro del material.
- En el caso de tejido óseo se evalúa el área de contacto y la densidad de hueso que rodea al implante, así como la presencia de tejido fibroso en la interfase y la resorción o formación de hueso.

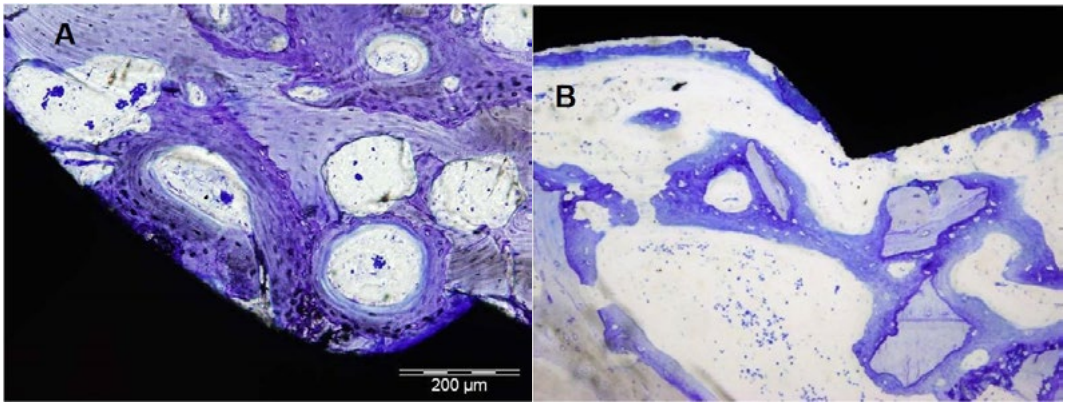


Figura 7.6. Imagen histológica de un material ostointegrado (A), y representación de áreas y de hueso nuevo rodeando partículas de hueso lamelar (B)

7.5. Modelo de informe de ensayo

El informe ha de ser muy detallado; lo suficiente para permitir una evaluación independiente de los resultados. Ha de tener al menos los siguientes apartados:

a. Muestras: descripción de los materiales de ensayo y control (forma, tamaño, composición, método de fabricación y tipo de superficie). Se ha de explicar cómo se ha seleccionado el material de control y el porqué. Se explica la técnica de preparación de la superficie, técnicas de limpieza y esterilización.

b. Animales e implantación: origen, edad, sexo y raza. También las condiciones de alojamiento, dieta y peso durante el estudio. También se anotan las muertes inesperadas y enfermedades.

c. Se ha de explicar la técnica quirúrgica, el número de materiales implantados por animal, el lugar y tiempos de observación.

d. Recuperación y método histológico. El informe ha de reflejar la técnica de recuperación del material y el número de implantes recuperados. Se ha de describir el método de preparación de las muestras.

e. Evaluación: se han de describir los hallazgos observados macroscópicamente, así como los resultados obtenidos de la evaluación histológica.

f. Evaluación final. Se debe reflejar una comparación de la respuesta biológica entre los materiales objeto de ensayo y el control. El informe concluirá si el material estudio es: no irritante, ligera, moderada o severamente irritante comparado con la muestra de control negativo.

Referencias bibliográficas

Anderson J. M., Schoen F.J. (2004) In vivo assessment of tissue compatibility. In: Biomaterials science Ratner B.D. et al (ed.), Elsevier, California, USA, pp. 360-367.

Dee K. C., Puleo D. A., Bizios R. (2002) Biocompatibility. In: An introduction to tissue-biomaterial interactions, Wiley, New Jersey, USA, pp. 173-184.

Donath K., Breuner G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. J Oral Pathol 11:318-326.

Park J., Lakes R. S. (2007). Tissue response to implants. In: Biomaterials. An introduction. Springer, New York, USA, pp. 266-288.

UNE-EN ISO 10993-6, Evaluación biológica de productos sanitarios - Parte 6: Ensayos relativos a los efectos locales después de la implantación.

von Recum A. F. (1999) Implantology. En: Handbook of biomaterials evaluation A. F. Recum (ed.), Taylor & Francis, Philadelphia, USA, pp. 465-586.

Este libro pretende ser un reflejo del espíritu de cooperación e interdisciplinaridad que destila la *Rede Galega de Biomateriais,* ya que el alto grado de desarrollo alcanzado por las investigaciones que aquí se presentan solo es posible gracias al esfuerzo de equipos multidisciplinares, agrupados en torno a la ingeniería biomédica.

En **Biomateriales:** diseño, producción y caracterización se aglutinan las aportaciones de áreas tan diversas como las ciencias de la salud, la ingeniería, la biología y otras ciencias básicas, proporcionando una visión actualizada y enriquecedora de la investigación en biomateriales.

A lo largo del contenido de este libro se desgranan varios procesos de fabricación novedosos, basados en la nanotecnología y la tecnología láser, y se exponen técnicas de análisis singulares, tratadas por especialistas en espectroscopia Raman y microtomografía computerizada. La visión de las aplicaciones clínicas de los biomateriales y otras aportaciones de tecnologías emergentes, como la terapia celular y la ingeniería de tejidos, también tienen cabida en este volumen, abriendo un nuevo escenario hacia la medicina regenerativa.

Rede Galega de Biomateriais

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE CULTURA, EDUCACIÓN E ORDENACIÓN UNIVERSITARIA

ISBN: 978-84-15086-50-5
9 788415 086505