

## ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD Y ADHESIÓN DE CÉLULAS HUMANAS DE OSTEOSARCOMA EN Ti6Al4V SUPERFICIALMENTE MODIFICADO

### Study of cytotoxicity and adhesion of human osteosarcoma cell in Ti6Al4V superficially modified

#### RESUMEN

El crecimiento y adhesión celular sobre biomateriales depende de las características superficiales de los materiales empleados, recubrimientos realizados sobre ellos y su grado de citotoxicidad.

En este trabajo se evaluó la biocompatibilidad y adhesión de células de osteosarcoma humano (HOS) sobre Ti6Al4V pulido mecánicamente y anodizado; con rugosidades en un rango de 2 – 10  $\mu\text{m}$ . Las células fueron cultivadas en un medio RPMI-1640, suero bovino 10%, en un período de 9 a 72 horas.

Ninguno de los sobrenadantes fue tóxico para las células y no se observaron diferencias en la adhesión celular entre los diferentes tipos de discos.

**PALABRAS CLAVES:** adhesión celular, biocompatibilidad, células HOS, citotoxicidad, cultivo celular, rugosidad, Ti6Al4V.

#### ABSTRACT

The growth and attachment cellular on biomaterials depend on its superficial characteristics of the used materials, coverings deposited on them and their degree of cytotoxicity

In this work the biocompatibility and adhesion of human osteosarcoma cells (HOS) was evaluated on Ti6Al4V polished mechanically and anodized; in a rank of roughness of 2 - 10  $\mu\text{m}$ .

The cells were cultivated in RPMI-1640 medium, bovine serum to 10%, in a period from 9 to 72 hours.

None of the dilutions were toxic for the cells and differences in the cellular adhesion between the different types from discs were not observed.

**KEYWORDS:** biocompatibility, cell culture, cellular adhesion, cytotoxicity, HOS cells, roughness, Ti6Al4V.

#### 1. INTRODUCCIÓN

En la fabricación de implantes dentales y ortopédicos, se utilizan aleaciones de titanio, porque tienen excelentes propiedades mecánicas, buena biocompatibilidad y resistencia a la corrosión. [1] Sin embargo, su oseointegración es limitada por lo cual, su superficie debe ser modificada considerando la variación de su rugosidad y la formación de una capa anódica para evitar la liberación de iones que formen un medio citotóxico.

Desde el punto de vista del implante es muy importante que no presente liberación de iones o formación de productos, que puedan generar consigo un medio citotóxico, lo cual conlleva a una posterior muerte celular

y del tejido circundante presentándose un aflojamiento o desprendimiento del implante.

La oseointegración, proceso mediante el cual el implante se integra al hueso donde es colocado, formando una sola fase en la que los dos interactúan mutuamente generando nuevo tejido óseo desde el hueso hacia el implante y viceversamente, del implante, puede determinarse mediante pruebas in Vitro, simulando la funcionalidad de los osteoblastos, y el control del depósito de sales minerales. [2]

#### JAVIER ENRIQUE GÓMEZ R.

Ingeniero Metalúrgico, Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de Materiales, programa de maestría. Docente cátedra, GBIO Universidad Industrial de Santander zeus20003@hotmail.com jegor8008@yahoo.es

#### LUIS EMILIO FORERO GÓMEZ

Ph.D.C. Materials science, Director Grupo de Investigación en Biomateriales, Profesor Asociado, Universidad Industrial de Santander leforero@uis.edu.co

#### PATRICIA ESCOBAR RIVERO

Ph.D. Inmunoparasitología Directora Lab. De Quimioterapia CINTROP, Profesora Asociada Universidad Industrial de Santander. pescobarwww@yahoo.co.uk

#### WILFREDO VALDIVIESO Q.

Bacteriólogo, CINTROP Universidad Industrial de Santander. w\_valdiv@hotmail.com

En este trabajo se evaluó la adhesión de células HOS y biocompatibilidad *In Vitro*, de la aleación Ti-6Al-4V (grado 5) anodizada en una solución de  $H_2SO_4$  teniendo presente la rugosidad superficial y respuesta citotóxica.

## 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

La capacidad de integración tisular de los biomateriales es un factor importante para determinar su oseointegración y biocompatibilidad. Factores que dependen del comportamiento y adhesión de las células de su entorno.

Para determinar el grado de oseointegración del biomaterial, se tiene en cuenta la topografía de su superficie y su capacidad de reacción con proteínas corporales. [2-3]

Los ensayos y cultivos *In Vitro* simulan la funcionalidad de los osteoblastos, los que sintetizan el componente orgánico de la matriz ósea (colágeno, proteoglicanos, proteínas no colágenas como la osteocalcina, la osteopontina y la fosfatasa alcalina y factores de crecimiento) y controlan el depósito de las sales minerales. Tanto *in vivo* como *in Vitro* los osteoblastos pasan sucesivamente por tres estados funcionales [4]

- Proliferación celular y síntesis de los componentes orgánicos de la matriz ósea
- Maduración de la matriz ósea
- Depósito de mineral.

Para mejorar la respuesta tisular en el proceso de osteogénesis debe variarse la topografía de los implantes, modificando la rugosidad, porosidad, y/o controlar la formación de películas osteoconductoras. [5-6] Posteriormente, los osteoblastos se depositan sobre los implantes e interactúan con estas películas facilitando los enlaces químicos con el carbonato del hueso. [7]

## 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 3.1 Preparación superficial

Las probetas para los diferentes ensayos fueron discos de 12 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor, las cuales se pulieron mecánicamente con papel abrasivo, posteriormente se limpiaron ultrasónicamente en una solución de trifosfato de sodio, seguidas de un decapado en una solución de HF y  $NHO_3$  y una limpieza ultrasónica final con agua desionizada. Se dividieron en dos grupos; al primero no se le realizó tratamiento posterior al de limpieza y el segundo fue anodizado (solución de  $H_2SO_4$ ,  $\Delta V = 25V$ ).

### 3.2 Medición de Rugosidades

Se caracterizó la superficie de probetas de Ti6Al4V por medio de la distancia promedio entre picos y valles ( $R_a$ ); tomando 5 puntos aleatorios en la superficie de las probetas y en cada punto se hizo un barrido con 9 tomas, (el proceso se visualiza en la figura 1, el rectángulo celeste muestra la dirección de avance de la lectura de la perfilometría de un punto determinado sobre la probeta de Ti6Al4V, y el perfil respectivo se observa en el recuadro superior) respectivas en un video microscopio digital 3D HIROX KH-7700.

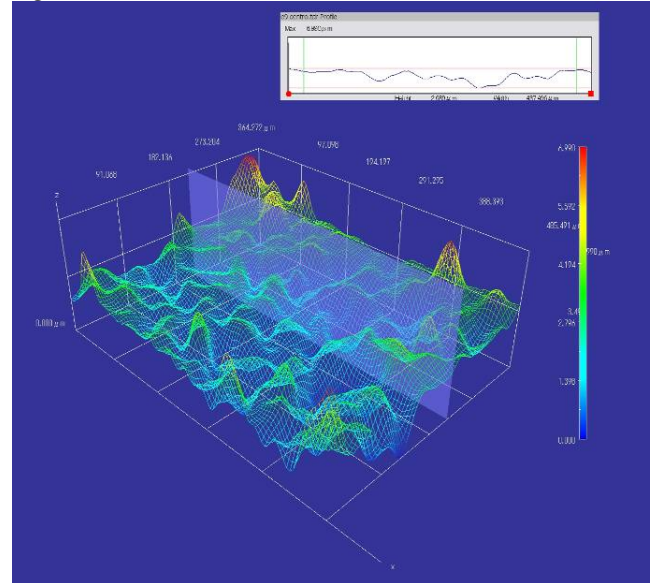


Figura 1. Medida de rugosidades  
Centro de Biomateriales, CBIO-UIS, HIROX KH 7700

Los resultados de las medidas de las rugosidades se reportan en las Tablas 1 y 2

PROBETAS	Rugosidad ( $R_a \mu m$ )	TRATAMIENTO SUPERFICIAL
E1	3.99	Pulidas mecánicamente, brillo espejo. Anodizadas 25V en una solución de $H_2SO_4$
E2	6.50	
E3	4.74	
E4	4.03	
E5	7.64	
E6	5.61	
E7	4.83	
E8	4.51	
E9	3.78	
E10	5.60	
E11	4.69	
E12	4.73	

Tabla 1. Rugosidad de probetas anodizadas utilizadas para la elaboración de la curva de crecimiento

PROBETAS	Rugosidad ( $R_a \mu m$ )	TRATAMIENTO SUPERFICIAL
M1	5.13	Pulidas mecánicamente con papel abrasivo
M2	10.43	
M3	7.77	
M4	5.29	
M5	4.15	
M6	5.30	

M7	5.80	
M8	7.18	
M9	6.88	
M10	6.42	
M11	6.16	
M12	9.06	

**Tabla 2. Rugosidad de probetas NO anodizadas utilizadas para la elaboración de la curva de crecimiento**

### 3.3 Cultivo Celular

Se llevó a cabo con células HOS, (ATCC CRL-1543) suministradas por el Grupo de Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC) cultivadas en medio RPMI-1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Se realizó una curva de crecimiento colocando 2.5x10<sup>4</sup> células/ml de células HOS en cajas de cultivo de 24 pozos entre 1 y 7 días. Las células del primer día y cada uno de los días siguientes, fueron desprendidas para con 0.25% de Tripsina-EDTA y contadas microscópicamente, por duplicado, en cámara de Neubauer utilizando 0.25% de eosina amarilla en buffer salino-fosfato (PBS) pH= 7,2.

### 3.4 Toxicidad celular

Para la realización del ensayo de toxicidad celular, las probetas anodizadas y no anodizadas fueron pesadas y trasladadas a un tubo de vidrio estéril (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes) con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBFi. Para conocer el comportamiento celular en el medio de cultivo se emplean dos parámetros de control del medio. Uno con medio de cultivo suplementado y otro con medio de cultivo sin suplementar. El medio se adicionó teniendo en cuenta una relación peso:volumen del disco de 70 mg/ml. Como controles, se colocaron tubos con medio sin discos. Los discos se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 3 meses. Células HOS en fase exponencial de crecimiento fueron colocadas en placa de cultivo de 96 pozos con diluciones seriadas 1:3 con cada una de las suspensiones e incubadas durante 72 horas. Se utilizaron como controles iones de aluminio y vanadio. La viabilidad celular fue medida utilizando la prueba colorimétrica de reducción del MTT. Los cristales de formazan, formados por la reducción del MTT por las mitocondrias de las células HOS, fueron solubilizados con dimetilsulfoxido (DMSO) y la densidad óptica (OD) de cada pozo fue medida utilizando un lector de microplacas con una longitud de onda de 580 nm. El porcentaje de muerte celular fue calculado usando la ecuación: (%) = 1 - (OD de las células tratadas / OD células control) x 100. La actividad citotóxica de los iones fue calculada utilizando análisis de regresión sigmoidal con el programa MsXlfit™ (ID Business Solution, Guildford, UK) y fue expresada como **dosis letal, DL**, que es la dosis capaz de matar el 50% (DL<sub>50</sub>) o el 90% (DL<sub>90</sub>) de las células.

## 3.5 Adhesión Celular

### 3.5.1 Recuento microscópico

Se colocaron 4x10<sup>3</sup> células (cantidad específica, obtenida por el tamaño de las probetas y la cantidad de células en fase de crecimiento) sobre cada una de las superficies de los discos anodizados y no anodizados. Las células fueron incubadas durante 9, 24, 48 y 72 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Las células fueron desprendidas y contadas microscópicamente. Para cada tiempo se utilizaron dos discos y los conteos se realizaron por duplicado. Los resultados fueron expresados como número de células en cada disco.

### 3.5.2 Microscopia de epifluorescencia.

Células en fase exponencial de crecimiento fueron colocadas sobre discos de Ti6Al4V anodizados y no anodizados. Después de 24 h, el medio fue retirado, se realizaron dos lavados con PBS pH= 7,2 y se adicionó 15 µM de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl, Sigma-Aldrich, USA) por 1 h para marcar el citoplasma y posteriormente 1µg/mL de Hoechs 33342 por 5 min para marcar el núcleo. Los discos fueron fijados y examinados en microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E4000) utilizando el filtro UV2A (Ex= 330-380, DM= 400, BA= 420).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Características de las probetas.

La adhesión de las células a los discos anodizados y no anodizados no presentó cambios significativos, tal como se observa en la figura 2. Adicionalmente, no se observaron cambios morfológicos ni nucleares en las células adheridas.

### 4.2. Toxicidad celular

Los valores de OD de los medios de control presentó un promedio de 1.4 – 1.6; los registros de OD de las diluciones de las probetas anodizadas y no anodizadas colocadas en la placa de 96 pozos presento un valor promedio comprendido entre el rango de los OD de los medios de control, de tal forma podemos decir que no se observó toxicidad del medio (incubado por tres meses) con los discos anodizados y no anodizados en las células HOS utilizando la técnica del MTT. La respuesta de los patrones de control muestra que los iones vanadio fueron más tóxicos para las células HOS (DL<sub>50</sub> = 8,88 µM, DL<sub>90</sub> = 50,25 µM) que los iones de aluminio (DL<sub>50</sub> = 253 µM, DL<sub>90</sub> = 3548 µM).

### 4.3. Adhesión celular.

El éxito de un implante está determinado por la

integración del tejido circundante al material. Diferentes autores han estudiado la asociación entre la rugosidad superficial y la composición química del material utilizado con su capacidad para permitir la adhesión y proliferación celular.[8-9] Nosotros evaluamos la capacidad que tiene los discos de Ti6Al4V anodizadas y no anodizadas de permitir la adhesión de células HOS por conteo celular y epifluorescencia.

Se presentó una pequeña variación en el conteo celular realizado en la cámara de Neubauer de las células viables sobre los discos de Ti6Al4V anodizados y no anodizados en los diferentes intervalos de tiempo (Figura 2).

Adicionalmente, después de 24 h de incubación, la microscopia de epifluorescencia permitió visualizar células HOS adheridas a la superficie de los discos anodizados y no anodizados, lo cual queda confirmado por la forma alargada que ellas presentan (figura 3). La tinción utilizada permite observar el citoplasma en color rojo y el núcleo de color azul. En los campos observados no se detectaron alteraciones del núcleo como condensación del DNA o fragmentación, que indiquen estrés o muerte celular (Figura 3).

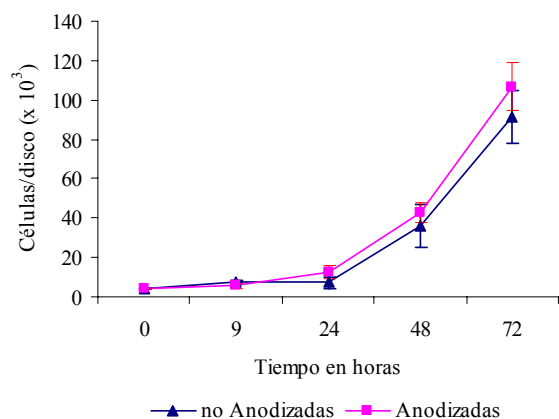


Figura 2. Curva de crecimiento de células HOS sobre discos de Ti6Al4V anodizados o no anodizados.

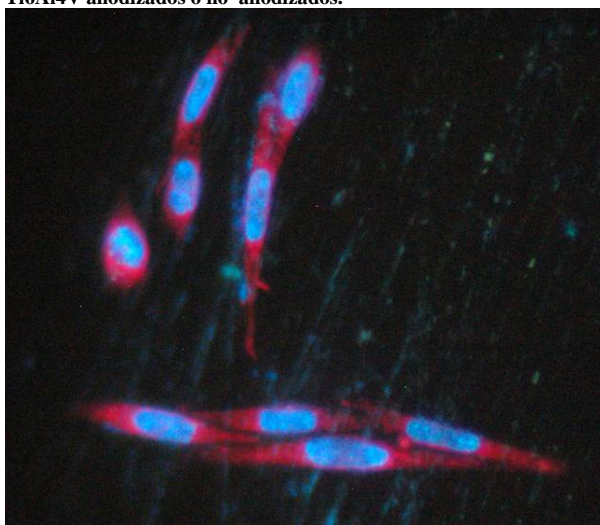


Figura 3. Fotografía representativa de células HOS adheridas a un disco de Ti6Al4V. La tinción roja del citoplasma es producida por la internalización de PcAlCl y el color azul del núcleo por el Hoechst 33342. Se observa la cromatina distribuida homogéneamente en el núcleo.

## 5. CONCLUSIONES

La respuesta de la técnica MTT indica que tanto las probetas no anodizadas como las anodizadas no presentaron citotoxicidad aparente, dado posiblemente por la capa de óxido de titanio que naturalmente se forma sobre las aleaciones de titanio y el efecto protector adicional que se obtiene por el anodizado

Los patrones de referencia empleados para la Citotoxicidad en las células HOS, mostraron que el vanadio presenta una citotoxicidad muy elevada respecto al aluminio.

NO se puede determinar el efecto de la rugosidad sobre la adhesión celular, puesto que la distribución de la misma es bastante similar para los dos tipos de probetas utilizadas para los ensayos.

La adhesión de las células HOS presente en ambos tipos de probetas se evidenció por medio de la microscopia de epifluorescencia en la cual las células presentan una forma alargada, y no se observaron cambios morfológicos ni nucleares en las células adheridas.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Her-Hsiung Huang. Osteoblast-like cell initial adhesion onto a network-structured titanium oxide layer. Scripta Materialia 51 (2004) 1017-1021
- [2] Braceras I, Onate J.I. Bone cell adhesion on ion implanted titanium alloys. Surface & Coatings Technology 196 (2005) 321-326
- [3] Schwartz Z. Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. Adv Res 13, (1999) 38-48
- [4] Mazzaglia Giuseppe. Evaluación de la humectabilidad y de la rugosidad de superficies de titanio con diferentes tratamientos y su relación con la adhesión celular. Tesis doctoral. 2006
- [5] Anselme K, Linez P. the relative influence of the topography and chemistry of Ti6Al4V on osteoblastic cell behavior. Biomaterials 21(2000) 1567-1577.
- [6] ----, Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials 21(2000) 667 – 681.
- [7] Ge Zhao, Effects of surface microstructure and nanostructure on osteoblast-like MG63 cell number,

differentiation and local factor production. Thesis. Master of Engineering in Biomedical Engineering. November 2003

[8] Jayaramann M, Meyer U. Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro. *Biomaterials* 25 (2004) 625 – 631.

[9] Xiaolong Zhu, Chen J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials* 25 (2004) 4087 - 4103

## 7. AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de Investigación en Biomateriales, **GBIO**, por su apoyo y soporte para la realización de los ensayos respectivos para el desarrollo de esta investigación.

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, **CINTROP**, Laboratorio de Quimioterapia: por su apoyo y soporte para la realización de los ensayos respectivos para el desarrollo de esta investigación.

Universidad Industrial de Santander, Vicerrectoría de Investigación y Extensión.

Grupo de Ingeniería Biomédica EIA-CES (GIBEC) por el suministro de las células HOS