

**“Scaffolds de hidroxiapatita obtenidos
a partir de cuerna de ciervo para
ingeniería de tejidos.
Caracterización y estudio de
biocompatibilidad”**

[Hydroxyapatite scaffolds obtained from deer antler for tissue engineering. Characterization and study of biocompatibility]

LAURA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Julio, 2017

**“Scaffolds de hidroxiapatita
obtenidos a partir de cuerna de ciervo para
ingeniería de tejidos.
Caracterización y estudio de biocompatibilidad”**

“Hydroxyapatite scaffolds obtained from deer antler
for tissue engineering.
Characterization and study of biocompatibility”

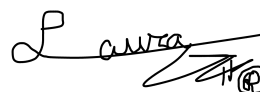
El Dr. Pío Manuel González Fernández, en calidad de tutor de este trabajo,
autoriza su presentación ante el Tribunal Evaluador.



Pío Manuel González Fernández

Grupo Nuevos Materiales, Dpto. Física Aplicada
Escuela Ingeniería Industrial,
Instituto Investigación Sanitaria Galicia Sur,
Universidad de Vigo

**Autora: Laura González Rodríguez
Vigo, julio del 2017**



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Pío González, por acogerme en su grupo, por los consejos y conocimientos brindados en todo momento, siempre con una sonrisa.

A la “familia” que conforman todos y cada uno de los miembros del Grupo de Nuevos Materiales, por su cariño y compañerismo.

A las biólogas compañeras de batallas en el laboratorio, sin las cuales la organización y el trabajo bien hecho no sería tan fácil.

A mis amigos de siempre y a los más recientes, por la fuerza transmitida durante todo el máster, lo que me hizo mantener el entusiasmo que me caracteriza hasta el final.

Y a mi familia en general, por acompañarme a lo largo del camino, con apoyo y confianza; con especial mención a mi abuela, con la que pude volver a disfrutar el día a día el primer año de curso, y a mi Madre, por haberme inculcado el valor del esfuerzo y la autonomía y apoyarme en todas las decisiones que voy tomando, con una comprensión infinita.

A todos, Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN y Palabras Clave.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Los biomateriales.....	3
1.2. Las biocerámicas.....	5
1.3. La hidroxiapatita.....	7
1.4. Hidroxiapatita de origen biológico.....	9
1.5. La cuerna de ciervo.....	10
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1. Procesamiento del biomaterial.....	14
3.1.1. Preparación inicial.....	14
3.1.2. Pirólisis.....	14
3.1.3. Lavado y esterilización.....	15
3.2. Caracterización físico-química.....	15
3.2.1. Termogravimetría (TGA).....	15
3.2.2. Difracción de Rayos X (XRD).....	15
3.2.3. Determinación de la composición química por ICP-OES.....	16
3.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS).....	16
3.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (HR-TEM).....	17
3.3. Ensayos biológicos <i>in vitro</i>	17
3.3.1. Línea celular.....	17
3.3.2. Microscopía óptica (MO).....	18
3.3.3. Optimización de las condiciones de cultivo.....	18
3.3.4. Citotoxicidad por MTT.....	18
- Por Contacto Directo.....	19
- De extractos.....	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
4.1. Obtención y propiedades del scaffold.....	20
4.2. Respuesta biológica.....	26

CONCLUSIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
ANEXO.....	33

RESUMEN

Los scaffolds basados en fosfatos cálcicos despiertan gran interés por sus aplicaciones clínicas como sustitutivos óseos y como andamiajes para el crecimiento de células precursoras de tejido óseo orientadas a la ingeniería de tejidos.

Nuestro interés se centra en la obtención de scaffolds de hidroxiapatita a partir de un recurso natural, como es la cuerna de ciervo ibérico (*Cervus elaphus*), con el objetivo de mimetizar la composición química, porosidad y estructura jerarquizada que presenta el tejido óseo.

El método de fabricación se basa en un proceso pirolítico, sometiendo la muestra natural a un calentamiento controlado con una rampa optimizada para eliminar su contenido orgánico. Se fabricaron series de experimentos a diferentes temperaturas máximas para investigar las características físico-químicas del compuesto final obtenido.

En este estudio se presenta, mediante ensayos *in vitro*, el efecto de los scaffolds de hidroxiapatita sobre la viabilidad y proliferación celular de la línea de pre-osteoblastos MC3T3-E1, con técnicas como la citotoxicidad de extractos, citotoxicidad por contacto directo y viabilidad mediante MTT. La respuesta biológica se complementa con estudios de caracterización físico-química como la microscopía SEM para la valoración morfológica y TEM para observar las variaciones de cristalinidad que la muestra sufre según la temperatura de procesamiento.

Palabras clave: hidroxiapatita, biomaterial, cuerna, scaffold, ingeniería de tejidos

INTRODUCCIÓN

Según datos demográficos de la OMS del 2015, nos encontramos frente a un fenómeno irreversible que resultará en la existencia de poblaciones muy envejecidas en todo el mundo en los próximos años. Se espera que la proporción de personas de 60 años o más se doble hasta el año 2050, alcanzando una cifra cercana a los 2000 millones. Además, en la mayoría de los países el número de personas mayores de 80 años podría cuadruplicarse, llegando a los 400 millones para entonces.

Hablamos de este envejecimiento poblacional como un problema más cercano para los investigadores en Galicia, ya que, según datos de la Eurostat en enero de 2016, se trata de la comunidad más envejecida de España, estando Lugo y Ourense entre las 10 provincias más envejecidas en Europa.

Este aumento de la esperanza de vida es uno de los factores sociológicos que más ha influenciado en el desarrollo del campo de los biomateriales, dando lugar a que exista una demanda de nuevas exigencias en cuanto al bienestar social y sea necesaria una mayor investigación en este ámbito. Es, por tanto, este aumento en la edad de los pacientes la principal causa para el despunte en el uso de biomateriales en la clínica con aplicación no sólo en la remediación de las enfermedades degenerativas como la osteoporosis, sino también en cicatrización de heridas, cirugía plástica y neurología, entre otras.

Es un hecho que el campo de los biomateriales ha crecido de manera espectacular en la última década: el mercado global de dispositivos con aplicación biomédica creados a partir de biomateriales contabilizó unos 240 billones de dólares en el año 2013 (*Global biomaterials - Bio Implants - Market 2016: Industry Demand, Segment, Statistics and Research to 2021*). Esto demuestra no sólo el punto álgido en el que se encuentra este mercado sino el potencial de crecimiento que aún tiene. Según la *Society for Biomaterials*, hay más de 5000 nuevos artículos científicos publicados cada año con el objetivo de mejorar las técnicas médicas que hacen uso de biomateriales.

A medio plazo, los biomateriales también juegan un papel clave dentro de la llamada ingeniería de tejidos; disciplina basada en la combinación de células, andamiajes a base de biomateriales y señales celulares adecuadas para conseguir sustituir tejidos. La meta principal en este momento es la regeneración, la cual permite la recuperación completa del

tejido dañado, consiguiendo una estructura biológica funcional, sea cual sea el origen de su destrucción y superando así las posibles modificaciones estructurales que se pueden dar en la reparación. Se trata de un salto cualitativo que implica pasar de sustituir a reparar y que empieza a concebirse en la sociedad científica cuando ésta es consciente de que la posible reacción química del implante con los tejidos vivos no conlleva riesgo siempre que el producto sea positivo para el organismo. Hablamos de un campo multidisciplinar, enmarcado dentro de la ingeniería biomédica y que desembocará en la medicina regenerativa, y en el cual es necesaria la colaboración entre distintos profesionales de muy diversos sectores para conseguir soluciones reales en la práctica clínica.

• Los biomateriales

El término “biomaterial” definido en los años 60 ha sufrido un cambio de concepto debido a la amplitud en las funciones médicas que en la actualidad un biomaterial desempeña, por lo que se considera “toda sustancia o combinación de sustancias que se puede usar para tratar, mejorar o reemplazar cualquier tejido o función del cuerpo” según la *Second Consensus Conference on definitions in Biomaterials* (Segunda Conferencia para el Consenso de definiciones en Biomateriales) que tuvo lugar en el Reino Unido en 1991. A día de hoy, los biomateriales aportan soluciones transitorias o permanentes que nos ayudan a recuperar funcionalmente alteraciones fisiopatológicas. Concretamente, la aplicación en ingeniería de tejidos surge con los biomateriales de tercera generación, dentro de los cuales también podemos destacar otras múltiples aplicaciones como prótesis, suturas, lentes de contacto, dispositivos para liberación de fármacos, etc.

Como características básicas, todo biomaterial debe cumplir una función adecuada y al mismo tiempo no ocasionar daños al organismo en el que sea implantado. Además ha de cumplir una serie de requisitos fundamentales como la biocompatibilidad, tanto química como médica y mecánicamente, y duración, ya que ha de mantener sus prestaciones durante el tiempo necesario (**figura 1**).

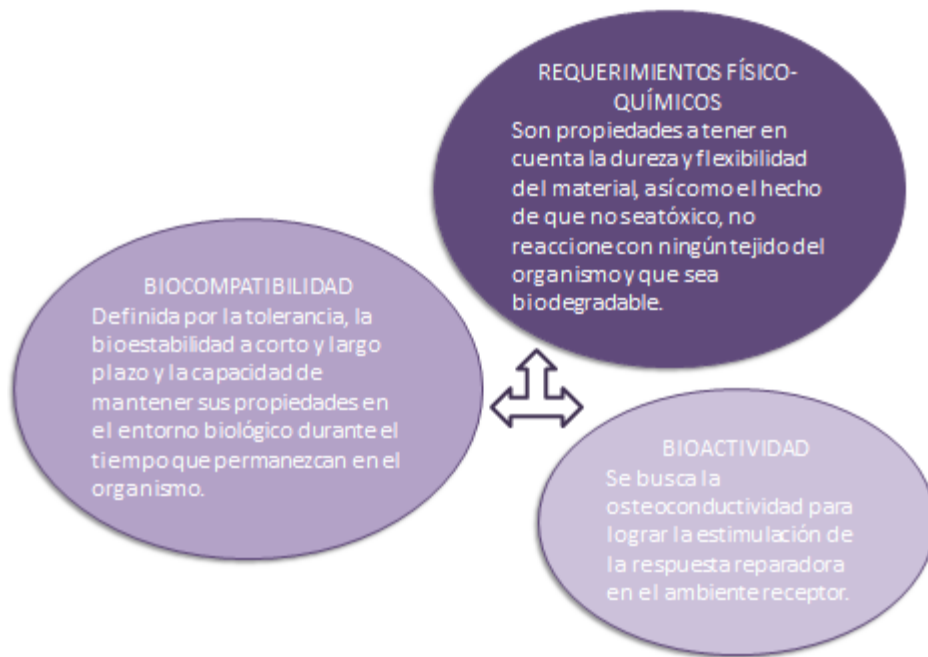


Figura 1. Características generales que ha de cumplir un biomaterial.

En el ámbito de la ingeniería de tejidos, surgen los scaffolds, andamiajes a base de un biomaterial fabricado a partir de un material natural u obtenido mediante el procesamiento del mismo, con una configuración porosa y una geometría determinadas y cuya función es favorecer la adhesión inicial de la células que se utilizarán en la regeneración del tejido.

Atendiendo a la naturaleza del material con el que se creará el scaffold, podemos clasificar los biomateriales en (**figura 2**):

1. Metálicos; como nanoestructuras de titanio antibacterianas para implantes óseos (*Izquierdo-Barba et al. 2015*) u otros de naturaleza electromagnética o electroconductora (*Fassina et al. 2008*).
2. Poliméricos; como el colágeno o el ácido hialurónico (*Kutlusoy et al. 2017*).
3. Cerámicos; como la alúmina - Al_2O_3 (*Bragazzi et al. 2015*), la circonia - ZrO_2 (*Hisbergues et al. 2009*) o las biocerámicas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (*Kim et al. 2017*).
4. Composites o materiales compuestos; que consisten en una matriz que constituye la fase continua y el material que da refuerzo que sería la fase discontinua embebida. Por ejemplo, el composite de BF/n-HA/PLGA recién probado para promover la osteogénesis (*Jiang et al. 2017*).

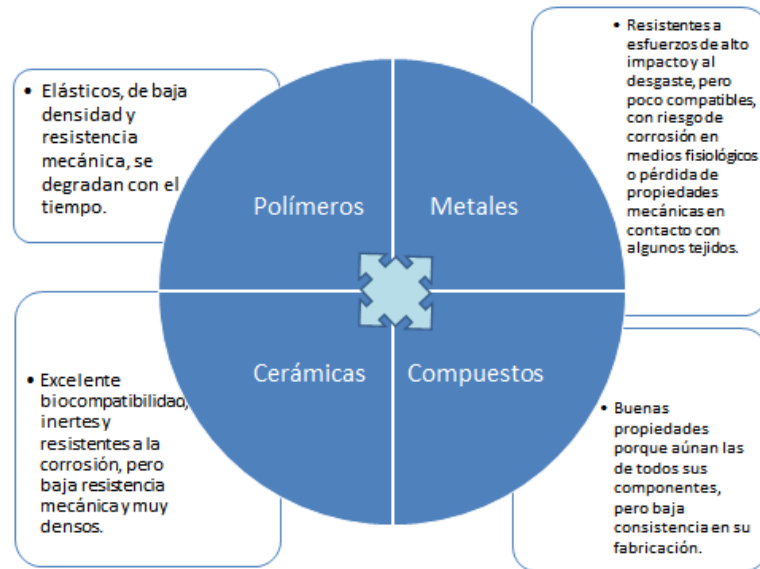


Figura 2. Características generales que de cumplir un biomaterial.

• Las biocerámicas

Nos centraremos pues en las biocerámicas, las cuales han tenido un gran auge y han sido objeto de una investigación creciente, comparable a la de los materiales cerámicos con aplicaciones electrónicas. Es en la década de los setenta cuando se comenzó a hablar de materiales cerámicos en cuanto a su posible aplicación médica y son los que hasta ahora han demostrado resultados más favorables a la hora de investigar en regeneración ósea. Las aplicaciones de las biocerámicas se centran fundamentalmente en los campos de la cirugía maxilofacial, vertebral y ortopédica; esto es debido a sus innumerables propiedades:

- alta biocompatibilidad
- baja tasa de desgaste
- alta rigidez (módulo de Young alto)
- favorecer la adherencia celular y tisular
- con alta tensión superficial, alto grado de humectación
- gran resistencia a la compresión

Siendo las biocerámicas los materiales que se han consolidado indiscutiblemente como primera elección en el campo de la regeneración ósea (*Vallet-Regí 2001*), la investigación se ha orientado en los últimos años en el desarrollo y obtención de biocerámicas lo más

similares posible a los materiales biológicos, intentando mimetizar la estructura y composición ósea. Este tipo de materiales, en función de su grado de biocompatibilidad, pueden ser clasificados en (Salinas et al. 2013):

- a) bioinertes (i.e. estudio de biocerámicas recubiertas con plata y zinc, *Furko et al. 2016*)
- b) bioactivas (i.e. estudio de un vidrio bioactivo para aplicaciones dentales, *Beketova et al. 2016*)
- c) reabsorbibles (i.e. efectos de una biocerámica a base de $\text{Ca}_2\text{SiO}_4\text{--Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sobre la viabilidad, adhesión, proliferación y función de células mesenquimales humanas , *Piedad et al. 2013*)

TIPOS	MATERIALES
Bioinertes	Al_2O_3 ; TiO_2 ; SiO_2 ; ZrO_2
Bioactivas	Biovidrios, Vitrocerámicas, Hidroxiapatita
Bio-reabsorbibles	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Tabla 1. Biocerámicas según su actividad química (adaptada de Castañeda 2004)

Las cerámicas inertes son aquellas que no dan lugar a necrosis ni reacción inflamatoria pero que el tejido vivo reacciona frente a ellas debido a su naturaleza extraña, creando encapsulados acelulares de tejido fibroso alrededor del implante. Estas surgieron como la primera generación de biocerámicas.

Por otra parte, las de tipo bioactivo surgieron en los años 80 mostrando prometedores resultados; junto con las reabsorbibles o biodegradables, las cuales se degradan progresivamente tras su implantación y son sustituidas por tejido endógeno, conformaban la segunda generación de biocerámicas. Estas presentan una superficie reactiva que forma fuertes enlaces con el tejido adyacente tras su implante, formando en su superficie una capa biológicamente activa al entrar en contacto con fluido biológico. Entre ellas destacan los fosfatos de calcio (*Vallet-Regí 2001*). Encontramos dentro de este grupo los fosfatos beta-tricálcicos (b-TCP), los fosfatos de calcio bifásicos (BCP) y la biocerámica utilizada en el presente trabajo: la hidroxiapatita (HAP), con gran interés en el campo de los nuevos materiales con aplicación clínica.

Los fosfatos de calcio (CaP) representan una de las familias de materiales inorgánicos con mayor presencia en el campo de la medicina reconstructiva ortopédica y dental. Los éxitos en la implantación de dichos materiales empieza en 1920 cuando Albee usó un CaP para reparar un defecto óseo en un paciente humano (*Albee y Morrison 1920*). Sin embargo, el desarrollo moderno de los biomateriales basados en CaP ocurre a principios de los 80, con la comercialización de una HAP sintética para aplicaciones de reparación de tejido dental y óseo. En la actualidad, los requerimientos para que un implante de CaP sea ideal son más estrictos, con el objetivo de que no se produzcan fracasos en la práctica clínica.

Finalmente surgió la tercera generación de biocerámicas, con una orientación clara hacia la regeneración de tejidos vivos, actuando como scaffolds de células y moléculas transportadoras (*Vallet-Regí 2008*).

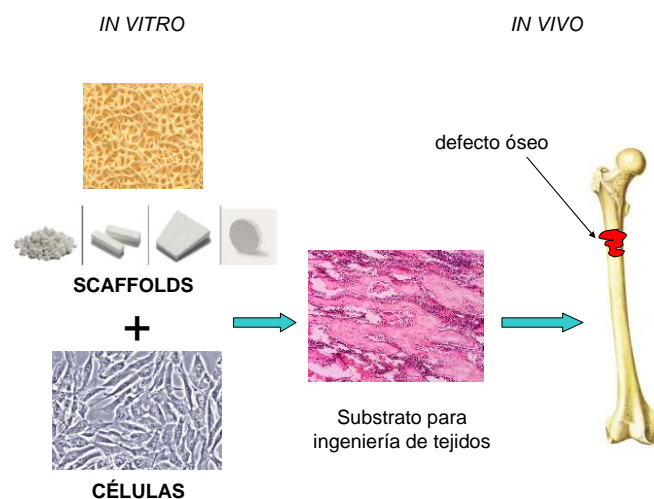


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes pasos de la investigación en ingeniería de tejidos.

• **La hidroxiapatita**

La HAP es un fosfato cálcico cuya fórmula es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Se trata de un mineral que está presente en dientes y huesos, además de en exoesqueletos animales, confiriéndoles su dureza característica, al igual que en la estructura ósea humana (*García-Garduño et al. 2006*).

El tejido óseo se trata de un tejido conectivo con gran resistencia a la tracción y compresión y caracterizado por su rigidez, cuyas funciones son de sostén, protección y regulación de la calcemia como depósito de calcio. Está formado por una matriz extracelular amorfa y calcificada, entre la que se distribuyen los distintos tipos de células óseas (Estrada et al. 2006). Dicha matriz, según su densidad, da lugar al tejido óseo denso o compacto y al trabecular, con más oquedades. Está constituida por dos componentes: orgánico e inorgánico, siendo este último la parte mineral de fosfato cálcico cristalino o hidroxiapatita (Bigi et al. 1997). Esta fase constituye el 65-70% del peso seco del hueso (Teixeira, 2005).

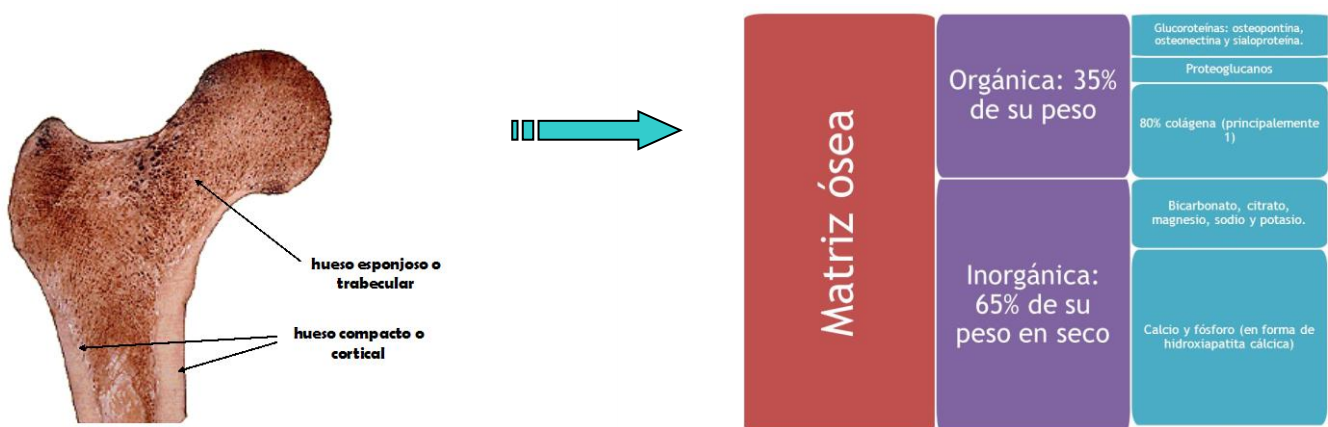


Figura 4. Corte longitudinal de parte distal de fémur y composición de su matriz.

La hidroxiapatita en la naturaleza presenta una estructura hexagonal (figura 5), presenta alta estabilidad a temperatura y pH fisiológico, tarda un tiempo prudencial en reabsorberse y posee excelentes propiedades de biocompatibilidad, osteoconductividad y osteointegración, lo que la convierten en un biomaterial ideal para regeneración ósea. De hecho parece que no sólo es capaz de promover la regeneración ósea y unir directamente el hueso nuevo con el tejido conectivo intermedio sino que lo hace a una velocidad mayor que otros materiales (Gao et al. 2006).

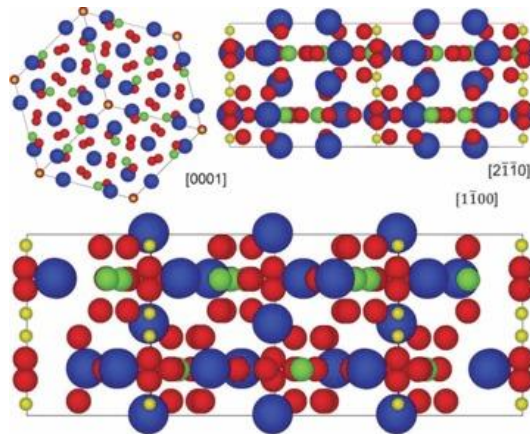


Figura 5. Proyección esquemática de la estructura hexagonal de la HAP en distintos ejes. Ca^{2+} =azul, P= verde, O = rojo and H = Amarillo. (Reyes-Gasga et al. 2012)

La HAP como material biocompatible ha incursionado en la biomedicina y ya se usa como restaurador en ortopedia, odontología y en oftalmología. Sin embargo los resultados no dan una forma óptima en el comportamiento de la reparación de los tejidos a pesar de ser compatibles, por ello, es necesaria más investigación para dilucidar aspectos que permitan el conocimiento más completo de este material y pueda generar aplicaciones que superen la etapa de sólo su uso como relleno.

- **Hidroxiapatita de origen biológico**

Los scaffolds de naturaleza apatítica pueden ser de origen artificial o biológico, atendiendo al material del que proceden o con el que se fabrican. Son los de origen biológico los que más interés han suscitado en los últimos años ya que es muy llamativa la eficiencia de los materiales existentes en la naturaleza, que han resultado de millones de años de evolución en los que se han conseguido estructuras perfectamente adaptadas, tanto funcional como mecánicamente y que además son biodegradables (Elices 2000). Además en la actualidad existe un creciente interés por la biodiversidad que ofrecen los nichos ecológicos por suponer un enorme potencial para la obtención de nuevos productos, en este caso biomateriales. Es pues una opción usar los recursos naturales de forma directa para crear andamiajes, entre los que podríamos destacar tejidos mineralizados como los huesos, cuernos, dientes, y otros fosfatos cálcicos procedentes del medio marino como los corales y el caparazón de crustáceos. Aunque muchas veces nos encontramos el problema de que

muchas de las especies de las que proceden estos interesantes tejidos están en peligro de extinción, lo que supone una desventaja en cuanto a la obtención del biomaterial.

En la actualidad las fuentes de HAP biológica de uso clínico más extendida son las procedentes de hueso bovino, además de las de tipo alogénico y autogénico, usadas como materiales estándar durante muchos años pero que presentan muchos problemas como la disponibilidad del donante, el rechazo por parte del sistema inmunitario del hospedador, el tiempo de reabsorción y la posible transferencia de patógenos (*Gao et al. 2006*).

Por otro lado, muchos sustitutos de hueso de tipo xenogénicos han sido aprobados en el uso médico debido a su amplia disponibilidad y a la aceptable eficacia reparando y curando defectos óseos (*Stavropoulos y Karring 2010*). Pero en estos casos surge un problema y es la necesidad de sacrificar a los animales para poder obtener el material, lo que va en contra de la ética y el bienestar animal.

Es por todas las causas anteriores que otras fuentes de origen se están explorando, como los dientes de tiburón procedentes de descartes de la pesca (*López-Álvarez et al. 2016*), los corales marinos (*Socarrás 1991*) o la cuerna de ciervo (*Lucaciu et al. 2010*).

• **La cuerna de ciervo**

La cuerna de ciervo (*Cervus elaphus spp*) es la única parte del cuerpo en mamíferos que posee la capacidad de regenerarse totalmente, y con la tasa más rápida de crecimiento de tejido. Cada año, las cuernas de estos animales comienzan a crecer en primavera, empiezan a calcificarse en otoño desde la base a la parte distal (*Goss 1983*), para que finalmente la cornamenta se pierda, cerrando un ciclo de conservación de la energía. Dado que el desarrollo de la cuerna tiene lugar durante muy pocos meses, esto supone unas elevadas necesidades de calcio y fósforo, parte de las cuales serán cubiertas con las reservas óseas de estos minerales. Se trata de una estructura cuya composición y morfología de cristal apatítico es similar a la parte trabecular del hueso en humanos y huesos largos de otros animales.

Se ha descrito que este tejido óseo está compuesto por cuatro zonas diferentes histológicamente, desde la periferia que está recubierta por la borra o terciopelo, hacia el centro: osteoide, hueso osteónico formado por hueso lamelar compacto, una tercera región

como transición del hueso compacto y el trabecular y la zona más central que constituye el hueso trabecular (Rolf y Enderle 1999).

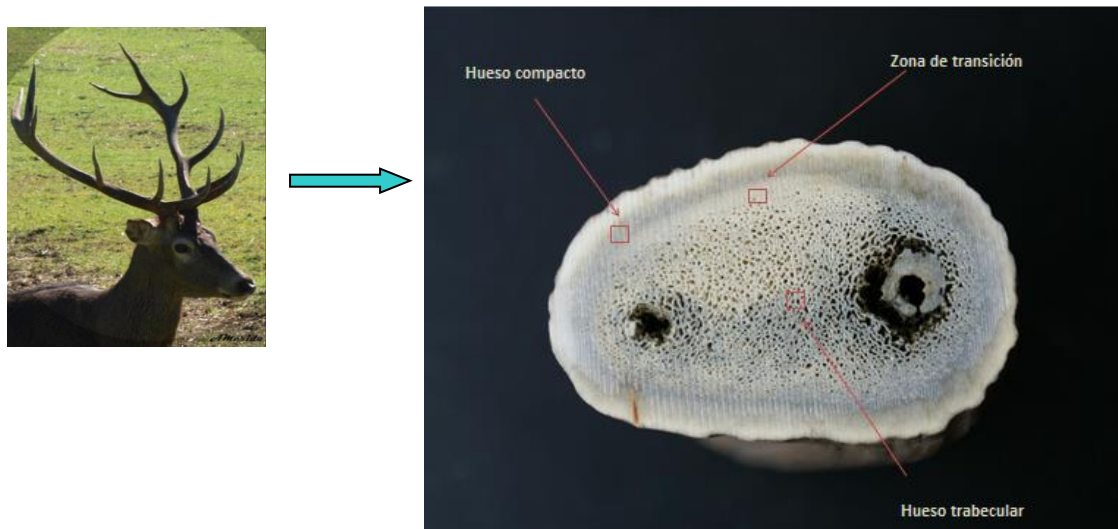


Figura 6. Estructura en sección transversal de cuerna de ciervo.

Además su función ha despertado gran interés en los investigadores, ya que, al ser utilizadas como armas en el combate cuerpo a cuerpo para el establecimiento de una jerarquía social y en el apareamiento, sus propiedades mecánicas, junto con las estructurales antes mencionadas, la convierten en un modelo excepcional para el crecimiento y regeneración ósea. Demostrada su capacidad osteoconductiva en experimentos *in vivo* (Zhang et al. 2012), podemos empezar a pensar en la cuerna de ciervo como biomaterial que contribuya en sustituciones óseas y cuyo uso, a diferencia de los de tipo xenogénico ya utilizados, es éticamente aceptable por no suponer el sacrificio del animal para la obtención del material, respetando así los principios de la ética animal, además de ser renovable y sustentable.

El estudio previo realizado por Landete-Castillejos y col. en 2007 sobre la cuerna de esta especie ibérica demostró que dichos animales tenían astas con mayor módulo de elasticidad y resistencia a la flexión y a la fractura que las otras especies de ciervos estudiadas (*Cervus nippon*, *Cervus elaphus canadensis*, *Cervus porcinus*, *Axis axis*).

Una estrategia rápida y barata para mejorar este material y alcanzar características óptimas para su aplicación como injerto es el tratamiento por calor, manteniendo las propiedades químicas y físicas del hueso natural (*Figueiredo et al. 2010*).

OBJETIVOS

Comprobada la biocompatibilidad del scaffold de hidroxiapatita derivado de la cuerna sobre células mesenquimales de médula ósea de conejo con la ayuda de varios factores de crecimiento (*Zhang et al. 2013*), proponemos como objetivo principal del presente trabajo:

- > la caracterización físico-química del biomaterial y la confirmación de las propiedades osteoconductoras del scaffold en contacto con una línea de preosteoblastos

Como objetivos específicos destacaremos:

- » optimizar las condiciones bajo las cuales la muestra se procesará para convertirla en un scaffold bioinspirado
- » reforzar la caracterización previamente hecha con el uso de técnicas físico-químicas como el TEM y el SEM de las muestras obtenidas
- » valorar el comportamiento de las muestras sometidas a las condiciones de los ensayos *in vitro*
- » cuantificar la viabilidad de la línea celular utilizada en contacto con los scaffolds
- » tratar estadísticamente los datos brutos obtenidos en cada técnica
- » relacionar los resultados de la caracterización físico-química con los obtenidos con los cultivos celulares

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Procesamiento del biomaterial

3.1.1. Preparación inicial.

El material de partida es cuerna natural de *Cervus elaphus spp* extraídas de la parte más cortical, obteniendo muestras con morfología cúbica y cuyas dimensiones son 4,8 x 4,8 x 2 mm³, medidas previamente optimizadas para su adecuada disposición en el fondo de los pocillos de la placa a utilizar (96-well) en los ensayos biológicos.

Se utiliza una cortadora de precisión MINITOM automática (servicios centrales del CACTI de la Universidad de Vigo), la cual dispone de un disco de corte de diamante capaz de cortar toda clase de muestras metalográficas y cerámicas.

3.1.2. Pirólisis.

Esta técnica consiste en la descomposición de la materia orgánica por la acción del calor. Dicha descomposición se produce a través de una serie compleja de reacciones químicas y procesos de transferencia de masa y calor. Para ello se ha utilizado un horno de mufla de altas temperaturas de la marca Nabertherm, modelo LT/9/13/P330. Con el objetivo de obtener las muestras de hidroxiapatita bioinspirada, se han establecido los siguientes parámetros de pirólisis: aumento de temperatura con una rampa de calentamiento de 2°C/min y 12 horas de permanencia a la temperatura máxima (de 600 a 1100°C), con un descenso final que se realiza de forma gradual hasta alcanzar la temperatura ambiente. El material de partida empleado son muestras ya cortadas de cuerna natural de *Cervus elaphus spp*.

Previamente se habían definido y controlado los parámetros de procesamiento con el objetivo de realizar un estudio detallado, variando la temperatura y caracterizando el material en cada una de dichas temperaturas para controlar la pérdida de peso de la muestra y su composición.

3.1.3. Lavado y esterilización.

Se procede al lavado final de las muestras con el objetivo de eliminar cualquier partícula o residuo que haya quedado en los poros tras el proceso de pirolisis. Para ello sometemos las muestras a dos lavados de 3 minutos cada uno, primero con etanol 70% y después con agua milliQ, bajo condiciones de cavitación haciendo uso del Baño de Ultrasonidos Cobos de Precisión. Posteriormente las muestras se dejaron secar al aire y se esterilizaron con calor húmedo en autoclave en programa de 121°C durante 20 min.

3.2. Caracterización físico-química

3.2.1. Termogravimetría (TGA).

Se trata de una técnica que permite el registro, de manera continua, de la masa de una muestra en atmósfera controlada y en función de la temperatura. En este caso, la temperatura de la muestra va aumentando de manera controlada y lineal con el tiempo, obteniéndose un termograma que representa los parámetros temperatura y pérdida de masa (TG). Se utiliza un equipo modelo TG-DSC Setsys evolution (Setaram), disponible en los servicios centrales del CACTI de la Universidad de Vigo.

3.2.2. Difracción de rayos X (XRD).

La difracción de rayos X permite identificar los componentes cristalinos o fases en la composición de la biocerámica obtenida, en concreto la presencia de los cristales con el grano de crecimiento preferentes que *Hughes J. M. et al.* en 1989 refieren a la hidroxiapatita. La XRD se basa en el hecho de que cuando los rayos X alcanzan la superficie de un cristal a un ángulo θ , una parte es dispersada por la capa de átomos de la superficie, mientras que la fracción no dispersada penetra en la segunda capa de átomos donde otra vez una fracción es dispersada y la que queda pasa a la tercera capa. El efecto acumulativo de esta dispersión desde los centros simétricamente espaciados del cristal es la difracción del haz. Las redes cristalinas pueden actuar como redes de difracción de los rayos X debido a que las longitudes de onda de los rayos X son del mismo orden de amplitud que las distancias interatómicas. La estructura cristalina típica de cada cristal, al

ser incidida por el haz de rayos X, dará lugar a modelos de difracción que también serán específicos (*Faraldos y Goberna 2003*).

El difractograma resultante muestra la relación entre la intensidad y el ángulo obtenido cuando la muestra, que gira y está rodeada por un detector, registra la posición e intensidad de los haces.

Se utilizó el modelo Siemens D-5000 Diffractometer 2 disponible en los servicios centrales del CACTI de la Universidad de Vigo.

3.2.3. Determinación de la composición química por ICP-OES.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que, junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES), constituye el equipo utilizado para la determinación de la composición química de nuestra muestra.

El modelo de equipo utilizado es Optima 4300DV de PerKin Elmer disponible en los servicios centrales del CACTI de la Universidad de Vigo.

En esta técnica se usa una disolución de Indio de 20mg/L como patrón interno y la muestra se introduce en estado líquido; para ello 0,25g fueron atacados por ácido nítrico en digestores cerrados de teflón. Posteriormente, un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el gas argón a la antorcha de plasma, en donde los analitos son atomizados e ionizados y se generan espectros característicos que son detectados y medidos, obteniendo así los datos brutos en mg/kg de cada uno de los componentes de la muestra.

3.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM/EDS).

La microscopía electrónica de barrido o SEM (por sus sigla en inglés de Scanning Electron Microscopy) se basa en el principio de la microscopía óptica en la que se sustituye el haz de luz por un haz de electrones. Con ello conseguimos hasta los 100 Å de resolución, que es muy superior a cualquier elemento óptico y que nos permitirá obtener imágenes tridimensionales que detallan características morfológicas y topográficas de nuestro material. Su funcionamiento consiste en hacer incidir un barrido de haz de electrones procedente de un filamento incandescente sobre la muestra, la cual, salvo que sea conductora, generalmente está recubierta por una capa fina de oro o carbón. El fundamento

físico de la técnica se basa en la aceleración de los electrones emitidos a través de una rejilla polarizada positivamente y la condensación de los mismos, los cuales tienden a separarse debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas, lo que permite realizar el barrido a lo largo de la muestra. Durante la interacción del haz de electrones se producen diferentes procesos: la formación de electrones secundarios que son los expulsados de la muestra y los retrodispersados que son los reflejados y que forman la imagen.

Se utiliza un SEM modelo Philips XL30, disponible en los servicios centrales del CACTI de la Universidad de Vigo.

3.2.5. Microscopía electrónica de transmisión (HR-TEM).

Se basa en la incidencia del haz de electrones que son acelerados a altas energías y atraviesan la muestra, siendo enfocados por las lentes electromagnéticas del objetivo para formar una imagen sobre una pantalla fluorescente. Con esta técnica podemos obtener dos tipos de imágenes: una directa de la microestructura de la muestra y otra del diagrama de difracción producido por los electrones al atravesar un medio ordenado.

El microscopio HR-TEM utilizado es un JEOL JEM2010F a 200 kV, del CACTI de la Universidad de Vigo.

3.3. Ensayos biológicos *in vitro*

3.3.1. Línea celular.

La línea celular utilizada es la MC3T3-E1 (ECACC, nº catálogo: 99072810) que fue establecida a partir de explantes de ratón C57BL/6 y consiste en células pre-osteoblásticas sin diferenciar (*Wang et al. 1999*). La morfología es fibroblastoide y su tipo de crecimiento adherente. Se trata de una línea celular que se ha establecido como modelo estándar *in vitro* de la osteogénesis. El requerimiento nutritivo de esta línea celular es a base de medio alpha-MEM (Modified Eagle Medium) enriquecido con un 10% de FBS (Foetal Bovine Serum) y al cual se le añade un 1% de una mezcla de antibióticos y antifúngicos con el objeto de prevenir posibles contaminaciones comunes en el cultivo.

3.3.2. Microscopía óptica (MO).

Se trata de un microscopio basado en lentes ópticas que proporcionan una imagen amplificada en base al comportamiento de la luz al atravesar lentes pulidas.

La microscopía óptica nos ha permitido ver morfologías, posibles contaminaciones y hacer el seguimiento del crecimiento celular en los pocillos durante la siembra. El más utilizado es el microscopio de campo claro. En nuestro caso, el usado ha sido un microscopio invertido modelo Nikon Eclipse TS100.

3.3.3. Optimización de las condiciones de cultivo.

Previo a la parte experimental biológica principal realizamos un experimento para optimización de concentraciones, estructura del scaffold y tiempo necesario para el correcto desarrollo de los ensayos celulares posteriores. Se dispondrán diferentes concentraciones (2×10^5 ; $6,6 \times 10^5$ y 10^6 cells/mL) de diferentes pases celulares y en dos tipos de morfología (cúbica y en granulada), con sus correspondientes controles y blancos, en placa de 96 pocillos. Se cambia el medio cada 2-3 días y se observa la evolución de las células diariamente a microscopio óptico. Finalmente se realiza una prueba de MTT (ver punto 3.4.) a día 7 para valorar la viabilidad y proliferación celular.

3.3.4. Citotoxicidad por MTT.

La evaluación biológica se llevó a cabo con la norma ISO 10993-5:2009 como referencia para ensayar la citotoxicidad de las muestras de cuerna utilizadas en el presente trabajo. Esta norma pretende establecer unas pautas tanto de preparación de las muestras y de las células como del modo de exposición de las células a las muestras o extractos, para poder cuantificar aspectos del metabolismo celular que nos darán información de la viabilidad de nuestra línea en contacto con el biomaterial.

El MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) llevada a cabo por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa que rompe el anillo de tetrazolio del MTT y que da lugar a cristales de formazán, los cuales serán solubilizados con un disolvente orgánico que corresponde al segundo reactivo utilizado en el ensayo. Este método permite determinar la

funcionalidad mitocondrial de las células tratadas y, por consiguiente, es utilizado para medir supervivencia y proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán obtenido. Esta técnica fue desarrollada por *Mosmann* en 1983 siendo modificado en 1986 por *Francois Denizot y Rita Lang*.

- **Por contacto directo.**

Para la realización de esta modalidad, se sembraron las células de la línea MC3T3-E1 en densidad $1,7 \times 10^4$ /well en un volumen final de 100 μ L el día de inicio de experimento. Tras 24h de incubación a 37°C y 5% CO₂, se dispusieron las muestras (pirolizadas a 600 y 950°C como temperaturas máximas) sobre las células adheridas. Se dejaron 24h en contacto con el biomaterial y se realizan fotografías de la morfología a través del MO y se adicionan los reactivos del ensayo de MTT para valoración de la viabilidad celular. La lectura, tras la incubación con el reactivo de solubilización overnight, se realiza a 595 y 655nm.

- **De extractos.**

En este caso, se dispondrá una relación de muestra en medio α -MEM de 0,1mg/mL en tubos Falcon y se dejarán en agitación orbital a 160rpm y 37°C durante 72h para la obtención de los extractos. Sobre la línea celular MC3T3-E1 crecida durante 24h se dispondrán dichos extractos en diferentes concentraciones (0-100%). Se dejarán otras 24h de contacto, tiempo tras el cual se realizará el MTT. Como control positivo se usará fenol a las mismas concentraciones que los extractos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y propiedades del scaffold.

En la **figura 7** se presenta un análisis de termogravimetría llevado a cabo según la técnica descrita anteriormente. En ella se representa la pérdida de masa (en %) en función de la temperatura de pirolizado (curva azul) y, por otro lado, el flujo de calor que se genera a lo largo del proceso (curva roja).

El análisis de composición complementado con la **TGA** indica que se produce una pérdida de masa total de un 43,5%. Se observa que, tras el pirolizado, aparecen picos de flujo de calor, correspondiendo a reacciones exotérmicas. Por otro lado, vemos la variación de la masa con respecto a la temperatura, indicando los puntos en los que se da un cambio de tendencia (**tabla 2**); para ello se ha calculado la derivada de los resultados. Por último, podemos observar que a partir de 600°C la muestra no presenta variaciones en cuanto a pérdidas de masa ni reacciones químicas significativas.

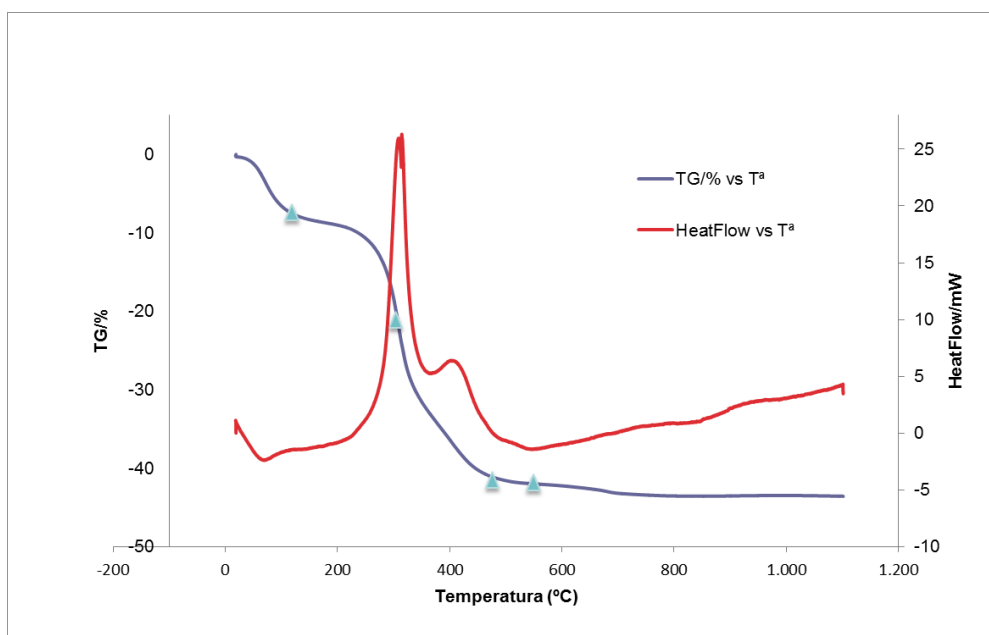


Figura 7. Resultados de la TGA de la parte cortical de cuerna de ciervo, en donde se muestra la pérdida de masa y el flujo de calor con respecto a la temperatura de procesamiento.

Rango de temperatura (°C)	Transformación físico-química	Pérdida de masa (%)
100-150	Evaporación agua	8.5
200-400	Combustión materia orgánica y deshidratación apatita (proceso exotérmico)	25.6
450	Descomposición carbono	7.8
500-800	Estabilización. Combustión colágeno y re-cristalización mineral (proceso exotérmico)	1.5

Tabla 2. Rangos de temperatura y pérdidas de materia orgánica en función de la temperatura.

Mediante **SEM (figura 8)** confirmamos que la morfología superficial del scaffold de cuerna de ciervo se modifica en función de la temperatura de pirolización utilizada: de tipo granular y porosa uniformemente distribuida en “A” y con alternancia de zonas más laxas en “B”, correspondiendo posiblemente esta última situación a restos orgánicos que no se han conseguido eliminar a 600°C como temperatura máxima de pirolización.

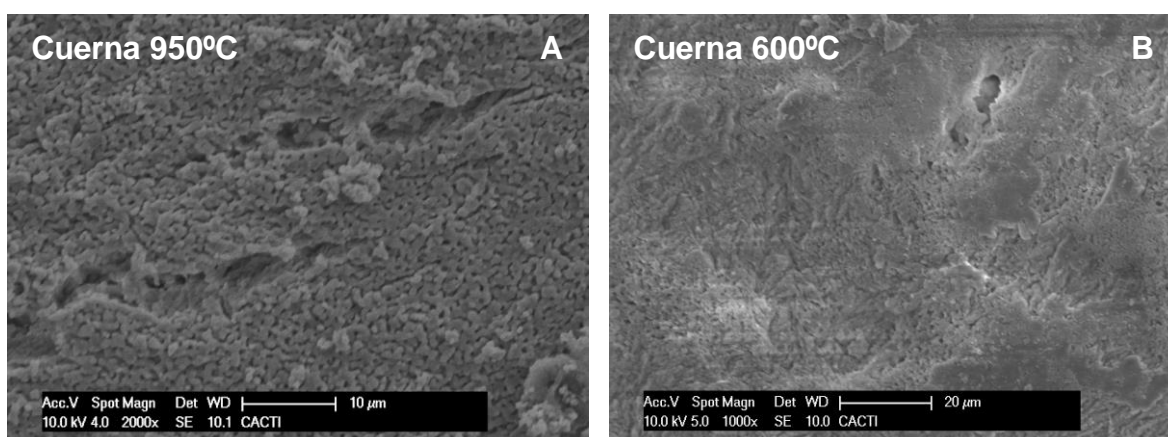


Figura 8. Imágenes SEM de las muestras de HAP de cuerna de ciervo pirolizadas a 600 y 950°C.

En la **tabla 3** se muestra la composición química del scaffold, expresado en porcentaje en peso, de los elementos presentes en el material. Dichos datos son el resultado del análisis llevado a cabo con **ICP-OES**, el cual confirma que no aparece carbono y revela una composición química muy similar a la del hueso humano, con Ca y P como elementos mayoritarios y presencia de Mg y Na, además de otros elementos traza (**tabla 3**).

Ca	P	Mg	Na	S	K	Si	Fe	Zn	Sr
61,9	34,5	1,83	1,29	0,25	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02

Tabla 3. Composición química del scaffold, representada en % en peso, revelada a partir de la técnica de ICP-OES que se aplicó tras la pirolización de la cuerna original.

En cuanto a las propiedades estructurales del scaffold obtenido de cuerna de ciervo, se han realizado estudios por **XRD** y **HR-TEM** con el objetivo de dilucidar parámetros que caractericen la muestra de HAP bioinspirada.

El análisis de **XRD** de la muestra mineralizada revela, en un primer análisis cualitativo, la presencia de una única fase cristalina y de tipo apatítico, que corresponde con HAP. Además observamos un difractograma muy similar en las muestras pirolizadas a 600 y a 950°C, mientras que la estructura de la muestra natural no se pudo identificar correctamente debido a la presencia de compuestos orgánicos (**figura 9**). Por otra parte, según un segundo análisis de tipo cuantitativo y haciendo uso de los datos brutos obtenidos en el difractograma, se ha calculado el tamaño de grano aplicando la fórmula de *Debye-Scherrer*:

$$D_p = \frac{0.94\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

en donde,

λ = longitud de onda de los rayos X

$\beta_{1/2}$ = ancho a media altura del pico de difracción

θ = ángulo de difracción,

y el grado de cristalinidad según la siguiente ecuación, teniendo en cuenta la relación entre los planos 211 y 300 para cada temperatura, como se aclara en la **figura 10**:

$$X_c = 1 - \frac{V_{211/300}}{I_{300}} \times 100$$

en donde,

V = valle o background entre dos picos

I = intensidad o altura de pico.

Calculados dichos parámetros, se observa un incremento abrupto en el tamaño de grano entre 600°C y el resto de temperaturas. En cuanto al grado de cristalinidad, podemos decir también que los valores experimentan un aumento a temperaturas más altas, aunque de manera más gradual (**tabla 4**).

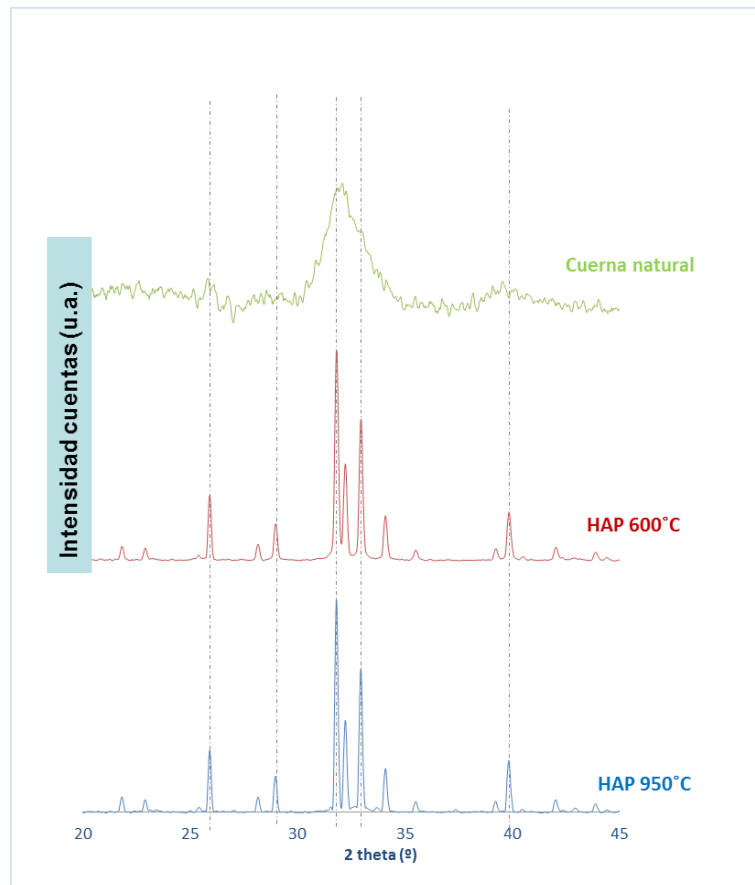


Figura 9. Difractograma obtenido por XRD en donde se representan los resultados de la muestra original de cuerna de ciervo y las dos tratadas a las temperaturas máximas determinadas como claves en los cambios observados.

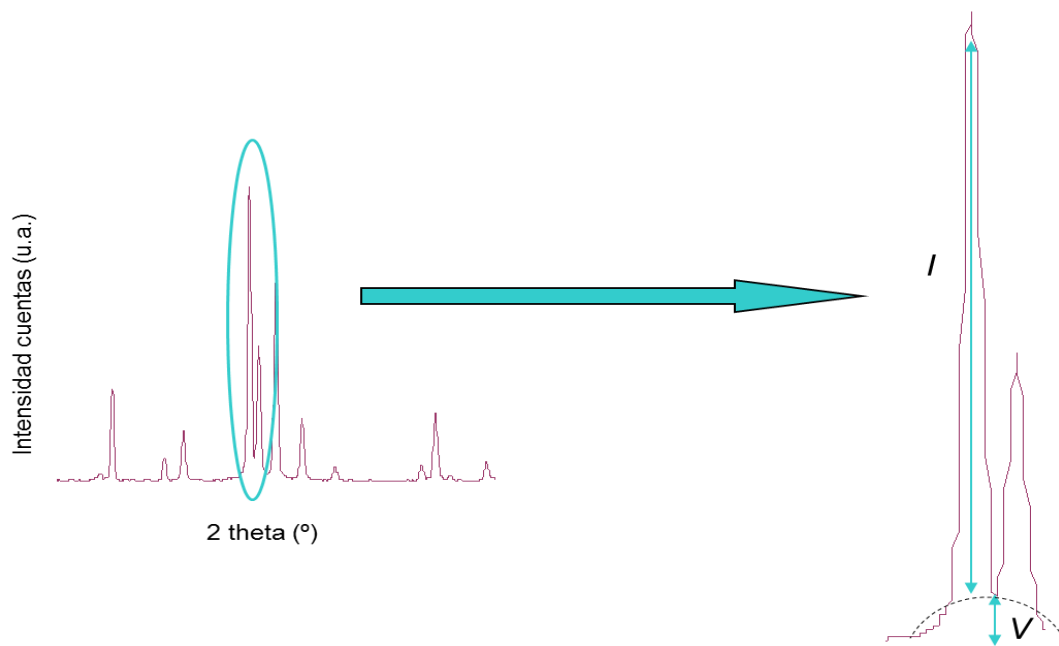


Figura 10. Cálculo de los parámetros cristalinicos sobre los picos resultantes del análisis por XRD.

Muestra (°C)	Tamaño de grano \bar{T} (nm)	Grado de cristalinidad X_c (%)
600	47,47	33,01
800	55,39	43,58
850	55,39	58,25
950	55,39	46,22
1000	55,39	56,82
1050	55,39	51,02
1100	55,39	50,23

Tabla 4. Parámetros de la estructura cristalinica obtenidos a partir de las fórmulas indicadas.

En la **figura 11** se muestran las fotografías hechas de la observación con **TEM**, los patrones de difracción que corresponden a cada una de las muestras observadas e imágenes a alta resolución de las mismas, tanto de la cuerna natural de ciervo como de las muestras pirolizadas a 600 y 950°C. Dicha observación mediante HR-TEM nos revela las siguientes características:

- la presencia de cristales tipo aguja correspondientes a HAP tanto en la muestra natural de cuerna como en las sometidas a pirólisis (a, b y c)
- una modificación del tamaño del cristal en relación al aumento de la temperatura
- la fase apatítica es confirmada con alta resolución (HR), en donde las distancias intercristalinas son coherentes con HAP (g y h)
- se observan indicios de cambio de tendencia en cuanto a la estructura cristalina en relación a la temperatura

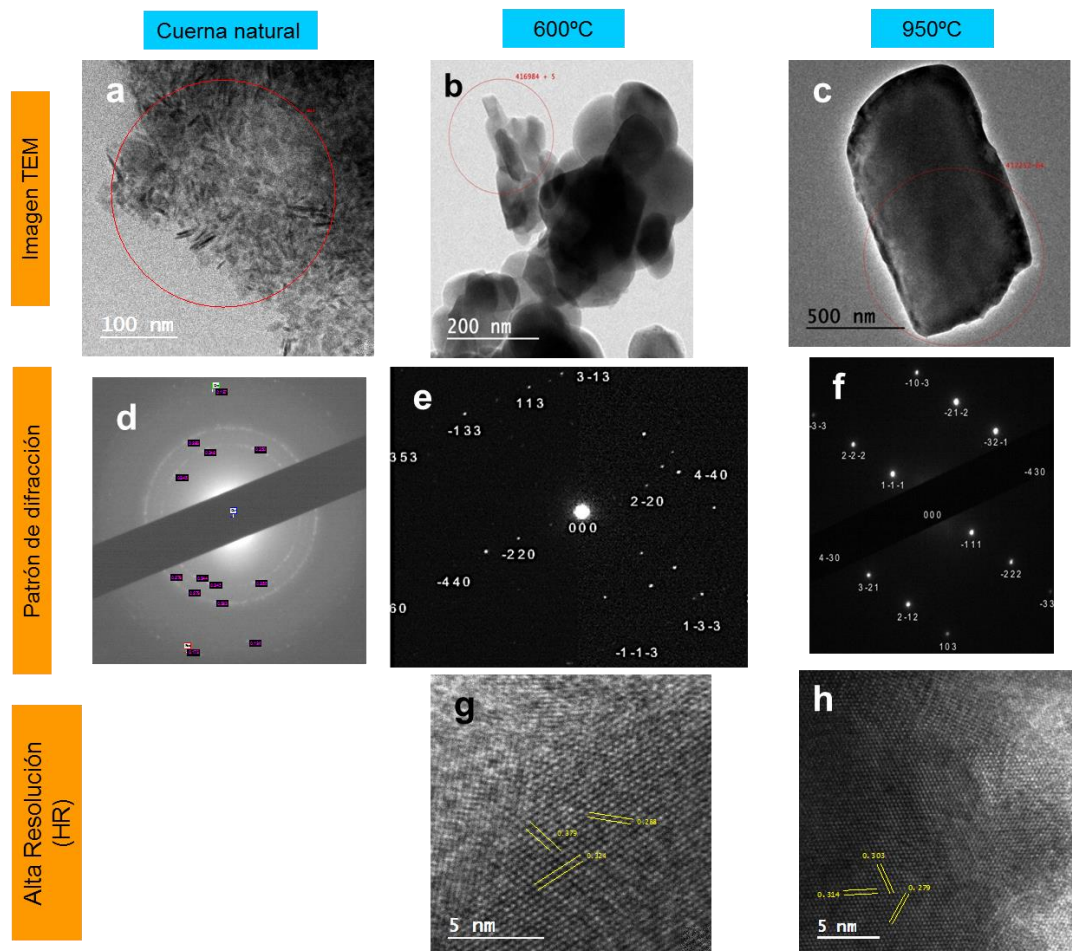


Figura 11. Imágenes TEM de muestras de HAP de cuerna de ciervo natural y pirolizada a 600 y 950°C.

4.2. Respuesta biológica.

Antes de realizar el ensayo de MTT, las fotografías realizadas a 10x aumentos en **MO** nos revelaron información sobre la morfología y disposición de las células con respecto al scaffold: la imagen 1 corresponde al control de células (TCP), en donde se comprueba la morfología fibroblastoide característica de esta línea celular. En 2 y 3 podemos observar la diferencia en la morfología de los preosteoblastos sembrados en contacto con el biomaterial con respecto al control, ya que han perdido adherencia y se disponen separados por un halo formado alrededor del scaffold. En las fotografías de extractos, 4 y 5, las células han adquirido una morfología más redondeada de lo esperado pero no es un efecto tan acusado como en el caso del contacto directo.

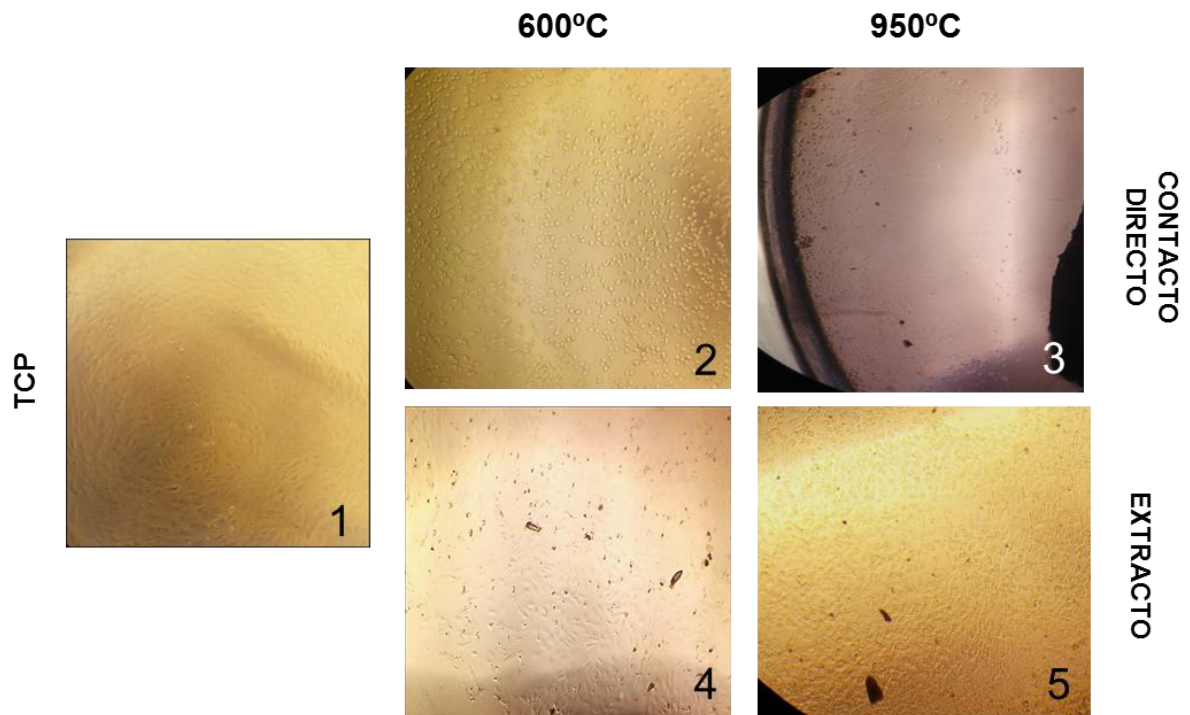


Figura 12. Imágenes de la observación a MO de células de la línea MC3T3-E1 tras su incubación con scaffolds y extractos de HAP.

Volviendo a las imágenes obtenidas por SEM (**figura 13**), en este caso de los scaffolds incubados durante 24h con la línea celular MC3T3-E1, podemos observar una reducida presencia de células adheridas en ambas muestras, siendo el caso de las tratadas a 950°C (“C”) más acusado. En “D” encontramos células aisladas siempre asociadas a las zonas más laxas de la superficie del scaffold, las cuales posiblemente correspondan a restos orgánicos aun presentes en la muestra.

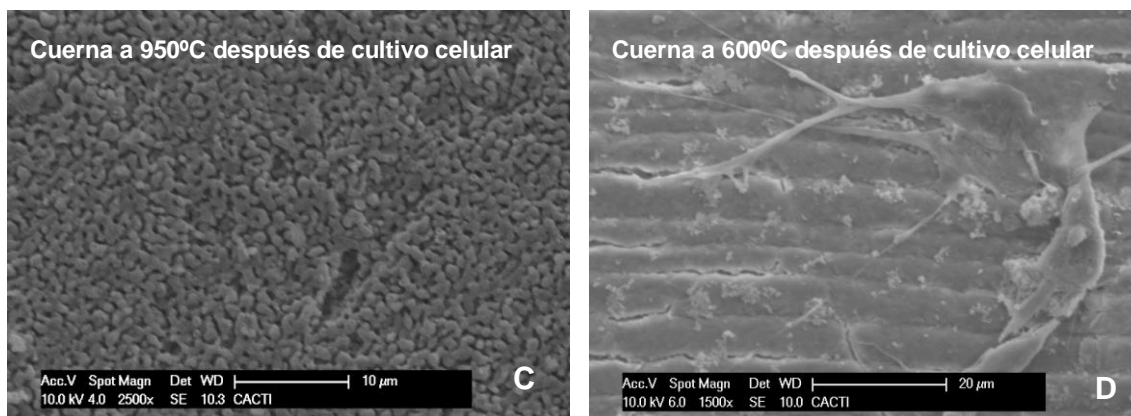


Figura 13. Imágenes SEM de los scaffolds de HAP de cuerna de ciervo pirolizados a 600 y 950°C tras haber sido incubados con las células de la línea MC3T3-E1.

Los gráficos de las **figuras 14** y **15** representan los porcentajes de viabilidad de la línea celular MC3T3-E1 tras haber sido incubada con las muestras de HAP: los resultados de la primera gráfica corresponden con las células incubadas con los extractos de HAP procedente de cuerna y los de la segunda a las células con los propios scaffolds de HAP.

De los datos de absorbancias tras la lectura del **MTT**, los cuales han sido tratados estadísticamente y normalizados, obtenemos unos valores de porcentajes de viabilidad que en el caso del ensayo con extracto a partir de la cuerna de ciervo revelan que éste no es tóxico para la línea celular MC3T3-E1, pudiendo incluir dicho valor en la escala 1 de citotoxicidad según *Xian 2009*. En cuanto al ensayo por contacto directo, los valores de las dos muestras tratadas a diferentes temperaturas son muy distintos, siendo la viabilidad de las células en contacto con las muestras tratadas a 600°C hasta 8 veces mayor que las que

crecen en contacto con las muestra a 950°C (nivel 2 de citotoxicidad con muestras a 600°C frente a nivel 4 con 950°C), dándose en esta última una situación cercana a la muerte total de las células y confirmando los resultados obtenidos por SEM.

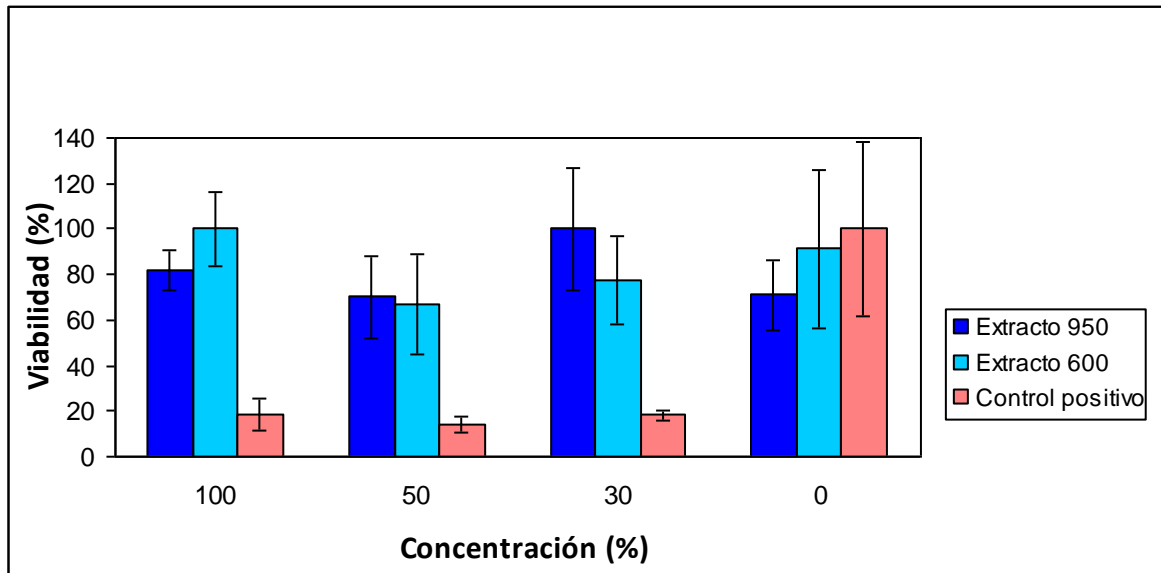


Figura 14. Viabilidad celular de la línea MC3T3-E1 tras su incubación con extractos de HAP.

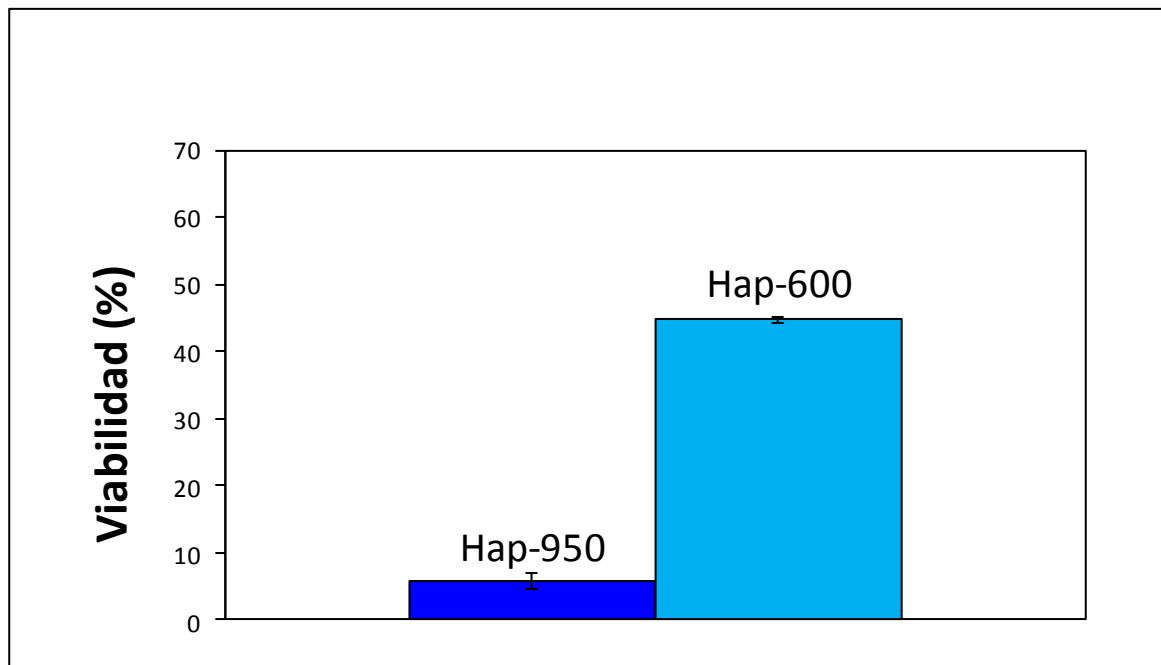


Figura 15. Viabilidad celular de la línea MC3T3-E1 tras su incubación directa con muestras de HAP.

CONCLUSIONES

Tras la valoración de los resultados obtenidos con las técnicas y métodos definidos, podemos extraer las siguientes conclusiones:

- Se confirma que la cuerna de ciervo ibérico presenta unas características físico-químicas adecuadas para su utilización como scaffolds para regeneración de tejido óseo en ingeniería de tejidos, dado que su composición mineral es similar a la del hueso humano y que su estructura cristalina es coherente con la hidroxiapatita - HAP-, componente principal de los tejidos mineralizados.
- Se determina que el tamaño de grano de la hidroxiapatita aumenta con la temperatura aplicada para la preparación de la muestra, parámetro que también influye en la morfología superficial.
- La respuesta biológica *in vitro* de estos scaffolds muestra que pequeñas variaciones en la temperatura de procesamiento influyen en el comportamiento de las células cultivadas sobre los scaffolds. A valores bajos (600°C) se observa cierta viabilidad pero a temperaturas más altas (950°C) la viabilidad disminuye drásticamente. Estas diferencias de viabilidad encontradas deben atribuirse a modificaciones estructurales del material, dependientes de la temperatura de procesamiento, pero no a las de tipo composicional.

Se constata la necesidad de ampliar este estudio y analizar con un mayor grado de detalle la influencia de la temperatura de procesamiento del biomaterial en la respuesta biológica mediante cultivos celulares.

BIBLIOGRAFÍA

Albee F, Morrison H. Studies in Bone Growth. *Annals of Surgery*. 1920;71(1):32-39.

Beketova A, Poulakis N, Bakopoulou A, Zorba T, Papadopoulou L, Christofilos D et al. Inducing bioactivity of dental ceramic/bioactive glass composites by Nd:YAG laser. *Dental Materials*. 2016;32(11):e284-e296.

Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Ripamonti A, Roveri N, Romanello M et al. Chemical and structural characterization of the mineral phase from cortical and trabecular bone. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1997;68(1):45-51.

Bragazzi N, Gasparini R, Amicizia D, Panatto D, Larosa C. Porous Alumina as a Promising Biomaterial for Public Health. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. 2015;:213-229.

Castañeda Martín, E., Biomateriales de naturaleza inorgánica: metales, aleaciones y cerámicas., Real Academia Nacional de Farmacia, 11 28004 Madrid, España (2013) web <http://www.analesranf.com/index.php/discurso/article/view/802/767>

De Aza P, García-Bernal D, Cragnolini F, Velasquez P, Meseguer-Olmo L. The effects of Ca₂SiO₄–Ca₃(PO₄)₂ ceramics on adult human mesenchymal stem cell viability, adhesion, proliferation, differentiation and function. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(7):4009-4020.

Estrada M C, Paz A, Lopez Rojas L. Ingeniería de tejido óseo. Medellín: Escuela de Ingeniería de Antioquia; 2006.

Eurostat European Commission. (2016). <http://ec.europa.eu/eurostat>

Faraldos M, Goberna C. Técnicas de análisis y caracterización de materiales. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2012.

Fassina L, Saino E, Visai L, Silvani G, Cusella De Angelis M, Mazzini G et al. Electromagnetic enhancement of a culture of human SAOS-2 osteoblasts seeded onto titanium fiber-mesh scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008;87A(3):750-759.

Figueiredo M, Fernando A, Martins G, Freitas J, Judas F, Figueiredo H. Effect of the calcination temperature on the composition and microstructure of hydroxyapatite derived from human and animal bone. *Ceramics International* 36 (2010) 2383–2393

Furko M, Jiang Y, Wilkins T, Balácsi C. Electrochemical and morphological investigation of silver and zinc modified calcium phosphate bioceramic coatings on metallic implant materials. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;62:249-259.

Gao Y, Cao W, Wang X, Gong Y, Tian J, Zhao N et al. Characterization and osteoblast-like cell compatibility of porous scaffolds: bovine hydroxyapatite and novel hydroxyapatite artificial bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006;17(9):815-823.

García-Garduño, Margarita Victoria, Reyes-Gasga, José, La Hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas [en línea]* 2006, 9 (Diciembre-Sin mes) : [Fecha de consulta: 22 de junio de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43211937005>> ISSN 1405-888X

Global biomaterials (Bio Implants) Market 2016: Industry Demand, Segment, Statistics and Research to 2021 <https://www.researchandmarkets.com/research/27vzrv/global>

Goss, R. 1. 1983: Deer antlers, regeneration, function and evolution. Academic Press. Pp. 134 - 135.

Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: Established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2009;88B(2):519-529.

Hughes JM, Cameron M, Crowley K.D. American Mineralogist, Volume 74, pages 870-876, 1989 Structural variations in natural FF, OH and Cl apatites.

Izquierdo-Barba I, García-Martín J, Álvarez R, Palmero A, Esteban J, Pérez-Jorge C et al. Nanocolumnar coatings with selective behavior towards osteoblast and Staphylococcus aureus proliferation. Acta Biomaterialia. 2015;15:20-28.

Jiang L, Li Y, Xiong C, Su S, Ding H. Preparation and Properties of Bamboo Fiber/Nano hydroxyapatite/Poly(lactic-co-glycolic) Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering. ACS Applied Materials & Interfaces. 2017;9(5):4890-4897.

Kim W, Yun H, Kim G. An innovative cell-laden α -TCP/collagen scaffold fabricated using a two-step printing process for potential application in regenerating hard tissues. Scientific Reports. 2017;7(1).

Kutlusoy T, Oktay B, Apohan N, Süleymanoğlu M, Kuruca S. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering. International Journal of Biological Macromolecules. 2017;103:366-378.

Landete-Castillejos T, Garcia A, Gallego L. Body weight, early growth and antler size influence antler bone mineral composition of Iberian Red Deer (Cervus elaphus hispanicus). Bone. 2007;40(1):230-235.

López-Álvarez M, Vigo E, Rodríguez-Valencia C, Outeiriño-Iglesias V, González P, Serra J. In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. Clinical Oral Implants Research. 2016;.

Lucaciu O, Băciuț M, Băciuț G, Cămpian R, Sorițău O, Bran S, Crișan B, Crișan L. Tissue engineered bone versus alloplastic commercial biomaterials in craniofacial reconstruction. Rom J Morphol Embryol 2010;51:129–36.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 1983;65(1-2):55-63.

Organización Mundial de la Salud OMS (2015) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs404/es/>

Reyes-Gasga J, Marrúnez-Piñeiro E, Brés È. Crystallographic structure of human tooth enamel by electron microscopy and x-ray diffraction: hexagonal or monoclinic?. Journal of Microscopy. 2012;248(1):102-109.

Rolf H, Enderle A. Hard fallow deer antler: A living bone till antler casting?. The Anatomical Record. 1999;255(1):69-77.

Salinas A, Esbrit P, Vallet-Regí M. A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. Biomater Sci. 2013;1(1):40-51.

European Society for Biomaterials. (1991) Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials, Chester, UK. <http://www.esbiomaterials.eu/Cms/Content/20>

Socarrás E. Evaluación clínica de hidroxapatita porosa obtenida a partir de corales marinos. Tesis. ISCMH, 1991

Society for biomaterials <https://www.biomaterials.org/>

Stavropoulos A, Karring T. Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss®) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. Journal of Clinical Periodontology. 2010;37(2):200-210.

Teixeira de Sousa Oliveira. G.M. Osteocompatibilidad de filmes finos de fosfato de calcio obtidos por Pulsed Laser Deposition (PLD). Trabajo experimental para obter o grado de Mestre en Engenharia Biomédica. Faculdade de Engenharia. Universidade do Porto (2005).

Vallet-Regí M. Ceramics for medical applications. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 2001;(2):97-108.

Vallet-Regí M. *Progress in bioceramics*. Stafa-Zurich: Trans Tech Publications; 2008.


Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach P, Franceschi R. Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with Distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1999;14(6):893-903.

Zhang X, Cai Q, Liu H, Heng B, Peng H, Song Y et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;41(11):1330-1337.

Zhang X, Xu M, Song L, Wei Y, Lin Y, Liu W et al. Effects of compatibility of deproteinized antler cancellous bone with various bioactive factors on their osteogenic potential. *Biomaterials*. 2013;34(36):9103-9114.

ANEXO


Comunicación tipo póster presentada en las Jornadas BioIntegra Saúde, A Coruña, 30 de mayo de 2017.



Universidade de Vigo


Scaffolds de hidroxiapatita obtenidos a partir de cuerna de ciervo.
Estudio de biocompatibilidad.
 González-Rodríguez L, Astray S, Hidalgo-Robatto B.M, Serra J y González P.

Grupo Nuevos Materiales, Dpto. Física Aplicada, Escuela Ingeniería Industrial,
 Instituto Investigación Sanitaria Galicia Sur, Universidad de Vigo, España



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA
Galicia Sur

Introducción



ORÍGEN NATURAL

INGENIERÍA DE TEJIDOS
CELULAR, TISSUE, ENGINEERING

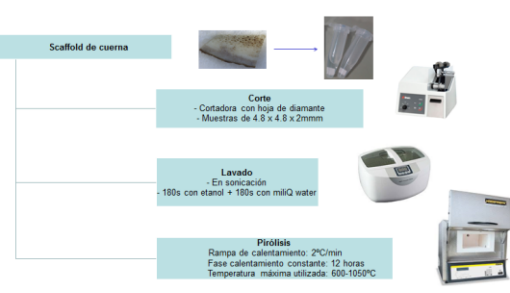
SCAFFOLDS Y SUSTITUTOS ÓSEOS

• El uso de la cuerna de ciervo supone la revalorización de un recurso natural que se pierde cada año, siendo además un recurso renovable, sostenible y éticamente aceptable, y superando los inconvenientes de algunas hidroxiapatitas del mercado.

Objetivo

Caracterización físico-química y ensayos *in vitro* de scaffolds de hidroxiapatita procedente de cuerna de *Cervus elaphus*.

Materiales y métodos / Obtención y preparación del biomaterial



Scaffold de cuerna

Corte
- Cortadora con hoja de diamante
- Muestras de 4.8 x 4.8 x 2mm


Lavado
- En sonicación
- 180s con etanol + 180s con miliQ water

Pirólisis
Rampa de calentamiento: 2°C/min
Fase calentamiento constante: 12 horas
Temperatura máxima utilizada: 600-1050°C

Resultados / Caracterización físico-química

TERMOGRAVIMETRÍA

Termogravimetría Cuerna Ciervo - Parte Cortical



Se produce una pérdida de masa total de un 43.5%.

Rango de temperatura (°C)	Transformación físico-química	Pérdida de masa
100-150	Evaporación agua	8.5%
200-400	Combustión materia orgánica y deshidratación apatita	28.8%
450	Descomposición carbonosa	7.2%
500-600	Estabilización Combustión oxígeno y re-oxidación mineral	1.5%

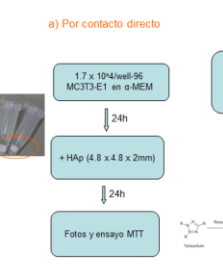
COMPOSICIÓN QUÍMICA (ICP-OES)

Elemento	Concentración (%)
Ca	61.9
P	34.5
Mg	1.83
Na	1.29
S	0.25
K	0.03
Si	0.03
Fe	0.03
Zn	0.03
Sr	0.02

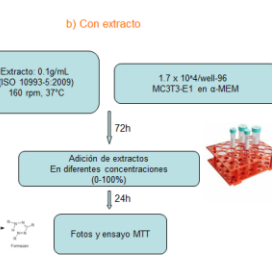
• El resultado por ICP-OES revela una composición muy similar a la de los tejidos mineralizados biológicos, como por ejemplo el hueso, en el cual destacan el Ca y P como componentes principales de la parte mineral.

Materiales y métodos / Bioensayo de citotoxicidad por MTT

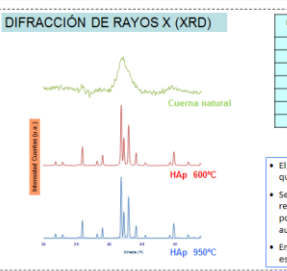
a) Por contacto directo



b) Con extracto



DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)



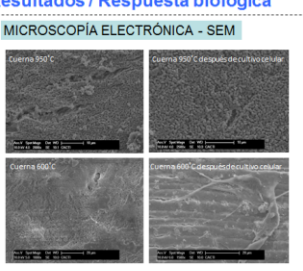
Muestra (°C)	Tamaño de grano T (nm)	Grado de cristalinidad Xc (%)
600	47.47	33.01
800	55.39	43.58
850	55.39	58.25
950	55.39	46.22
1000	55.39	56.82
1050	55.39	51.02
1100	55.39	55.23

$D_p = \frac{0.943}{\beta_{HLL} \cos \theta}$ $X_c = 1 - \frac{V_{(11100)}}{300} \times 100$

• El análisis de XRD revela la presencia de una única fase apatítica que corresponde con Hidroxiapatita (HAp).
 • Se observa un aumento en el tamaño de grano entre 600°C y el resto de temperaturas. En cuanto al grado de cristalinidad, podemos decir también que los valores experimentan un aumento a temperaturas más altas.
 • En la muestra natural no se puede identificar correctamente la estructura debido a la presencia de compuestos orgánicos.

Resultados / Respuesta biológica

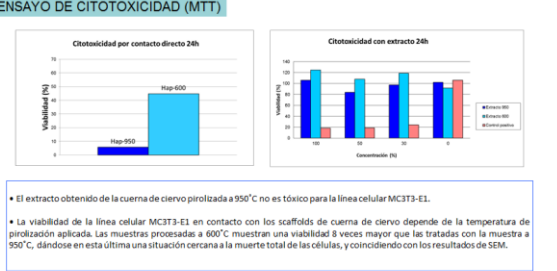
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA - SEM



• La morfología superficial del scaffold de cuerna de ciervo se modifica en función de la temperatura de pirólisis utilizada. El scaffold a 950°C presenta una morfología granular porosa uniformemente distribuida, mientras que en el caso de 600°C esta morfología convive con otra de aspecto plano, correspondiendo posiblemente a restos orgánicos de la muestra.

• Los scaffolds incubados durante 24h muestran una reducida y aislada presencia de células, siendo en el caso de las muestras a 950°C mucho más acusado.

BIENSAYO DE CITOTOXICIDAD (MTT)



Citotoxicidad por contacto directo 24h

Citotoxicidad con extracto 24h

• El extracto obtenido de la cuerna de ciervo pirolizada a 950°C no es tóxico para la línea celular MC3T3-E1.

• La viabilidad de la línea celular MC3T3-E1 en contacto con los scaffolds de cuerna de ciervo depende de la temperatura de pirólisis aplicada. Las muestras procesadas a 600°C muestran una viabilidad 8 veces mayor que las tratadas con la muestra a 950°C, dándose en esta última una situación cercana a la muerte total de las células, y coincidiendo con los resultados de SEM.

CONCLUSIÓN

Las diferencias de viabilidad encontradas deben atribuirse a modificaciones estructurales del material, dependientes de la temperatura de procesamiento, no a las de tipo composicional. La continuación del estudio se hace necesaria, con la ampliación del rango de temperaturas de procesamiento de la cuerna y ensayos complementarios, para dilucidar este efecto.

AGRADECIMIENTOS

