

## COMPARACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* Y RESISTENCIA A LA FLEXIÓN DE $\alpha$ - ALÚMINA NANO Y MICROMÉTRICA COMO MATERIAL POTENCIAL PARA RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Gabriel Acevedo<sup>1</sup>, María Taborda<sup>1</sup>, Valentina Ramírez<sup>2</sup>, Paola Villegas<sup>3\*</sup>

1: Estudiante Ingeniería Biomédica, Instituto Tecnológico Metropolitano. Medellín, Colombia.

2: Estudiante Maestría Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.

3: M. Sc. Ciencias Químicas, Instituto Tecnológico Metropolitano. Medellín, Colombia.

\* Contacto: paolavillegas@itm.edu.co

### RESUMEN

En el campo de reconstrucción ósea se emplean materiales biológicos y sintéticos según el requerimiento mecánico; en el caso de proporcionar sostén se usan específicamente materiales metálicos con tratamientos superficiales o recubrimientos cerámicos para mejorar la adhesión del implante al tejido, mientras que para regenerar y rellenar defectos óseos cavitarios se utilizan principalmente autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos obteniendo mejor respuesta mecánica que con cerámicos porosos sintéticos, pero con el riesgo de infección, transmisión de enfermedades y la potencial morbilidad del sitio donante. En este trabajo se comparó la viabilidad biológica *in vitro* y la resistencia a la flexión de matrices conformadas con óxido de aluminio de orden micro y nanométrico, con el fin de estudiar la posibilidad de emplear este material en la fabricación de matrices con resistencia mecánica para regeneración ósea resolviendo las desventajas de los materiales cerámicos actualmente empleados. El material sintetizado fue caracterizado como óxido de aluminio fase cristalina alfa obtenido a 1200°C con tamaños de partícula menores de 100 nm y conglomerados en promedio de 525.2 nm. Por medio del estudio biológico *in vitro* se confirmó que los polvos de  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanométrico son biocompatibles al no presentar efectos negativos en las células ni alteraciones en su ADN. La alúmina con tamaño nanométrico proporcionó matrices de mayor resistencia a la flexión (11.98±2.73MPa) que las probetas realizadas con partículas micrométricas (4.21±0.98MPa), evidenciando el efecto del tamaño de partícula en los procesos de pre-sinterización y densificación, por lo cual es un material prometedor para el uso en regeneración ósea.

**Palabras Clave:** Alúmina nanométrica, Biocompatibilidad, matrices, Resistencia a la flexión

### ABSTRACT

In bone reconstruction field, biological and synthetic materials are used according to mechanical behavior of substituted tissue. In case of be need as support, metallic materials with ceramic coatings are specifically used to improve implant adhesion to the tissue. In this study was compared the *in vitro* biological viability and the flexural strength of matrices formed with micro and nano size of aluminum oxide particles, in order to study the possibility of using this material for preparing scaffolds with mechanical strength for bone regeneration, solving the disadvantages of ceramic materials currently employed. The synthesized materials were characterized as alpha phase of aluminum oxide obtained at 1200 ° C with particle sizes of 100 nm and average cluster

525.2 nm. The biological in vitro tests confirmed that nanoparticles of  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powders are biocompatible without negative effects on the cells or alterations in their DNA. The samples with nanoparticles of aluminum oxide provided greater flexural strength ( $11.98 \pm 2.73$ MPa) than the samples made with micrometric particles ( $4.21 \pm 0.98$ MPa). This demonstrates the effect of particle size in the process of pre-sintering and densification, and lets us find a new promising material for bone regeneration uses.

**Keywords:** *Nano-alumina, Biocompatibility, Scaffold, Flexural strength*

## 1 INTRODUCCIÓN

Un sustituto óseo es un biomaterial utilizado para remplazar, cambiar o mejorar un segmento óseo faltante o defectuoso, y debe cumplir ciertas características como biocompatibilidad, biodegradabilidad, resistencia mecánica, osteoconductividad y osteoinductividad [1]. En el campo de la reconstrucción ósea se emplean materiales biológicos y sintéticos según el requerimiento mecánico; en el caso de proporcionar sostén se usan específicamente materiales metálicos con tratamientos superficiales o recubrimientos cerámicos para mejorar la adhesión del implante al tejido; con el fin de regenerar y rellenar defectos óseos cavitarios se utilizan principalmente autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos obteniendo mejor respuesta mecánica que con cerámicos porosos sintéticos, pero con el riesgo de infección, transmisión de enfermedades y la potencial morbilidad del sitio donante [2].

Los biocerámicos inertes (óxidos o compuestos de carbono) son materiales biocompatibles que mantienen sus propiedades mecánicas y físicas luego de su implantación [3], estos sufren poco o ningún cambio químico durante una exposición a largo plazo en el medio fisiológico [4]. La alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) u óxido de aluminio es un material cerámico bioinerte, ampliamente utilizado en dispositivos aprobados por la FDA [5]. A principios de los 70's el Dr. Pierre Boutin inició la implantación de cojinetes de Alúmina sobre Alúmina 99% de alta densidad en remplazos totales de cadera, convirtiéndose así, en uno de los pioneros de utilización de alúmina de alta densidad en reparaciones ortopédicas [6]. Actualmente, se utiliza como soporte de carga en prótesis de cadera y como base para prótesis dentales debido a su excelente resistencia a la corrosión, buena biocompatibilidad y alta resistencia al desgaste [7]. Los materiales nanoestructurados poseen además, una estructura cristalina más compacta y por ende, mejores propiedades mecánicas y de superficie que podrían favorecer efectos sobre la proliferación, adhesión y diferenciación celular [8]. El objetivo de este estudio fue comparar la viabilidad biológica *in vitro* a través de ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad y la resistencia a la flexión de matrices conformadas con óxido de aluminio de orden nano y micrométrico.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron alúmina de tamaño nanométrico sintetizada mediante la ruta sol gel modificada descrita por Villegas (2007)[9], y alúmina de tamaño micrométrico comercial, marca Erecos, con los cuales se desarrollaron los siguientes procedimientos:

## 2.1 Conformación de probetas

Con ambos materiales se conformaron probetas cilíndricas de 20 mm de diámetro y 1.50 mm de espesor (Norma C1499 - 09 de la ASTM)[10] mediante prensado uniaxial a 27.59 y 34.48 MPa durante 30 segundos. Para las probetas se empleó un 91% (p/p) de alúmina sintetizada y 9% de alcohol polivinílico al 7% p/p como aglomerante. Luego se sinterizaron mediante un procedimiento isotérmico a 1200°C con una velocidad de calentamiento de 5°C min<sup>-1</sup> durante 3 horas.

## 2.2 Caracterización de fase cristalina y microestructural

La fase cristalina del material fue determinada por difracción de rayos X en un equipo Rigaku (Modelo Miniflex) y comparada con patrones de la base de datos del programa X'Pert HighScore versión 2.1 (PANanalytical) para confirmar el tipo de fase. La morfología del material fue determinada por microscopia electrónica de barrido (SEM), utilizando un microscopio marca JEOL, (modelo JSM 5910LV); el tamaño de partícula fue caracterizado por medio de un Nanosizer Malvern Mastersizer y además, por microscopia electrónica de transmisión (TEM) utilizando el microscopio marca FEI (modelo TECNAI 20), con un voltaje de aceleración de electrones de 200 KeV. La respuesta a la flexión de los materiales se evaluó en una maquina universal de ensayos Shidmazu Scientific Instruments, a una velocidad de desplazamiento del indentador de 0.1 mm s<sup>-1</sup>.

## 2.3 Caracterización mecánica

Las probetas fueron evaluadas mediante ensayos de flexión. Los resultados se expresaron como esfuerzo equibiaxial según Norma C1499 - 09 de la ASTM [10]. Con los datos de esfuerzo equibiaxial se evaluó la probabilidad de fractura de las probetas mediante la estadística de Weibull, teniendo en cuenta que ésta define qué tan dispersa es la distribución de fallas dentro del material debido a un esfuerzo; así un valor más alto en el módulo de Weibull se relaciona con una menor dispersión de los puntos de falla en el material, lo que garantiza la confiabilidad del material al ser sometido a esfuerzos mecánicos [11].

## 2.4 Evaluación de Biocompatibilidad *In vitro*

### 2.4.1 Inmersión estática

Se tomaron 3 gramos de cada una de las muestras y se sumergieron en tubos cónicos de polipropileno estériles con 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (LONZA) pH=7. Las suspensiones se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> para su envejecimiento durante una semana.

### 2.4.2 Cultivo Celular

Las células mononucleares de sangre periférica humana aisladas, fueron cultivadas en medio RPMI 1640, expuesto a la inmersión estática y suplementado al 10% con suero fetal bovino

(SFB) y 1% de fitohemaglutinina (PHA). Para el cultivo y evaluación se emplearon cajas de cultivo de 96 pozos con un volumen final de medio de 100 $\mu$ l. Todos los cultivos fueron mantenidos durante 48 horas bajo condiciones estándares de incubación (37°C, humedad >95%).

#### 2.4.3 *Ensayo MTT*

Para la evaluación de la proliferación de las células mononucleares en el medio envejecido con los materiales nano y micrométrico se removió el medio y se agregaron 20 $\mu$ l de la solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a cada pozo; posteriormente, se incubó durante 3-4h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% y se agregaron 100 $\mu$ l de Isopropanol acidificado. Las placas se sometieron a agitación orbital durante 20 minutos y se realizó la lectura de absorbancia a 560nm en un lector de placas ELISA (GloMax ® -Multi Promega).

#### 2.4.4 *Test Cometa*

Los daños ocasionados por los materiales en estudio, sobre la cadena del ADN de las células mononucleares aisladas fueron determinados por medio de suspensiones celulares con una concentración de 10<sup>4</sup> células/ml en 200  $\mu$ l. Para la evaluación, se centrifugaron las suspensiones durante 5 minutos y las células se mezclaron con 10  $\mu$ l de buffer fosfato 1X y 90  $\mu$ l agarosa de bajo punto de fusión (0,5%), servidas sobre láminas con agarosa de punto de fusión normal (1%) previamente preparadas. Las células embebidas se incubaron a 4°C por 10 minutos y se colocaron en solución de lisis durante 18 horas a 4°C. Pasado este tiempo, se lavaron las placas con PBS libre de Calcio y Magnesio frío y se incubaron en buffer de electroforesis (pH 13) durante 20 minutos para desnaturalización de DNA, luego se sometieron a electroforesis horizontal en este mismo medio durante 30 minutos a 25V y 300mA. Las placas se lavaron nuevamente con un buffer neutralizante por 5min y se tiñeron con 25 $\mu$ l de bromuro de etidio, por último, se analizaron con el microscopio de fluorescencia invertido (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U, Ti-U/B, Ti-S, and Ti-S/L100) utilizando el software CometScore.

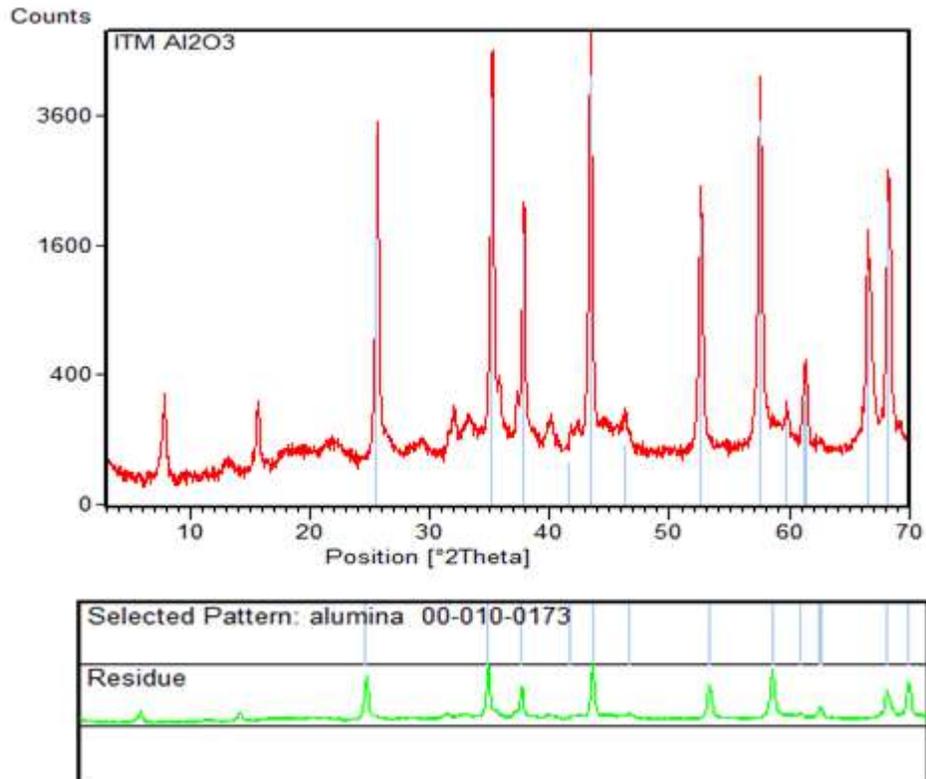
#### 2.4.5 *Ensayo Micronúcleos*

Se cultivaron 1,5 $\times$ 10<sup>4</sup> células por pozo y con tres réplicas de cada tratamiento durante 72 horas. Como controles se emplearon cultivos de células en medio no envejecido y al control positivo (C+) se le adicionó Mitomicina C (20 $\mu$ g/ml) durante las últimas 48 horas de cultivo. Para la observación de estructuras nucleares se adicionó a todos los cultivos Citocalasina B (10 $\mu$ g/ml) (Sigma) durante las últimas 24 horas. Posterior a ello, se analizaron extendidos celulares obtenidos por frotis y fijación (metanol y ácido acético 3:1) y tinción con Giemsa 5% (Sigma) en buffer sörrense. Para el análisis se empleó microscopía de campo claro con un objetivo de 40X (400X de magnificación) para el recuento de 1000 células por tratamiento, haciendo distinción entre células que presentaron uno o más micronúcleos.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

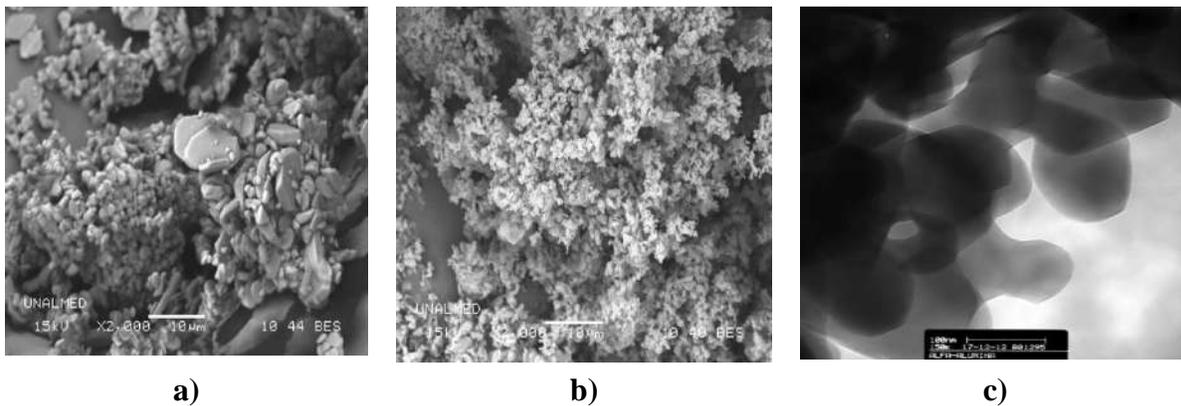
#### 3.1 Caracterización de fase cristalina y microestructural

Los análisis cristalográficos realizados por difracción de rayos X confirmaron mediante el programa X'Per Higscore que el material sintetizado era alúmina, puesto que la fase cristalina correspondió a la referencia 00-010-0173, equivalente a alúmina en fase  $\alpha$  o corindón (Figura 1). La intensidad de los picos observada, refleja la cristalinidad de la alúmina en fase  $\alpha$ .



**Figura 1.** Difractograma de alúmina sintetizada

Las fotomicrografías mostraron partículas más finas en el material sintetizado que en la muestra comercial, con tamaños mayores a 10  $\mu\text{m}$  (Figura 2. a) para la muestra comercial en comparación con tamaños menores a 10  $\mu\text{m}$  para el material sintetizado en el que además, se presentó aglomeración de partículas con forma de aguja (formas aciculares) (Figura 2. b). El tamaño promedio de partícula en la muestra comercial fue de 1247 nm y el de la alúmina sintetizada fue de 525.2 nm, demostrando que esta última, posee aglomerados de menor tamaño. Mediante microscopía electrónica de transmisión se comprobó también la presencia de partículas con un tamaño menor a 100 nm (Figura 2 c).



**Figura 2.** Materiales en polvo a) Alúmina comercial, b) Alúmina sintetizada, c) Tamaño nanométrico de alúmina sintetizada

### 3.2 Caracterización mecánica

Los valores de la resistencia a la flexión de las probetas de óxido de aluminio con tamaño nanométrico y micrométrico, evidenciaron la influencia del tamaño de partícula puesto que se encontró mayor valor del esfuerzo crítico en el material conformado con partículas nanométricas como se muestra en la tabla 1. Sin embargo, el módulo de Weibull mostró valores diferentes entre sí para ambos materiales, indicando que la distribución y los tipos de falla no son similares [11]. El material sintetizado proporcionó matrices con mayor resistencia a la flexión que el material comercial lo cual es un indicio del efecto del tamaño de partícula en la resistencia del material.

**Tabla 1.** Resultados de resistencia a la flexión en probetas de alúmina micro y nanométrica.

Presión de conformación	Matrices de Alúmina	Resistencia a la flexión (MPa)	Módulo de Weibull	Esfuerzo crítico (MPa)
27.59 Mpa	Sintetizada	10.41+/-1.91	5.08	11.30
	Comercial	5.27+/- 0.82	5.97	5.68
34.48 Mpa	Sintetizada	11.98+/- 2.73	4.17	13.19
	Comercial	4.21+/- 0.98	4.15	4.63

### 3.3 Biocompatibilidad *in vitro*

La evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* del óxido de aluminio nanométrico constituye el inicio para su caracterización como biomaterial. Los resultados obtenidos en el ensayo MTT mostraron que los medios envejecidos durante la inmersión estática de alúmina nanométrica en fase alfa, no producen efectos citotóxicos sobre células mononucleares, lo que indica que los posibles productos liberados por el material al medio, durante el periodo de una semana, no interfieren con la viabilidad celular. En el ensayo cometa se encontró que los medios envejecidos con alúmina nanométrica presentaron mayor número de nucleoides con alta integridad (97.64%) y por tanto, un menor efecto genotóxico que la muestra de alúmina comercial (93.16%). La actividad genotóxica mediante el ensayo de micronúcleos, mostró que no hubo producción de

éstos en las células expuestas a los medios envejecidos. De la similitud de los índices de división celular para las muestras de alúmina nanométrica (1.007) y micrométrica (1.006) puede inferirse que los tratamientos posiblemente no alterarán el material genético en las siguientes divisiones celulares.

#### 4 CONCLUSIONES

El material sintetizado fue caracterizado como óxido de aluminio fase cristalina alfa con tamaños de partícula y conglomerados de orden nanométrico. El incremento en la resistencia a la flexión de las probetas de alúmina sintetizada ( $11.98 \pm 2.73$ MPa) frente a la alúmina comercial ( $4.21 \pm 0.98$ MPa) evidencia el efecto del tamaño de partícula en los procesos de pre-sinterización y densificación, los cuales llevan a mejorar la resistencia mecánica del material. Por medio del estudio biológico *in vitro* se confirmó que los polvos de  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanométrica bajo las condiciones de estudio y con las técnicas aplicadas, son biocompatibles al no presentar efectos citotóxicos ni alteraciones en el ADN de las células mononucleares de sangre periférica humana. El óxido de aluminio con partículas de tamaño nanométrico proporcionó matrices biocompatibles y de mayor resistencia a la flexión que las probetas realizadas con partículas micrométricas, por lo cual es un material prometedor para el uso en regeneración ósea.

#### 5 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con la financiación proporcionada por el proyecto N° 09237 "Evaluación de un biocerámico para la generación de matrices tridimensionales para regeneración osteogénica: Etapa 1." del Instituto Tecnológico Metropolitano y con el apoyo del Laboratorio de cerámicos y vítreos de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

#### 6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Velasco, M., Garzón, D. "Scaffolds implants for the bone regeneration. Materials, Techniques and modeling by means of reaction- diffusion systems", Revista cubana de Investigaciones Biomédicas, Vol., 29(1), 140-154, 2010.
2. Estrada, C., Paz, A., López, L., "Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas", Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia, EIA, Vol., 5., 93-100, 2006.
3. Binyamin, G., Shafi, B.M., Mery, C.M., "Biomaterials: A primer for surgeons", Seminars in Pediatric Surgery, Vol., 15, 276-283, 2006.
4. Hulbert, S.F., Morrison, S.J., Klawitter, J.J., "Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures", Journal of Biomedical Materials Research, Vol., 6, 347-374, 1972.
5. Bose, S., Darsell, J., Hosick, H.L., Yang, L., Sarkar, D.K., Bandyopadhyay, A., "Processing and characterization on porous alumina scaffolds", Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Vol., 13(1), 23-28, 2002.

6. Hulbert, S. F., Hench, L. L., Forbers, D., Bowman, L. S. “History of Bioceramics” *Ceramics International*, Vol., 8 (4), 131-140, 1982.
7. Hench, L.L., Wilson, J., “An Introduction to Bioceramics”, Florida, World Scientific Publishing Co. Pte., Ltd, 1999.
8. Desai, T.A., “Micro- and nanoscale structures for tissue engineering constructs”, *Medical Engineering & Physics*, Vol., 22, 595–606, 2000.
9. Villegas, P., “Obtención y caracterización de un biomaterial dental de aluminio silicato de lantano infiltrado en una matriz de alúmina con tamaño nanométrico”, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia, 2007.
10. ASTM, C1499-09, (2009) Standard Test Method for Monotonic Equibiaxial Flexural Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature.
11. B. Janet and Quinn. George D, (2009) “A practical and systematic review of Weibull statistics for reporting strengths of dental materials” in *Academy of Dental Materials*. Published by Elsevier Ltd.