

# Caracterización biológica de un composite de Hidroxiapatita bovina sinterizada.

R Comín<sup>1,4</sup>, M. P. Cid<sup>1,2</sup>, L. Reyna Musso<sup>4</sup>, L. Grinschpun<sup>3</sup>, R. A. M. Taborda<sup>4</sup> y N. A. Salvatierra<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Ingeniería Biomédica. Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

<sup>2</sup>IIBYT-CONICET. Argentina.

<sup>3</sup>Laboratorio de Ensayos. Centro de Vinculación Materiales y Tecnología. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina

<sup>4</sup>LIAD (Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo). Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.

[romicom@gmail.com](mailto:romicom@gmail.com)

**Resumen.** El objetivo principal de este estudio fue evaluar la morfología y adhesión celular de dos líneas celulares cultivadas en presencia de un composite de hidroxiapatita bovina sinterizada preparada en nuestros laboratorios. Se utilizaron las líneas celulares NIH 3T3, de origen fibroblástico y VERO, de origen epitelial. Esta última es una de las líneas celulares recomendada por la norma ISO 10993 para la evaluación de la citotoxicidad de los dispositivos médicos. La morfología y adhesión celular se evaluó mediante la utilización de microscopía electrónica de barrido. Los resultados mostraron que ambas líneas celulares fueron capaces de proliferar en presencia de HA, sin embargo solo células NIH 3T3 fueron capaces de adherirse y proliferar sobre la superficie de HA. Por lo tanto, la HA utilizada en estos ensayos no mostró efectos citotóxicos e incluso fue un sustrato adecuado para esta línea celular constituyendo un insumo factible para la fabricación de implantes.

## 1. Introducción

La hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ , HA) ha logrado captar una atención significativa en el campo de los biomateriales debido a la similitud en su composición con los huesos y los dientes humanos y su excelente biocompatibilidad [1]. HA es un material biocompatible y bioactivo. Cuando HA se implanta en el tejido óseo, la formación de hueso se puede producir en su superficie, y a continuación, HA se une directa y fuertemente al hueso [2-4]. El establecimiento de una interfaz estable entre un biomaterial y su entorno biológico es impulsado tanto por el tipo y las propiedades de la superficie del material como por el estado biológico de los tejidos. Características de la superficie de materiales tales como topografía, humectabilidad, química o energía superficial son importantes porque afectan las interacciones biológicas en el material [5-6] y son también una característica importante para la biocompatibilidad in vitro y estudios de citotoxicidad. Por lo tanto el control de la adhesión celular al

biomaterial es primordial para guiar la proliferación, migración y diferenciación de las células asegurando la correcta integración del biomaterial al tejido.

En la actualidad, una de las principales aplicaciones de HA es como material de relleno en odontología y se dispone comercialmente de una variedad de productos tales como matrices de hueso en polvo y granulada o de HA granulada. En nuestro grupo desarrollamos un composite de HA bovina sinterizada. La obtención de este material tiene la ventaja de utilizar hueso bovino como fuente de HA haciendo más fácil su obtención y tratamiento con respecto al material de origen humano. Asimismo, al tratarse de un material sinterizado podría utilizarse también como sustituto óseo de pequeñas dimensiones. En estudios previos encontramos que discos de HA sinterizada mostraron no ser tóxicos en ensayos *in vitro* con células Vero [7]. En el presente trabajo continuamos con la caracterización biológica de este biomaterial analizando por un lado la morfología de las células expuestas a extractos de HA y por otro, la proliferación de las mismas sobre discos de HA.

## 2. Materiales y métodos

La HA utilizada en este estudio se obtuvo a partir del calcinado de huesos de origen bovino. Luego de la remoción de tejido visible sobre la superficie del hueso y el calcinado a 900 °C (60 min) se realizó la molienda en molino centrífugo de bolas durante 30 min. Posteriormente se efectuó el tamizado (malla de 420 µm) y el prensado de los polvos. Este último se hizo de forma uniaxial en frío en una prensa hidráulica a 300 MPa, en matrices cilíndricas de acero de 8 mm diámetro. Finalmente se sinterizaron las muestras en verde a 1000 °C al aire durante 60 min. Los discos obtenidos se limpiaron por sonicación en acetona y agua destilada, durante 10 min en cada caso. Finalmente las muestras se esterilizaron en autoclave a 121°C.

### 2.1 Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares: una de origen epitelial (Vero) y otra de origen fibroblástico (NIH 3T3). La primera es una de las líneas celulares sugerida por la Norma ISO 10993 para evaluar toxicidad de materiales para uso médico [8] y la segunda es elegida debido a la similitud funcional de los fibroblastos con la población celular más abundante en huesos (osteoblastos). Las mismas se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Pasching, Austria), 4 mM de L-Glutamina (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ), 4 mM de Piruvato de Sodio (Sigma, St Louis, USA) y 10.000 unidades/mL de penicilina-10.000 µg/mL de estreptomina, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo se renovó cada 3 días.

### 2.2 Efecto de los extractos de HA sobre la morfología y densidad de células Vero.

Se analizó la morfología de las células Vero expuestas a los extractos de HA mediante microscopía electrónica de barrido. Este análisis se llevó a cabo en el LASEM, INIQI-CONICET, UNSA. Se utilizó un Microscopio Electrónico de barrido Marca JEOL modelo JSM 6480 LV. El extracto fue preparado de acuerdo con la norma ISO 10993-12 [9]. Los discos de HA se mezclaron con el medio de cultivo a una concentración de 0,100 g/mL y se incubó a 37°C durante 72 hrs. A continuación los discos se removieron para obtener los extractos. Las células se sembraron en pocillos conteniendo diferentes diluciones del extracto original (50 y 100%) a una densidad de 10.000 células/pocillo. Células cultivadas en ausencia de extracto se utilizaron como control negativo.

### 2.3 Análisis de la adhesión de células Vero y NIH 3T3 a discos de HA.

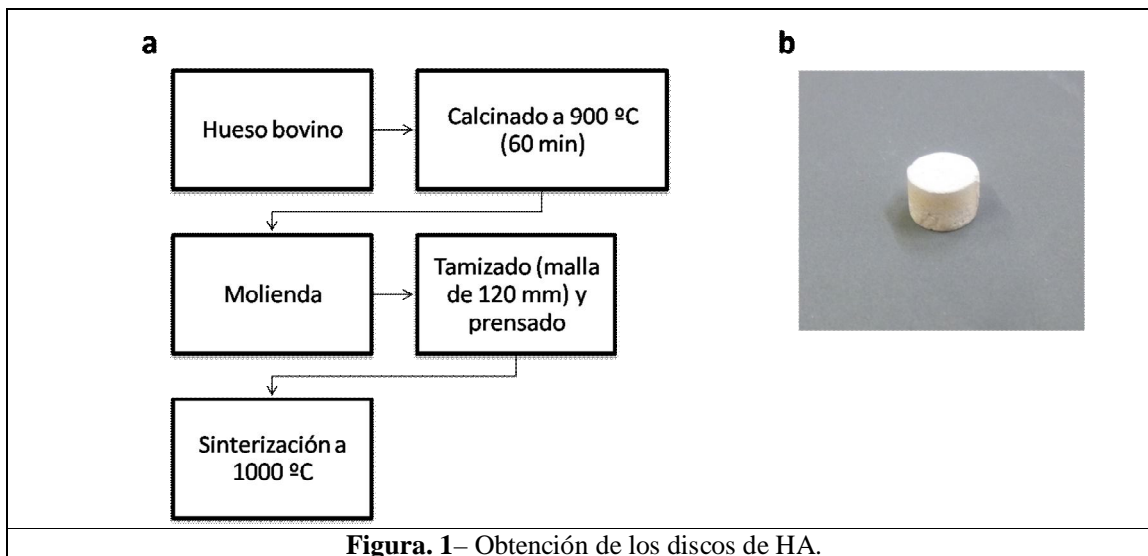
La adhesión de células Vero y NIH 3T3 a discos de HA fue evaluada por microscopía electrónica de barrido. Los discos de HA se colocaron en placas de cultivo. Se sembraron las células a una concentración de 10.000 células /pocillo y se cultivaron a 37° C. Como control de crecimiento celular se sembraron células sobre cubreobjetos de vidrio en idénticas condiciones. Después de 4 días, las muestras se lavaron cuidadosamente con PBS y se fijaron durante toda la noche en 4% de

glutaraldehído en PBS a 4 ° C. A continuación las muestras fueron procesadas y examinadas en un microscopio electrónico de barrido.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Obtención de los discos de HA

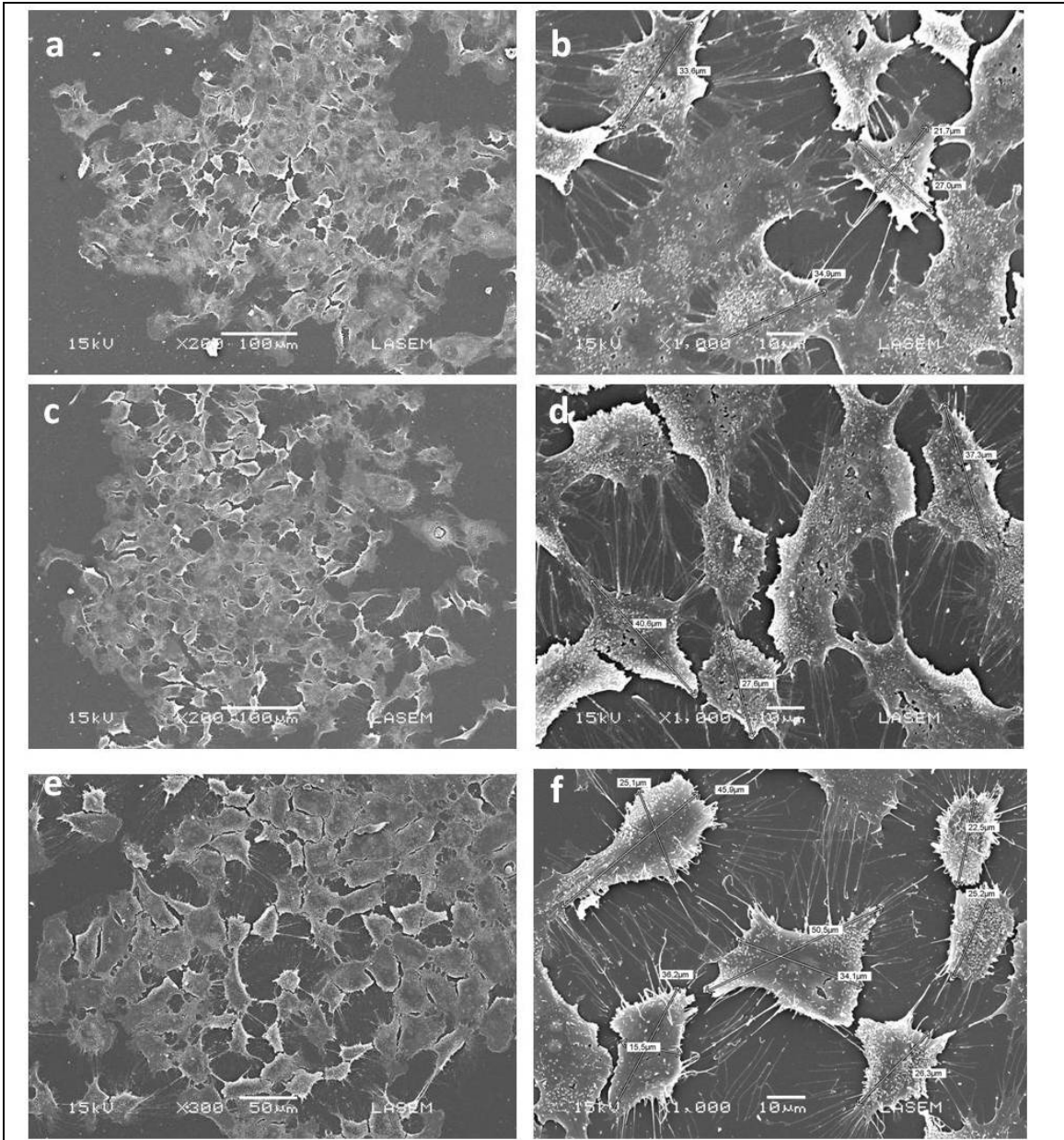
En Fig. 1 se muestra el esquema de los pasos seguidos para la obtención de los discos de HA (figura 1a) y una imagen macroscópica de dicho disco (figura 1b)



**Figura. 1**– Obtención de los discos de HA.

#### 3.2 Efecto de los extractos de HA sobre la morfología y densidad de células Vero.

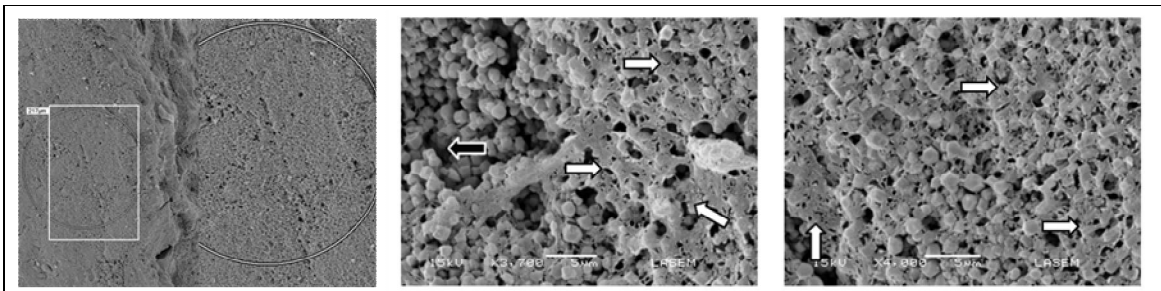
El análisis de la morfología de las células expuestas a los distintos extractos de HA (50 y 100%) sugirió que la muestra fue inocua, ya que la morfología y la adherencia de las células al sustrato incubadas en presencia de los extractos fue semejante a la observada para aquellas crecidas en ausencia de los mismos (figura 2 a-f). El porcentaje de confluencia alcanzado después de las 96 hs de cultivo fue semejante para las tres condiciones: en presencia de los extractos 50 % y 100% de HA y en ausencia de los mismos (control) (figura 2 a-c-e). En las figuras 2 b-e-f, puede verse que la incubación con el extracto tampoco afectó la morfología y el tamaño celular como revelaron las mediciones.



**Figura. 2**– Microscopía electrónica de barrido de células Vero luego de 4 días de cultivo en presencia de extractos de HA: 50%, **a-b**; 100% **c-d** y en ausencia de los mismos, **e-f** (control).

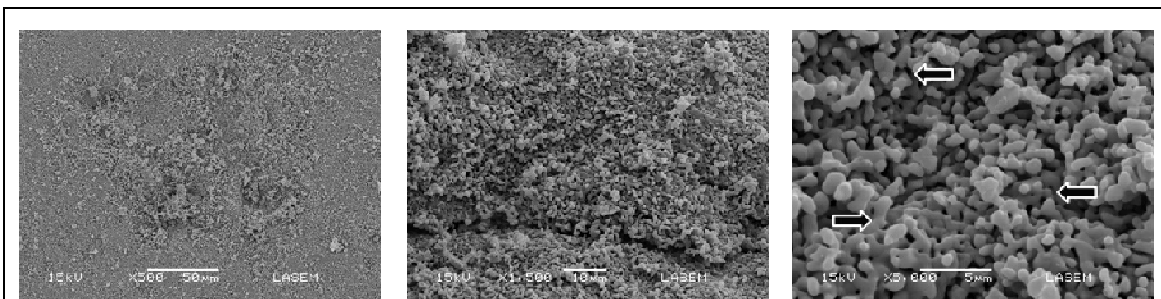
### 3.3 Adhesión de células Vero y NIH 3T3 a discos de HA.

Con el uso de microscopía electrónica de barrido pudimos observar el crecimiento celular sobre la superficie de los discos de HA solo para células NIH 3T3. La Figura 3 muestra el crecimiento de dichas células sobre la superficie de HA después de 4 días de cultivo. Las células se extendieron y aplanaron sobre los discos indicando que HA es un buen sustrato para la proliferación de este tipo celular.



**Figura 3**-Micrografía electrónica de barrido de células NIH 3T3 después de 4 días de cultivo sobre discos de HA. Las tres figuras corresponden a distintas magnificaciones. Las flechas blancas muestran regiones de adhesión celular sobre la superficie de HA. La flecha negra indica una región en donde no se observa adhesión celular.

Por otro lado, células Vero no fueron capaces de adherirse sobre la superficie de HA por lo que no pudo observarse proliferación celular. La figura 4 muestra imágenes de microscopía electrónica de los discos de HA cultivados con células Vero. Puede observarse la topografía típica de HA (figura 5), pero ninguna evidencia de crecimiento celular.

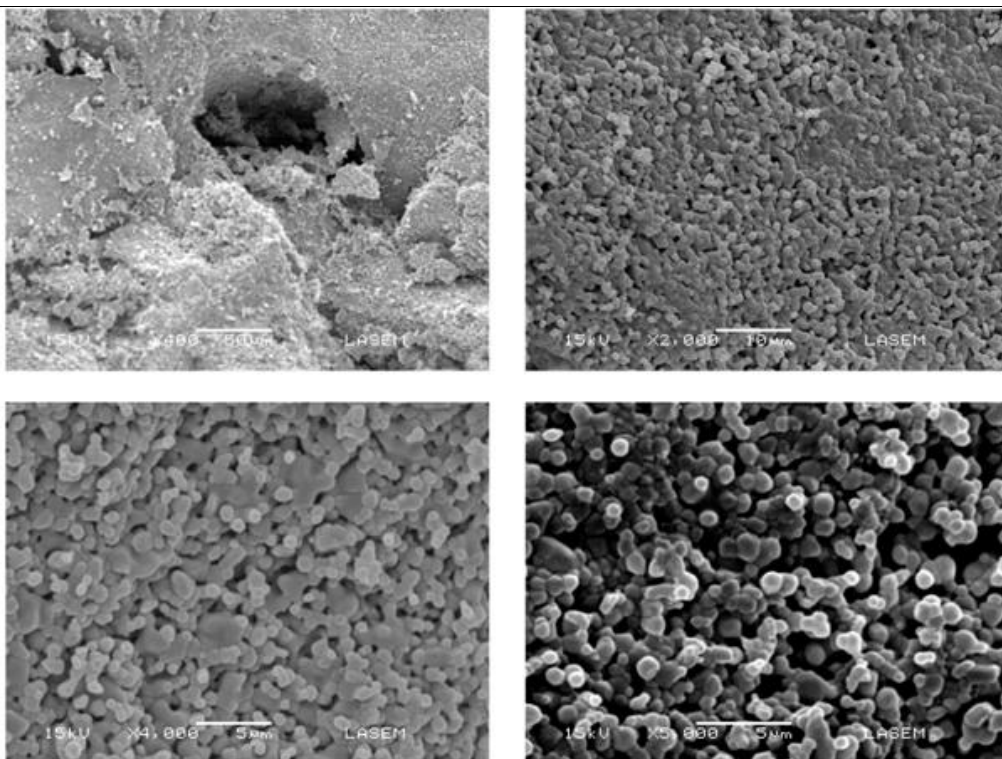


**Figura 4**-Micrografía electrónica de barrido de células Vero después de 4 días de cultivo sobre discos de HA. Las tres figuras corresponden a distintas magnificaciones. Las flechas negras muestran regiones en donde no se observa adhesión celular.

## 4. Conclusión

En este trabajo se profundizó la caracterización biológica de HA bovina obtenida en nuestra facultad mediante pulvimetalurgia. Los resultados mostraron que el cultivo de células Vero en presencia de extractos de HA no afectó la morfología y adhesión celular ya que las micrografías electrónicas obtenidas en estas condiciones revelaron un porcentaje de confluencia y tamaño celular semejante a lo

observado para células cultivadas en ausencia de los extractos (control). Estos resultados son complementarios a los obtenidos previamente [7], en donde pudimos determinar que extractos de HA no inhibieron cuantitativamente la proliferación celular. Para continuar con la caracterización de este biomaterial evaluamos la adhesión de células Vero a la superficie de discos de HA, ya que esto es una condición imprescindible para que ocurra la proliferación celular. Aunque estas células fueron capaces de crecer en presencia de HA extendiéndose sobre la placa de cultivo, no pudieron adherirse a la superficie de HA. Sin embargo cuando se cultivó células NIH 3T3 sobre los discos de HA pudo observarse que las mismas pudieron extenderse y proliferar sobre dicha superficie. Estas observaciones pueden explicarse ya que células NIH 3T3 comparten propiedades con los osteoblastos, los cuales son la población celular más abundante en hueso. De este modo HA es un buen sustrato para células fibroblásticas NIH 3T3 y no así para células epiteliales Vero. Estos resultados juntos con los obtenidos anteriormente [7] brindarían una nueva herramienta en el campo de los Biomateriales y avalan la utilización de nuestra HA como insumo para la fabricación de implantes.



**Figura 5-**Micrografía electrónica de discos de HA a distintas magnificaciones.

## 5. Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico del LIADE (Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo), así también como a la Secretaría de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

## Referencias

- [1] W. Suchanek and M. Yoshimura, Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *J Mater Res*, 13 (1998), 94–117.
- [2] Bakera K.C., Andersonb M.A., Oehlkeb S.A., Astashkinaa A.I., Haikioa D.C., Drelichb J., Donahuea S.W.. Growth, characterization and biocompatibility of bone-like calcium phosphate layers biomimetically deposited on metallic substrata. *Materials Science and Engineering: C* (2006) 26 (8): 1351–1360.
- [3] Choi JM, Kim HE, Lee IS. Ion-beam-assisted deposition (IBAD) of hydroxyapatite coating layer on Ti-based metal substrate. *Biomaterials*, (2000) 21 (5):469-473.
- [4] Coathupa M. J., Blackburna J., Goodshipa A. E., Cunninghamb J. L., Smitha T., Blunna G. W. Role of hydroxyapatite coating in resisting wear particle migration and osteolysis around acetabular components. *Biomaterials*, (2005) 26: 4161-4169.
- [5] J. Lincks, B.D. Boyan, C.R. Blanchard, C.H. Lohmann, Y. Liu, D.L. Cochran, D.D. Dean, Z. Schwartz. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19 (1998) 2219-2232.
- [6] Hong Z, Mello A, Yoshida T, Luan L, Stern PH, Rossi A, Ellis DE, Ketterson JB. Osteoblast proliferation on hydroxyapatite coated substrates prepared by right angle magnetron sputtering. *J Biomed Mater Res A*. (2010) Jun 1;93(3):878-85.
- [7] Comín R., Reyna Musso L. A., Cid M. P., Oldani C. R. y Salvatierra N. A. Citotoxicidad de Hidroxiapatita y su morfología en composites con Ti. *IEEE Latin American Transactions*, (2013). [http://www.ewh.ieee.org/reg/9/etrans/ieee/issues/vol11/vol11issue1Feb.2013/11TLA1\\_18Comin.pdf](http://www.ewh.ieee.org/reg/9/etrans/ieee/issues/vol11/vol11issue1Feb.2013/11TLA1_18Comin.pdf).
- [8] *International Organization for Standardization*, ISO 10993-12, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, 2012.
- [9] *International Organization for Standardization*, ISO 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in Vitro Methods, 2009.