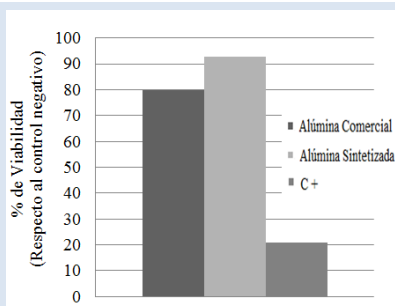


CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MECÁNICA DE α -ALÚMINA NANO Y MICROMÉTRICA COMO MATERIAL POTENCIAL PARA RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDO ÓSEO

Paola Villegas*, Valentina Ramírez, Viviana Taylor, Sandra Arango

Grupo de Investigación e Innovación Biomédica. Instituto Tecnológico Metropolitano. Calle 73 No 76A-354 Vía al Volador. Medellín (Antioquia). Colombia.

*e-mail: paolavillegas@itm.edu.co



RESUMEN

El óxido de aluminio denso y de orden micrométrico ha sido empleado por varios años en cirugía ortopédica debido a su buena resistencia mecánica, los bajos coeficientes de fricción y desgaste, y su naturaleza inerte, que lo hace químicamente estable en ambientes fisiológicos, lo cual garantiza una alta biocompatibilidad. En cuanto a su uso como componente de matrices microporosas para regeneración de tejido óseo se ha evaluado su citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*, confirmando que en forma porosa tampoco presenta efectos citotóxicos, mientras que el mejoramiento en la resistencia mecánica de piezas porosas aún continúa investigándose. Este trabajo comparó la viabilidad biológica *in vitro* y la resistencia a la flexión de matrices conformadas con alúmina de orden micro y nanométrico, con el fin de estudiar la posibilidad de emplear la alúmina nanométrica en la fabricación de matrices para regeneración ósea con mayor resistencia mecánica que los biocerámicos utilizados actualmente. La evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* se realizó por medio de los ensayos MTT, test cometa y micronúcleos; los resultados obtenidos sugieren que los medios condicionados con polvos de α -Al₂O₃ nanométrica son biocompatibles al no presentar efectos negativos ni alteraciones en el ADN de células mononucleares de sangre periférica humana. La alúmina con tamaño nanométrico proporcionó matrices de mayor resistencia a la flexión equibiaxial (11,40±1,72MPa) que las probetas realizadas con partículas micrométricas (5,27±0,82 MPa), evaluadas según la norma ASTM C1499 – 09, lo cual evidencia el efecto del tamaño de partícula sobre la resistencia mecánica, posiblemente debido a diferencias en los procesos de pre-sinterización y densificación del material. El óxido de aluminio con tamaño nanométrico proporcionó matrices biocompatibles y de mayor resistencia a la flexión que las probetas realizadas con partículas micrométricas, resultado que lo convierte en un material prometedor para el uso en regeneración de tejido óseo.

Palabras Claves: alúmina, técnicas biológicas, test *in vitro*, resistencia a la flexión.

BIOLOGICAL AND MECHANICS CHARACTERIZATION OF MICROMETRIC AND NANOMETRIC α -ALUMINA LIKE POTENTIAL MATERIAL FOR BONE TISSUE RECONSTRUCTION

ABSTRACT

Thick and micrometric aluminum oxide has been used for several years in orthopedic surgery because of its good mechanical properties, low friction and wear coefficients, and inert nature, which makes it chemically stable in physiological environments guaranteeing high biocompatibility. Regarding its use as a component of microporous matrixes for bone tissue regeneration, it has been tasted its cytotoxicity *in vivo* and *in vitro*, confirming that porous shape has no cytotoxic effects, while the enhancing in mechanical strength of porous pieces is still being investigated. This research compared the biological viability *in vitro* and the flexural strength of matrixes formed with aluminum oxide of micro and nanometric order, in order to study the possibility of employing nanometric alumina in fabrication of matrixes for bone regeneration with higher mechanical strength than bioceramics, which are currently offered. Cytotoxic and genotoxic *in vitro* studies were tasted using MTT test, cometa test and micronucleus test; which suggest that conditioned media with α -Al₂O₃ nanometric powder are biocompatible bearing no negative effects or alterations in mononuclear cells DNA of peripheral human blood. Nanometric alumina provided matrixes with higher equibiaxial flexural strength (11,40±1,72MPa) than micrometric material specimens (5,27±0,82 MPa), evaluated according to ASTM C1499 – 09, which evidence the effect of size particle in mechanical strength, likely due to differences in pre-sintering process and densification of each material. Aluminum oxide nanometric sized provided biocompatible matrixes with better flexural strength than samples made with micrometric particles; therefore it becomes a promising material for using in bone regeneration.

Keywords: alumina, biological techniques, *in vitro* test, bending resistance

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el interés y desarrollo de materiales para aplicaciones biomédicas se ha centrado en proporcionar alternativas que puedan reducir los efectos secundarios como inflamación y daño de tejidos en contacto o rechazo de implantes [1, 2, 3] ocasionados por tratamientos contra el cáncer, cirugías de reconstrucción de tejidos duros o blandos, metodologías de diagnóstico, entre otros [4]. Adicionalmente, los materiales diseñados deben contribuir a la recuperación temprana de defectos, a la reparación de tejidos lesionados y órganos deteriorados, y garantizar soporte mecánico y funcionalidad [5].

En el campo de la reconstrucción ósea se emplean diversos materiales 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 [6] y para la regeneración de tejido óseo, se utilizan principalmente injertos biológicos, cerámicos, polímeros y materiales compuestos porosos, como relleno de defectos óseos cavitarios [6, 7].

Actualmente, la implementación de autoinjertos, aloinjertos y xenoinjertos en la reconstrucción ósea proporciona una mejor respuesta mecánica al compararla con materiales sintéticos, pero con la potencial morbilidad del sitio donante, dolor y tiempo prolongado de hospitalización, riesgo de infección, respuesta del sistema inmunológico y transmisión de enfermedades [5, 8, 9]. Entre los materiales sintéticos cerámicos ampliamente usados como sustitutos óseos, por su biocompatibilidad [10], están la hidroxiapatita (HA), que debido a su composición química semejante a la matriz inorgánica del hueso [11], es reconocida por su capacidad para integrarse al tejido óseo [12]; el fosfato tricálcico (TCP), también osteoconductor pero con mayor velocidad de biodegradación [13, 14, 15] y los vidrios bioactivos o biodegradables. Sin embargo, su fragilidad y baja resistencia al impacto y a la tensión, limitan su implementación en defectos óseos en los que la carga funcional sea mínima y en donde no haya que responder a altos esfuerzos mecánicos [15, 16, 17].

El mejoramiento de sustitutos óseos cerámicos con materiales bioactivos reforzados con partículas

caracterizadas por una alta resistencia mecánica como ZrO_2 [15], Al_2O_3 [15, 18, 19] y TiO_2 [15], son tema de estudio desde hace varios años y aunque se han logrado obtener resistencias a la compresión que podrían compararse con las requeridas en hueso trabecular [15], hasta el momento no se ha diseñado un material para regeneración ósea capaz de promover una rápida formación de hueso, en zonas con grandes defectos óseos y con alta demanda mecánica, que permita la disminución de los tiempos de recuperación del paciente.

El óxido de aluminio denso y de orden micrométrico ha sido empleado por varios años en cirugía ortopédica y dental debido a su buena resistencia mecánica, los bajos coeficientes de fricción y desgaste, y su naturaleza inerte, que lo hace estable químicamente en ambientes fisiológicos, y lo cual garantiza una alta biocompatibilidad [13, 20, 21, 22]. En cuanto a su uso como componente de matrices microporosas para regeneración de tejido óseo se ha evaluado su citotoxicidad *in vitro* confirmando que en forma porosa tampoco presenta efectos citotóxicos [22, 23, 24]. En ensayos *in vivo* se ha determinado que factores como la forma del andamio, el tamaño de poro y la distribución e interconexión de poros son aspectos que influyen en la proliferación celular, la osteoconductividad, el crecimiento de nuevo hueso y la vascularización [14, 22, 24]. También se encuentra en la literatura, investigaciones en las cuales se presenta la fabricación de materiales compuestos de óxido de aluminio con partículas de orden micrométrico con características bioactivas, a través de recubrimientos con fosfatos de calcio [14, 25] e HA [22, 25], no solamente para regeneración de tejido óseo sino para la osteointegración de implantes [26]. Los estudios acerca de materiales porosos para la regeneración y reparación de tejido óseo con mayor resistencia mecánica y bioactividad, aún continúan investigándose.

En este estudio se comparó la actividad citotóxica y genotóxica *in vitro* y la respuesta a esfuerzos de flexión biaxial de matrices conformadas con partículas de alfa-alúmina a escala nanométrica frente a matrices de igual composición química y cristalina pero conformadas con tamaños micrométricos de partícula, con el fin de evaluar la influencia de las diferencias en el área superficial y los fenómenos relacionados al tamaño de partícula de óxido de aluminio en el mejoramiento de las

propiedades biológicas y resistencia mecánica del material y con ello dar comienzo al estudio de la viabilidad de matrices de la alfa alúmina conformadas con partículas de orden nanométrico en el área de ingeniería de tejidos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Síntesis de óxido de aluminio nanométrico

Bajo el protocolo reportado por Villegas [27], se sintetizó la alúmina nanométrica empleando como precursores, gel de hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) GEL-P50 (Industrias Químicas Andinas y Cía. S.A) y ácido fórmico (Merck 98-100%) en medio etanólico, para guiar hacia la formación de partículas nanométricas [27]. Se emplearon tiempos de maduración de 48 horas para el sol obtenido, que posteriormente fue secado a 100°C , para llevar a tratamiento térmico a 1200°C , con el objetivo de conseguir la formación de la fase cristalina α del óxido de aluminio [27].

2.2 Caracterización microestructural y microquímica

2.2.1 Estudio de estructuras cristalinas:

La estructura cristalina del óxido de aluminio fue determinada por difracción de rayos X en un equipo Rigaku modelo Miniflex, usando fuente de cobre $\text{K}\alpha_1 \lambda=1,54 \text{ \AA}$ y a una velocidad de barrido de $0,5$ grados de 2θ por minuto, con el fin de definir el tipo de fase conseguida en la alúmina sintetizada. Los resultados obtenidos fueron comparados con patrones de óxido de aluminio proporcionados por el programa X'Pert High Score.

2.2.2 Microestructura:

La morfología y tamaño de las partículas del óxido de aluminio sintetizadas y comerciales, se determinaron mediante microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 5910LV) y microscopio electrónico de transmisión, marca FEI, modelo TECNAI 20, con un voltaje de aceleración de electrones de 200KeV .

2.2.3 Distribución de tamaños de partícula:

Los óxidos de aluminio sintetizado y comercial fueron evaluados por medio de un equipo Mastersizer 2000.

2.2.4 Análisis Microquímico:

La composición química semicuantitativa de los materiales precursores y sintetizados fue analizada

mediante la microsonda EDS, acoplada al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM 5910LV).

2.3 Caracterización biológica

Se empleó una muestra de α -alúmina sintetizada según protocolo reportado por Villegas, *et al*, [27] y una muestra de alúmina micrométrica comercial (Acros Organics); ambas muestras fueron sometidas a inmersión estática durante una semana. La inmersión se realizó adicionando 3 gramos de cada una de las muestras en polvo en tubos cónicos de polipropileno estériles con 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640-HEPES (LONZA) y manteniéndolas en incubación a 37°C y 5% de CO_2 para el condicionamiento de los medios y la evaluación de la citotoxicidad de las posibles sustancias liberadas por las muestras en ellos.

2.3.1 Obtención de muestras biológicas (Células mononucleares de sangre periférica)

Las células se aislaron mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque (Histopaque 1077, Sigma) a partir de 4 ml de sangre periférica humana obtenida por venopunción usando tubos BD vacutanier® con Heparina. Las células mononucleares aisladas se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) a 2000 rpm durante 10 minutos y su viabilidad celular inicial se evaluó mediante el método de exclusión de colorante con azul de tripano (0,4%) (Eurobio). Para los ensayos de biocompatibilidad solo se emplearon muestras aisladas de células mononucleares que presentaron una viabilidad superior al 95%.

2.3.2 Evaluación de la citotoxicidad in vitro (ANSI/AAMI/ISO 10993-5)

Después del condicionamiento de los medios, estos se suplementaron al 10% (v/v) con suero fetal bovino (SFB, Lonza®) y se emplearon para el cultivo de células mononucleares estimuladas con Fitoheماغlutinina (Eurobio-PHA®) en platos de 96 pozos. La citotoxicidad de los posibles productos liberados por los materiales se evaluó mediante la prueba de MTT [28] por cuadruplicado, en la que se cultivaron $1,5 \times 10^4$ células por cada pozo en un volumen final de medio condicionado igual a $100\mu\text{l}$. Todos los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones estándares de incubación durante 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Como control negativo (C-) se emplearon cultivos de células en medio no condicionado y como control positivo (C+) medio

no condicionado al que se le adicionó H_2O_2 (50 μM) durante 1 hora. Al finalizar el tiempo de incubación, se agregó a cada pozo 20 μl de MTT (5mg/ml) (Sigma®) y los cultivos se mantuvieron nuevamente durante 6 horas bajo las mismas condiciones de incubación. Luego, se agregó a cada pozo 100 μl de Isopropanol acidificado y se llevaron los platos a agitación orbital durante 20 minutos. El porcentaje de viabilidad celular se determinó en cada caso con las relaciones de absorbancia respecto al control negativo a 560 nm (lector de ELISA GloMax®-Multi Promega).

2.3.3 Determinación de la genotoxicidad in vitro ANSI/AAMI/ISO 10993-3

La genotoxicidad de los posibles productos liberados a los medios se evaluó mediante el ensayo cometa y el test de micronúcleos [29, 30, 31]. Posterior al cultivo de células mononucleares en los medios condicionados, se obtuvieron suspensiones celulares a una concentración de 1×10^4 células/ml en 200 μl . Como control negativo (C) se emplearon cultivos de células en medio no condicionado y como control positivo (C^+) cultivos celulares en medio no condicionado con H_2O_2 (50 μM). Se mezclaron 10 μl de cada una de las suspensiones celulares con 90 μl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP 0.5% en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++}) y se sirvieron sobre láminas base preparadas previamente con agarosa de punto de fusión normal (NMP 1% en PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++}). Las células embebidas en agarosa se incubaron de forma horizontal a 4°C por 10 minutos para su solidificación e incubación en solución de lisis a pH=10 durante 18 horas a 4°C. Posterior a ello y en oscuridad, se lavaron las placas con PBS frío y se incubaron en buffer de electroforesis (NaOH (300mM), EDTA (1mM), pH=13) durante 20 minutos y luego se sometieron a electroforesis horizontal en este mismo medio durante 30 minutos a 25V y 300mA. Las placas fueron neutralizadas con una solución de Tris-HCl (pH 7,5) y deshidratadas con metanol para su tinción con bromuro de etidio (0,02mg/ml). Los resultados fueron visualizados en microscopio de fluorescencia (NIKON) con lente de 40X y las imágenes tomadas, fueron analizadas con el software Comet-Score® usando el porcentaje de ADN en cabeza (relación entre las intensidades de la cabeza y cola) y el momento de cola como el producto de la distancia (en dirección x) del centro de gravedad de la cabeza

y de la cola, dividido por el porcentaje de ADN en la cola.

Para la evaluación de genotoxicidad con el uso del test de micronúcleos, se cultivaron $1,5 \times 10^4$ células por pozo en 100 μl de los medios condicionados durante 72 horas bajo las condiciones de incubación descritas en el numeral 2.3.2. Como controles se emplearon cultivos de células en medio no condicionado y al control positivo (C^+) se le adicionó Mitomicina C (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante las últimas 48 horas de cultivo. Para la observación de estructuras nucleares se adicionó a todos los cultivos Citocalasina B (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (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 sörense. Para el análisis se empleó microscopía de campo claro para el recuento de 1000 células por tratamiento haciendo distinción entre células que presentaron uno o más micronúcleos de acuerdo a los parámetros establecidos por Zalacain [32].

Se reportó el porcentaje de células mononucleares con micronúcleos de cada tratamiento y se estimó el índice de división nuclear (IDN) usando la ecuación 1 [33].

$$IDN = \frac{1X_1 + 2X_2 + \dots + nX_n}{N} \quad (1)$$

N: número de células analizadas totales

n. número máximo de micronúcleos encontrados

X_n : número de células con n micronúcleos

2.3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos en cada uno de los ensayos se realizó usando el software StatGraphics®Centurion para modelos completamente al azar. Se realizó un Análisis de varianza (ANAVA) de una vía y prueba t para comparación múltiple. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos cuando se obtuvieron valores p inferiores a 0,05.

2.4 Caracterización Mecánica

2.4.1 Conformado uniaxial del material cerámico comercial y sintetizado.

La alúmina sintetizada y la alúmina comercial (Acros Organics) se conformaron en probetas

cilíndricas de 20 mm de diámetro y 1,50 mm de espesor mediante prensado uniaxial a 27,59 y 34,48 MPa durante 30 segundos. Para ello se empleó 84% de óxido de aluminio, 16% de alcohol polivinílico (Alfa Aesar®) (7% p/p) como aglomerante.

2.4.2 Presinterización de las probetas y porosidad.

Las probetas se pre-sinterizaron mediante un procedimiento isotérmico a 1200°C por 3 horas con una velocidad de calentamiento de 5°C.min⁻¹. Luego se evaluó la porosidad de 20 probetas de cada grupo a través de un método gravimétrico, en el que la saturación al vacío de las probetas con agua destilada, permitió evaluar el volumen poroso efectivo, es decir, aquel a través del cual puede pasar el fluido. Además, a través del microscopio electrónico de barrido, SEM (JEOL JSM 5910LV), se determinó el tamaño de poros que presentaron las probetas al observarlas a través de su sección transversal.

2.4.3 Evaluación de resistencia a la flexión equibiaxial según norma ASTM C 1499-09

Las cuarenta probetas entre alúmina sintetizada y el material comercial se sometieron a flexión entre dos anillos concéntricos a temperatura ambiente bajo carga monotónica, esto se realizó en una máquina universal de ensayos mecánicos de marca Shimadzu Scientific Instrumens Inc., a una velocidad de desplazamiento del indentador de 0,1 mm.min⁻¹.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización microestructural y microquímica

De acuerdo al protocolo reportado por Villegas [27], se logró reproducir la alúmina con partículas de tamaño nanométrico y fase cristalina alfa, lo cual se verificó al comparar el patrón de difracción de rayos X del óxido de aluminio en fase alfa (Código ICSD No. 00-010-0173 X'PertHighScore) con la muestra sintetizada (Figura 1), en el cual no se observaron trazas de impurezas.

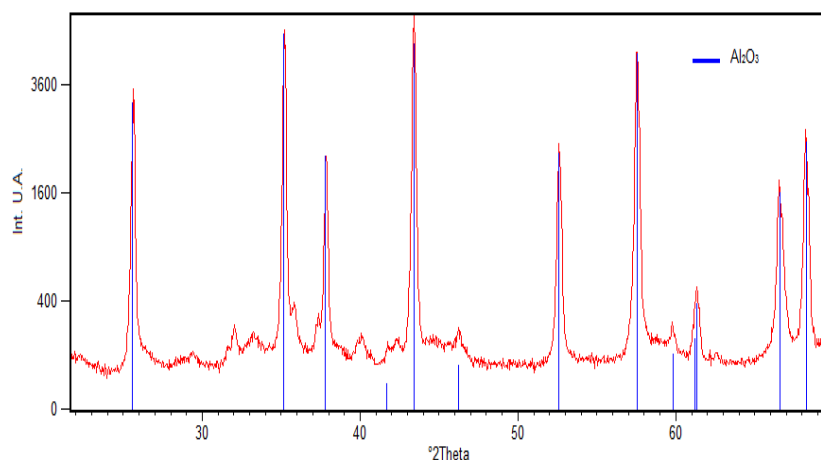


Figura 1. Comparación del espectro de difracción de rayos X de la alúmina sintetizada con un patrón de óxido de aluminio.

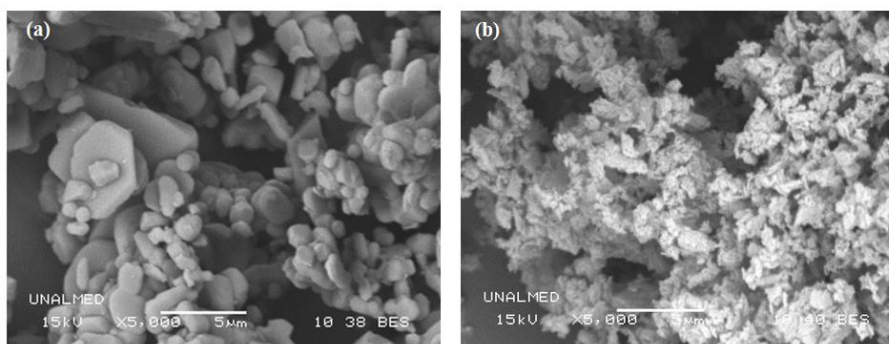


Figura 2. Imágenes de SEM del óxido de aluminio comercial (a) y del óxido de aluminio sintetizado (b).

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió confirmar que el tamaño de las partículas obtenidas mediante la síntesis sol-gel modificada es menor a la que presenta la alúmina comercial (Figura 2), además se observaron diferencias en la morfología de las partículas, por ejemplo, la muestra sintetizada presentó una morfología de agujas con tamaños menores de $5\text{ }\mu\text{m}$ de longitud aproximadamente y sección transversal del orden nanométrico (Figura 2b) con una tendencia a partículas finas, presentando conglomerados con tamaños secundarios mayores de $5\text{ }\mu\text{m}$.

Mediante la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se pudo concluir que las partículas primarias fueron de orden nanométrico, menores de 100 nm (Figura 3a), las cuales se agruparon formando conglomerados con tamaños superiores a 250 nm (Figura 3b). El estudio de la alúmina comercial a través de microscopía electrónica de barrido mostró partículas con tamaños superiores a $5\text{ }\mu\text{m}$ en su mayoría, con una morfología similar a paralelepípedos irregulares y un espesor micrométrico, aunque también presentaron partículas en forma de lentejas aplanadas de $2\text{ }\mu\text{m}$ aproximadamente (Figura 2a). El análisis de la distribución del tamaño de partículas estableció que la alúmina sintetizada presentó una distribución bimodal con picos a $2,512\text{ }\mu\text{m}$ y $34,674\text{ }\mu\text{m}$, en un intervalo de tamaños de partícula de $0,336 - 138,038\text{ }\mu\text{m}$ y un D50 de $8,883\text{ }\mu\text{m}$, también se encontró que el área superficial de éstas fue de $1,79\text{ m}^2/\text{g}$, siendo mayor que para la alúmina comercial ($0,0636\text{ m}^2/\text{g}$), la cual presentó una distribución de tamaños de partícula monomodal con un máximo de $104,7\text{ }\mu\text{m}$ en un rango de tamaños de partícula entre $39,811 - 239,883\text{ }\mu\text{m}$ y un D50 igual a $100,052\text{ }\mu\text{m}$; al comparar estos resultados en el caso de la alúmina sintetizada se observa que la distribución de tamaños corresponde a los conglomerados observados por microscopía de transmisión, resultado que conduce sugerir la hipótesis de que en los procesos térmicos realizados a 1200°C , las partículas sintetizadas no solamente establecen su fase cristalina alfa sino que también presentan procesos de sinterización. El análisis químico semi-cuantitativo proporcionado por la sonda EDS corroboró la pureza obtenida en el material sintetizado, puesto que a través de ella se determinó solamente la presencia de átomos de aluminio y oxígeno en porcentajes atómicos de

$42,60\text{ }\%$ Al y $57,40\text{ }\%$ O, lo que corresponde a la relación molar 2:3, lo mismo sucedió en el caso del material comercial en el cual se encontró porcentajes atómicos de $46,39\text{ }\%$ Al y $53,61\text{ }\%$ O.

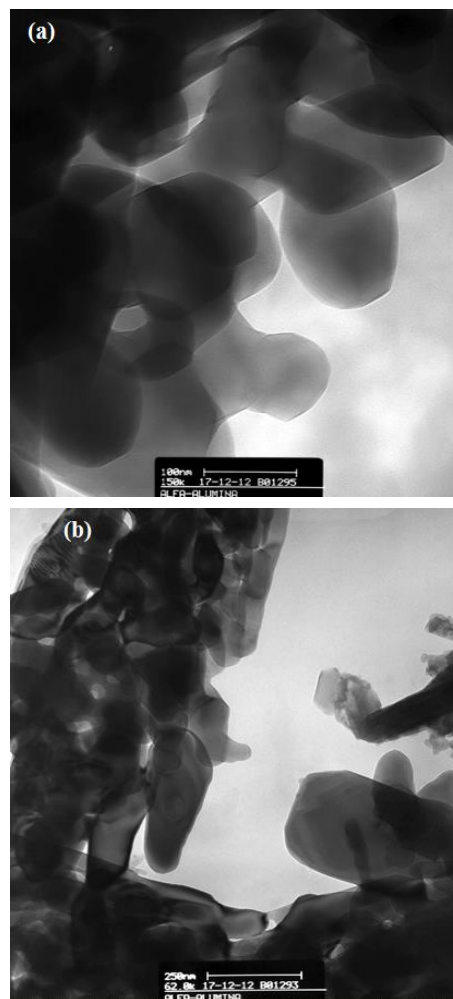


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión del óxido de aluminio sintetizado en polvos desaglomerados (a) y en conglomerados (b).

3.2 Comparación de la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* del óxido de aluminio comercial y sintetizado

Mediante la prueba de MTT se realizó la comparación de las medias del porcentaje de viabilidad celular a partir de los tratamientos con alúmina sintetizada y comercial encontrando que respecto al control negativo, la alúmina sintetizada no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), mientras que la alúmina comercial sí exhibió diferencias (Figura 4). Esto sugiere que los medios condicionados durante la inmersión estática de alúmina sintetizada en fase alfa, no produce

efectos citotóxicos sobre células mononucleares, es decir, que los posibles productos liberados por el material al medio durante un periodo de una semana no interfieren con la viabilidad celular, contrario a lo observado con el óxido de aluminio comercial.

Dado que el ensayo se realizó con los sobrenadantes de los medios expuestos a los materiales y no por contacto de estos con las células, no es posible atribuir la diferencia en los resultados a la diferencia en los tamaños de estos. Una razón podría ser que en el proceso de condicionamiento con la alúmina comercial se afectó ligeramente el pH del medio, el cual es un factor que podría influir en la respuesta celular. Además, a través de un estudio de los medios condicionados mediante absorción atómica se encontró mayor cantidad de iones Ca^{2+} en la muestra de alúmina comercial, lo cual puede interferir en la respuesta celular, por esta razón, se

recomienda tener en cuenta estas variables en próximos estudios.

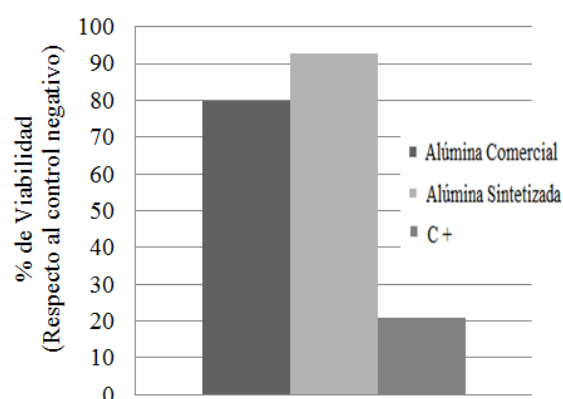


Figura 4. Porcentaje de viabilidad de células mononucleares humanas cultivadas en los medios condicionados.

Tabla 1. Resumen estadístico de porcentajes obtenidos con el ensayo cometa para los diferentes medios analizados

Tratamiento	Número de células con daño ^a	% Media ADN en cabeza	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
C +	12	89,8018	15,2129	16,94%	45,5237	99,9757	54,452
Alúmina Comercial	11	93,1555	10,4241	11,19%	62,2867	99,9987	37,7121
Alúmina Sintetizada	6	97,6437	3,5482	3,63%	86,1059	99,9862	13,8803
C -	2	99,0967	1,36345	1,38%	92,8708	99,9989	7,12811

^a Número de células con daño que se presenta corresponde a aquellas con daño superior al 30%.

Los porcentajes de ADN en cabeza obtenidos a través del ensayo cometa se encuentran resumidos en la Tabla 1. En ella se observa que la alúmina comercial al compararla con el control negativo presenta una diferencia estadísticamente significativa. Es claro también que la alúmina comercial presenta un efecto menor que el control positivo pero mayor que el efecto de la alúmina nanométrica y el control negativo.

Cuando se contrasta la alúmina sintetizada con el control negativo se observa que hay un efecto ligeramente mayor, no obstante, la producción de núcleoides que presentaron un daño agudo es menor respecto al producido con la alúmina comercial y al control positivo. Además, existen entre los tratamientos diferencias estadísticamente

significativas ($p < 0,05$) entre las medias de porcentaje de ADN en cabeza. El análisis de los resultados obtenidos por esta técnica sugiere que los medios condicionados con alúmina sintetizada presentan menor efecto genotóxico que la muestra de alúmina comercial.

La prueba de micronúcleos proporcionó los valores de índice de división nuclear y el porcentaje de células con presencia de micronúcleos que se resumen en la tabla 2. Los porcentajes de células con micronúcleos en las muestras analizadas son similares a los encontrados en células sin tratamiento (C-), diferenciándose de los valores encontrados para las células del control positivo tratadas con Mitomicina C. Al analizar la actividad genotóxica mediante el ensayo de micronúcleos, se

pudo determinar que no hay producción significativa de micronúcleos en las células expuestas a los medios condicionados con cada uno de los materiales. De la similitud de los índices de división nuclear puede inferirse que los tratamientos no alteran de forma aguda el material genético y son acordes a los valores esperados para este tipo celular [34].

Tabla 2. Valores obtenidos para los diferentes medios analizados.

Tratamiento	% células con micronúcleos ^a	IDN
C -	0,4	1,005
C +	4,5	1,006
Alúmina Sintetizada	0,6	1,007
Alúmina Comercial	0,5	1,006

^a sobre un total de 1000 células

3.3 Comparación de la porosidad y la resistencia a la flexión equibiaxial

La resistencia a la flexión equibiaxial fue evaluada en matrices conformadas con óxido de aluminio

comercial y sintetizado para poder determinar el efecto del tamaño de partícula. La tabla 3 contiene los valores de resistencia a la flexión determinados bajo la norma ASTM C 1499-09 [35] y el porcentaje de porosidad correspondiente, donde se observó que las matrices conformadas con el material sintetizado para las dos presiones de conformación estudiadas, presentan una resistencia a la flexión que duplica el valor de la resistencia obtenida con las matrices conformadas con el material comercial.

Las fotomicrografías de los materiales analizados (Figura 5) muestran que a medida que disminuye la presión de conformación, mayor es la presencia de poros en los dos materiales en estudio, debido al menor empaquetamiento de partículas. Respecto a la matriz con alúmina comercial conformada a 27,59 MPa (Fig. 5 a) y las probetas con alúmina sintetizada a ambas presiones (Fig. 5 c y d) se observa que presentan grietas que cambian de dirección, lo cual puede explicar la mayor resistencia a la flexión que ellas presentan. En el caso de las matrices conformadas con alúmina comercial se observa que la porosidad medida fue menor a menor presión de compactación, mientras que en las probetas con alúmina sintetizada se observa una mayor resistencia a la flexión a menor porosidad (ver tabla 3).

Tabla 3. Valores de porosidad y resistencia a la flexión equibiaxial

Tratamiento	Alúmina Comercial		Alúmina Sintetizada	
Presión de conformado, MPa	27,59	34,48	27,59	34,48
Resistencia a la flexión, MPa	5,27 ± 0,82	4,84 ± 1,07	11,40 ± 1,72	11,98 ± 2,73
Porosidad, %	45,50 ± 0,84	56,99 ± 1,42	58,60 ± 0,82	55,54 ± 1,31

En la figura 6 se observa que los tamaños de poro de las probetas fabricadas presentan un tamaño menor de 5 micras, pero las diferencias radican en la unión causada por la sinterización del material a 1200°C, ya que en las muestras sintetizadas se observa una mayor proporción de grandes granos formados con partículas en forma de agujas sinterizadas, mientras que en el material comercial se observa la sinterización de granos de varios tamaños de mayor dimensión que las partículas sintetizadas, razón por la que es evidente un efecto provocado por las diferencias entre el tamaño de partícula, la distribución de tamaños de partícula y

conglomerados, el factor de empaquetamiento, el área superficial, además de otros fenómenos que dependen de estas variables y que afectan la resistencia a la flexión de las matrices sinterizadas.

La distribución de Weibull ha sido ampliamente empleada en la caracterización mecánica de materiales frágiles como los cerámicos, asumiendo que la resistencia depende de la presencia de defectos en el material [36]. La figura 7a muestra un módulo de Weibull de 7,4545 para las probetas realizadas con partículas de óxido de aluminio comercial frente a un módulo de 7,1391 en las probetas elaboradas con material sintetizado, aunque

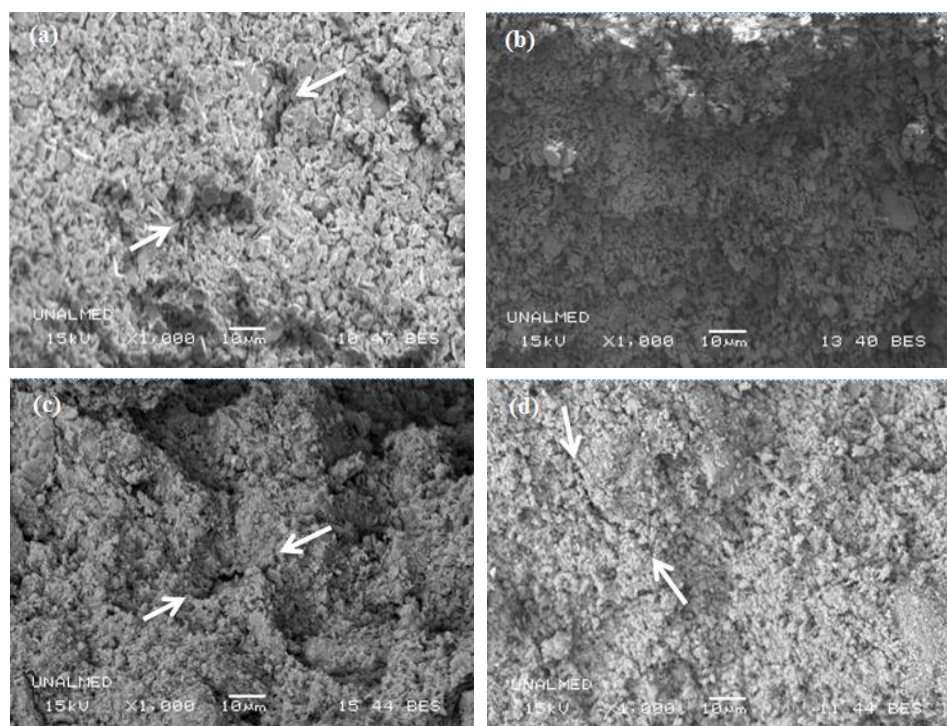


Figura 5. Sección transversal de matrices porosas: (a) Al_2O_3 comercial conformadas a 27,59 MPa, (b) Al_2O_3 comercial conformadas a 34,48 MPa, (c) Al_2O_3 sintetizada conformadas a 27,59 MPa, (d) Al_2O_3 sintetizada conformadas a 34,48 MPa.

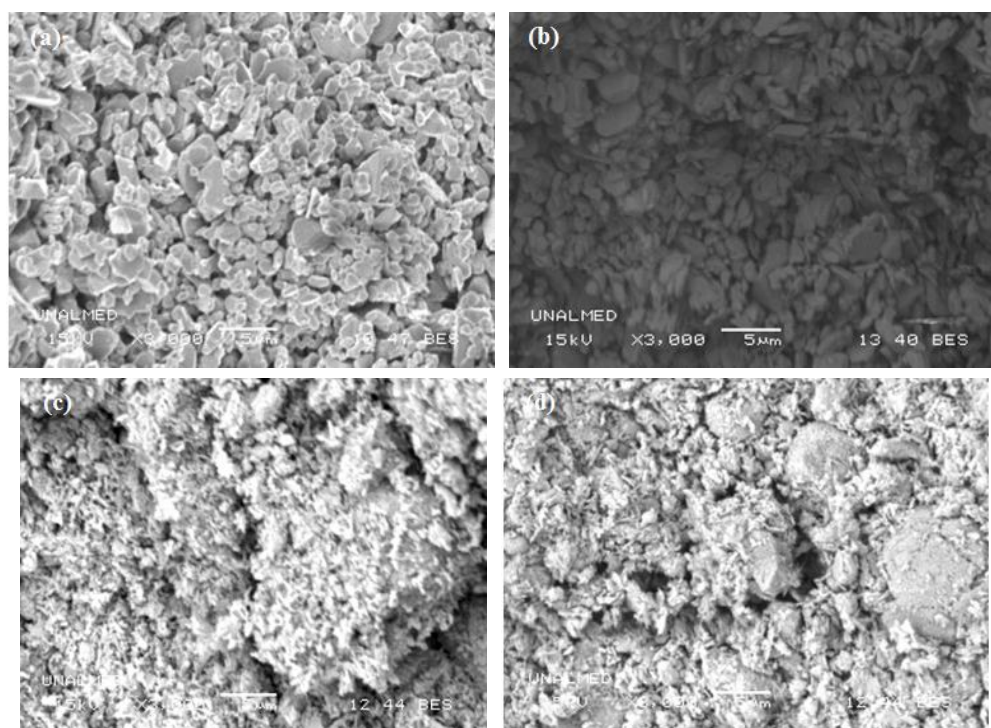


Figura 6. Tamaños de poro de matrices: (a) Al_2O_3 comercial conformadas a 27,59 MPa, (b) Al_2O_3 comercial conformadas a 34,48 MPa, (c) Al_2O_3 sintetizada conformadas a 27,59 MPa, (d) Al_2O_3 sintetizada conformadas a 34,48 MPa.

son valores muy cercanos para este indicador, se plantea una dispersión de fallas en las probetas fabricadas con el material comercial comparables en confiabilidad con la resistencia a la flexión de las muestras sintetizadas y conformadas a presiones de compactación de 27,59 MPa (Figura 7a). Un caso similar se encuentra para la presión de conformación de 34,48 MPa, aunque con una diferencia mucho menor entre los módulos de Weibull.

El esfuerzo característico (σ_c), para el cual se tiene

una probabilidad de falla del 62,3%, es 2,17 veces superior para las matrices fabricadas con alúmina sintetizada frente a las realizadas con la alúmina comercial en las muestras conformadas a una presión de 27,59 MPa. En el caso de las probetas conformadas a 34,48 MPa de presión uniaxial (Figura 7b), el esfuerzo característico en las muestras nanométricas fue 2,48 veces superior que las obtenidas con el material comercial.

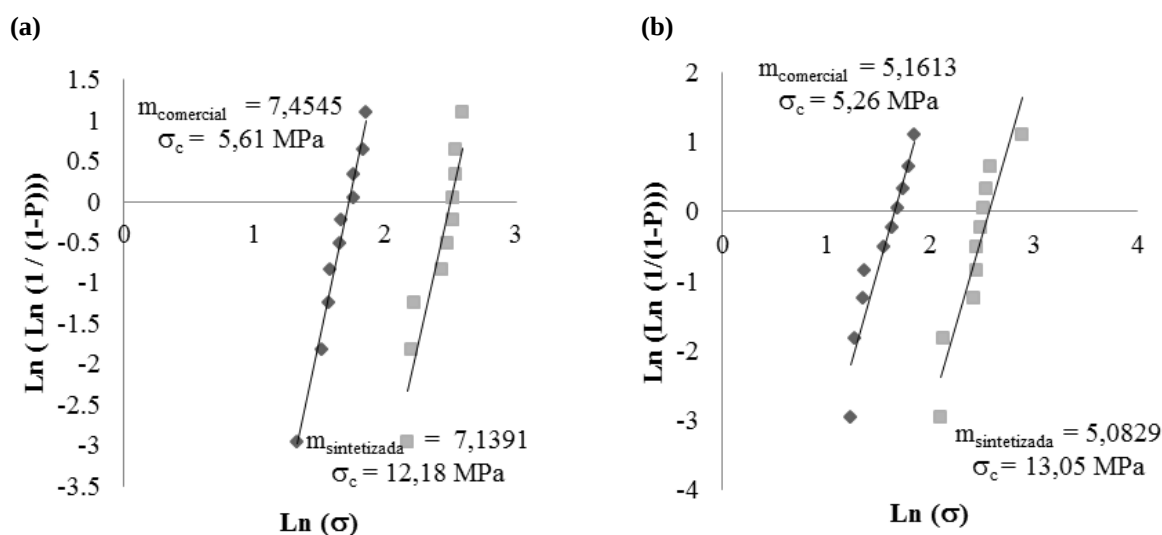


Figura 7. Efecto del tamaño de partícula en la resistencia a la flexión. (a) Conformadas a 27,59 MPa y (b) Conformadas a 34,48 MPa.

4. CONCLUSIONES

La implementación de las técnicas de citotoxicidad y genotoxicidad para la evaluación de la biocompatibilidad debe constituir la primera fase en el desarrollo y aplicación de materiales de uso biomédico. En estos procesos es necesario que se consideren diferentes aspectos que incluyan el estudio del metabolismo, división y regulación celular, entre otros. Es en este punto, el uso de cultivos con células mononucleares se convierte en una buena herramienta para estimar los posibles efectos citotóxicos y genotóxicos del material [37, 38, 39], ya que participan en diferentes procesos inmunológicos constituyendo una primera barrera, además, su obtención es viable cuando no se cuenta con líneas celulares establecidas. No obstante, el modelo podría presentar limitaciones o restricciones al momento de extrapolar los resultados con los diversos tejidos y sistemas biológicos, y en

particular la cercanía o no del tipo celular seleccionado para el estudio.

El óxido de aluminio fase cristalina alfa de tamaño nanométrico (menor de 100 nm y conglomerados de 250 nm) y tamaños micrométricos (superiores a 5 μ m) bajo las condiciones de estudio y con las técnicas aplicadas, no presentó efectos citotóxicos. Respecto a la genotoxicidad se observó que los resultados obtenidos por medio del test cometa manifiestan efectos sobre el ADN en la muestra comercial, sin embargo la evaluación con micronúcleos revela que no existe un daño genético agudo para el tipo de células evaluadas, lo cual, sugiere la necesidad de realizar un estudio más detallado en este aspecto. La evaluación de la resistencia a la flexión equibiaxial de las muestras estudiadas evidencia el efecto de variables como: el tamaño de partícula, la distribución de tamaños de partícula y conglomerados, el factor de

empaquetamiento, el área superficial, el mecanismo de agrietamiento, entre otros, las cuales dieron como resultado el incremento de 2,45 veces la resistencia de las probetas al emplearse el material sintetizado. Por el valor obtenido en la resistencia a la flexión con el óxido de aluminio sintetizado ($11,40 \pm 1,72$ MPa y $58,60 \pm 0,82\%$ de porosidad) se podría comenzar el estudio para su implementación en la reparación de hueso trabecular, el cual se caracteriza por una resistencia a la flexión de 10-20 MPa [13].

La evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* y la resistencia a la flexión de probetas conformadas con óxido de aluminio nanométrico constituye la primera etapa para su caracterización como biomaterial y se considera un ensayo preliminar con limitaciones. El estudio no descarta citotoxicidad del material como tal, solo permitió evaluar si de acuerdo a las proporciones usadas con la solución de cultivo no se liberan sustancias químicas solubles en el medio de cultivo y no proporciona información sobre sus capacidades para soportar funcionalmente el crecimiento celular característica primordial en la valoración del potencial para uso en aplicaciones de ingeniería tisular y que será evaluada en próximos estudios.

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

- [1]. Pareja A, García C, Abad P, Marquéz M. Iatreia Revista médica Universidad de Antioquia. 2007; 20,(1): 12-20.
- [2]. Pelaéz A, Pareja A, García C, Marquéz M, Toro A. Key Engineering Materials. 2005; 1: 593-596.
- [3]. Galliano P. Cuad de Cerám y vit. 1999; 8: 32-35.
- [4]. Prasad GL. "Biomedical Applications of Nanoparticles". En: Safety of Nanoparticles Nanostructure Science and Technology. New York (EE.UU.): Springer, 2009, p. 89-109.
- [5]. Lichte P, Pufec T, Kobbe P, Fischer H. Injury, Int. J. Care Injured. 2011;42: 569-573
- [6]. Jones FH. Surface Science Reports. 2001; 42: 75-205.
- [7]. Hongjian Z, Jaebeom L. Acta Biomaterialia. 2011; 7, 2769-2781.
- [8]. Estrada C, Paz A, López L. Revista EIA, 2006; 5: 93-100.
- [9]. Fu Q, Saiz E, Mohamed N, Rahaman C, Antoni, P. Materials Science and Engineering: C. 2011; 31(7): 1245-1256.
- [10]. Negroiu G, Piticescu R, Chitanu M, Mih G. J Mater Sci: Mater Med. 2008;19:1537-1544.
- [11]. Palumbo B, Xavier R. Estudio in vitro del comportamiento de cementos basados en fosfato de calcio para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos, Tesis Ph.D. Cataluña (España): Universidad Politécnica de Cataluña, 2004.
- [12]. Garima T, Basu B. Ceramics International.2012; 38: 341-349.
- [13]. Hench LL, Wilson J. "Chapter 1. Introduction"En: An introduction to bioceramics. London (Inglaterra): World Scientific Publishing, 1993, p. 1-25.
- [14]. Jun YK, Kim WH, Kweon O, Hong S. Biomaterials. 2003; 24: 3731-3739.
- [15]. Kailasanathan C, Selvakumar, N. Ceramics International. 2012; 38: 3569-3582.
- [16]. Rezwani K, Chen QZ, Blaker JJ, Boccaccini AR. Biomaterials. 2006; 27: 3413-3431.
- [17]. Vallet-Regí M. C. R. Chimie. 2010; 13: 174-185.
- [18]. Evis Z, Doremus R. Materials Science and Engineering C. 2007; 27: 421-425.
- [19]. Mohammad S, Zamanian, A. Ceramics International. 2013; 39: 9835-9844.
- [20]. Webster T, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Biomaterials. 2000; 21:1803-1810.
- [21]. Webster T, Ergun J, Doremus R, Siegel R, Bizios R. Fourth International Conference on Nanostructured Materials. 1999; 12: 983-986.
- [22]. Bose S, Darsell J, Hosick H, Yang L, Sarkar D, Bandyopadhyay A. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2002; 13: 23-28.
- [23]. Eckert KL, Rok SU, Mathey M, Mayer J, Wintermantel E. Biomaterials. 2000; 21: 63-69.
- [24]. Eckert KL, Rösler U, Mathey M, Mayer J, Wintermantel E, Hofmann H. Biomaterials. 1993; 6: 251-255.
- [25]. Rambo CR, Müller FA, Müller L, Sieber H, Hofmann I, Greil P. Materials Science and Engineering C, 2006; 26: 92 - 99.
- [26]. Takaoka T, Okumura M, Ohgushi H, Inoue K, Takakura Y, Tamai S. Biomaterials. 1996; 17: 1499-1505.

- [27]. Villegas P, Paucar C, García C. Boletín de ciencias de la tierra. 2010; 28: 51-60.
- [28]. Mossman T. Journal Immunol Methods. 1983; 65: 55-63.
- [29]. Snigh N, McCoy M, Tice RS, Schneider E. Experimental Cell Research. 1988; 175,(1):184-191.
- [30]. Schmid W. Mutat. Res.1975; 31: 9-15.
- [31]. Fenech M. Mutation Research. 2006; 600: 58-66.
- [32]. Zalacaín M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. An. Sist. Sanit. Navar. 2005; 28, (2): 227-236.
- [33]. Fenech M, et al. Mutantion Research. 2003; 534: 65-75.
- [34]. Castillo E, Guevara-Fujita ML, Fujita R. Rev. Perú. Biol. 2011; 18, (2): 261 – 263.
- [35]. Norma ASTM C1499-09, Standard Test Method for Monotonic Equibiaxial Flexural Strength of Advanced Ceramics at Ambient Temperature, Filadelfia (EE.UU.): American Society for testing and Materials, 2009.
- [36]. Sarkar S, Das P. Materials Chemistry and Physics. 2012; 137: 511-518.
- [37]. Wilson S, Lelah M, Cooper S. “Biocompatibility”. En: Blood- Materials interactions: Assessment of in vitro test methods. Boca Ratón (EE.UU.): CRC Press Inc. 1986, p. 151-154.
- [38]. Weichert H, Blechschmidt I, Schroder S, Ambrosius H. Allergie and Immunology.1991; 37, (3-4):139-144.
- [39]. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. Biomaterials.1993;14,(5): 359–364.