

FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MATRIZ TRIDIMENSIONAL DE HIDROXIAPATITA MACROPOROSA PARA APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS ÓSEOS

MARCELA RINCÓN¹
ALEJANDRA RODRÍGUEZ²
MARTA ELENA LONDOÑO³
ALEJANDRO ECHAVARRÍA⁴

RESUMEN

La ingeniería de tejido óseo surge como una nueva opción para el tratamiento de muchos tipos de afecciones, entre ellas las enfermedades óseas, permitiendo resolver múltiples problemas en el área médica. El desarrollo de una matriz de hidroxiapatita para cultivo de células óseas permitirá contar con otra alternativa para enfrentar las enfermedades causadas en el hueso y articulaciones que frecuentemente llevan a la discapacidad en las personas. En este trabajo se obtuvo hidroxiapatita sintética por la ruta de precipitación a partir de fosfato de amonio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Se formaron matrices en las cuales se indujo macroporosidad con el agente natural *Zea mays*, con partículas entre $350 \mu\text{m}$ y $600 \mu\text{m}$, y microporosidad con celulosa en proporciones peso/peso de 4% y 8%. Las muestras fueron caracterizadas con pruebas de compresión, microscopía electrónica de barrido (SEM), que incluyó espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS) y difracción de rayos X (DRX). Se obtuvieron matrices macroporosas de hidroxiapatita cristalina con un diámetro de poro entre $300 \mu\text{m}$ y $500 \mu\text{m}$ en promedio, con porosidades entre 35,85% y 45,61%, densidades en el rango de $1,48\text{-}1,77 \text{ g/cm}^3$ y relación Ca/P de 1,7. Para los bloques con 4% de agente microporoso la resistencia a la compresión fue de 1,06 MPa y el módulo de elasticidad,

¹ Ingeniera Biomédica EIA-CES. bmamarin@eia.edu.co

² Ingeniera Biomédica EIA-CES. bmaler@eia.edu.co

³ Física, MSc Ingeniería. Área Ingeniería Biomédica. Escuela de Ingeniería de Antioquia y Universidad CES. pfmalon@eia.edu.co

⁴ Ing. Met, Ph.D, Universidad de Antioquia. aechave@udea.edu.co

de 67,15 MPa. Los bloques con 8% tuvieron una resistencia a la compresión de 1,08 MPa y un módulo de elasticidad de 54,65 MPa.

PALABRAS CLAVE: hidroxiapatita; matrices macroporosas; ingeniería de tejidos; hueso.

ABSTRACT

Bone tissue engineering came up as a new option treatment for different kinds of illness, among them bone diseases. All this development has allowed solving multiple medical problems. The development of a hydroxyapatite scaffold for bone cells culture will be another alternative to attend several diseases that are caused on bones and that usually lead to disabilities in people. In this study synthetic hydroxyapatite was produced by a precipitation route with ammonium phosphate ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) and calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) as precursors. Scaffolds were manually molded, and macroporosity was induced with a natural agent, named Zea mays, with a particle size ranging between 350 μm and 600 μm . Microporosity was induced using cellulose with proportions of 4% and 8% (weight/weight). The samples were characterized by compression test, scanning electronic microscopy (SEM), energy dispersive spectroscopy (EDS), and X ray diffraction (XRD). Crystalline hydroxyapatite scaffolds were obtained and they presented an average pore diameter between 300 μm and 500 μm , porosities between 35,85% and 45,61%, densities in the range of 1,48-1,77 g/cm^3 and Ca/P ratio of 1,7. The calculated compressive strength for the 4% of microporous block was 1,06 MPa and the elastic modulus was 67,15 MPa; while the 8% microporous blocks showed a strength of 1,08 MPa and an elastic modulus of 54,65 MPa.

KEY WORDS: hydroxyapatite; macroporous scaffolds; tissue engineering; bone.

INTRODUCCIÓN

Los traumas y las enfermedades de huesos y articulaciones frecuentemente llevan a daños estructurales en la superficie del cartílago articular y en el hueso, lo que produce un dolor severo y la discapacidad de millones de personas alrededor del mundo ^[1]. Normalmente el tratamiento médico de este tipo de afecciones está dirigido a aliviar el daño y las molestias sin mejorar las lesiones subyacentes. Las estrategias actuales para reparar el hueso incluyen el uso de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos, las cuales son terapias con muchas limitaciones, debido a problemas como fuentes limitadas de obtención de hueso, morbilidad de los sitios donantes, problemas de rechazo del injerto y transmisión de enfermedades. También se han utilizado implantes y dispositivos biomédicos que tienen como fin reem-

plazar la función perdida del tejido afectado, pero estas soluciones están sujetas a limitaciones como fatiga, fracturas, toxicidad y desgaste. Además, el comportamiento de estos implantes y dispositivos no responden completamente a las exigencias de órganos y tejidos que reemplazan^[2-4].

Como alternativa de solución a estos problemas, surge la ingeniería de tejidos, que se define como "una ciencia interdisciplinaria donde se aplican principios de ingeniería y las ciencias de la vida para crear sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido u órgano que ha sido afectado"^[5].

El éxito de la ingeniería de tejidos depende del desarrollo de matrices porosas que proporcionen el soporte necesario a las células para su proliferación y el mantenimiento de sus funciones diferenciadas o



señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión específica de los genes en el tejido^[6]. Un material que ha de ser elegido como matriz debe cumplir con los siguientes requisitos: ser biocompatible, osteoconductor, bioabsorbible y tener suficientes propiedades mecánicas para proveer un soporte estructural durante el crecimiento y la remodelación del hueso^[3, 6-8].

Gracias a su excelente biocompatibilidad y a su semejanza química y cristalina con la fase mineral del hueso, los fosfatos de calcio se han usado en medicina desde hace unos 20 años. Aunque no han mostrado efecto osteoinductivo, los fosfatos de calcio tienen efectos osteoconductivos y pueden, en ciertas condiciones, unirse al hueso. Numerosos ensayos *in vivo* e *in vitro* han reportado que los fosfatos de calcio, no importa en qué forma: compactos, recubrimientos, porosos o en polvo ni en qué fase: cristalinos o amorfos, siempre soportan la unión, diferenciación y proliferación de células como osteoblastos y células mesenquimatosas. La hidroxiapatita (HA) es uno de los fosfatos más eficientes^[7], debido a su estabilidad ante cambios de pH, temperatura y composición del fluido fisiológico^[9,10]. La HA puede obtenerse de fuentes naturales o mediante síntesis artificial, preferiblemente de reactivos analíticos como el nitrato de calcio y el fosfato de amonio^[11]. La HA obtenida por síntesis artificial tiene la ventaja de ser muy pura y, además, durante el proceso de síntesis se pueden seleccionar la relación Ca/P, el tamaño de grano, la cristalinidad, entre otras características^[12].

Se han desarrollado muchas rutas para sintetizar HA sintética, usando métodos de hidrólisis, hidrotermales o de precipitación. De estos, la precipitación se caracteriza por su simplicidad, bajo costo y potencial aplicación industrial^[12].

El desarrollo de matrices de hidroxiapatita para su aplicación en ingeniería de tejido óseo ha dado muy buenos resultados. T. M. Chu *et al.*^[13] fabricaron dos matrices de hidroxiapatita de diferente arquitectura interna y las evaluaron *in vivo*. Ambas matrices mostraron regeneración ósea en las primeras cinco semanas y se halló que el hueso penetró todos los

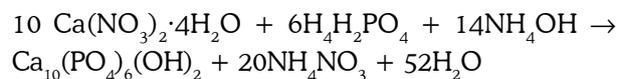
canales de la matriz. La hidroxiapatita también ha sido utilizada en matrices compuestas para mejorar la biocompatibilidad y la osteointegración. Guobao Wei y Peter X. Ma^[3] crearon matrices compuestas de HA y obtuvieron buenas propiedades mecánicas; con este proceso se mejoró la distribución celular dentro de la matriz, debido a la introducción de hidroxiapatita osteoconductor. De la misma manera, H. W. Kim *et al.*^[2] crearon matrices compuestas de gelatina e hidroxiapatita y encontraron mejores respuestas celulares que las halladas con las matrices de gelatina pura. Sang-Soo Kim *et al.*^[14] demostraron que con matrices hechas de hidroxiapatita y ácido poliláctico-glicólico (PLGA) se incrementa la formación de hueso, debido a la presencia de hidroxiapatita en la superficie de la matriz, lo cual permitió un contacto directo con las células trasplantadas y estimuló la proliferación celular y la diferenciación osteogénica. López *et al.*^[15] crearon matrices de HA porosa con el agente *Zea mays* y obtuvieron porosidades grandes (>85%) y densidades altas (3,11 g/cm³), aunque propiedades mecánicas bajas.

En este trabajo se diseñaron y construyeron matrices de hidroxiapatita sintética. Esta es la primera fase de un proyecto cuyo fin es obtener matrices macroporosas con porosidad interconectada para su posterior evaluación biológica, su uso en cultivo de células y su futura aplicación en injertos que permitan restaurar la función ósea perdida por traumas o defectos congénitos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Síntesis de HA

Se obtuvo hidroxiapatita sintética por la ruta de precipitación a partir de soluciones acuosas de nitrato de calcio Ca(NO₃)₂·4H₂O (Merck 97,3%), y fosfato de amonio NH₄H₂PO₄ (Merck 99,5%) partiendo de la reacción^[15,16]:



Para garantizar las condiciones básicas de la reacción y evitar que sea reversible, ambas soluciones se alcalinizaron, una vez preparadas y antes de mezclarse, utilizando hidróxido de amonio 28-30% (vol/vol). (J. T. Baker). Luego se mezclaron ambas soluciones en un recipiente con agitación continua a 20 r. p. m. Una vez mezclados los productos, se mantuvieron en constante agitación y posteriormente se dejaron en reposo en un proceso llamado maduración. Luego del reposo, se recuperó el precipitado y se realizaron varios lavados con agua destilada, con el fin de obtener un pH de 7.

La hidroxiapatita obtenida se dividió en dos partes iguales para adicionar el agente microporógeno, que se obtuvo a partir de papel de filtro picado y disuelto en agua destilada para ser agregado a la hidroxiapatita en cantidades de 4% y 8% (peso/peso). La mezcla se dejó en reposo y después se centrifugó usando la centrífuga Heraeus Instruments Megafuge 1.0. Con esto se obtuvo una masa blanca y húmeda a la cual se le agregó el agente macroporoso, que se obtuvo picando *Zea mays* ("crispeta" cocida). A todas las muestras de HA se les adicionó un 30% de agente macroporoso (peso/peso) y luego se procedió a fabricar los bloques manualmente con dimensiones de 1,5 mm x 1,5 mm x 2,3 mm (figura 1).

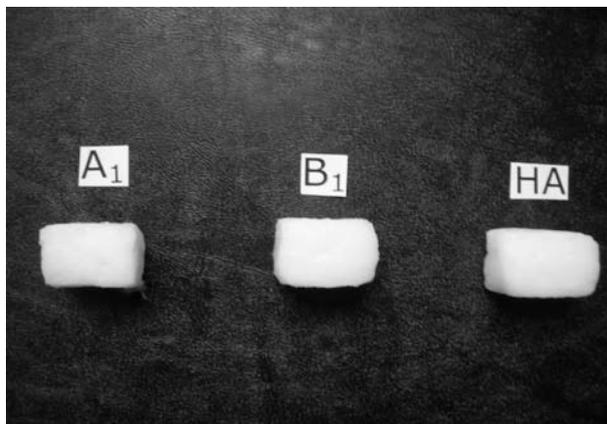


Figura 1. Bloques de HA obtenidos por moldeo manual. A₁: 4% de celulosa + 30% *Zea mays*
 B₁: 8% de celulosa + 30% de *Zea mays*
 HA: bloque sin agentes porógenos.
 Los bloques son de 1,5 mm x 1,5 mm x 2,3 mm

Finalmente, los bloques se sometieron a un calentamiento suave a 120 °C en estufa de secado Memmert durante dos horas para retirar el exceso de humedad y luego se llevaron a un tratamiento térmico hasta alcanzar una temperatura de 1050 °C en una mufla Vulcan 3-550.

CARACTERIZACIÓN

Difracción de rayos X

Para analizar la composición química y la cristalinidad de la hidroxiapatita se usa difractómetro Rigaku Miniflex (lámpara de cobre, 100-8000 cps).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se analizan en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5910LV para evaluar la morfología de poro, la microestructura y la composición química por EDS.

Densidad y porosidad

Se pesa un bloque de hidroxiapatita seco (P₁) y luego se sumerge en 100 mL de agua destilada y se calienta a 200 °C durante una hora. La muestra se deja en reposo en la misma agua durante 23 horas más. Los bloques se pesan mientras se encuentran suspendidos en agua para obtener el peso boyante (P₃). Para terminar, se retira la muestra, se seca la superficie y se pesa nuevamente (P₂). La porosidad y la densidad relativa se calculan a partir de las ecuaciones^[15]:

$$\text{Porosidad} = \frac{P_2 - P_1}{P_2 - P_3} \quad \text{Densidad} = \frac{P_1}{P_2 - P_3}$$

Ensayos mecánicos

Se cargan 14 bloques porosos de 9,55 mm x 6,6 mm x 6,2 mm en la máquina de ensayos universales



Test Resources, y se evalúan en compresión a una velocidad de carga de 0,1 mm/min hasta su ruptura. Adicionalmente se cargan dos bloques compactos como punto de referencia para el análisis de las propiedades mecánicas.

De los resultados se obtiene el módulo elástico E y la resistencia a la compresión. Se realiza una prueba basándose en el estadístico T (Prueba-t) ($\alpha=0,05$) para analizar las diferencias entre las muestras con 4% (peso/peso) y 8% (peso/peso) de agente microporógeno.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Difracción de rayos X

La figura 2 muestra el difractograma de una muestra sinterizada a 1050 °C. Los picos estrechos y agudos indican la alta cristalinidad de la muestra. Se observa una cerámica bifásica, con presencia de 90% de hidroxiapatita (HA) y 10% de fosfato tricálcico (FTC). Los picos marcados con * son los característicos de la HA, mientras que el pico con la marca ♦ corresponde al FTC según lo expresado en el artículo de López *et al.*^[15].

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

A partir de la SEM y la EDS, se observan la microestructura y la composición química de las muestras. En la figura 3 se puede ver la superficie de

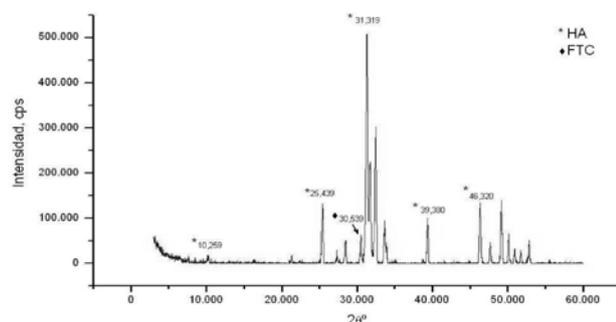


Figura 2. Espectro de DRX de hidroxiapatita sintética

la hidroxiapatita donde se presentan cristales con forma redondeada, debido al proceso de sinterización; la microporosidad presente se debe a la falta de una completa unión entre las partículas. También se pueden apreciar algunos microporos, con un diámetro promedio de 2 μm , en la superficie de la muestra.

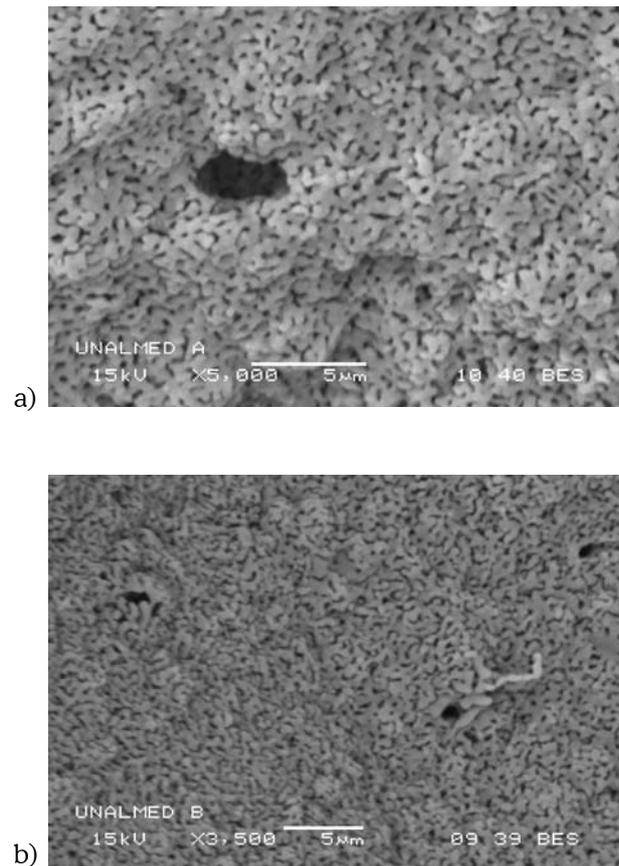


Figura 3. Micrografía SEM

- a) Microestructura del bloque con 4% de microporosidad.
- b) Microestructura del bloque con 8% de microporosidad.

En la figura 4 se observan algunos macroporos con morfologías irregulares. Se presentan algunos poros redondeados con un diámetro entre 300 μm y 500 μm , adecuado para el crecimiento celular^[17-20]. En las fotografías se alcanza a observar claramente el contorno de los poros, aunque no se observa la profundidad, por la presencia de polvos de HA que

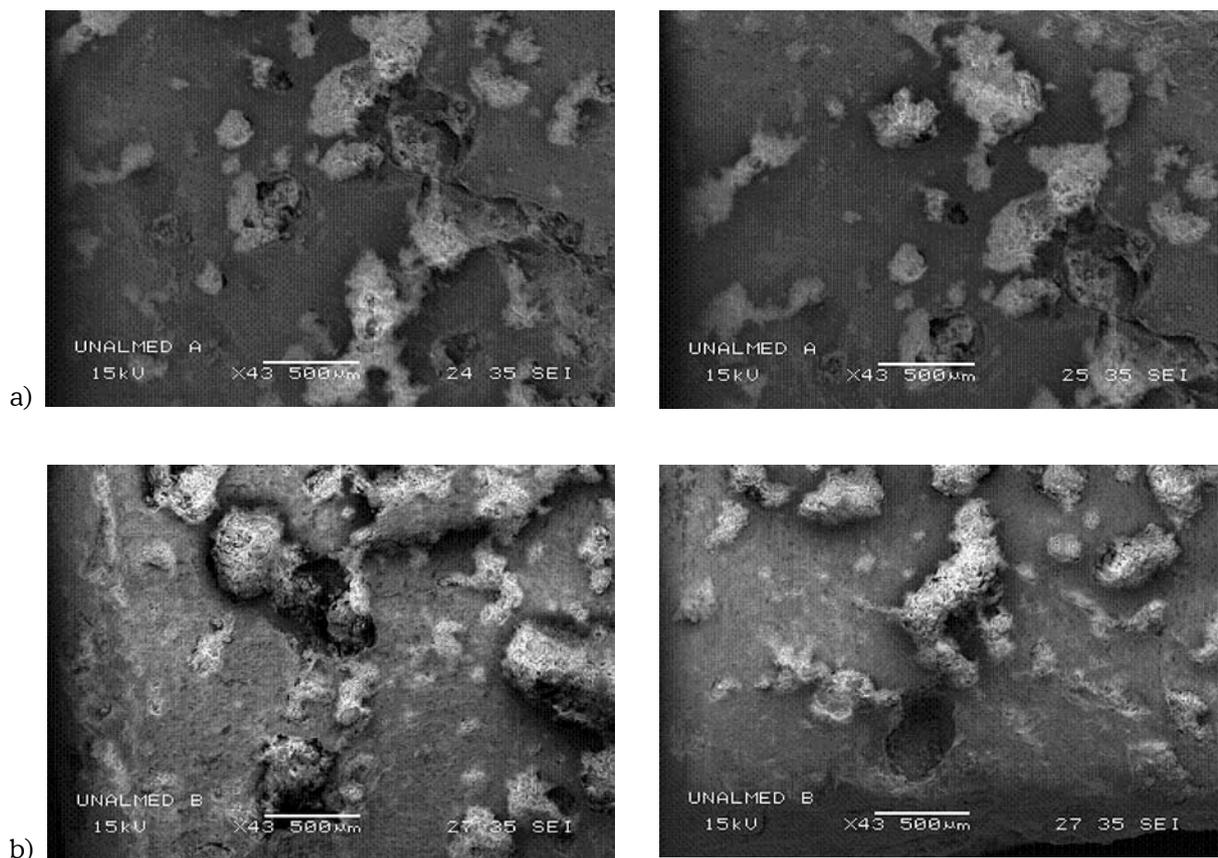


Figura 4. Fotografía con SEM

a) Muestra con 4% de microporosidad. b) Muestra con 8% de microporosidad.

quedan atrapados en el poro debido al proceso de preparación. En las muestras se observa muy poca microporosidad e interconectividad, y principalmente se ven poros cerrados. La interconectividad favorece el crecimiento de células, por lo cual es importante buscar esta característica adicionando una mayor cantidad de agente porogénico.

La composición química se realiza en dos muestras para calcular un valor promedio de las proporciones de Ca/P; los resultados indican una relación Ca/P de 1,70 que confirma la cristalinidad de la hidroxiapatita (figura 5)^[9,12,21].

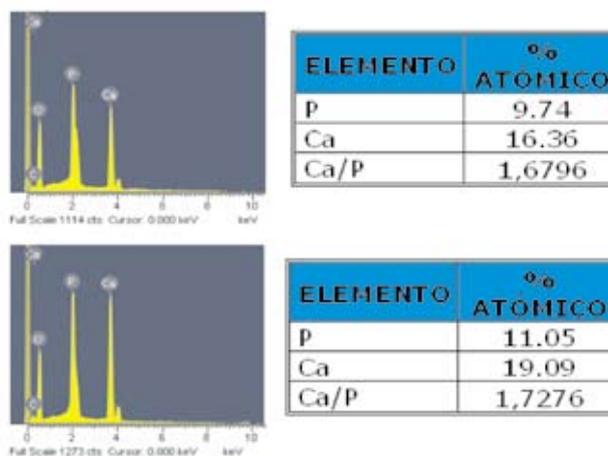


Figura 5. Composición química de los bloques de HA



Densidad y porosidad

Para los bloques de 4% de microporosidad se obtuvieron una porosidad del 35,85% y una densidad de 1,77 g/cm³. El bloque de 8% mostró una porosidad de 45,61% y una densidad de 1,48 g/cm³. Los valores de densidad y porosidad para el control fueron de 2,36 g/cm³ y 11,28%, respectivamente. Esto evidencia la presencia de poros en las muestras cerámicas. El valor de densidad del control es menor que el valor teórico de la hidroxiapatita (3,16 g/cm³), que puede deberse a la dificultad que hay al remover los vacíos durante el proceso de fabricación.

Las porosidades típicas reportadas en la literatura varían entre el 35% y 92%^[7, 15, 20, 22-26], y los resultados aquí obtenidos se encuentran dentro de este rango.

Ensayos mecánicos

Las pruebas de compresión se realizaron a 16 muestras. Se evaluaron 14 muestras macroporosas; 7 con 4% de celulosa y 7 con 8% de celulosa. También se evaluaron dos muestras compactas, sin ningún tipo de porosidad, correspondientes a las muestras C. Los resultados de los valores medios y las desviaciones estándar se muestran en la tabla 1.

En ambos casos, las propiedades mecánicas de las matrices estuvieron por debajo de los valores de resistencia y elasticidad de las muestras compactas C2 y C3. La resistencia de los bloques porosos es más o menos 10 veces menor que la de los que no presentan porosidad. Respecto al módulo de elasticidad, es unas 8 veces menor para los bloques porosos. Estos resul-

tados muestran que la porosidad afecta la resistencia, pues reduce el área de la sección transversal sobre la que se aplica la carga y, por lo tanto, disminuye la tensión que el material puede soportar^[7,8].

La variabilidad en los resultados de las muestras fabricadas en las mismas condiciones puede deberse a que durante el moldeo manual de los bloques no hay una distribución controlada del agente porógeno y pueden obtenerse bloques más porosos que otros. Además, puede haber fallas estructurales o grietas en cada muestra que hacen que el comportamiento de un bloque difiera considerablemente de otro.

Las diferencias entre las propiedades de las muestras con 4% y 8% de microporosidad se analizan basándose en el estadístico T (Prueba-t), el cual sigue una distribución t-Student con ν grados de libertad. Esta prueba se elige dado el tamaño de la muestra ($n = 7$).

Con esta prueba se concluyó que no hay diferencia significativa entre las propiedades mecánicas de las muestras con 4% y 8% de celulosa. Aunque con estas dos proporciones de microporosidad no se obtuvieron diferencias considerables, en estudios anteriores^[15], donde se trabajó con 16% del mismo agente microporoso, se obtuvieron propiedades mecánicas muy bajas, lo que indica que la microporosidad sí afecta la resistencia del material.

CONCLUSIONES

En este trabajo se construyeron matrices de hidroxiapatita macroporosa por moldeo manual, un método sencillo, práctico y económico, que permite

Tabla 1. Valor promedio y desviación estándar de la resistencia y el módulo de elasticidad de cada tratamiento

Microporosidad	Resistencia media (MPa)	σ_2 Resistencia (MPa)	E Medio (MPa)	σ_2 E (MPa)
A (4%)	1,063	0,1705	67,150	20,3891
B (8%)	1,077	0,3792	54,655	20,5792
C (sin porosidad)	10,080	3,543	489,000	322,582

elegir la forma de la matriz, el tamaño del poro y el grado de porosidad, aunque presenta limitaciones si se desean controlar la interconectividad y la estructura porosa interna.

La matriz obtenida fue cristalina bifásica con un porcentaje de hidroxiapatita de 90% y de fosfato tricálcico de 10%. Para inducir la macroporosidad y la microporosidad se usaron el agente *Zea mays* y celulosa en proporciones de 4% y 8% (peso/peso), respectivamente. Se obtuvo una matriz macroporosa, con un diámetro de poro entre 300-500 μm , adecuado para el crecimiento celular, y algunos microporos de $\sim 2 \mu\text{m}$. La densidad de las muestras porosas estuvo entre 1,48 g/cm^3 y 1,77 g/cm^3 y la porosidad entre 35,85% y 45,61%. Si bien los tamaños de poro son los reportados en la literatura como ideales para crecimiento celular, se debe buscar mejorar la interconectividad entre ellos para facilitar dicho crecimiento.

Las propiedades mecánicas de las matrices mostraron resistencias y módulos de elasticidad muy bajos, con respecto al hueso esponjoso. Generalmente, la mayoría de los materiales usados en ingeniería de tejido óseo no alcanzan a igualar las propiedades mecánicas del hueso^[27]. Sin embargo, se ha mostrado que es suficiente con que las matrices alcancen propiedades mecánicas suficientes para soportar el crecimiento celular; además, las células, al invadir la matriz, mejoran dichas propiedades lo cual ha quedado demostrado en ensayos *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan los agradecimientos a la Escuela de Ingeniería de Antioquia y a la Universidad de Antioquia por el patrocinio brindado para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

1. Cancedda R.; Giannoni P. and Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*, 81-91 (2003).
2. Kim H. W.; Kim H. E. and Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin-hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 26, 5221-5230 (2005).
3. Wei G. and Ma P. X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 25, 4749-4757 (2003).
4. Palsson B.; Hubell J.; Plonsey R. and Bronzino J. D. (eds.) *Tissue engineering: principles and applications in engineering*. CRC Press, 2003. 357 p.
5. Vunjak-Novakovic G. and Freshney R. I. *Culture of cells of tissue engineering*. Wiley Interscience, 2006. 491 p.
6. Ma P. and Wei G. Nanostructured scaffolds for tissue engineering and regeneration. *Handbook of nanostructured biomaterials and their applications in nanobiotechnology*, Volume 1, 1-21 (2005).
7. Rezwani K.; Chen Q. Z.; Blaker J. J. and Boccaccini R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 3413-3431 (2006).
8. Salgado A. J.; Coutinho O. P. and Reis R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience* 4, 743-765 (2004).
9. Kalita S. J.; Bhardwaj A. and Bhatt H. A. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering*. Article in press (2006).
10. Gross K. Bioceramics: An overview including calcium phosphates, hydroxyapatite, alumina, zirconia and pyrolytic carbon. <http://www.azom.com/details.asp?ArticleID=1743>. Fecha de consulta: diciembre 16 de 2006.
11. Hernández J. H. Evaluación del efecto del tratamiento térmico en los parámetros cristalinos de la hidroxiapatita sintética mediante difracción de rayos X. Universidad de Antioquia. Medellín (2003).
12. Suárez R. Síntesis y caracterización de hidroxiapatita macroporosa. Universidad de Antioquia. Medellín (2002).
13. Chu T. M.; Orton D. G.; Hollister S. J.; Feinberg S. E. and Halloran J. W. Mechanical and *in vivo* performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials* 23, 1283-1293, (2002).
14. Kim S. S.; Sun Park M.; Jeon O.; Yong Choi C. and Kim B. S. Poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 1399-1409 (2006).



15. López M. E.; Echavarría A.; Suárez R. and Herrera N. Hidroxiapatita macroporosa obtenida en la Universidad de Antioquia: síntesis, caracterización y comparación con el hueso esponjoso y calcinado de bovino. *Revista Facultad de Ingeniería* 30, 109-124 (2003).
16. Rivera J. A.; Riaño C. H.; Echavarría A.; Monsalve, P. A.; Alzate G.; Restrepo L. F. y Jaramillo C. D. Injertos óseos. Nueva alternativa. Fase III. Obtención, caracterización y evaluación de hidroxiapatita sintética y el compuesto de hidroxiapatita sintética porosa. Proteínas morfogenéticas óseas en un modelo experimental Lapino. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17:1 (2004).
17. Ma P. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials today*, 30-40 (2004).
18. Lin H. R. and Yeh Y. J. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization and *in vitro* studies. *Wiley InterScience*, 52-64 (2004).
19. Ma P. and Elisseff J. *Scaffolding in tissue engineering*. Boca Raton, Taylor and Francis, 2006. 638 p.
20. Kim H. W.; Lee S. Y.; Bae C. J.; Noh Y. J.; Kim H. E.; Kim H. M. and Ko J. S. Porous ZrO_2 bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer. *Biomaterials* 24, 3277-3284 (2003).
21. Londoño M. E. Influencia del tratamiento térmico en las propiedades cristal químicas de la hidroxiapatita sintética. Universidad Pontificia Bolivariana. 2005.
22. Rumpels E.; Allegrini S.; Kauschke E.; Fanghanel J. and König B. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osteointegration of smooth titanium implants. *Annals of Anatomy* 188, 143-151 (2006).
23. Cyster L. A.; Grant D. M.; Howdle S. M.; Rose F. R. A. J.; Freeman I. D.; Scotchford C. A. and Shakesheff K. M. The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26, 697-702 (2005).
24. Deville S.; Saiz E. and Tomsia A. P. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27, 5480-5489 (2006).
25. Ramay H. R. and Zhang M. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of gel-casting and polymer sponge method. *Biomaterials* 24, 3293-3302 (2003).
26. Barralet J. E.; Grover L.; Gaunt T.; Wright A. J. and Gibson I. R. Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 23, 3063-3072 (2002).
27. Athanasiou, K. A.; Zhu, C.; Lanctot, D. R.; Agrawal, C. M. and Wang, X. *Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone*. *Tissue Engineering*, 6-4 (2000).

