

BIOCOMPATIBILIDAD DE LOS MATERIALES NANOESTRUCTURADOS HIDROXIAPATITA, SILICA Y ALUMINA

Luis Roberto Ruiz Ramírez¹, MC Jesús Alberto Garibay Alvarado² y Dr. Simón Yobanny Reyes López³

Resumen—Los materiales que se diseñan para la reparación de la pérdida de tejidos por desgaste, trauma o enfermedad en condiciones fisiológicas se les conoce como biomateriales; los cuales deben de tener tres características básicas que son: tener contacto con el tejido vivo, ser bioquímica y mecánicamente compatibles. Los cerámicos como la hidroxiapatita, que es un fosfato de calcio se usa ampliamente en la regeneración ósea, sin embargo, debido a su fragilidad nos es viable usarla en condiciones fisiológicas. Por lo que en esta investigación se fabricaron fibras coaxiales de hidroxiapatita, alúmina y sílica para potencializar las propiedades de resistencia y biocompatibilidad en la hidroxiapatita.

Palabras clave—Biomateriales, biocompatibilidad, infiltrado inflamatorio, fibras coaxiales.

Introducción

A lo largo de la historia de la medicina se ha tenido la necesidad de subsanar problemas que están relacionados con la pérdida de tejidos por trauma, enfermedad o desgaste, esto ha orientado las investigaciones a la fabricación de biomateriales, los cuales se emplean para reproducir la función de los tejidos vivos en los sistemas biológicos de forma segura y aceptable fisiológicamente, que pueden ser temporal o permanentemente implantados en el cuerpo y que su función es restaurar un defecto existente (Williams, 1976; Williams, 1999). La mayoría de los biomateriales se obtienen sintéticamente tratando de simular las características de los tejidos del cuerpo humano.

Los tejidos óseos son los más buscados a reparar, al ser uno de los tejidos más duros y resistentes del cuerpo humano, pueden ser reemplazados por cerámicos que pueden llegar a imitar las características de los huesos o dientes. La hidroxiapatita (HA) es un fosfato de calcio biocerámico que se encuentra naturalmente en los huesos, el cual se puede obtener de manera sintética y que puede contribuir a la regeneración ósea, sin embargo, ya que es un material frágil no es viable usarlo en condiciones fisiológicas, por lo tanto, se ha optado por incorporarles biovidrios los cuales se pueden obtener de manera sintética (Shelby, 2005).

La alúmina (Al_2O_3) que es un material inerte y resistente, con esto se le busca dar a la hidroxiapatita una mayor resistencia y soporte, así como aumentar su actividad regeneradora y su integración. Una de las maneras para conjuntar estos materiales es mediante la técnica de electrohilado que permite la fabricación de fibras coaxiales las cuales no requieren un alto costo para su elaboración. El electrohilado permite la reproducibilidad del material y su aplicación es más fácil por su versatilidad (González & Contreras, 2012; Smith, 2017).

Una de las características principales de los biomateriales es que estos no tengan una reacción adversa en un organismo vivo por lo cual se tienen que realizar pruebas de biocompatibilidad *in vivo* para garantizar que el material no genere una reacción adversa en el organismo portador del material. Por lo tanto, en la presente investigación se propone evaluar la biocompatibilidad del tejido subcutáneo de ratas Wistar, con materiales nanoestructurados por la técnica de electrohilado como $HA/SiO_2-Al_2O_3$ en la búsqueda de determinar la biocompatibilidad de los materiales propuestos para crear una nueva opción de un biomaterial regenerador de hueso (Marques, Reis, & Hunt, 2002).

Descripción del Método

El presente estudio se realizó en el instituto de ciencias biomédicas de la universidad autónoma de ciudad Juárez, en el laboratorio de materiales híbridos nanoestructurados donde se sintetizaron los materiales a evaluar por medio de la técnica de Sol-Gel y electrohilado. Los estudios de biocompatibilidad *in vivo* se realizaron en ratas Wistar machos con una edad entre dos y tres meses. La biocompatibilidad se determinó por medio del infiltrado

¹ El Lic. Químico farmacéutico biólogo es estudiante del programa de maestría en ciencias químico-biológicas del instituto de ciencias biomédicas de la universidad autónoma de ciudad Juárez, Chihuahua, México al199127@alumnos.uacj.mx (**autor correspondiente**)

² El MC Jesús Alberto Garibay Alvarado es estudiante del programa de doctorado en ciencias químico-biológicas del instituto de ciencias biomédicas de la universidad autónoma de ciudad Juárez. Chihuahua, México. jesus.garibay@uacj.mx

³ El Dr. Simón Yobanny Reyes López es Profesor-Investigador de Tiempo completo en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. simon.reyes@uacj.mx

inflamatorio presente en el tejido subcutáneo de las ratas después del tiempo de exposición que fue de 2, 4 y 6 semanas.

Los cortes de la muestra se realizaron en un micrótopo (KEDE®-3358) para parafina con un espesor aproximado de 5 micrómetros, para esto fue necesario retallar el bloque de parafina ya que de esta manera fue más fácil realizar los cortes, los portaobjetos utilizados fueron tratados con una solución de gelatina para garantizar que el tejido se quedara adherido al cristal, una vez que las muestras se extendieron en el portaobjetos se realizó un secado entre 35 y 40°C durante toda la noche para eliminar el agua presente. Se realizó una tinción hematoxilina-eosina sobre los cortes de parafina para lo cual se llevó a cabo un desparafinado con xileno (Sigma-Aldrich®) durante 10 minutos, después del desparafinado se pasó a la parte de hidratación donde se hizo uso de etanol (Sigma-Aldrich®) en una concentración decreciente de 100° a 80° donde se dejó la muestra por 10 minutos en cada una de las concentraciones de etanol, para terminar la parte de la hidratación se colocó el porta objetos con las muestras en agua corriente durante 20 minutos, una vez hidratadas las muestras el portaobjetos se colocó en hematoxilina (MERCK®) durante 3 minutos y se enjuago con agua corriente y agua destilada, después las muestras se colocaron en eosina (MERCK®) durante 30 segundos y se lavó con etanol (Sigma-Aldrich®) 80° durante 15 segundos, después de terminar la tinción las muestras se cubrieron con el porta objetos y quedaron listas para observarlas al microscopio.

Las muestras se analizaron por medio de microscopia óptica en un microscopio de marca Oxion®, al cual se le adjunto una cámara de marca CMEX® de 2 megapíxeles; observando los tejidos a los aumentos de 400x.

La evaluación de las muestras fue únicamente microscopia descriptiva, sin un análisis estadístico debido a la cantidad de muestras y animales de experimentación que se tuvieron disposición. Para esto se observaron las características de las muestras a nivel macroscópico y microscópico observando principalmente el infiltrado inflamatorio.

Resultados

En la figura 1 se observa la microestructura de las fibras obtenidas de HA/SiO₂-Al₂O₃ con un tratamiento térmico a 800 °C, en donde se puede apreciar que las fibras presentan un diámetro de 260 ±60 nm. En la figura 1 incisos a y c se observa que las fibras no son continuas presentan disrupción aleatoria, son aplanadas y muestran elongaciones curvas en su morfología debido al proceso de electrohilado. En la figura 1-d se observa la composición química de las fibras las cuales están formadas principalmente por calcio (39.85%), fosforo (13.24%), silicio (1.19%) y oxígeno (32.72%).

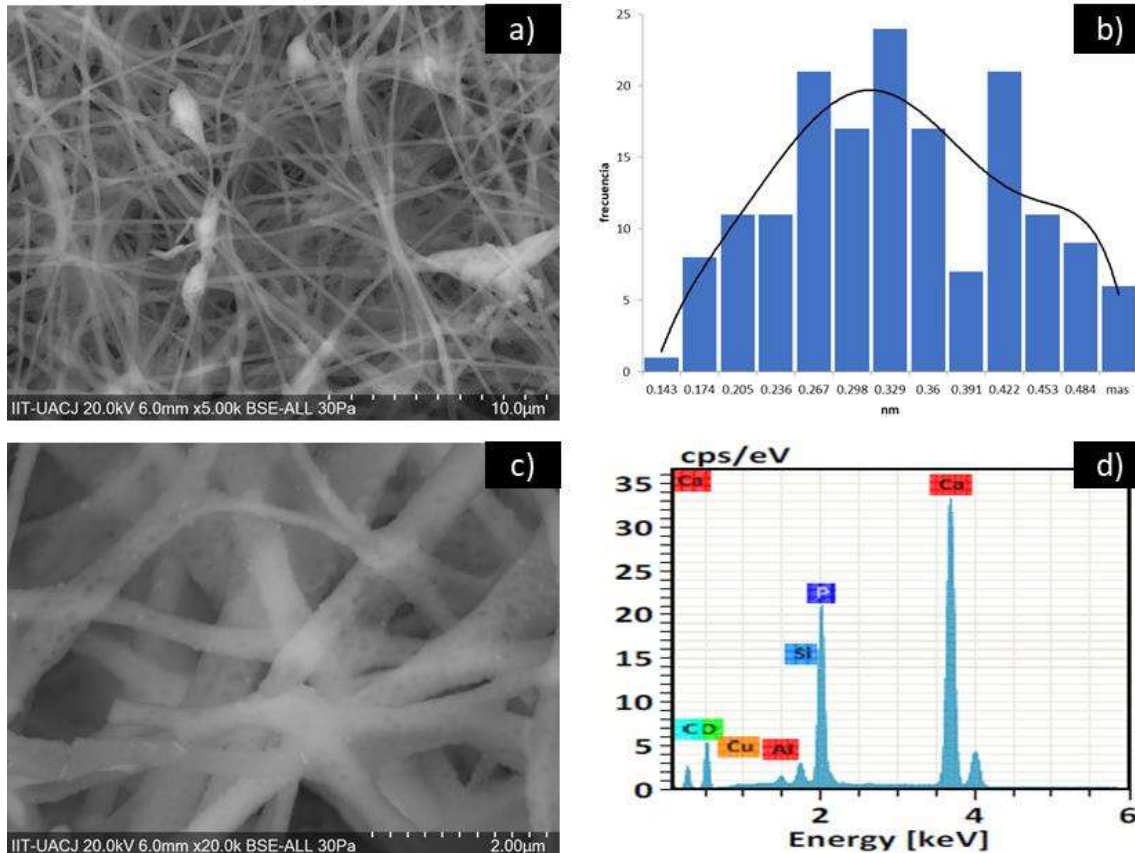


Figura 1. a) Microfotografía de fibras HA/SiO₂-Al₂O₃ tratadas a 800 °C a 5000x, b) histograma de diámetros de las fibras, c) microfotografías de fibras HA/SiO₂-Al₂O₃ tratadas a 800°C a 20,000x d) análisis EDX.

En la figura 2 se observan los cortes histológicos control, 2, 4 y 6 semanas de exposición al material HA/SiO₂-Al₂O₃, teñidos con hematoxilina-eosina observados a 400x. En la figura 2-a se observa el tejido control el cual no se expuso a ningún material, se puede apreciar que en el tejido no se presenta ningún tipo de infiltrado inflamatorio, se puede apreciar perfectamente la dermis (círculo amarillo), el tejido adiposo (círculo rojo) y el tejido muscular (círculo negro), zonas donde no se presenta ninguna clase de infiltrado inflamatorio. En la figura 2-b se observa el tejido expuesto durante dos semanas a HA/SiO₂-Al₂O₃ donde en comparación con el tejido control (figura 2-a) se observa un fuerte infiltrado inflamatorio de tipo crónico compuesto principalmente por linfocitos y macrófagos (círculos rojos) adyacentes al material (círculos negros) y células gigantes multinucleadas (círculos amarillos) que en algunos casos se encuentran adyacentes al material. En la figura 2-c se observa el tejido expuesto a HA/SiO₂-Al₂O₃ durante cuatro semanas, donde se puede apreciar cúmulos del material (círculos negros) y adyacente a este un infiltrado inflamatorio de tipo crónico compuesto por linfocitos, macrófagos (círculos rojos) y células gigantes multinucleadas (círculos amarillos), donde en comparación a la figura 2-b que representa el tejido expuesto al material durante dos semanas, el infiltrado inflamatorio ha disminuido en una pequeña cantidad, sin embargo, el infiltrado inflamatorio a las 4 semanas continua siendo de tipo crónico. En la figura 2-d se observa el tejido expuesto a HA/SiO₂-Al₂O₃ durante seis semanas donde en comparación a los tejidos de dos y cuatro semanas en este se observan pocos cúmulos de material (círculo negro), un infiltrado inflamatorio crónico de tipo linfocítico (círculos rojos) y se puede decir que aunque el infiltrado inflamatorio sigue siendo de tipo crónico este ha disminuido considerablemente ya que no hay presencia de macrófagos y las células gigantes multinucleadas han desaparecido casi por completo.

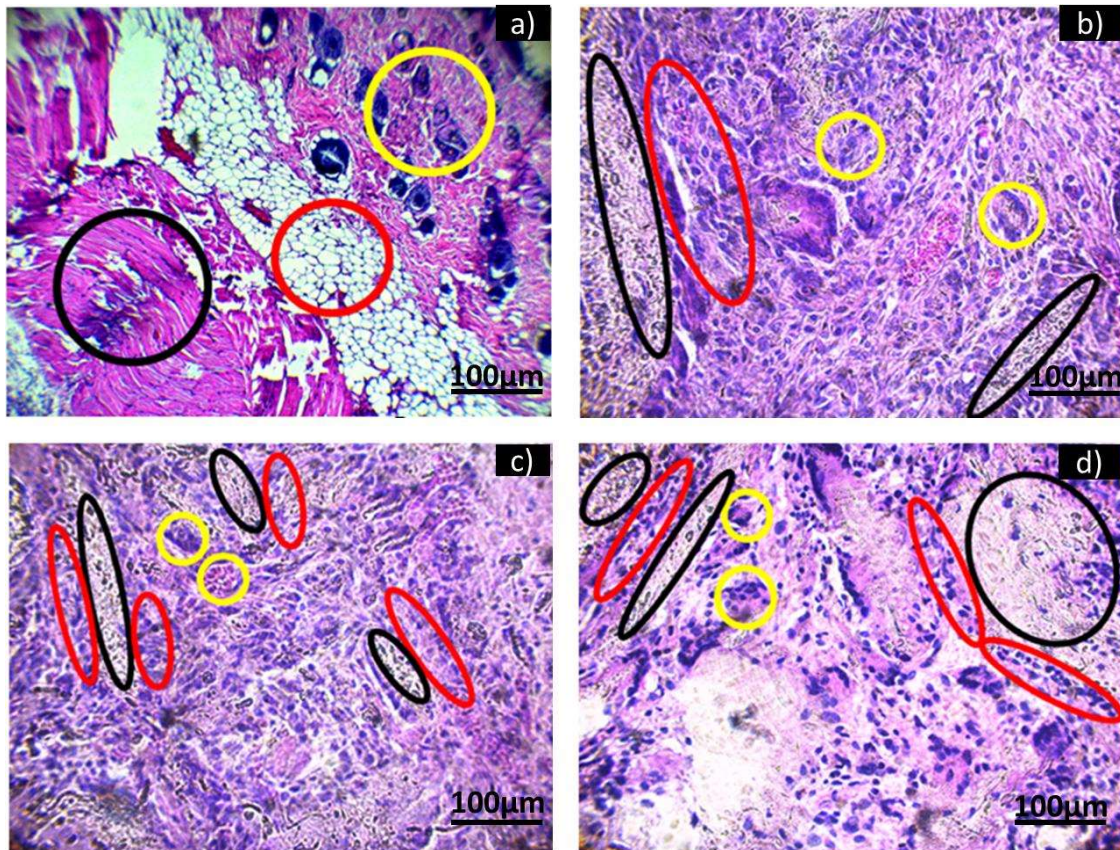


Figura 2. a) Corte histológico control, teñido con hematoxilina-eosina observado a 400x. b) Corte histológico expuesto a $HA/SiO_2-Al_2O_3$ durante dos semanas teñido con hematoxilina-eosina observado a 400x. c) Corte histológico expuesto a $HA/SiO_2-Al_2O_3$ durante cuatro semanas teñido con hematoxilina-eosina observado a 400x. d) Corte histológico expuesto a $HA/SiO_2-Al_2O_3$ durante seis semanas teñido con hematoxilina-eosina observado a 400x.

En esta investigación se fabricaron composites de escala nanométrica en forma de fibras por medio de la técnica de electrohilado, las fibras que se fabricaron debido a la técnica que se usó para obtenerlas presentan grandes áreas superficiales por su tamaño nanométrico facilidad de funcionalización para diversos propósitos y propiedades mecánicas superiores lo que es favorable para generar una biocompatibilidad con el hospedero. Además de esto la técnica de electrohilado nos permite fabricar composites en los que se combinen diferentes materiales para promover aún más la biocompatibilidad (Agarwal, Wendorff, & Greiner, 2008).

Los armazones con arquitecturas a nanoescala tienen un área de superficie más grande para absorber proteínas y presentan más sitios de unión a los receptores de la membrana celular. Las proteínas adsorbidas pueden cambiar aún más las conformaciones, exponiendo sitios de unión adicionales, que se espera que proporcionen una ventaja sobre las arquitecturas de microescala para aplicaciones de generación de tejidos (Ratner, 2015). Se han fabricado por medio de la técnica de electrohilado exitosamente nanofibras de diferentes materiales con biopolímeros los cuales han presentado resultados excelentes de proliferación celular de osteoblastos (Sui et al., 2007), por lo cual sería una buena opción integrar estos biopolímeros a los materiales aquí estudiados para aumentar la biocompatibilidad y bioactividad de los materiales estudiados.

Comentarios Finales

Resumen de resultados

En este trabajo investigativo se fabricó un material cerámico con una potencial biocompatibilidad, la cual se evaluó por medio de estudios de histocompatibilidad por un periodo de tiempo de seis semanas en donde se observó un infiltrado inflamatorio de tipo crónico en las primeras cuatro semanas, el cual disminuyó notablemente a la sexta semana. El material fabricado por la técnica de electrohilado está conformado por fibras aleatorias aplanadas

con diámetro de 260 ± 60 nm con una composición química principalmente de calcio (39.85%), fósforo (13.24%), silicio (1.19%) y oxígeno (32.72%).

Conclusiones

En el presente trabajo se evaluó la biocompatibilidad de un material cerámico fabricado por la técnica de electrohilado. El material HA/SiO₂-Al₂O₃ presentó una disminución en el infiltrado inflamatorio por lo cual podría presentar una biocompatibilidad a un periodo de tiempo más largo del estudiado. La morfología del material y sus propiedades mecánicas provoca la generación celular lo cual favorece la biocompatibilidad.

Recomendaciones

Se recomienda realizar pruebas de biocompatibilidad en animales de mayor tamaño donde se coloque el material directamente en el hueso y de esta manera determinar el porcentaje de generación ósea que puede llegar a inducir el material.

Debido a que el tejido se encontraba en una etapa de reparación es necesario realizar más pruebas alargando el tiempo de exposición del tejido con el material para determinar si se trata de un material biocompatible.

En esta investigación se realizó un estudio sobre la biocompatibilidad que existe entre el tejido subcutáneo de ratas Wistar y en un material cerámico por lo cual se recomienda que los materiales que presentaron una biocompatibilidad sean sometidos a más pruebas de biocompatibilidad para definir si tal material es posible usarlo en la terapia de regeneración ósea.

Referencias

- Agarwal, S., Wendorff, J., & Greiner, A. (2008, December). Use of electrospinning technique for biomedical applications. (ELSEIVER, Ed.) *Polymer*, 49(26), 5603-5621.
- González, G., & Contreras, A. (2012). HIDROXIAPATITA: EL BIOMATERIAL IDEAL. *Rev. LatAm. Metal. Mat.*, 4-7.
- Marques, A. P., Reis, R. L., & Hunt, J. A. (2002). The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: In vitro studies. *Biomaterials*, 23(6), 1471-1478. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00272-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00272-1)
- Ratner, B. D. (2015). The Impact of Host Response on Biomaterial Selection. *Host Response to Biomaterials*, 37-51.
- Shelby, J. E. (2005). *Introduction to Glass Science and Technology*. Great Britain: Royal Society of Chemistry.
- Smith, D. K. (2017). Calcium phosphate apatites in nature. In B. C. Paul W. Brown, *Hydroxyapatite and Related Materials* (p. 368). London: CRC Press.
- Sui, G., Yang, X., Mei, F., Hu, X., Chen, G., Deng, X., & Ryu, S. (2007). Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 82, 445-454.
- Williams, D. F. (1999). *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool: Liverpool University Press.
- Williams, F. D. (1976). Biomaterials and biocompatibility. *Med Prog Technol*, 4:31-42.

Notas Biográficas

El **Q.F.B Luis Roberto Ruiz Ramírez** es egresado del programa de químico farmacéutico biólogo de la universidad autónoma de ciudad Juárez, y actualmente es estudiante de la maestría en ciencias químico-biológicas de la universidad autónoma de ciudad Juárez.

El **M.C Jesús Alberto Garibay Alvarado** es egresado de la licenciatura en química de la universidad autónoma de ciudad Juárez. Sus estudios de maestría en ciencias químico-biológicas los culminó en la universidad autónoma de ciudad Juárez y actualmente se encuentra realizando sus estudios de doctorado en ciencias químico-biológicas en la universidad autónoma de ciudad Juárez, el MC ha participado en la publicación de artículos científicos y ha participado en congresos nacionales e internacionales.

El **Dr. Simón Yobanny Reyes López** es Profesor-Investigador de Tiempo completo en el Departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Terminó sus estudios de doctorado en la *Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México*. Ha publicado artículos en revistas internacionales indexadas y varios capítulos de libro; así como múltiples presentaciones en congresos nacionales e internacionales.