

Cytotoxicity of hydroxyapatite and morphology in composites with Ti

Romina Comín, Laura A. Reyna Musso, *member IEEE*, Mariana P. Cid, Carlos R. Oldani y Nancy A. Salvatierra

Resumen— La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) es el material más utilizado para mejorar la oseointegración de implantes en humanos. Actualmente se utilizan recubrimientos de hidroxiapatita sobre implantes de Ti, aunque esto presenta diversos problemas como, la baja tenacidad a la fractura de la hidroxiapatita, la generación de grietas interfaciales durante la etapa de deposición y la baja adherencia cerámica/metal. Por otro lado, existe evidencia que pueden fabricarse composites de Ti-HA mediante pulvimetalurgia. En este trabajo se determinó la citotoxicidad de hidroxiapatita de origen coralino y animal y se evaluó, mediante microscopía electrónica de barrido, la topografía de composites de Ti-HA obtenidos por pulvimetalurgia. Los resultados obtenidos mostraron que las muestras de HA analizadas no afectaron la viabilidad celular. Además, mediante los estudios de microscopía pudo observarse una buena integración de la HA a la matriz de Ti.

Palabras clave—Hidroxiapatita, composites de Ti-HA, biocompatibilidad, pulvimetalurgia.

Abstract— Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is the material used to improve osseointegration of implants in humans. Traditionally Ti-based implant is coated with hydroxyapatite, but this presents several problems such as, low fracture toughness of hydroxyapatite, generation of interfacial cracks during the deposition step and low adhesion ceramic /metal. Furthermore some studies reported that some excellent Ti-HA bio-composites could be fabricated by the powder metallurgy (PM) technology. In present study it was investigate the cytotoxicity of coralline and bovine hydroxyapatite. Topography of Ti-HA composites obtained by powder metallurgy was evaluated by scanning electron microscopy. The results showed that HA samples analyzed did not affect cell viability. Furthermore, a good integration of HA to the matrix of Ti was observed by microscopy studies

Keywords— Hydroxyapatite, Ti-HA composites, biocompatibility, powder metallurgy

I. INTRODUCCIÓN

LA hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) es el material más utilizado para lograr un mejor control de la oseointegración de implantes de hueso en humanos. La HA

posee una estructura cristalina y composición química similar a la porción mineral del hueso natural y es quien le otorga la rigidez al mismo. La HA se encuentra en forma natural en el exoesqueleto de corales, en los huesos humanos y animales, y en la estructura de la dentina de los elementos dentarios. Asimismo, se han propuesto diversos métodos para obtener HA, mediante procesos de síntesis [1] o a partir de la calcinación de huesos del mismo paciente (antólogo), de hueso cadavérico (alógeno) o de dientes, los cuales tendrían la ventaja de involucrar tejido natural a un costo muy bajo [2]. Actualmente se utilizan recubrimientos de HA sobre implantes de Ti, aunque esto presenta diversos problemas: la tenacidad a la fractura de la HA es muy baja ($\text{KIC} \approx 1 \text{ MPa m}^{1/2}$); durante la etapa de deposición (Proyección térmica por plasma, Plasma Spray) se generan grietas interfaciales; la adherencia metal/cerámico es baja y disminuye con el tiempo [3]. Se ha encontrado también, que la HA como recubrimiento interfiere en la proliferación y síntesis de los osteoblastos humanos [4]. Por otro lado, las técnicas de Pulvimetalurgia están bien desarrolladas por lo menos en lo que respecta a piezas de aleaciones de Ti para uso aeronáutico y hay evidencia preliminar de que es posible obtener composites de Ti-HA por pulvimetalurgia [5].

El tema de los biomateriales fue establecido como área estratégica del conocimiento para la carrera de Ingeniería Biomédica en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la UNC en el año 2006. El dictado de esta carrera comenzó en el año 2004 y desde la cátedra de Biomateriales se comenzó a trabajar en modelado de prótesis de cadera hasta llegar actualmente a la obtención de HA bovina y a la fabricación de composites de Ti-HA bovina obtenidos por pulvimetalurgia. Esta línea de investigación es llevada a cabo en el Laboratorio de Materiales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC) quienes junto al Laboratorio de Química comparten en un espacio común de carácter interdisciplinario en el Laboratorio de Biocompatibilidad.

El desarrollo de nuevos materiales para su utilización en implantes hace necesario la realización para asegurar la compatibilidad biológica entre los materiales y el tejido. La utilización de estos materiales tiene ventajas desde distintos puntos de vista. Primero, la disminución en los costos de fabricación: la pulvimetalurgia involucra el trabajo con polvos de hidruro de Ti (TiH_2) en vez de polvos de Ti puro y la utilización de HA bovina, en lugar de sintética, otorga una fuente de materia prima de bajo costo. Segundo, los compuestos metal/cerámica obtenidos mediante esta técnica tendrían la habilidad de inducir la nucleación y el crecimiento de apatita en su superficie, cuando se los sumerge en soluciones de fluidos corporales [6], además de disminuir la rigidez del implante

Romina Comin Dpto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina

Laura A.Reyna Musso LIADE, FCEfyN, UNC, Córdoba, Argentina

Mariana P. Cid. Dpto de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina

Carlos R. Oldani Dpto de Materiales, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina

Nancy A. Salvatierra Dpto de Química, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina

disminuyendo su módulo de elasticidad, redistribuyendo la tensión en el tejido óseo adyacente, minimizando el efecto escudo y prolongando el tiempo de vida de la prótesis. El aumento del área interfacial entre el implante y el tejido óseo resulta en el aumento de la resistencia al movimiento del implante en el tejido. Finalmente, la porosidad de la HA también permite el abastecimiento sanguíneo en la superficie del implante proveyendo de células osteoblásticas a la interfase entre la superficie del material y el medio fisiológico [7]-[9]. Si bien estos trabajos aportan posibles mejoras en la bioactividad de los implantes de Ti, faltan estudios que evalúen la citotoxicidad de estos compuestos.

En este trabajo, se evaluó la citotoxicidad de HA de origen animal, y se observó, mediante microscopía electrónica de barrido, la topografía los composites de Ti-HA obtenidos por pulvimetalurgia.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

La HA de origen bovino (HA-b) y los composites de Ti y Ti-HA utilizados en este trabajo fueron preparados en el Laboratorio de Materiales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNC). La HA-b se obtuvo por calcinado de huesos largos de vaca (patas y osobuco). Los composites de Ti y Ti-HA se obtuvieron por pulvimetalurgia, mediante un proceso de sinterizado en vacío. Se realizó la mezcla elemental de polvos de TiH₂ y de HA. Posteriormente, la mezcla fue prensada uniaxialmente en frío a 300 MPa en una prensa hidráulica, en matrices cilíndricas de acero de 8 mm de diámetro. Finalmente, se sinterizaron las muestras en verde en vacío a temperaturas de 1000 °C durante 2 horas de permanencia. Se prepararon composites de Ti (liso) y composites con 5 y 10% de hidroxiapatita (HA). Adicionalmente se preparó un composite de Ti poroso, el cual posibilita una mejor osteointegración que una superficie de Ti liso.

A1. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular Vero. La misma se cultivó 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 estreptomycin, a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. El medio de cultivo se renovó cada 3 días.

A2. Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de HA-b, como control se utilizó una muestra de hidroxiapatita comercial de origen coralino (HA-c). El ensayo se realizó de acuerdo con la norma ISO 10993-5[10], utilizando extractos de las muestras ISO 10993-12 [11]. La HA en polvo se mezcló con el medio de cultivo a una concentración de 0,100 g/mL y se incubó a 37°C durante 48 hrs. A continuación las

muestras se filtraron-esterilizaron a través de un filtro de 0,22-µm (Millex GV, Millipore, Cork, Ireland) para obtener los extractos. Las células se sembraron en pocillos conteniendo diferentes diluciones del extracto original (15, 30 y 45%) a una densidad de 10.000 células/pocillo. Se eligieron tales diluciones del extracto de forma tal, que fueran representativas de la cantidad de HA presente en los composites de Ti-HA. También se sembraron células en pocillos conteniendo solo medio de cultivo como control negativo y como control positivo se utilizó una solución de fenol al 0,2% en buffer fosfato salino. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Después de 96 hrs se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, este es un método colorimétrico que permite valorar la viabilidad y cuantificar la proliferación celular. A todas las muestras ensayadas se le agregó MTT a una concentración final de 1 mg/mL en buffer fosfato salino y se incubaron durante 2 hrs. Las muestras se leyeron en un lector de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) a 490 nm.

B. Examen microscópico de composites de Ti-HA

Para evaluar el uso de la pulvimetalurgia en la obtención de composites de Ti-HA, la topografía de los mismos fue analizada mediante microscopía electrónica. Este análisis se llevó a cabo en el LASEM, INIQUI-CONICET, UNSA). Se utilizó un Microscopio Electrónico de barrido Marca JEOL modelo JSM 6480 LV.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Citotoxicidad de HA-b e HA-c

Se realizó el ensayo de MTT como una medida de viabilidad y proliferación celular de células Vero crecidas en extractos de HA-b e HA-c. Los valores de densidad óptica (DO) medidos en los pocillos correlacionan con la viabilidad y proliferación en los diferentes extractos. En la Fig. 1 se muestran los valores de DO obtenidos para las diferentes concentraciones del extracto de HA-b luego del cultivo por 96 hrs. Se puede observar que los valores de DO obtenidos para las células cultivadas en los extractos son semejantes al obtenido para el control negativo.

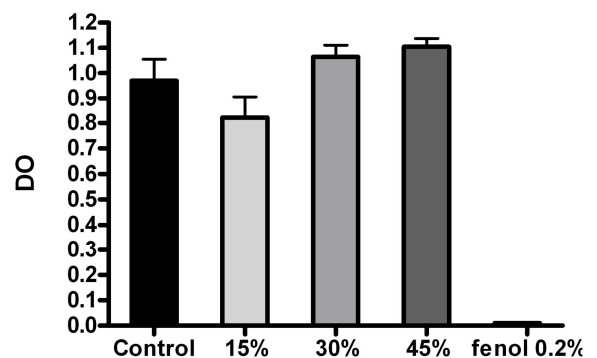


Fig. 1- Ensayo de viabilidad celular. Proliferación celular en diferentes concentraciones de extractos de HA bovina (15% - 30% - 45%).

Resultados similares fueron observados para la HA-c (Fig. 2). En ambos casos no se observó viabilidad celular en pocillos conteniendo fenol 0,2%.

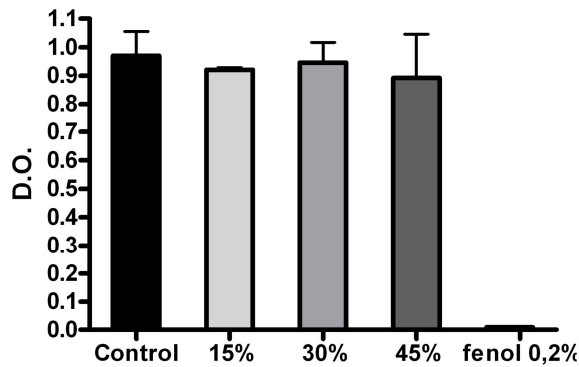


Fig. 2 – Ensayo de viabilidad celular. Proliferación celular en diferentes concentraciones de extractos de HA coralina (15% - 30% - 45%).

Estos resultados indican que la HA-b y la HA-c no inhiben la proliferación celular favoreciendo su uso potencial como biomaterial al no generar toxicidad.

B. Examen microscópico de composites de Ti-HA

En la Fig 3 se muestran las micrografías electrónicas obtenidas para los composites de Ti.

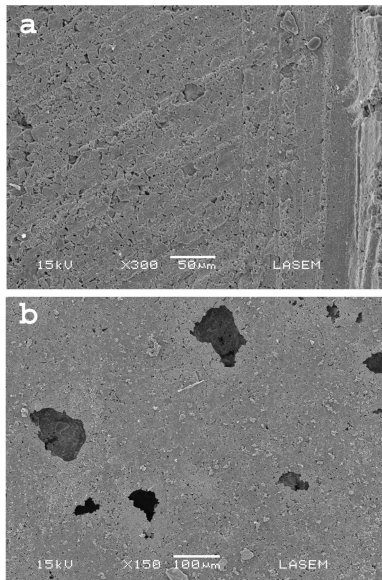


Fig. 3 – Microscopía electrónica de barrido de composites de Ti. (a) Ti, (b) Ti poroso

Las micrografías de Ti y Ti poroso muestran una morfología semejante a la descrita en la bibliografía [12], [13] (Fig.3 (a,b)). Se destaca el aumento en el número de poros en la muestra de Ti poroso.

En el análisis de los composites de Ti-HA pudieron identificarse cristales de HA en las muestras conteniendo

tanto 5 como 10 % de HA (Fig. 4 (a-d)). Asimismo, se observó un mayor número de cristales en las muestras de Ti-HA 10% respecto de las muestras con 5% de HA.

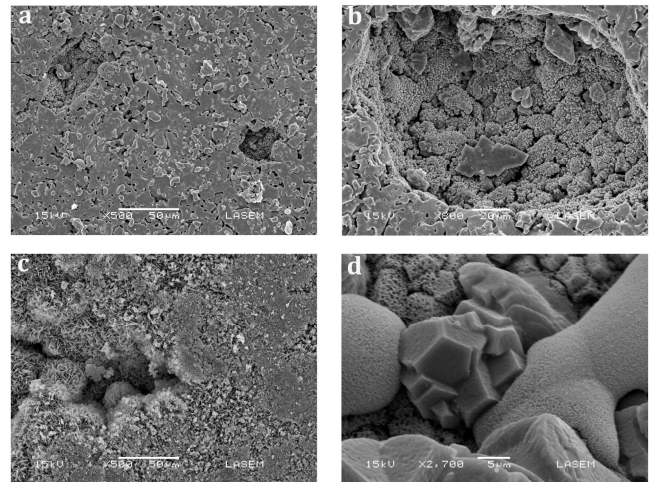


Fig. 4 – Microscopía electrónica de barrido de composites de Ti-HA-b. (a,b) Ti-HA 5%, (c,d) Ti-HA 10%

Estos resultados indican que la pulvimetalurgia sería un método apropiado para la fabricación de los composites al lograr una integración de la HA en la matriz de Ti.

IV. CONCLUSION

En este trabajo analizamos la citotoxicidad de muestras de HA bovina obtenidas en el Laboratorio de Materiales. Los resultados mostraron que los diferentes extractos de HA analizados, al igual que los extractos de HA coralina, no afectaron la viabilidad celular, ya que la proliferación determinada fue semejante a los valores obtenidos para el control negativo (en ausencia de HA). Por otra parte, se obtuvo un composite de Ti e HA, mediante pulvimetalurgia, donde se observó la adecuada integración de la HA a la matriz de Ti como mostraron las micrografías electrónicas. Estos hallazgos brindarían una nueva herramienta en el campo de los Biomateriales posibilitando la utilización de estos materiales como insumo para la fabricación de implantes. En este sentido, se deberán realizar nuevos estudios que permitan confirmar la biocompatibilidad de estos materiales, como ensayos de citotoxicidad en composites de Ti-HA, complementar estos estudios en otras líneas celulares del tipo osteoblásticas con la finalidad de una mayor similitud a lo que ocurre naturalmente en el hueso y por último implementar ensayos *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico del LIADE (Laboratorio de Investigación Aplicada y Desarrollo), así también como a SECyT por la beca postdoctoral otorgada a la Dra. Romina Comín.

REFERENCIAS

- [1] R. López Padilla, C. Oldani, A. Giuliani, M. Toledo; “*Estudios iniciales de hidruración de titanio*”; Anales del Congreso SAM/CONAMET 2007, San Nicolás, Prov. de Buenos Aires, setiembre 2007
- [2] C. Oldani, A. Dominguez; “*Simulación del comportamiento mecánico de un implante de cadera*”; Anales del XV Congreso SABI 2005, Paraná, Entre Ríos, setiembre 2005
- [3] Williams, et al., “The phase as an Example of an Unusual Shear Transformation” Metallurgical Transactions, v. 4, pp. 2701-2708, 1973
- [4] J. Rivera, C. Riaño, A. Echevarría, P. Monsalve, G. Alzate, L. Restropo, C. Jaramillo; 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 LapinoRev. Col. Cienc. Pec. 17 (1) (2004) 20-28A.
- [5] C. Ning, Y. Zhou. On the microstructure of biocomposites sintered from Ti, HA and bioactive glass. Biomaterial 25, 3379-3387.
- [6] O. Trentz, A. Platz, N. Helmy, O. Trentz; Response of osteoblast culture to titanium, steel and hydroxyapatite implants Swiss Surg. 4 (1998) 203
- [7] Y. Yang, K. Kim, C. Agrawal, J. Ong; Interaction of hydroxyapatite-titanium at elevated temperature in vacuum environment. Biomaterials 25 (15) (2004) 2927-2932.
- [8] T. Marcelo, V. Livramento, M. Varella de Oliveira, M. Carvalho; Microstructural Characterization and Interactions in Ti- and TiH2-Hydroxyapatite Vacuum Sintered CompositesMaterials Research 9 (1) (2006) 65-71
- [9] C Ning, Y. Zhou; In vitro bioactivity of a composite fabricated from HA and Ti powders by powder metallurgy method”. Biomaterials 23 (14) (2002) 2927-2932
- [10] International Organization for Standardization, ISO 10993-5, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for Cytotoxicity; in Vitro Methods, 1999.
- [11] International Organization for Standardization, ISO 10993-12, Biological Evaluation of Medical Devices. Part 12: Sample preparation and reference materials, 2002.
- [12] Otsuka F, Kataoka Y, Miyazaki T. Enhanced osteoblast response to electrical discharge machining surface. Dent Mater J. 2012 Apr 3;31(2):309-15. Epub 2012 Mar 23.
- [13] M.H. Prado da Silva, G.A. Soares, C.N. Elias, J.H.C. Lima, H. Schechtman, I.R. Gibson, S.M. Best. Surface Analysis of Titanium Dental Implants with Different Topographies . Mat. Res. vol.3 n.3 São Carlos July 2000. pag 61-67



Romina Comín recibió el título Licenciada en Química Biológica en el año 2001, otorgado por la Facultad de Ciencias Químicas – UNC. Posteriormente realizó un doctorado en Ciencias Químicas en la misma facultad, recibiendo el título de Doctora en Ciencias Químicas en el año 2009. Actualmente, es docente en la cátedra de Química Aplicada de las Carreras de Ingeniería de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC. Integrante de proyectos de Investigación en

los sistemas formales de apoyo a la investigación en el área de los Biomateriales. Desde Agosto de 2011, forma parte del Laboratorio de Biocompatibilidad, el cual está dedicado al desarrollo y caracterización física, química y biológica de biomateriales.



Laura A. Reyna Musso obtuvo el título de Ingeniera Química en el año 2009, otorgado por la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Actualmente se encuentra realizando tesis de carrera de Magister en Ingeniería Ambiental en la Universidad Tecnológica Nacional – FRC. Es docente en la cátedra de Química Orgánica y Biológica de la Carrera de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y

Naturales - UNC. Integrante de proyectos de Investigación en los sistemas formales de apoyo a la investigación en el área de los Biomateriales. lreyna@efn.uncor.edu



Mariana P. Cid recibió el título de Licenciada en Bioquímica en el año 2000, otorgado por la Facultad de Ciencias Químicas – UNC. Posteriormente realizó un doctorado en Biología en la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC, recibiendo el título de Doctora en Biología en el año 2008. Es docente en las cátedras de Química Orgánica Biológica y Química Biológica de la Carrera de Ingeniería Biomédica de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC. Integrante de proyectos de Investigación en los sistemas formales de apoyo a la investigación en el área de los Biomateriales. Desde Enero de 2011, forma parte del Laboratorio de Biocompatibilidad, el cual está dedicado al desarrollo y caracterización física, química y biológica de biomateriales.



Carlos R. Oldani recibió el título de Doctor en Ciencias de la Ingeniería en el año 2003, otorgado por la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC. Desde el año 2000 es Investigadora del CONICET. Es Profesor Titular en la cátedra de Biomateriales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC. Director de proyectos de Investigación en los sistemas formales de apoyo a la investigación en el área de Biomateriales. Desde el año 2009

forma parte del Laboratorio de Biocompatibilidad, el cual está dedicado al desarrollo y caracterización física, química y biológica de biomateriales.



Nancy A. Salvatierra recibió el título de Doctora en Biología en el año 19xx, otorgado por la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC. Desde el año 2000 es Investigadora del CONICET. Es Profesora Asociada en las cátedras de Química Orgánica Biológica y Química Aplicada de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales – UNC. Directora de proyectos de Investigación en los sistemas formales de apoyo a la investigación en el área de la Neurociencia.

Desde el año 2009 forma parte del Laboratorio de Biocompatibilidad, el cual está dedicado al desarrollo y caracterización física, química y biológica de biomateriales.