



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

MATERIALES METÁLICOS

**“ESTUDIO DE BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE UNA  
ALEACIÓN TERNARIA VÍTREA Ni - Nb - Zr”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIA E INGENIERÍA DE MATERIALES**

P R E S E N T A

**Q. LIDIA ESCUTIA GUADARRAMA**

Tutor Principal

Dr. Ignacio Alejandro Figueroa Vargas

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM.

Miembros del comité tutor

Dra. Elizabeth Chavira Martínez

Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM

Dr. Gonzalo Galicia Aguilar

Universidad Veracruzana

**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# RESUMEN

---

Un material es considerado biocompatible cuando al estar en contacto con un sistema biológico, no produce reacción adversa como alteraciones en las funciones celulares o daño al ADN entre otras. Las pruebas de biocompatibilidad son muy importantes para conocer si un material dado, puede ser utilizado satisfactoriamente como implante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aleación vítrea con la composición  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  procesada mediante la técnica de *melt spinning* o enfriado ultra rápido, para ser utilizada en un futuro en aplicaciones biomédicas como pudieran ser la fabricación de tornillos, placas, suturas metálicas etc., ya que presenta propiedades mecánicas superiores a sus análogas con estructura cristalina. Se analizó la respuesta que este material pudiera inducir en cultivos de linfocitos humanos mediante el ensayo de reducción de MTT para evaluar la actividad metabólica mitocondrial y del índice mitótico para conocer si hay alguna alteración en la fase M del ciclo celular. Se cultivaron linfocitos de 10 donadores de entre 25 y 35 años, sanos. Después de 24 horas de incubación, los cultivos se expusieron a la aleación en forma de cintas de 2 cm de largo esterilizadas y se incubaron durante 48 horas más. El ensayo de MTT consistió en centrifugar el cultivo para separar 75  $\mu\text{L}$  de glóbulos blancos, eliminar eritrocitos e incubar con 50  $\mu\text{L}$  de MTT por 3 horas. Los cristales de formazán se disolvieron en 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se midió la absorbancia a 595 nm.

Para el índice mitótico una hora antes de la cosecha se agregó a los cultivos 0.125 mL de Colcemid, las células se lavaron, se les dio un tratamiento hipotónico, se fijaron y se lavaron para después distribuir la suspensión celular en dos portaobjetos. Se contaron 6000 células en cada lote por donador y se determinó el índice mitótico. Los resultados obtenidos en ambos ensayos no muestran diferencia significativa entre los lotes testigo y experimental. Esto quiere decir que en presencia de la aleación las células sobreviven y realizan sus funciones normalmente. Sin embargo, estos resultados aún no son suficientes para afirmar que este material pueda ser

implantado sin causar daño; es necesario evaluar la posible genotoxicidad y realizar pruebas *in vivo* para garantizar su inocuidad.

# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los técnicos del IIM-UNAM que me brindaron su ayuda durante la parte experimental de mi trabajo, sin algún orden en particular los menciono a continuación: Dr. G. A. Lara Rodríguez, Dr. O. Novelo Peralta, M. en C. A. Tejeda Cruz, Ing. J. J. Camacho, Ing. G. Arámburo, Sr. E. A. Caballero, Fis. R. Reyes, C. Flores, E. Sánchez, J. Morales, C. González y M.J. Arellano por su apoyo y colaboración técnica.

Agradezco enormemente al proyecto PAPIIT-UNAM "IB100712" por el financiamiento para la realización del proyecto.

# INDICE GENERAL

---

RESUMEN

AGRADECIMIENTOS

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.    | ANTECEDENTES.....  | 1  |
| 1.1   | Biomateriales y criterios de biocompatibilidad .....                         | 1  |
| 1.1.1 | Biomateriales metálicos.....   | 4  |
| 1.2   | Aleaciones vítreas o vidrios metálicos.....                                  | 6  |
| 2.    | PROCESAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN  |    |
| 2.1   | Procesado de aleaciones vítreas por la técnica de <i>melt spinning</i> ..... | 9  |
| 2.2   | Técnicas de análisis estructural y morfológico.....                          | 10 |
| 2.2.1 | Difracción de Rayos X.....   | 10 |
| 2.2.2 | Microscopía Electrónica de Transmisión.....                                  | 12 |
| 2.2.3 | Microscopía Electrónica de Barrido.....                                      | 12 |
| 3.    | PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD.....  | 14 |
| 3.1   | Estudios de citotoxicidad <i>in vitro</i> .....                              | 14 |
| 3.2   | Linfocitos como sistema de prueba .....                                      | 15 |
| 3.3   | Biomarcadores.....   | 16 |
| 3.4   | Viabilidad celular .....   | 17 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.5   | Ensayo de reducción de MTT.....   | 17 |
| 3.6   | Determinación del índice mitótico.....  | 19 |
| 3.7   | Adhesión celular. Respuesta de macrófagos a biomateriales.....                | 22 |
| 4.    | METODOLOGÍA EXPERIMENTAL .....  | 26 |
| 4.1   | Preparación y procesado de muestras.....                                      | 26 |
| 4.2   | Caracterización estructural y morfológica.....                                | 29 |
| 4.2.1 | Difracción de rayos X.....  | 29 |
| 4.2.2 | Microscopía electrónica de transmisión.....                                   | 31 |
| 4.2.3 | Microscopía electrónica de barrido.....                                       | 32 |
| 4.3   | Pruebas de Citotoxicidad.....   | 32 |
| 4.3.1 | Colección de muestras sanguíneas para la obtención de linfocitos humanos..... | 32 |
| 4.3.2 | Cultivo de linfocitos humanos.....  | 33 |
| 4.3.3 | Exposición.....   | 34 |
| 4.3.4 | Viabilidad celular. Ensayo de MTT.....  | 35 |
| 4.3.5 | Índice mitótico.....  | 36 |
| 4.3.6 | Pruebas de adhesión celular.....  | 38 |
| 5.    | RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....   | 42 |
| 5.1   | Cintas de la aleación $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$ .....                           | 42 |
| 5.2   | Análisis por difracción de rayos X.....                                       | 43 |
| 5.3   | Microscopía electrónica de transmisión.....                                   | 44 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.4   | Microscopía electrónica de barrido.....                      | 45 |
| 5.5   | Resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad.....  | 47 |
| 5.5.1 | Resultados de viabilidad celular en linfocitos humanos ..... | 47 |
| 5.5.2 | Resultados de índice mitótico en linfocitos humanos .....    | 49 |
| 5.5.3 | Adhesión celular de macrófagos peritoneales de ratón .....   | 51 |
|       | CONCLUSIONES.....  | 55 |
|       | TRABAJO FUTURO.....  | 56 |
|       | REFERENCIAS.....   | 58 |



# ÍNDICE DE FIGURAS

---

| Figura | Título   | Página |
|--------|--|--------|
| 1.1    | Aplicaciones de los diversos tipos de biomateriales  | 2      |
| 1.2    | Los antiguos egipcios empleaban alambres de oro para amarrar la corona del diente de un donador a sus propios dientes                          | 4      |
| 1.3    | Comparación entre la estructura de un sólido amorfo y un sólido cristalino   | 6      |
| 1.4    | Solidificación de materiales cristalinos y vítreos   | 7      |
| 2.1    | Esquema de obtención de vidrios metálicos con la técnica de <i>melt spinning</i>   | 10     |
| 2.2    | Esquema que describe la ley de Bragg   | 11     |
| 2.3    | Comparación entre los patrones de difracción de a) un material cristalino, b) un material de dimensiones nanométricas y c) un material amorfo. | 12     |
| 2.4    | Señales obtenidas por la interacción del haz de electrones con la muestra  | 13     |
| 3.1    | Estructura química del azul de tripano o azul de tripán, colorante azóico utilizado para tinciones histológicas                                | 18     |
| 3.2    | Reacción de reducción del MTT a formazán   | 19     |
| 3.3    | En el ensayo MTT la intensidad del color del producto de reacción es directamente proporcional al número de células viables.                   | 19     |
| 3.4    | Las cuatro fases del ciclo de una célula eucarionte.   | 20     |
| 3.5    | Fases de la mitosis  | 21     |
| 3.6    | Estructura química de la colchicina y del colcemid   | 22     |
| 3.7    | El índice mitótico se obtiene con la proporción de células en metafase del total de células contadas   | 22     |
| 3.8    | Esquema de la hematopoyesis, proceso mediante el cual se diferencian las células madre hasta convertirse en macrófagos                         | 24     |
| 3.9    | Estructura de las integrinas   | 25     |
| 3.10   | Esquema de la respuesta de macrófagos a un material extraño según el tamaño del mismo  | 26     |
| 4.1    | Horno de arco eléctrico  | 28     |
| 4.2    | En los crisoles se colocó titanio puro y después los elementos que componen la aleación  | 28     |
| 4.3    | Fusión de los metales mediante arco eléctrico para formar una aleación homogénea   | 29     |
| 4.4    | Equipo para obtener cintas vítreas mediante la técnica de <i>melt spinning</i>   | 30     |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 4.5  | Montaje de la muestra para su análisis por difracción de rayos X   | 31 |
| 4.6  | Difractómetro Siemens D5000 del Instituto de Investigaciones en Materiales   | 32 |
| 4.7  | Montaje de la muestra para realizar el desgaste iónico para microscopía electrónica de transmisión   | 33 |
| 4.8  | Material para cultivo de linfocitos en condiciones estériles   | 34 |
| 4.9  | Exposición de los cultivos a la aleación en estudio  | 35 |
| 4.10 | Incubación de los cultivos de sangre periférica a 37°C   | 36 |
| 4.11 | Microplaca de 96 pozos para lector ELISA   | 37 |
| 4.12 | Preparación de las laminillas mediante goteo de la suspensión celular  | 38 |
| 4.13 | Linfocitos teñidos con GIEMSA observados en el microscopio óptico, 40X   | 39 |
| 4.14 | Incisión abdominal en forma de libro para dejar expuesto el peritoneo  | 40 |
| 4.15 | Las células obtenidas del peritoneo de ratón se transfirieron a pozos de cajas de cultivo y se les añadió medio de cultivo, todo en condiciones de esterilidad | 41 |
| 4.16 | Equipo para secado por punto crítico   | 43 |
| 5.1  | Imagen de las cintas obtenidas mediante la técnica de <i>melt spinning</i>   | 44 |
| 5.2  | Difractograma obtenido para las cintas de la aleación $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$  | 45 |
| 5.3  | Patrón de difracción de electrones de la cinta $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$ . Característico de un sólido amorfo  | 46 |
| 5.4  | Micrografía de MET en campo claro, no se observa formación de cristales  | 47 |
| 5.5  | Micrografía de la cara lisa tomada a 300X  | 48 |
| 5.6  | Micrografía de la cara lisa tomada a 1000X   | 48 |
| 5.7  | Micrografía de la cara rugosa tomada a 300X  | 49 |
| 5.8  | Micrografía de la cara lisa tomada a 1000X   | 49 |
| 5.9  | Cultivos de linfocitos después de 48 horas de exposición a la aleación, correspondientes al lote testigo y al lote experimental                                | 50 |
| 5.10 | Lote testigo. Macrófagos normales, 24 horas de cultivo, 20X  | 54 |
| 5.11 | Lote experimental. Macrófagos expuestos durante 24 horas a la aleación $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$ , 20X   | 54 |
| 5.12 | Lote control negativo. Macrófagos expuestos durante 24 horas a acero inoxidable 316L, 20X  | 55 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 5.13 | Lote control positivo. Macrófagos expuestos durante 24 horas a cobre, 20X  | 55 |
| 5.14 | Lote experimental. Macrófagos expuestos durante 72 horas a la aleación $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ , 20X      | 56 |
| 5.15 | Lote control negativo. Macrófagos expuestos durante 72 horas a acero inoxidable 316L, 20X                                      | 56 |
| 5.16 | Micrografías de MEB de macrófagos adosados a la superficie de la aleación $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ , 2000X | 58 |
| 5.17 | Micrografías de MEB de macrófagos adheridos en acero inoxidable 316L después de 72 horas de cultivo, 2000X                     | 59 |

# INTRODUCCIÓN

---

Los materiales metálicos presentan buenas propiedades mecánicas (resistencia, tenacidad, etc.) respecto a otros materiales, como son los polímeros y cerámicos. Esto hace que sean los materiales más adecuados hasta ahora para aplicaciones estructurales en seres vivos, como pueden ser las prótesis articulares, placas de osteosíntesis, tornillos de fijación, implantes dentales, entre otras aplicaciones.

Las aleaciones vítreas o vidrios metálicos como también se les conoce, son un novedoso tipo de material las cuales presentan propiedades mecánicas superiores a las de las aleaciones cristalinas de la misma composición.

La microestructura amorfa de estos materiales, les confiere características excepcionales entre las que se pueden mencionar: alta resistencia mecánica ( $\sim 2$  GPa), alto límite de deformación elástica ( $\sim 2\%$ ), relativamente bajo módulo de Young (50 – 100 GPa), alta resistencia al impacto y a la fractura y gran resistencia a la corrosión en fluidos corporales artificiales.

Las propiedades anteriormente mencionadas, le confieren a estos materiales un gran potencial para ser estudiados como biomateriales. Actualmente se investigan diversas composiciones de aleaciones vítreas, entre ellas la aleación  $\text{Ti}_{40}\text{Cu}_{36}\text{Pd}_{14}\text{Zr}_{10}$  que es aproximadamente tres veces más resistente al desgaste que el titanio y su módulo elástico es muy similar al de los huesos, o la aleación  $\text{Mg}_{60}\text{Zn}_{35}\text{Ca}_5$  para implantación en hueso.

No todos los materiales metálicos son aceptados biológicamente por parte de los tejidos que están en contacto con ellos, por esto los estudios de biocompatibilidad son fundamentales para la aplicación de un biomaterial. Por otra parte, los materiales metálicos implantables, deben presentar una buena resistencia a la corrosión, ya que

si se produce la oxidación del metal por el ambiente hostil del cuerpo humano, además de que el implante se debilita, se produce una liberación de productos de corrosión a los tejidos circundantes que producen efectos no deseables.

Las pruebas *in vitro* son el primer paso en la evaluación de la biocompatibilidad de un material, permiten obtener un panorama general del comportamiento del material en contacto con un determinado tipo de células. Si los resultados de estos ensayos son favorables, entonces resulta viable proceder a la evaluación utilizando ensayos *in vivo*.

En el presente trabajo de tesis se contribuye en el conocimiento sobre la biocompatibilidad de una aleación vítrea de composición  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ .

En el capítulo de antecedentes se da un panorama sobre los tipos de biomateriales que existen y los requisitos necesarios para que un material pueda ser considerado biocompatible. Se da también un marco de referencia sobre los materiales metálicos que en la actualidad son utilizados para aplicaciones biomédicas y las características de las aleaciones amorfas; así como la descripción de su proceso de fabricación y de las técnicas utilizadas para su caracterización estructural y morfológica.

En el capítulo 2 se describe la metodología seguida para la elaboración de las cintas metálicas y su caracterización. Se describen también las pruebas *in vitro* llevadas a cabo para evaluar si el material tiene un efecto citotóxico sobre cultivos de linfocitos humanos. Los resultados de la caracterización y las pruebas *in vitro* son presentados y discutidos en el capítulo 3.

Finalmente se dan las conclusiones más relevantes de este trabajo de tesis y se detalla el trabajo futuro que es necesario realizar para poder conocer con certeza si este material puede ser considerado biocompatible o no.

# OBJETIVOS

---

- Obtener cintas metálicas de la aleación amorfa  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  mediante la técnica de *melt spinning*.
- Caracterizar morfológica y estructuralmente el material obtenido mediante Microscopía Electrónica de Barrido, Microscopía Electrónica de Transmisión y Difracción de Rayos X.
- Realizar pruebas de biocompatibilidad in vitro, que consisten en:
  - a) Evaluar mediante el estudio del índice mitótico si las células en contacto con el material modifican su capacidad de proliferación.
  - b) Determinar mediante el ensayo de MTT si la viabilidad de los linfocitos en cultivo se ve afectada por exposición a la aleación.
  - c) Estudiar la morfología de macrófagos peritoneales de ratón expuestos a la aleación, así como el grado de adhesión y proliferación de manera cualitativa.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

---

### 1.1 Biomateriales y criterios de biocompatibilidad

Un biomaterial puede ser definido como cualquier material utilizado para fabricar dispositivos que reemplacen una parte o función del cuerpo en una forma segura, económica, confiable y fisiológicamente aceptable (Park & Lakes, 2007).

Los biomateriales pueden ser clasificados dentro de cinco categorías que son (Madhally, 2010):

- a) Metales y aleaciones: se utilizan principalmente para la fabricación de prótesis ortopédicas e implantes dentales. La tendencia actual es buscar nuevas técnicas de procesamiento para mejorar y maximizar las propiedades mecánicas y lograr que sus superficies sean adecuadas para una adecuada respuesta biológica.
- b) Cerámicos: se pueden subdividir a su vez en cerámicos bioinertes, que presentan excelente biocompatibilidad ya que son no tóxicos, no carcinogénicos, no alérgicos y relativamente no inflamatorios; cerámicos de superficie reactiva que al ser implantados en el cuerpo, interaccionan favorablemente con el tejido circundante mediante una reacción superficial de intercambio iónico y cerámicos reabsorbibles que son degradados tiempo después de la implantación en el organismo huésped.
- c) Polímeros: son la clase de biomateriales más versátil y se aplican extensamente en medicina para suturas, prótesis, ligamentos, etc. Los criterios básicos de diseño para un biopolímero requieren materiales biocompatibles, esterilizables, con resistencia química, rigidez y con estabilidad o degradación controlada en respuesta a las condiciones biológicas.

- d) Compositos: son materiales constituidos por más de un componente lo cual permite modificar notablemente las propiedades mecánicas en comparación con los materiales por separado. Se aplican por ejemplo para prótesis ortopédicas en las que al recubrir el metal con una capa de cerámico se mejora notablemente la resistencia a la corrosión por el medio biológico.
- e) Materiales biológicos: estos biomateriales se obtienen a partir de tejidos; se aplican principalmente en la medicina regenerativa, por ejemplo como andamios acelulares para hacer crecer sobre éstos las células del paciente y poder regenerar órganos, hueso, músculo, etc.

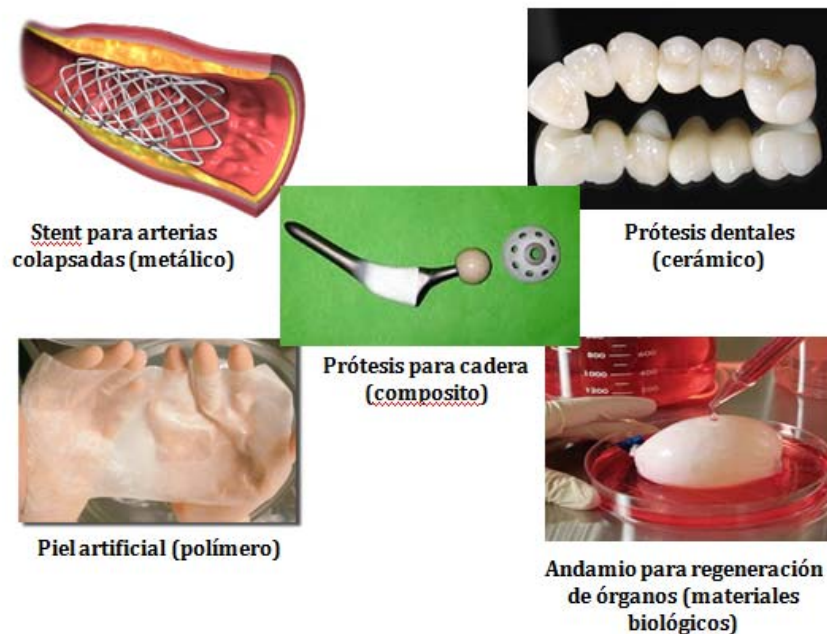


Figura 1.1 Aplicaciones de los diversos tipos de biomateriales

La inserción de un material extraño en el cuerpo induce una cascada de eventos producidos básicamente en la interfase entre el material implantado y el tejido que lo rodea. El grado de respuesta fisiológica hacia el material depende del lugar donde haya sido implantado y de la composición y propiedades mecánicas del material. Así, la respuesta del cuerpo a materiales extraños está influenciada por una gran variedad de factores (Ratner et al. 2006)



Para evaluar y reducir el riesgo de efectos colaterales inesperados o indeseados, es necesario realizar pruebas de biocompatibilidad para examinar nuevos biomateriales y/o dispositivos biomédicos destinados a la implantación. La evaluación biológica de la seguridad del material es una tarea compleja, ya que requiere conocimientos de diversas disciplinas como medicina, biología, química, patología, ingeniería y ciencia de materiales.

La palabra biocompatibilidad puede ser definida como la compatibilidad entre un material y el sistema biológico. Probablemente la mejor definición de biocompatibilidad es la que se acordó en la Conferencia de Consenso sobre Definiciones en Biomateriales en 1986 (de la Sociedad Europea de Biomateriales), la cual es “la habilidad de un material de actuar con una adecuada respuesta al huésped, en una aplicación específica” (Williams, 1986)

El tipo de metodología utilizada para evaluar la biocompatibilidad, dependerá de la función que se desea que tenga el material y tendrá que tomar en cuenta el entorno biológico al que estará expuesto según el tipo de tejido u órgano, las propiedades fisicoquímicas del material y la duración del periodo de implantación.

Dado que la biocompatibilidad busca la aceptabilidad biológica, esta puede examinarse a varios niveles de interacción:

- La interacción entre el material y los tejidos.
- La reacción resultante de la degradación del material.
- Factores mecánicos (elasticidad, tenacidad etc.) o físicos.

Además la interacción debe considerarse tanto del implante hacia el tejido como a la inversa. Cualquier riesgo biológico que pueda ser consecuencia del uso de biomateriales, depende de una serie de factores incluyendo el uso, frecuencia, duración de la exposición, cantidad o identidad de sustancias migradas al cuerpo humano así como la actividad biológica de dicha sustancia.

Cualquier nuevo material que se proponga para funcionar como biomaterial debe ser evaluado para obtener un perfil toxicológico antes de continuar con el diseño del

dispositivo para el cual se pretenda utilizar. Si el material exhibe una evidencia significativa de toxicidad, se debe examinar minuciosamente si es posible hacerle algún tratamiento para volverlo biocompatible antes de buscar un material alternativo.

La principal normatividad que regula las pruebas de biocompatibilidad para dispositivos biomédicos, es la ISO 10993 la cual describe un conjunto de estándares para evaluar la biocompatibilidad de un material previo a ser sometido a estudios clínicos (ISO 10993)

### **1.1.1 Biomateriales metálicos**

Los implantes y prótesis son fabricados de una amplia variedad de materiales incluyendo metales, polímeros, cerámicos y materiales compuestos. Entre estos materiales, los metales son los que se han usado desde tiempos más remotos. Sus primeros antecedentes documentables se remontan al siglo XXX a.C., en el antiguo Egipto. También durante las civilizaciones clásicas de Grecia y Roma (siglo VII a.C. a siglo IV d.c.) se usaron materiales no biológicos, en particular, metales y otros materiales naturales para el tratamiento de heridas y de algunas enfermedades (Silver & Christiansen, 1999).



Figura 1.2 Los antiguos egipcios empleaban alambres de oro para amarrar la corona del diente de un donador a sus propios dientes.

Ya en la era moderna, en la Europa del siglo XVI se empleó el oro y la plata para la reparación dental y, más tarde, hilos de hierro para la inmovilización de fracturas óseas. Los avances tecnológicos de fines del siglo XIX, en particular el desarrollo de la anestesia, de la cirugía en condiciones estériles y de los rayos X, dieron un fuerte impulso a la búsqueda de metales que pudieran ser utilizados en el interior del cuerpo. Pero a poco tiempo de la aplicación de metales a este fin, aparecieron inconvenientes causados por la corrosión o porque los metales carecían de las propiedades mecánicas necesarias para que el dispositivo cumpliera adecuadamente la función para la que fue diseñado. Hacia 1940 se mejoró la resistencia a la corrosión de los aceros mediante el agregado de 2-4% de molibdeno. Hacia 1960 se redujo la cantidad de carbono en estos aceros inoxidable a menos del 0,03% (tipo 316L), por lo que se logró una importante mejoría adicional. Posteriormente, la introducción del titanio y de sus aleaciones con niobio y tántalo, extendió el campo de aplicación de los metales.

Algunos elementos en estado puro, como cobalto, níquel o vanadio son en general tóxicos y en muchas ocasiones desencadenan reacciones alérgicas. Sin embargo, estando aleados como soluciones sólidas la cantidad de iones que se liberan al medio fisiológico es insignificante y por lo tanto no suponen riesgo (Sastre, 2004).

Los vidrios metálicos son relativamente nuevos en el campo de los biomateriales, sin embargo se ha hecho mucho énfasis en su estudio ya que estos materiales presentan excelentes propiedades mecánicas y versatilidad para su procesamiento, características que son deseables para la fabricación de implantes (Schroers et al, 2009). Durante los últimos veinte años, se han desarrollado un amplio rango de aleaciones vítreas entre las que destacan las que son base Zr-, Fe-, Cu-, Ni-, Ti-, Mg-, Pd-, Au- y Pt-; se ha realizado poca investigación sobre la biocompatibilidad de estos materiales, sin embargo los resultados que se tienen sugieren que estos materiales tienen un gran potencial como biomateriales.

## 1.2 Aleaciones vítreas o vidrios metálicos

El término vidrio metálico es aceptado generalmente para definir una clase de aleación amorfa, es decir sin un orden atómico, obtenida por solidificación rápida de un estado líquido. Mientras un material metálico tradicional posee una estructura ordenada de átomos llamada estructura cristalina, los vidrios metálicos poseen el desorden atómico típico de los líquidos como se muestra en la figura 3. El primer vidrio metálico, una aleación de oro y silicio, fue sintetizado en el Instituto de Tecnología de California en el verano de 1959 (Klement et al, 1960 ). El método de fabricación consistía en eyectar la aleación fundida sobre una superficie fría dando lugar a una fina capa de metal rápidamente solidificada; de esta manera se obtuvo el inesperado resultado de un sólido con una estructura atómica desordenada.

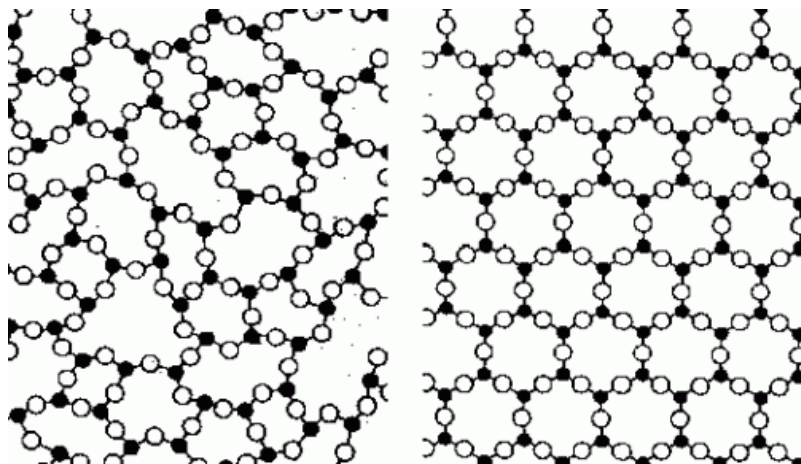


Figura 1.3 Comparación entre la estructura de un sólido amorfo (izquierda) y un sólido cristalino (derecha).

Una de las principales características de los vidrios metálicos es su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ). A esta temperatura y por debajo de ella, los cambios en la estructura atómica del líquido subenfriado se vuelven más difíciles y los átomos quedan “congelados” en una estructura amorfa metaestable.

La figura 1.4 es una representación de la variación del volumen frente a la temperatura. Al contrario que un sólido cristalino, que presenta una temperatura de fusión a la cual realiza la solidificación, tal como se indica en la figura siguiendo el

camino ABC, el material no cristalino se vuelve más viscoso a medida que la temperatura va disminuyendo, siguiendo el camino AD de la figura, transformándose a un estado vítreo, quebradizo y rígido en un intervalo reducido de temperaturas, donde la pendiente de la curva del volumen específico frente a la temperatura es marcadamente decreciente. El punto de intersección de las dos pendientes de la curva AD corresponde a la temperatura de transición vítrea,  $T_g$ .

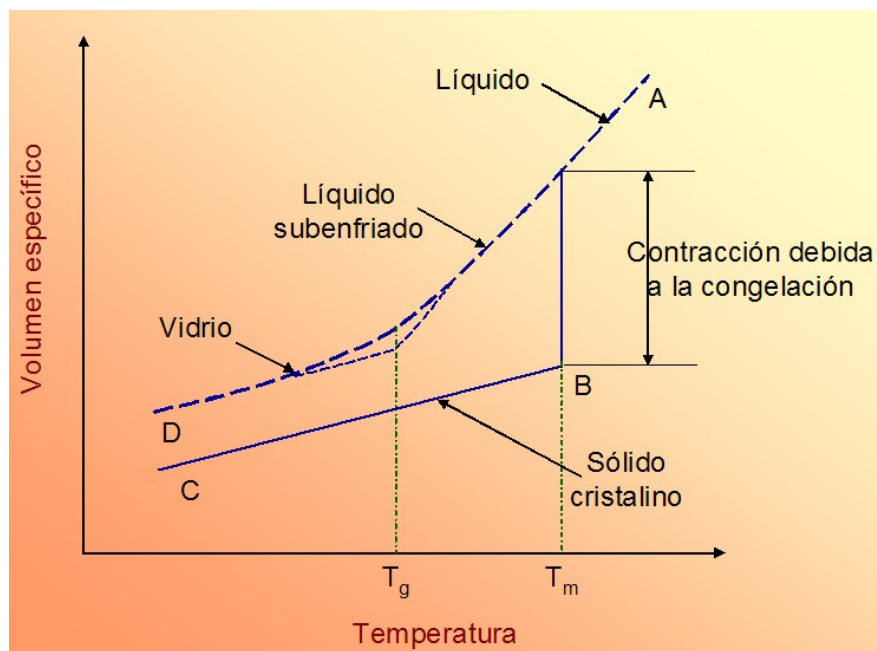


Figura 1.4 Solidificación de materiales cristalinos y vítreos.  $T_g$  es la temperatura de transición de un material vítreo.  $T_m$  es la temperatura de fusión de un material cristalino.

A diferencia de las aleaciones con estructura cristalina, las aleaciones vítreas no presentan fronteras de grano en las cuales se concentran la mayor parte de los esfuerzos y las fallas que puede presentar un material. Esto les confiere interesantes propiedades mecánicas que resultan de particular interés cuando se busca diseñar un biomaterial para aplicaciones ortopédicas por dar un ejemplo; entre las propiedades más notables están la superior resistencia al desgaste y a la corrosión (Schroers et al, 2009).

Lograr la producción de una aleación metálica amorfa no siempre resulta fácil; de hecho, por años se argumentó que era imposible fabricar vidrios metálicos por un par

de razones: la primera es que los metales tienen una fuerte tendencia a cristalizar cerca del punto de solidificación y la segunda, los metales en ese punto tienen una baja viscosidad por lo que se facilita el proceso de difusión de los átomos para formar una red cristalina. Por lo anterior, para fabricar vidrios metálicos es necesario la combinación de dos factores (Moya, 2009): 1) una velocidad de enfriamiento suficientemente rápida para “congelar” la estructura desordenada que posee el material fundido y 2) elementos inhibidores de la cristalización en la composición química de la aleación.

# CAPÍTULO 2

## PROCESAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

---

### 2.1 Procesado de aleaciones vítreas por la técnica de *melt spinning*

La formación de fases amorfas se lleva a cabo mediante un proceso de solidificación rápida de una aleación en fase líquida. Cuando se enfría una aleación desde la fase líquida, al llegar a la temperatura de fusión  $T_m$  se produce la nucleación de cristales. Si se permite al sistema alcanzar el equilibrio inmediatamente después se produce el crecimiento de estos núcleos. Sin embargo, si el líquido es enfriado rápidamente se produce un subenfriamiento manteniéndolo en una situación metaestable. Cuando el ritmo de enfriamiento es suficientemente elevado, se llega a evitar la cristalización debido a que la movilidad atómica disminuye tan rápidamente que no es posible alcanzar el equilibrio termodinámico. Esto supone la formación de una fase amorfa.

Durante los últimos 20 años, las aleaciones amorfas se han fabricado comercialmente mediante el proceso conocido como *melt spinning* (Ashby & Jones, 2009)

En esta técnica, desarrollada originalmente por Duwez en 1960 (Duwez et al. 1960), una aleación previa denominada aleación madre, se funde por medio de un horno de inducción en el interior de un crisol que generalmente es de cuarzo. La aleación fundida se inyecta mediante un gas inerte a presión a través de un pequeño orificio que hay en la parte interior del crisol. El líquido inyectado cae sobre una rueda que gira a alta velocidad y que actúa como foco térmico enfriando la muestra (figura 2.1). De este modo el material solidifica y debido al breve intervalo de tiempo que transcurre desde que pasa de la temperatura de fusión a la temperatura ambiente que es alrededor de un milisegundo, la solidificación se produce a un ritmo de enfriamiento del orden de  $10^6$  °C/seg.

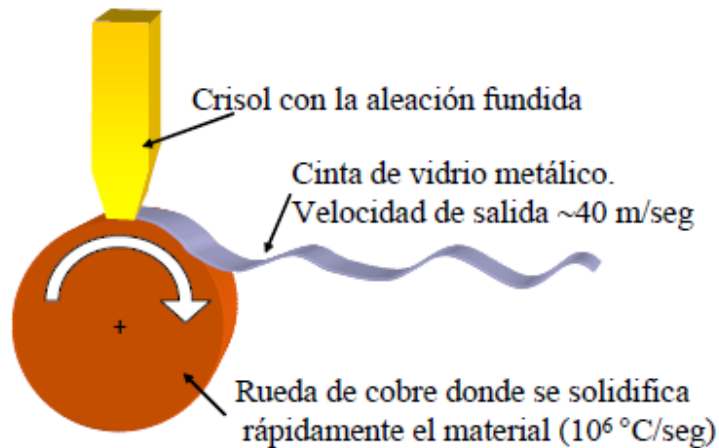


Figura 2.1 Esquema de la obtención de vidrios metálicos con la técnica de melt spinning

## 2.2 Técnicas de análisis estructural y morfológico

### 2.2.1 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una de las técnicas más utilizadas para el análisis estructural de sólidos; está sustentada por la ley de Bragg que se explica a continuación: los rayos X tienen una longitud de onda comparable con la distancia interplanar de los átomos en un sólido (Callister 2007), cuando estos son dirigidos de manera que incidan en un material cristalino, los rayos son difractados por los planos del cristal. Si el haz de rayos X incide con un ángulo arbitrario contra un conjunto de planos cristalinos, generalmente no habrá un haz reflejado, debido a que los rayos reflejados por los planos del cristal deben recorrer diferentes longitudes y tenderán a estar fuera de fase y cancelarse entre sí. Sin embargo, a un ángulo específico conocido como el ángulo de Bragg ( $\theta$ ), los rayos reflejados estarán en fase debido a que la distancia que recorren será un número entero de las longitudes de onda. La ecuación que relaciona el ángulo de Bragg con la distancia entre planos es la denominada ley de Bragg (figura 2.2):

$$n\lambda = 2d\text{sen}\theta$$



Donde  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X,  $d$  es la distancia entre los planos del cristal,  $\theta$  es el ángulo de Bragg o ángulo de incidencia del haz de rayos X y  $n$  es el orden de difracción.

Este tipo de radiación electromagnética se produce con la ayuda de un dispositivo llamado tubo de rayos X que básicamente consiste en un tubo de vidrio al vacío, dentro de éste es acelerado un haz de electrones por medio de una diferencia de potencial (30 - 50 kV) hacia un blanco o ánodo; los ánodos más utilizados son de cobre, cobalto, molibdeno y plata. Los rayos X deben ser monocromáticos para utilizarse en un experimento de difracción. Para lograr esto, los rayos X pasan a través de un filtro que selecciona la radiación  $K_\alpha$  del espectro característico del elemento que forma el ánodo.

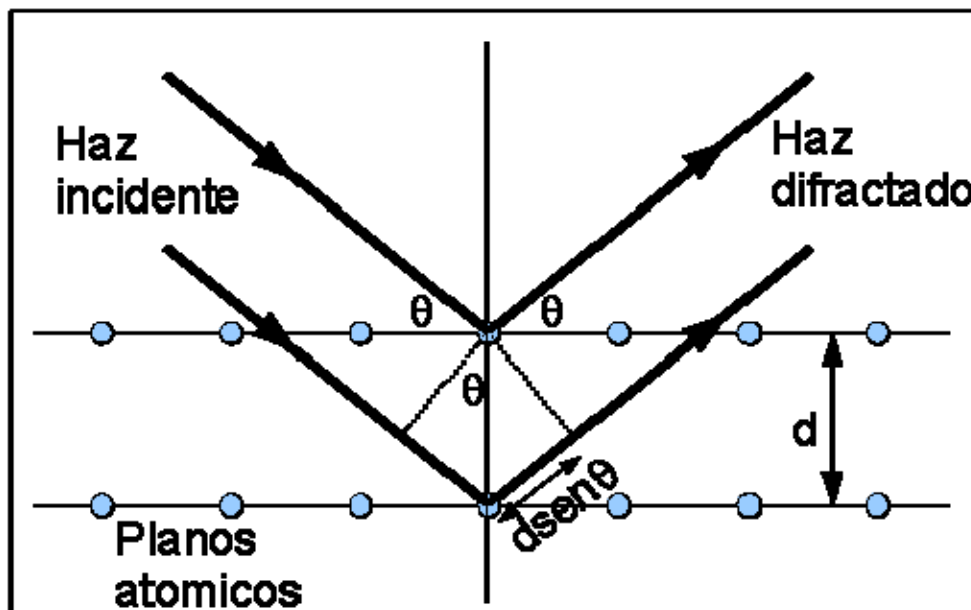


Figura 2.2 Esquema que describe la ley de Bragg

Los rayos difractados son detectados y transformados en pulsos eléctricos los cuales se registran análogamente; con los datos obtenidos y con la ayuda de una computadora se obtienen gráficas de intensidad relativa en función de  $2\theta$ , denominados difractogramas.

En los materiales cristalinos, el patrón de difracción tiene como característica fundamental la presencia de picos agudos bien definidos (figura 2.3), esto debido a que por el orden periódico en la estructura de estos materiales, existen diferentes planos atómicos que difractan el haz de rayos X incidente.

La ausencia de orden a largo alcance en los materiales amorfos implica que no habrá planos cristalográficos y por lo tanto no se presentarán máximos de difracción en el patrón obtenido; en cambio, se obtienen señales difusas basadas en la distribución de las distancias interatómicas dentro de la estructura desordenada.

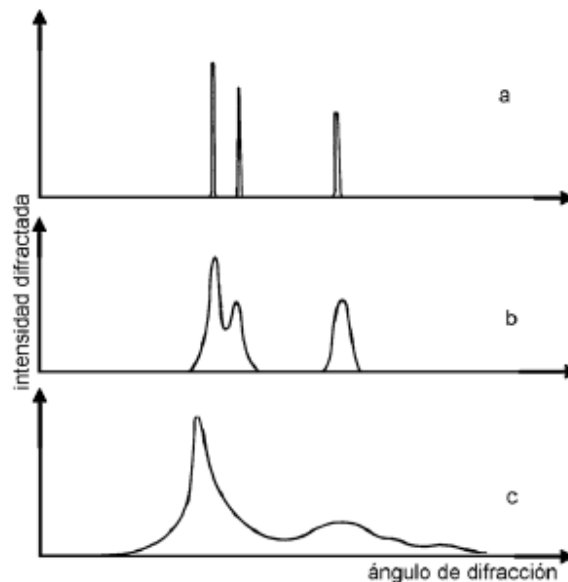


Figura 2.3 Comparación entre los patrones de difracción de a) un material cristalino, b) un material de dimensiones nanométricas y c) un material amorfo.

### 2.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión

En el microscopio electrónico de transmisión, los electrones son emitidos desde un filamento y acelerados en un campo eléctrico. Una lente condensadora enfoca el haz de electrones sobre la muestra; las lentes del objetivo y del proyector enfocan los electrones que pasan a través de la muestra y los proyectan sobre una pantalla de observación u otro detector. Debido a que los electrones son absorbidos por los

átomos del aire, todo el tubo entre la fuente de electrones y el detector se mantiene trabajando con vacío (al igual que en el microscopio electrónico de barrido).

La corta longitud de onda de los electrones implica que el límite de resolución para la microscopía electrónica de transmisión es, en teoría, de 0.005 nm.

### 2.2.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido se usa principalmente para el estudio de superficies de materiales sólidos (Sibilia, 1988). Esta permite observar el campo de la muestra con profundidad y con una resolución de alrededor de 3nm.

Esta técnica consiste en generar un haz puntual de electrones sobre un material. La interacción del haz con la muestra analizada produce varios tipos de señales, tales como: electrones retrodispersados, electrones secundarios, electrones Auger, rayos X continuos, rayos X característicos entre otros (figura 2.4).

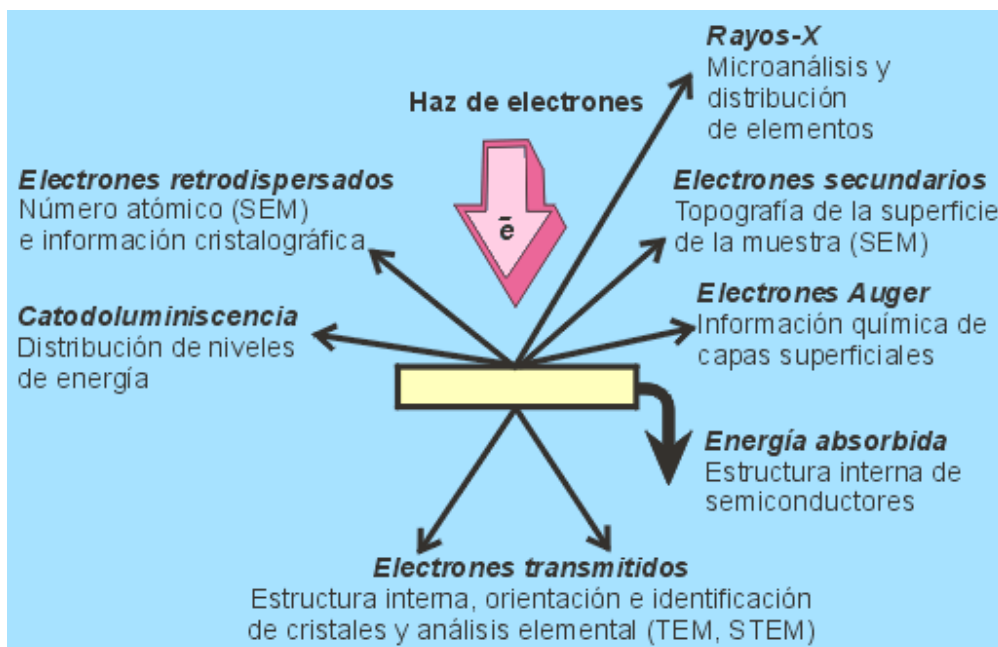


Figura 2.4 Señales obtenidas por la interacción del haz de electrones con la muestra

Las señales utilizadas para la obtención de imágenes son los electrones retrodispersados y los electrones secundarios.

Los electrones secundarios son sensibles a cambios en la morfología superficial del material, esta señal proviene principalmente del área que se encuentra debajo del haz, por lo que forma una imagen de gran resolución de la topografía de la muestra.

Por otro lado, los electrones retrodispersados son capturados por un detector más sensible, con esta señal se puede generar una imagen que provee contrastes entre los diferentes números atómicos; así, las áreas del material que contengan elementos de mayor número atómico serán más brillantes, lo cual permite diferenciar fases o granos en un material (Sastre, 2004).

# CAPÍTULO 3

## PRUEBAS DE BIOCOMPATIBILIDAD

---

### 3.1 Estudios de citotoxicidad *in vitro*

Cualquier programa de evaluación de la biocompatibilidad de un material debe incluir un conjunto de pruebas *in vitro* e *in vivo*. Las pruebas *in vitro* son experimentos de simulación del entorno biológico que son rápidos y sirven para dar una primera idea sobre la biocompatibilidad del material en estudio. Con los resultados de las pruebas *in vitro* no se puede obtener información acerca de la respuesta inflamatoria o de la respuesta inmune que ha generado el material ya que se utiliza generalmente un solo tipo de células para realizar el cultivo y por lo tanto no provee la representación apropiada de un entorno fisiológico porque no refleja la interacción que habría en un tejido en donde se encuentran involucrados varios tipos de células. Sin embargo, estos experimentos son menos costosos que los experimentos *in vivo* y resultan altamente efectivos como primer paso en la evaluación de la biocompatibilidad (Basu et al. 2009).

Las principales pruebas *in vitro* que se requieren hacer antes de poder proceder a realizar pruebas *in vivo* son:

- a) Citotoxicidad: estos experimentos determinan si un material es tóxico en contacto con ciertos cultivos de células. Como primer paso, se lleva a cabo la esterilización del material para remover microorganismos presentes en la superficie. El medio de cultivo que se utiliza en los cultivos celulares de prueba es DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium); el tipo de células usadas dependerá de la aplicación que se le quiera dar al material.
  
- b) Genotoxicidad: en estos experimentos se observa principalmente cuando ocurre cualquier mutación genética en las células al estar en contacto directo

con la superficie del material, algunos ejemplos de estas pruebas son: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas, electroforesis unicelular alcalina conocida también como ensayo cometa, entre otras.

- c) Hemocompatibilidad: estas pruebas evalúan la compatibilidad del material con los glóbulos rojos de la sangre. En particular, se busca saber si el contacto directo con el material induce la formación de trombos o cambios en el contenido de glóbulos rojos en la sangre.

### **3.2 Linfocitos como sistema de prueba**

El sistema inmune consiste de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  linfocitos, los cuales circulan libremente en la sangre o se hallan en los espacios estructuralmente específicos de ciertos órganos como los nódulos linfáticos, el timo, el bazo y la médula ósea. En términos de masa celular, los linfocitos son equivalentes al hígado o al sistema nervioso central y por lo tanto ocupan tanto lugar como estos sistemas de órganos.

Una gran proporción de los linfocitos se hallan en circulación constante de los órganos linfáticos a los linfáticos eferentes, de allí al ducto torácico y a la circulación sanguínea. Se logra, de esta manera una mezcla y una interacción ubicua de todas las células del sistema inmune.

Estas características generales, aunadas al hecho de que estas células se pueden obtener con técnicas poco invasivas para el ser humano, han hecho que sea considerado como un buen tejido sustituto para investigar los efectos citotóxicos y genotóxicos de la exposición a xenobióticos<sup>1</sup> (Ostrosky & Gonsebatt)

Como se mencionó anteriormente, la ausencia de citotoxicidad, es decir, de un efecto tóxico en las funciones celulares es un prerrequisito para poder decir que un material será biocompatible.

---

<sup>1</sup> Xenobiótico: es una sustancia química que tiene su origen fuera del organismo por lo que son compuestos extraños para el mismo. Pueden ser de origen natural o sintético (Schwab, 2001)

Existen numerosas posibilidades para evaluar citotoxicidad in vitro; en particular, en esta investigación se propone utilizar el cultivo de linfocitos humanos como sistema de prueba para la detección de un posible efecto tóxico producido por las aleaciones en estudio.

### **3.3 Biomarcadores**

Un método de cuantificar el posible impacto sobre las funciones biológicas por la exposición a xenobióticos es el uso de procedimientos de monitorización biológica por medio de biomarcadores (Gil, 2001). Los biomarcadores se definen como una medición en un sistema biológico que refleja cuantitativamente la interacción con el agente potencialmente tóxico. Se clasifican en tres tipos (Repetto, 2009):

- a) Biomarcadores de exposición: permiten detectar que un individuo ha absorbido un xenobiótico y cuantificar la absorción mediante la determinación del tóxico o de alguno de sus metabolitos en tejidos o fluidos.
- b) Biomarcadores de efecto: son indicadores de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren en las células o tejidos. Son los biomarcadores más estudiados e incluyen modificaciones en la composición celular de la sangre, alteraciones en algunas actividades enzimáticas, aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o modificaciones en las funciones biológicas.
- c) Biomarcadores de susceptibilidad: es un indicador de que el individuo es especialmente sensible al efecto de un xenobiótico o un grupo de ellos. Se hace mucho hincapié en la susceptibilidad genética.

En el caso de este trabajo, se han propuesto como biomarcadores de efecto el ensayo de MTT para monitorear viabilidad celular y el índice mitótico que evalúa la proliferación celular y alteraciones al ciclo celular.

### 3.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular puede definirse como el número de células sanas dentro de una muestra, no se distingue si las células están dividiéndose activamente o si están inactivas (Rode, 2008).

En contraste con el análisis de viabilidad celular, la evaluación de la proliferación celular se define como la medición de las células que se dividen activamente en una muestra, por lo que las células en reposo no son detectadas aunque estén sanas.

Uno de los ensayos más comunes para cuantificar las células viables es el de la exclusión de azul de tripano (figura 3.1). Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no se tiñen con el azul de tripano debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que pueden pasar a través de la membrana; sin embargo, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio o una cámara Neubauer.

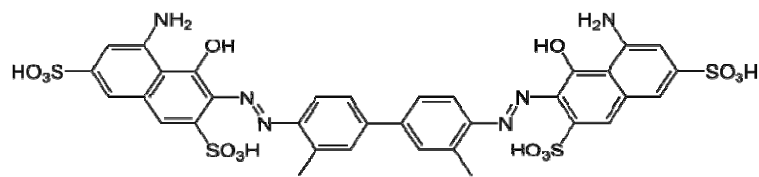


Figura 3.1 Estructura química del Azul de tripano o Azul de tripán, colorante azóico utilizado para tinciones histológicas.

De manera alternativa, se pueden emplear ensayos de actividad metabólica como indicadores indirectos de viabilidad celular ya que el daño conlleva inevitablemente a que la célula pierda su habilidad para proveer y mantener la energía necesaria para llevar a cabo sus funciones metabólicas y de crecimiento.

### 3.5 Ensayo de reducción de MTT

Este método permite la determinación del nivel de actividad metabólica de células eucarióticas. El fundamento químico es la reducción metabólica de la sal de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es de color



amarillo. Se reduce a formazan que se observa como cristales aciculares de color violeta. (Kupcsik, 2011).

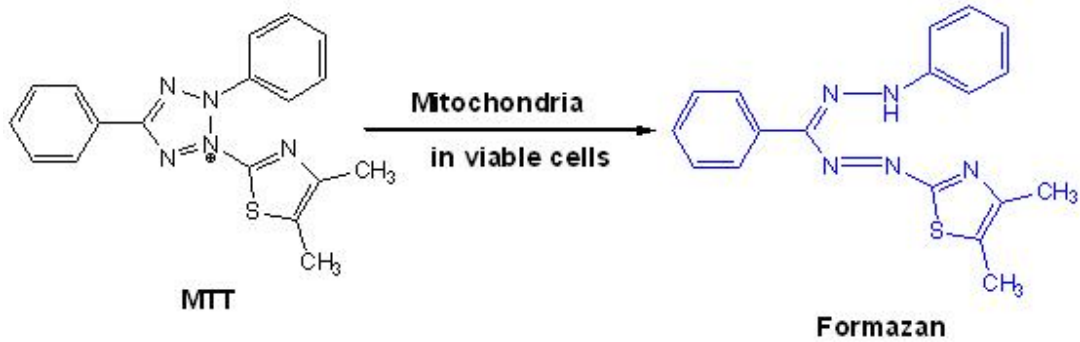


Figura 3.2 Reacción de reducción del MTT a formazan.

El proceso se lleva a cabo en la mitocondria; el sistema enzimático succinato – tetrazolio reductasa es el responsable de catalizar la reacción para que ésta se lleve a cabo.

Los cristales de formazan que se producen pueden ser solubilizados en isopropanol o dimetil sulfóxido [Mossman, 1983] y posteriormente se realiza la cuantificación por colorimetría en microplacas para lectores ELISA a 595nm (figura 3.3).

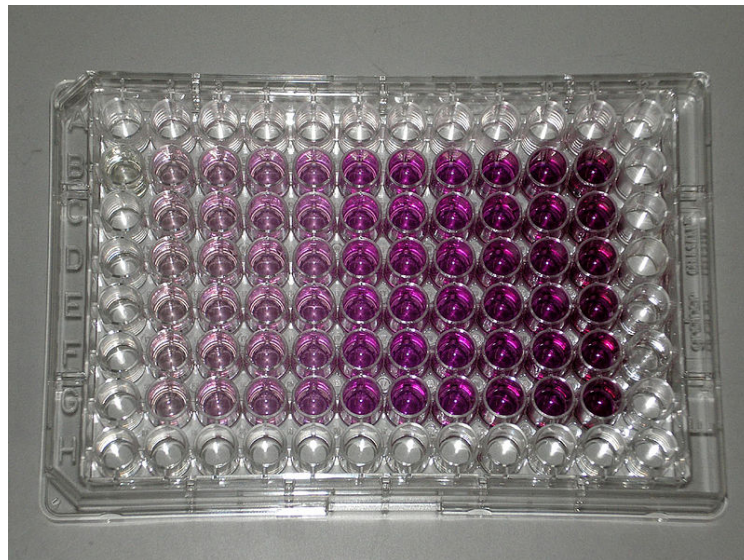


Figura 3.3 En el ensayo MTT la intensidad del color del producto de reacción es directamente proporcional al número de células viables.

Como las células proliferativas son más activas metabólicamente que las células en reposo, el ensayo es adecuado no solo para la determinación de la viabilidad celular sino también para la determinación de proliferación celular.

### 3.6 Determinación del índice mitótico

El índice mitótico es un parámetro basado en la determinación de proliferación celular como respuesta a la presencia de un agente externo y se define como el porcentaje de células que contienen cromosomas condensados en una etapa del ciclo celular, la mitosis.

En el ciclo de las células eucariontes (células que poseen núcleo) existen cuatro etapas: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> y M o Mitosis, como se observa en la figura 3.4 (Alberts, 2002).

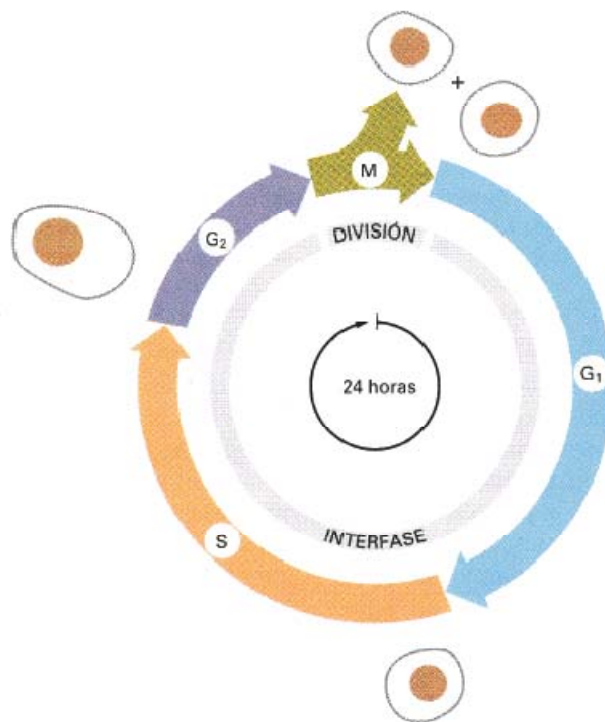


Figura 3.4 Las cuatro fases del ciclo de una célula eucarionte.

La fase M o mitosis se produce en varias etapas como se muestra en la figura 3.5. Durante la profase el material genético o cromatina se condensa en una forma muy compacta necesaria para la segregación y se vuelve visible al microscopio óptico como

cromosomas, al final de esta etapa, la membrana nuclear se desintegra, los centriolos migran a los polos de la célula y esta entra en metafase.

Durante su transcurso se forma el huso mitótico y los cromosomas se alinean en un plano de referencia conocido como placa metafásica; esta organización permite que en la siguiente fase cada nuevo núcleo reciba una copia de cada cromosoma.

En la anafase las cromátidas de cada cromosoma se separan, migrando hacia los polos de la célula mientras que el alargamiento del huso aumenta la separación entre los polos. Durante la telofase, el huso continúa alargándose mientras los cromosomas van llegando a los polos y se liberan de los microtúbulos del huso, estos se dispersan y vuelven a ser invisibles al microscopio óptico; en torno a ellos se reconstruye la membrana nuclear. Finalmente la célula se divide mediante el proceso conocido como citocinesis en el cual la membrana plasmática se estrangula de modo que fragmenta la célula original en dos células hijas (Watson et al., 2008)

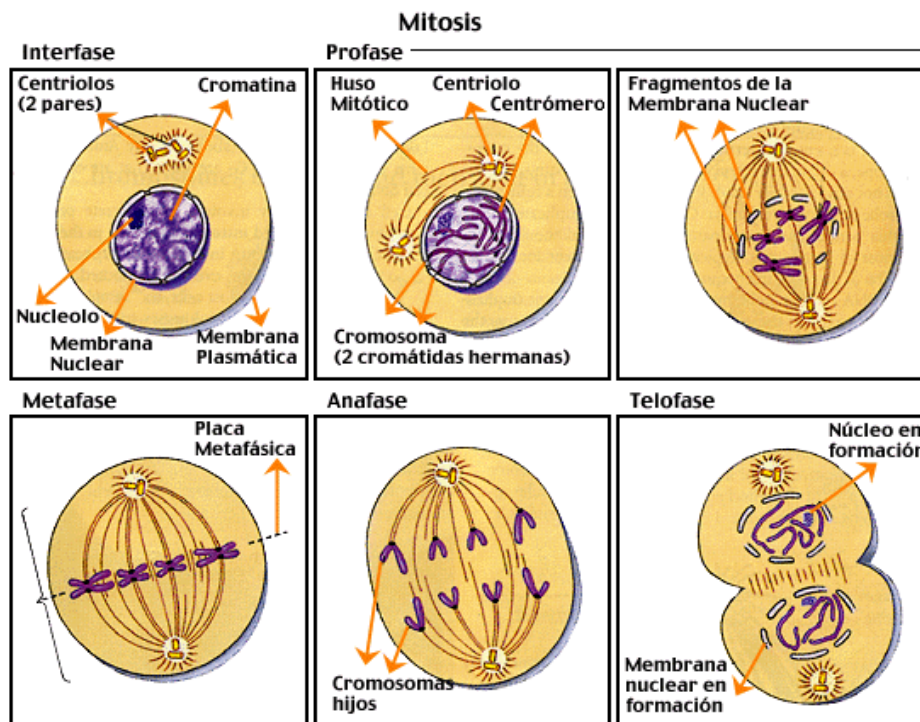


Figura 3.5 Fases de la mitosis

Para poder realizar la determinación del índice mitótico, es necesario añadir al cultivo un agente que detenga la división celular entre la profase y la metafase, en este punto los cromosomas ya son visibles y comienzan a alinearse en el huso mitótico.

La colchicina (figura 3.6) es un compuesto antimitótico que impide que la división celular se lleve a cabo. Su efecto se debe a su acción sobre las tubulinas, que son proteínas involucradas en la formación del huso mitótico. Al estar desorganizado el huso, los cinetocoros de las cromátidas no tienen donde anclarse y la división celular se interrumpe (Yang, 2010).

El colcemid es un análogo sintético de la colchicina que tiene los mismos efectos pero una menor toxicidad.

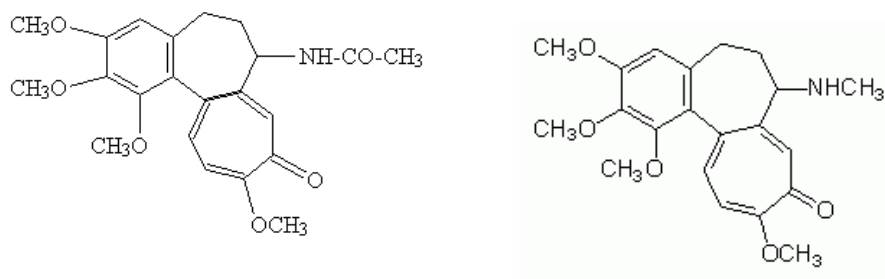


Figura 3.6 Estructura química de la colchicina (izquierda) y del colcemid (derecha)

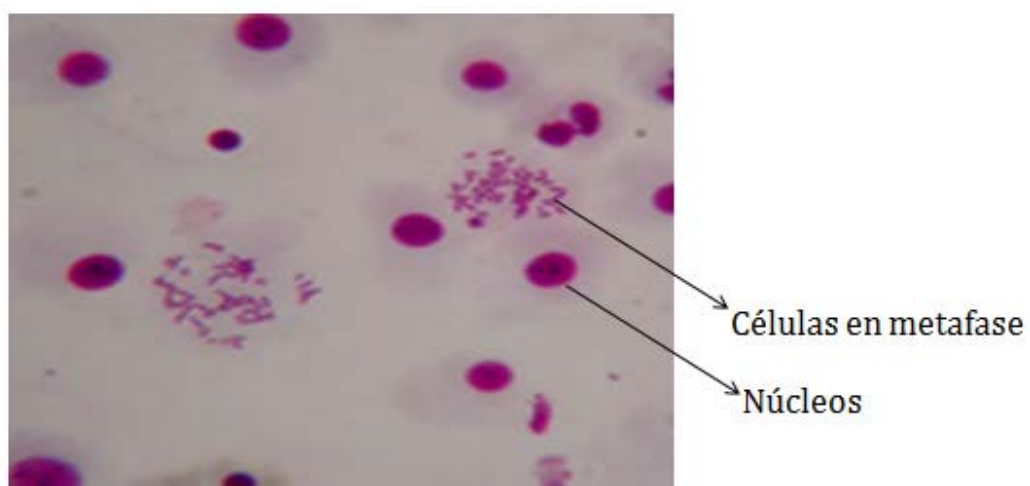


Figura 3.7 El índice mitótico se obtiene con la proporción de células en metafase del total de células contadas

El resultado que se obtiene con el índice mitótico nos permite tener una estimación de la duración relativa del ciclo celular. Un material citotóxico puede inducir la división desmedida de las células por lo que se obtendrá un índice mitótico significativamente más alto en comparación con el que se obtendría para un cultivo en el cual sólo están las células. Otra respuesta sería que el índice mitótico fuera más pequeño que el del cultivo testigo, en ese caso es un indicio de que no sólo no hay proliferación, sino que las células están muriendo por el contacto con el material.

### **3.7 Adhesión celular. Respuesta de macrófagos a biomateriales**

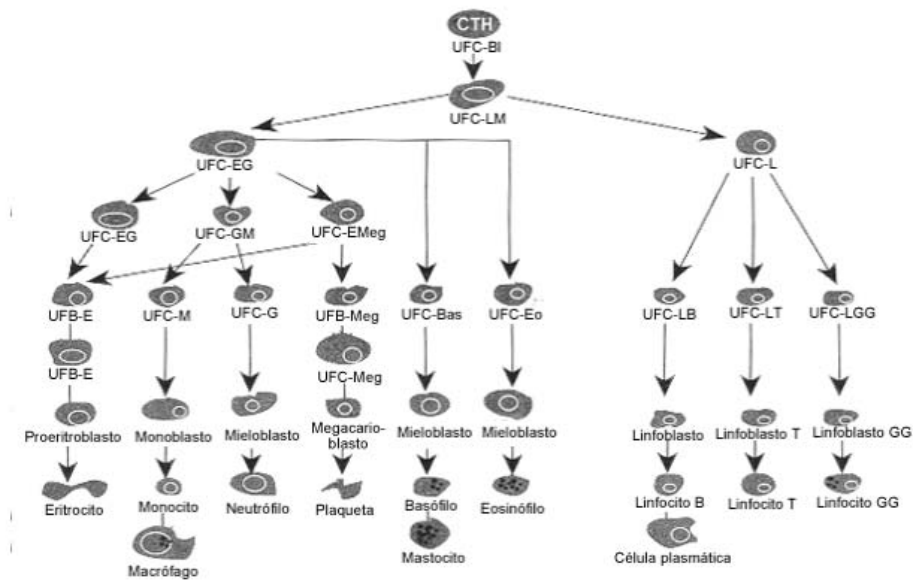
La biocompatibilidad de los biomateriales está fuertemente relacionada al comportamiento de las células en contacto con él y particularmente con la adhesión de las células a la superficie. La adhesión celular con todos sus procesos involucrados pertenece a la primera fase de interacciones célula – material, la cual influenciará la capacidad de las células para proliferar en contacto con el implante (Ramírez, 2005).

Cuando un material es implantado en el cuerpo, se desencadena una respuesta inmunológica debida a la presencia de cierta sustancia que el organismo detecta como un cuerpo extraño. Varios tipos de células intervienen según el tipo de respuesta inmune.

Los macrófagos son células mononucleadas del sistema inmunitario que responden rápidamente a la implantación de un biomaterial en tejido blando y duro (Xia et al., 1994). Estas células fueron descubiertas por el inmunólogo ruso Elie Metchnikoff. Proviene de células madre hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea, las cuales se diferencian posteriormente a un tipo de células llamadas monocitos; al llegar a los tejidos, los monocitos se diferencian a macrófagos los cuales constituyen las principales células fagocíticas<sup>2</sup> del sistema inmunitario innato presentes en los tejidos (Janeway, 2003).

---

<sup>2</sup> La fagocitosis es una función de células especializadas del sistema inmune capaces de remover cuerpos extraños y combatir infecciones como primera línea de defensa natural.



CTH = célula totipotencial hematopoyética. UFC= unidad formadora de colonias. UFB = unidad formadora de brotes. BI= blastos. LM = linfoide mieloide. GEMM = granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos. L = linfoide. EG = eritrocitos y granulocitos, megacariocitos. M = monocitos. G = granulocitos. Meg = megacariocitos. Bas = basófilos. Eo = eosinófilos. LB = linfocitos B. LT = linfocitos T. LGG = linfocitos grandes granulares.

Figura 3.7 Esquema de la hematopoyesis, proceso mediante el cual se diferencian las células madre hasta convertirse en macrófagos.

Como una variante morfológica, cuando las partículas a engullir son muy grandes para una sola célula (diámetro superior al intervalo de 10 - 100  $\mu\text{m}$ ), los macrófagos pueden fusionarse en células gigantes multinucleadas que también son conocidas como células gigantes de cuerpo extraño. Tanto los macrófagos como las células gigantes se pueden observar en la interfase tejido - material en dispositivos biomédicos (Anderson, 2000).

La principal función de los macrófagos es mediar la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria del organismo contra cuerpos extraños, adhiriéndose a ellos.

La interrelación exacta entre las propiedades fisicoquímicas del material, las proteínas que se adsorben sobre él y las células adherentes no está aún caracterizada por completo.

El primer paso que llevan a cabo los macrófagos como parte de su respuesta a un cuerpo extraño, es realizar un reconocimiento de la superficie del material para

distinguir entre las células y sustancias propias del organismo y los que corresponden a agentes extraños. El mecanismo por el cual se efectúa el reconocimiento no es bien conocido hasta ahora; sin embargo se piensa que después de la implantación, algunas proteínas de la sangre y de la matriz extracelular se adsorben sobre el biomaterial desencadenando la respuesta de los macrófagos (Kao, 1999).

Después del reconocimiento, los macrófagos requieren unirse al material antes de continuar con la respuesta de defensa. Esta unión se lleva a cabo mediante interacciones adhesivas mediadas por un grupo de proteínas llamadas integrinas.

Las integrinas son proteínas heterodiméricas transmembranales, las regiones terminales conectan al citoesqueleto (interior de la célula) con la matriz extracelular circundante (Greco, 1994).

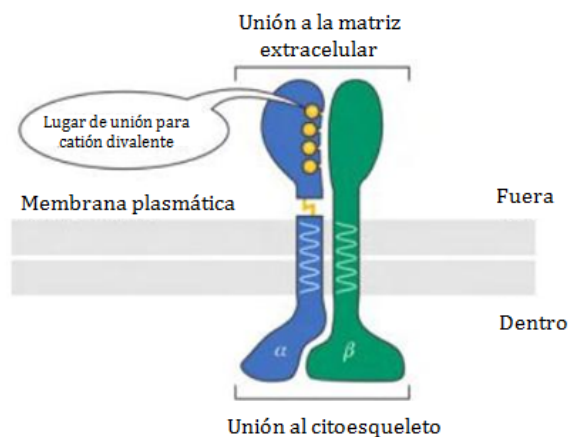


Fig 3.8 Estructura de las integrinas

Una vez que los macrófagos se adhieren sobre el material, da inicio el proceso de fagocitosis. Este consiste en que las células rodean al material (partículas  $< 10\mu\text{m}$ ) con su membrana citoplasmática y lo introducen al interior celular dentro de una vesícula denominada fagosoma.

Cuando el fagosoma se encuentra en el citoplasma comienza la desintegración del mismo mediante la digestión en la que intervienen los lisosomas (orgánulos celulares encargados de la digestión celular mediante enzimas).

Para partículas cuyo tamaño excede la capacidad de un solo macrófago, es decir partículas cuyo diámetro se encuentre dentro del intervalo de 10 - 100 $\mu$ m, se formarán macrófagos multinucleados, células gigantes multinucleadas o células gigantes de cuerpo extraño. Estas células tratarán de engullir las partículas grandes o en el caso de materiales en bulto permanecerán adheridas al material secretando matriz extracelular para recubrirlo y aislarlo.

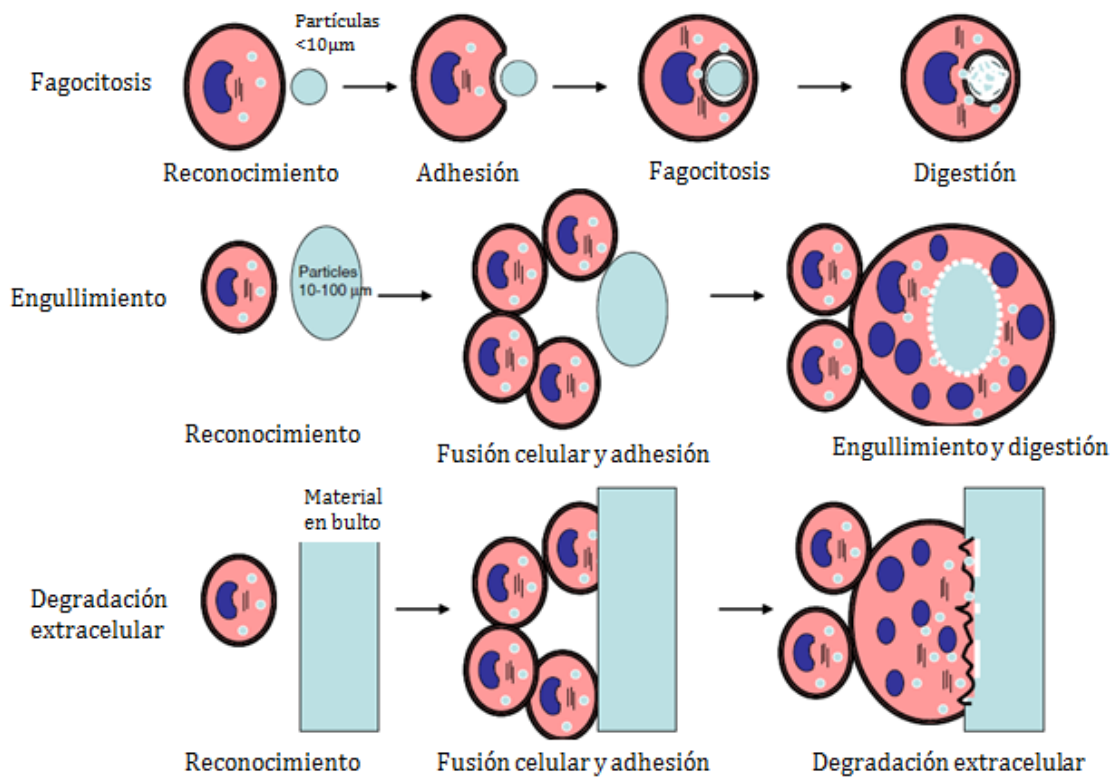


Fig 3.9 Esquema de la respuesta de macrófagos a un material extraño según el tamaño del mismo



# CAPÍTULO 4

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

---

### 4.1 Preparación y procesado de muestras

Para la fabricación de las cintas se parte de una aleación previa conocida como aleación madre, para la cual se pesaron los elementos níquel (AlfaAesar 99.9%), niobio (AlfaAesar 99.9%), y zirconio (AlfaAesar 99.9%), para obtener botones de 10 g con proporciones de 60 % en wt, 20% en wt y 20% en wt respectivamente.

Los elementos fueron colocados en un crisol de cobre que se encuentra en el interior de un horno de arco eléctrico (figura 4.1). Para impedir la oxidación de la muestra durante la fusión, el crisol se encuentra encerrado en el interior de una campana de vacío. Antes de comenzar el proceso de fusión se efectuaron cuatro purgas de dicha campana con argón para crear una atmósfera inerte. Se generó el arco eléctrico utilizando una fuente de poder y se fundió primero un material base (titanio) para consumir el oxígeno remanente que pudiera estar presente en la campana.

El proceso de fusión se realizó 4 veces cambiando de lado el botón obtenido para obtener una aleación lo más homogénea posible (figura 4.3).



Figura 4.1 Horno de arco eléctrico



Figura 4.2 En los crisoles se colocó titanio puro y después los elementos que componen la aleación



Figura 4.3 Fusión de los metales mediante arco eléctrico (izquierda) para formar una aleación homogénea (derecha).

Las cintas de la aleación ternaria vítrea  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  se prepararon mediante la técnica de *melt spinning* o solidificación rápida descrita en el capítulo 2. La aleación que se preparó previamente o aleación madre se fundió en un horno de inducción en el interior de un crisol de cuarzo al cual se le abrió un orificio en la parte inferior con un diámetro de 0.8 mm.

La aleación fundida se inyectó con una presión de 0.4 bar sobre una rueda de cobre que giraba a una velocidad tangencial de 25 m/s (figura 4.4).



Figura 4.4 Equipo para obtener cintas vítreas mediante la técnica de *melt spinning*

## **4.2 Caracterización estructural y morfológica**

### **4.2.1 Difracción de rayos X**

Las cintas metálicas producidas fueron analizadas mediante difracción de rayos X con el objetivo de analizar si se tiene una estructura cristalina o amorfa. La preparación de las muestras se realizó cortando segmentos de 30mm de las cintas y pegándolas a un portamuestras de sílice usando cinta de doble cara (figura 4.5).

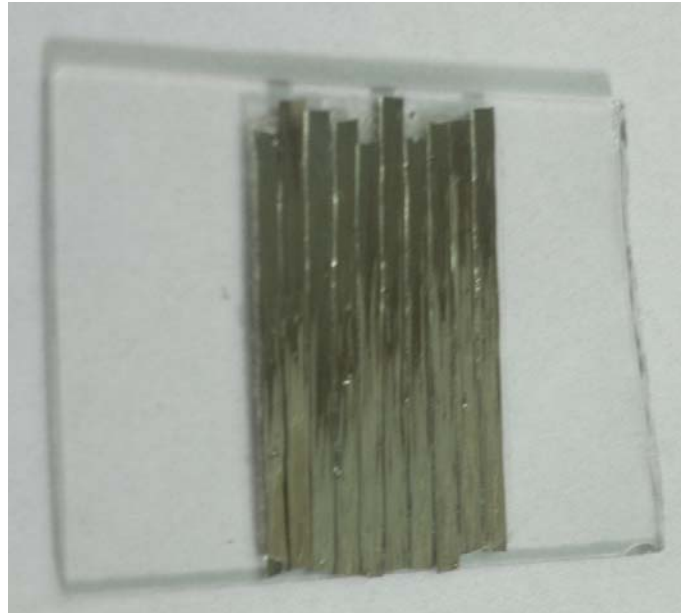


Figura 4.5 Montaje de la muestra para su análisis por difracción de rayos X.

Para el análisis de las muestras se utilizó el difractómetro de rayos X Siemens D5000 (figura 4.6) del IIM -UNAM con radiación  $k\alpha$  de Cu ( $\lambda = 0.5406$  nm) a 34 kV y 25 mA; el ángulo de barrido utilizado fue de 10 a 120°. Se estudiaron ambas caras de las muestras ya que las condiciones de cada una durante el procesamiento no son las mismas debido a que solo una cara de la cinta tiene contacto con el disco y por lo tanto las velocidades de enfriamiento son diferentes.



Figura 4.6 Difractómetro Siemens D5000 del Instituto de Investigaciones en Materiales.

#### **4.2.2 Microscopía electrónica de transmisión**

Se cortaron segmentos de 0.5 cm de las cintas y se colocaron sobre un soporte metálico pegándolas con silicón. Se adelgazaron en una pulidora utilizando primero una lija 2000 y luego una lija 4000.

Posteriormente se montaron sobre portamuestras de oro especiales para el microscopio de transmisión, esto con ayuda de un microscopio óptico como se observa en la figura 2.6 Se realizó un desgaste iónico mediante la técnica de ion milling para adelgazar la muestra a un grosor del orden de nanómetros de manera que el haz de electrones pudiera atravesarla. El equipo utilizado fue: Precision Ion Polishing System, modelo 691, Gatan.

Se utilizó el microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM-1200 EX del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM trabajando con una diferencia de potencial de 120 kV.

El análisis consistió en obtener imágenes de campo claro y un patrón de difracción.



Figura 4.7 Montaje de la muestra para realizar el desgaste iónico para microscopía electrónica de transmisión

#### **4.2.3 Microscopía electrónica de barrido**

Se realizó el análisis por microscopía electrónica de barrido a tres segmentos de la cinta metálica con la finalidad de caracterizar morfológicamente la superficie de ambas caras de la cinta. El microscopio utilizado fue marca Jeol modelo JSM 7600F del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM.

Las imágenes se obtuvieron utilizando el detector de electrones retrodispersados, se trabajó con una diferencia de potencial de 15 kV.

#### **4.3 Pruebas de citotoxicidad**

La evaluación de la citotoxicidad *in vitro* se realizó tomando como modelos experimentales linfocitos humanos para las pruebas de viabilidad celular e índice mitótico y macrófagos peritoneales de ratón para las pruebas de adhesión celular. Ambos tipos de células corresponden a células que se originan en la médula ósea y se diferencian mediante el proceso de hematopoyesis; forman parte del sistema inmunitario y son la primera línea de defensa del organismo.

Estas pruebas *in vitro* se realizaron en el laboratorio de Genética Evolutiva de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa.

#### **4.3.1 Colección de muestras sanguíneas para la obtención de linfocitos humanos**

Por cada donador se obtuvieron 10 mL de sangre periférica mediante punción venosa utilizando jeringas estériles con 0.3 mL de heparina (Microlab). Los donadores fueron 10 individuos adultos, 5 hombres y 5 mujeres de entre 25 y 35 años de edad habitantes de la Ciudad de México y miembros de la comunidad del IIM – UNAM, sanos, es decir, que no presentaran antecedentes de enfermedades recientes como gripe o infecciones gastrointestinales, que no consumieran alcohol, tabaco, drogas o medicamentos.

#### **4.3.2 Cultivo de linfocitos humanos**

La siembra de las células se realizó en condiciones de esterilidad, la muestra obtenida de cada donador fue distribuida en 18 tubos para cultivo de plástico (Axygen) para los donadores con los que se hizo control positivo o 12 tubos en los que sólo se formaron lotes testigo y experimental.



Figura 4.8 Material para cultivo de linfocitos en condiciones estériles



En cada tubo se agregaron 2.5 mL de medio DMEM (Gibco) preparado; cada 100 mL de medio contenían 4 mL de fitohemaglutinina (PHA, Microlab) como estimulante de la proliferación de linfocitos, 0.4 mL de solución antibacterial de penicilina – estreptomicina (In Vitro) y 1 mL de heparina (Microlab). Los lotes se incubaron a 37°C durante 24 horas.

#### 4.3.3 Exposición

Después de 24 horas, se realizó la exposición de los cultivos del lote experimental y del lote control positivo en condiciones estériles. Se abrieron los tubos y se les agregó un segmento de 2 cm de la cinta de la aleación vítrea  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  para el lote experimental, para el lote control positivo se colocaron rectángulos de 2cm de largo por 1 cm de ancho de cobre; previamente los metales se limpiaron con etanol en un baño de ultrasonido (Branson) y luego con agua destilada estéril antes de introducirlas en los tubos.

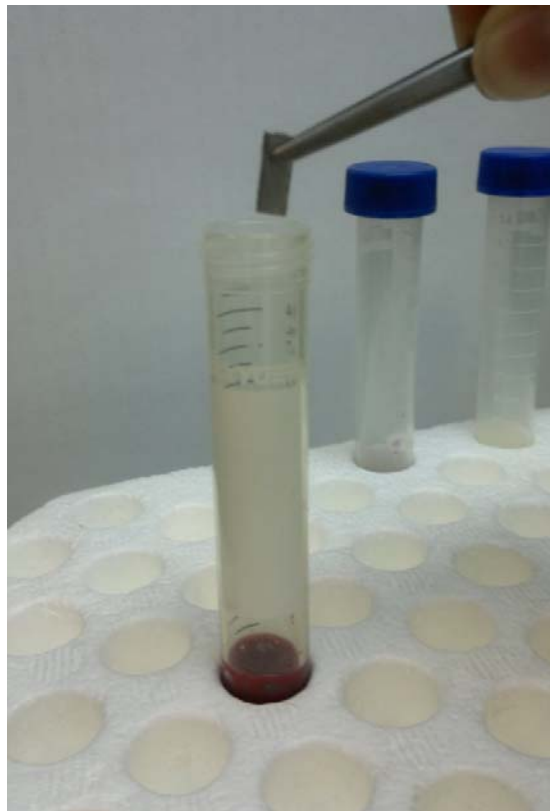


Figura 4.9 Exposición de los cultivos a la aleación en estudio

Los cultivos se incubaron de nuevo a 37°C durante 48 horas más.



Figura 4.10 Incubación de los cultivos de sangre periférica a 37°C.

La mitad de los cultivos de cada lote se utilizó para elaborar preparaciones para determinar el índice mitótico y la otra mitad se destinó para realizar el ensayo de MTT.

#### **4.3.4 Viabilidad celular. Ensayo de MTT**

Se utilizó la técnica del ensayo de MTT descrita por Mossman en 1983 para la determinación de viabilidad celular por actividad metabólica mitocondrial.

Se retiraron los cultivos de la incubadora y se centrifugaron durante diez minutos a 1500 rpm. Con una micropipeta se tomaron 75  $\mu$ L de la capa de glóbulos blancos y se transfirieron a tubos de ensayo limpios y etiquetados. A cada tubo se le agregaron 5 mL de una solución buffer de lisis de eritrocitos y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 minutos, los tubos se homogeneizaron a la mitad del tiempo de incubación.

Posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 2000 rpm y después se decantaron. El botón celular se resuspendió y se le agregaron 5 mL de una disolución hipotónica de KCl (JT Baker) al 0.04% y una vez homogeneizados, se incubaron durante 10 minutos a 37°C.

Después del tiempo de incubación, se separaron los linfocitos por centrifugación a 2000 rpm durante diez minutos. Los tubos se decantaron completamente.

Utilizando una micropipeta, en cada tubo se añadieron 50  $\mu$ L de MTT (Sigma)<sup>3</sup> resuspendiendo para romper el botón celular y se incubaron durante 3 horas y media a 37°C para que se llevara a cabo la reacción de reducción de MTT a formazán. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se agregaron 100  $\mu$ L de isopropanol en cada tubo y se incubaron durante 10 minutos más para solubilizar los cristales de formazán.

El contenido de los tubos se transfirió a los pozos de una microplaca para lector ELISA y se midió la absorbancia a 595 nm.



Fig 4.11 Microplaca de 96 pozos para lector ELISA,

#### 4.3.2 Índice mitótico

Después de 72 horas de incubación, se agregaron a los cultivos 0.125 mL de Colcemid (Microlab) y se reincubaron por una hora a 37°C; esto con la finalidad de detener el proceso de mitosis en la metafase y así poder observar los cromosomas.

---

<sup>3</sup> El MTT es un polvo amarillo, este se disolvió en PBS para obtener una concentración de 5 mg/mL. Se conservó en un frasco opaco en refrigeración.

Los linfocitos se separaron mediante centrifugación a 1500 rpm por diez minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió para romper el botón celular. Posteriormente se les dio un tratamiento con una solución hipotónica de KCl (JT Baker) al 0.4%, se añadieron 7 mL de esta solución a cada tubo y se incubaron media hora a 37°C, la solución hipotónica provoca la entrada de agua en las células como consecuencia de la diferencia de presión osmótica, esto se hizo para promover el hinchamiento de las células y que éstas se rompieran y se pudieran observar mejor los cromosomas.

Después de la incubación, los tubos se centrifugaron nuevamente a 1500 rpm durante diez minutos, se retiró el sobrenadante y se rompió el botón de células. Las células se fijaron utilizando solución de Carnoy que consiste en metanol (Meyer) y ácido acético glacial (Meyer) en proporción 3:1; esto permite conservar las células sin alterar su estructura para poder observarlas al microscopio.

Para la preparación de las laminillas, se colocaron dos portaobjetos sobre un bloque congelado, se tomó la suspensión celular con una pipeta Pasteur y se distribuyó de manera homogénea goteándola sobre los portaobjetos a una altura de un metro aproximadamente.



Figura 4.12 Preparación de las laminillas mediante goteo de la suspensión celular

Una vez secas, se tiñeron las laminillas utilizando colorante GIEMSA (Merck) diluido al 10% en buffer de Sörensen. Se realizó la revisión con el método del doble ciego utilizando un microscopio óptico (Zeiss) contando un total 6000 células en mitosis e interfase por lote por cada donador.

Finalmente, se calculó el índice mitótico aplicando los datos obtenidos en la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{\text{células en mitosis}}{\text{células totales}} \times 100$$

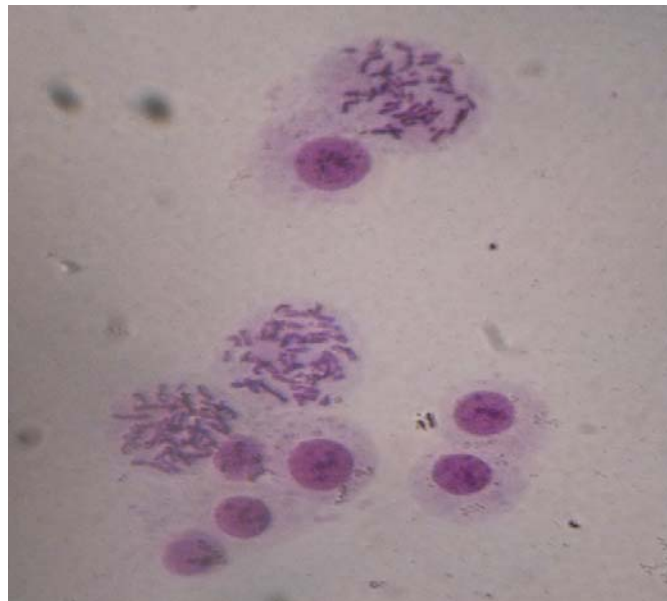


Fig 4.13 Linfocitos teñidos con GIEMSA observados en el microscopio óptico, 40X.

#### 4.3.6 Pruebas de adhesión celular

Este ensayo se realizó en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se utilizaron macrófagos intraperitoneales<sup>4</sup> de ratón ya que su sistema inmune es similar al de los seres humanos, por lo que resulta conveniente utilizarlo como modelo experimental; los macrófagos son células muy

---

<sup>4</sup> El peritoneo es la membrana que envuelve la mayor parte de los órganos del abdomen.

susceptibles a los cambios del microambiente. Se utilizó un macho de 6 semanas de la cepa CD-1 el cual se sacrificó mediante dislocación cervical.

Se limpió la zona abdominal con etanol y se realizó una incisión en forma de libro para retirar la piel, dejando expuesto el peritoneo.

Se inyectaron 5mL de una solución de PBS 1X frío dentro del peritoneo para así obtener los macrófagos que se encuentran en esa membrana, se distribuyó la disolución de PBS moviendo las patas del ratón y se volvió a succionar el líquido para verterlo en un tubo para centrífuga que se coloca dentro de un baño de hielo. Este proceso de lavado se realizó dos veces.

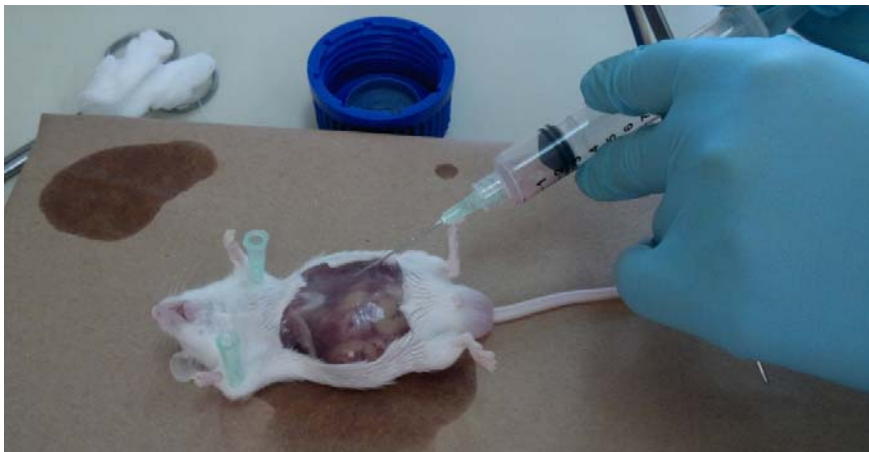


Figura 4.14 Incisión abdominal en forma de libro para dejar expuesto el peritoneo

Se hicieron tres lavados con PBS centrifugando las células durante 5 minutos a 2500 rpm. Se homogeneizaron las células y se distribuyeron en cajas de cultivo y en cada pozo se colocó 1 mL de medio de cultivo RPMI (Invitrogen) suplementado con suero fetal bovino (Invitrogen) al 10%. Se trabajaron 4 lotes (2 pozos por lote), 1 lote testigo (células + medio de cultivo), 1 lote experimental (células + medio de cultivo + aleación  $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$ ), 1 lote control positivo (células + medio de cultivo + cobre) y 1 lote control negativo (células + medio de cultivo + acero 316L). Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C manteniendo un nivel de  $CO_2$  de 5%.

Después de las primeras 24 horas de cultivo, primero se cambia el medio para eliminar los eritrocitos ya que éstos no tienen la capacidad de adherirse al vidrio como los macrófagos; posteriormente se exponen los lotes experimental, control positivo y control negativo a segmentos de 5mm de los metales que corresponden en cada lote. La mitad de los pozos de cada lote se incuban durante 24 horas y la otra mitad durante 72 horas en las mismas condiciones, 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%.

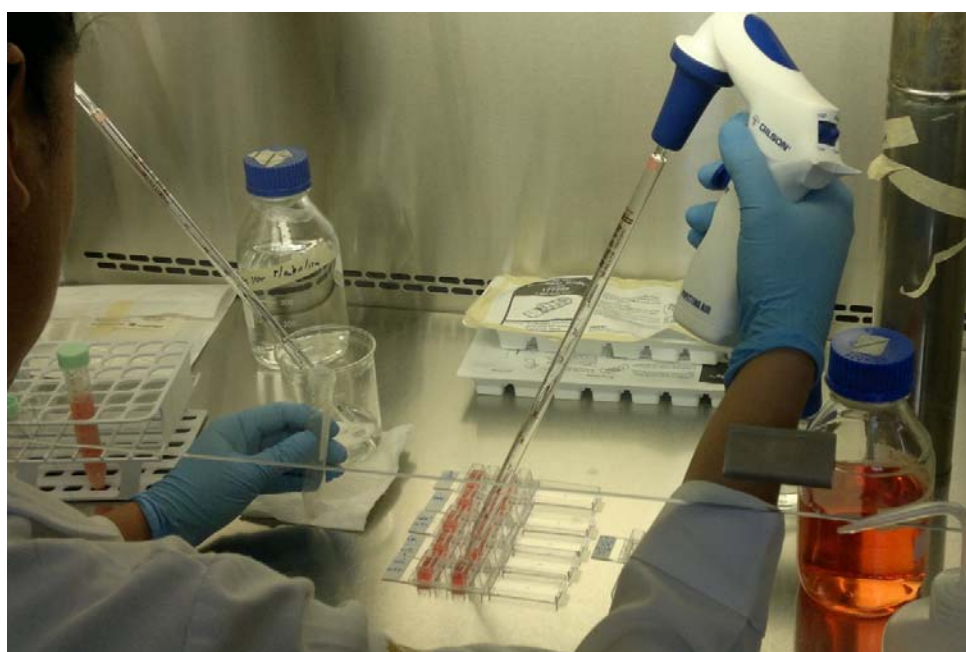


Figura 4.15 Las células obtenidas del peritoneo de ratón se transfirieron a pozos de cajas de cultivo y se les añadió medio de cultivo, todo en condiciones de esterilidad.

Una vez terminado el tiempo de cultivo, se obtuvieron imágenes de las células aún en los pozos con un microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse T5100 acoplado a una computadora. El software utilizado para la obtención de las fotografías fue NIS - Elements F.

Para conservar los metales con las células adheridas, se utilizaron frascos estériles de 5 mL en los cuales se colocó 1mL de disolución de glutaraldehído al 2.5% en un buffer de cacodilato de sodio 0.1M. Los metales se retiraron con una pinza y se lavaron con

un buffer de cacodilato de sodio 0.1M antes de introducirlo al frasco con glutaraldehído.

#### **4.3.7 Preparación de las muestras para microscopía electrónica de barrido**

La columna del microscopio electrónico de barrido utilizado tiene alto vacío, por lo que las muestras que se introduzcan en su interior deben estar desprovistas de líquidos que al evaporarse podrían modificar este alto vacío y, además, contaminarla. Por esta razón, la eliminación de los líquidos constituye un paso esencial en la preparación de muestras biológicas para microscopía electrónica de barrido.

Existen varios métodos de desecación, para estas muestras se empleó el método de sustitución de agua por un líquido de baja tensión superficial.

Este método consistió en deshidratar las muestras sumergiendo los metales en concentraciones crecientes de etanol (JT Baker) desde 30% a 100%. Con una pipeta Pasteur se colocó la cantidad suficiente de etanol al 30% para cubrir el metal y después de 30 segundos se retiró para añadir la siguiente dilución, así sucesivamente hasta llegar al 100% de etanol.

El paso siguiente en la preparación de las muestras fue el secado por punto crítico con CO<sub>2</sub>. Este procedimiento asegura que se mantenga la integridad estructural de las células durante el análisis por microscopía electrónica. El proceso consistió en llenar las cavidades celulares con el CO<sub>2</sub> líquido reemplazando el etanol que originalmente contenía la muestra. Posteriormente, la muestra se introdujo en una cámara hermética conectada a un intercambiador de calor donde se tienen las condiciones para contener el CO<sub>2</sub> líquido (T = 16°C y P = 900 psi). Una vez que se ha asegurado que el CO<sub>2</sub> ha llenado por completo el tejido, se cambian las condiciones de temperatura y presión a T = 32°C y P = 1150 psi que corresponden a las constantes críticas del CO<sub>2</sub> de manera que este cambia a fase gaseosa. Una vez hecho esto se debe bajar gradualmente la presión de la cámara, ya que un descenso brusco en la presión puede causar la ruptura de la membrana celular.





Figura 4.16 Equipo para secado por punto crítico

# CAPÍTULO 5

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 5.1 Cintas de la aleación $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$

Las cintas metálicas obtenidas por medio del proceso de *melt spinning* se muestran en la figura 5.1. Es posible observar que tienen geometría uniforme y bien definida; son cintas de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de espesor, que pueden flexionarse sin romperse, presentan lustre metálico y a simple vista no se observan defectos en la superficie.

La cinta tiene una cara lisa y una rugosa, esta diferencia en las superficies es debida al método de procesamiento ya que en la técnica de *melt spinning* la aleación madre fundida cae sobre una rueda de cobre, la cara de la cinta que hace contacto con la rueda es la que queda con superficie lisa y brillante mientras que la que está en contacto con la atmósfera de argón queda con una superficie ligeramente rugosa debido a la turbulencia que se genera al formarse la cinta.



Figura 5.1 Imagen de las cintas obtenidas mediante la técnica de *melt spinning*

## 5.2 Difracción de rayos X

El patrón de difracción de rayos X obtenido se muestra en la figura 5.2. La estructura amorfa de las cintas se confirma por la ausencia de picos de difracción así como por la presencia de un halo difuso lo cual es característico de los materiales vítreos.

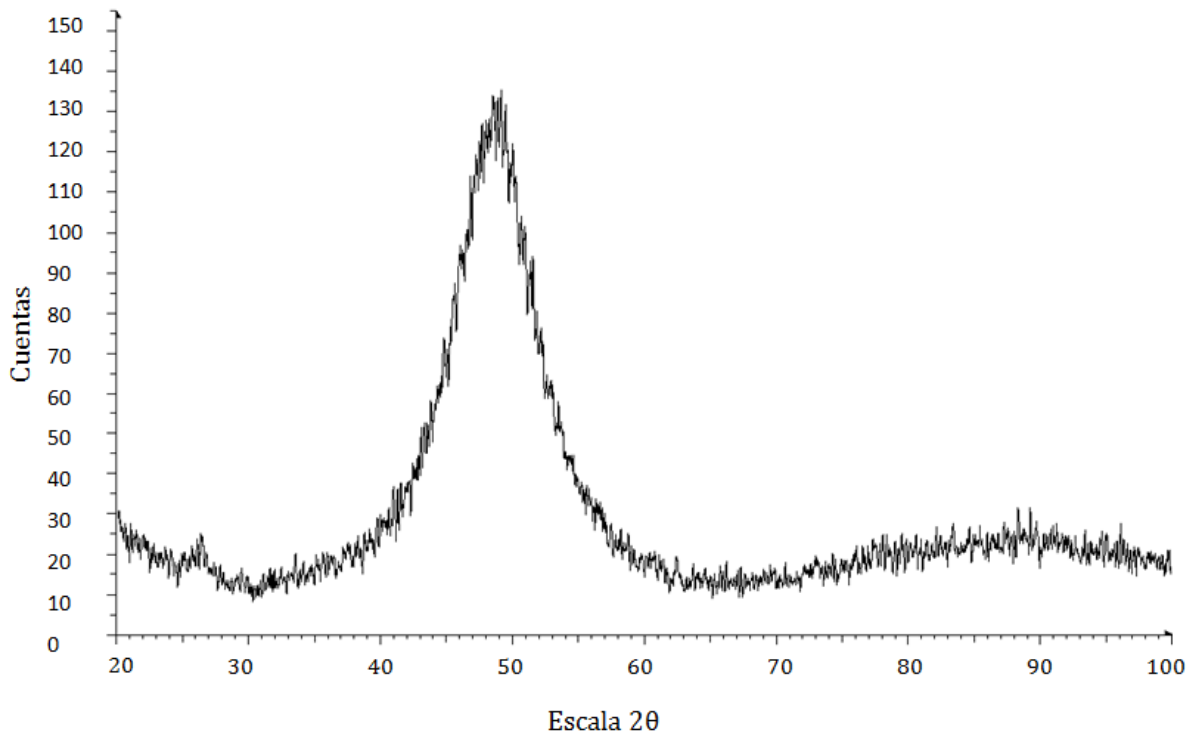


Figura 5.2 Diffractograma obtenido para las cintas de la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$

En los materiales cristalinos, el patrón de difracción tiene como característica fundamental la presencia de picos agudos bien definidos, esto debido a que por el orden periódico en la estructura de estos materiales, existen diferentes planos atómicos que difractan el haz de rayos X incidente.

La ausencia de orden a largo alcance en los materiales amorfos implica que no habrá planos cristalográficos y por lo tanto no se presentarán máximos de difracción en el patrón obtenido; en cambio, se obtienen señales difusas basadas en la distribución de las distancias interatómicas dentro de la estructura desordenada.

### 5.3 Microscopía Electrónica de Transmisión

En el patrón de difracción de electrones obtenido para la aleación vítrea  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  (figura 5.3), se puede observar que el material no posee una estructura cristalina, ya que se obtienen anillos en vez de los puntos característicos que aparecen cuando hay planos cristalográficos que difractan el haz de electrones. Esto permite confirmar el resultado obtenido por difracción de rayos X.

En la imagen de campo claro (figura 5.4) no se observa ningún indicio de que haya cristalización en la zona analizada.

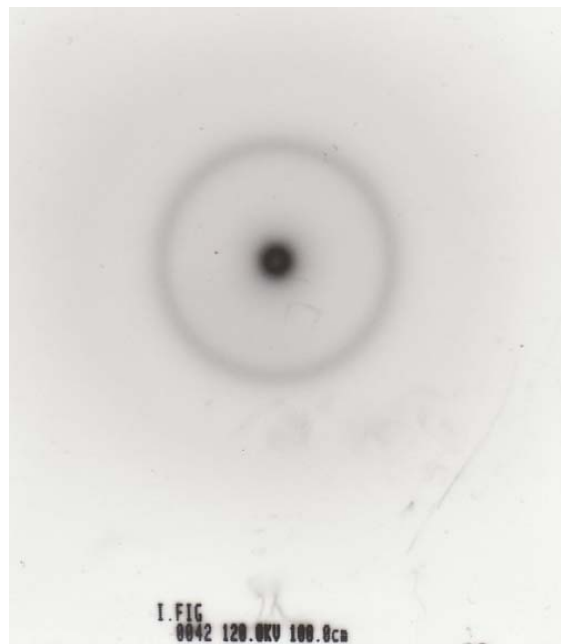


Figura 5.3 Patrón de difracción de electrones de la cinta de  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ . Característico de un sólido amorfo.

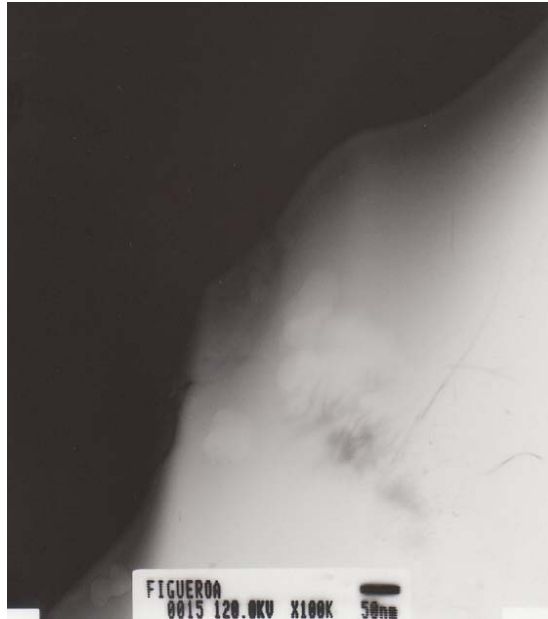


Figura 5.4 Micrografía de MET de campo claro, no se observa formación de cristales.

#### **5.4 Microscopía Electrónica de Barrido**

Se analizó la aleación mediante el microscopio electrónico de barrido para observar la morfología de la cinta, esto se hizo tanto para el lado liso como para el lado rugoso utilizando el detector de electrones retrodispersados. En las micrografías de la cara lisa (figuras 5.5 y 5.6) se puede observar que tienen una superficie homogénea, se encuentran mínimos poros generados por gas que se queda atrapado durante el proceso de fabricación.

Las micrografías obtenidas para el lado rugoso muestran pequeñas deformaciones superficiales que son producidas por la turbulencia que se genera en el momento en que las cintas son expulsadas de la rueda de cobre.

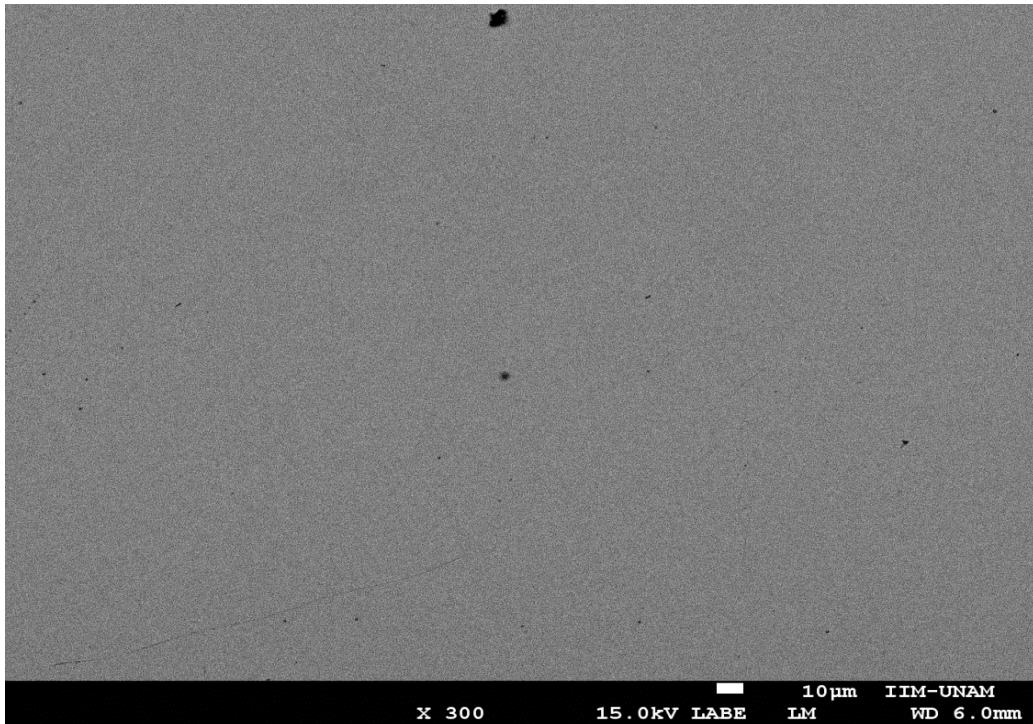


Figura 5.5 Micrografía de la cara lisa tomada a 300X

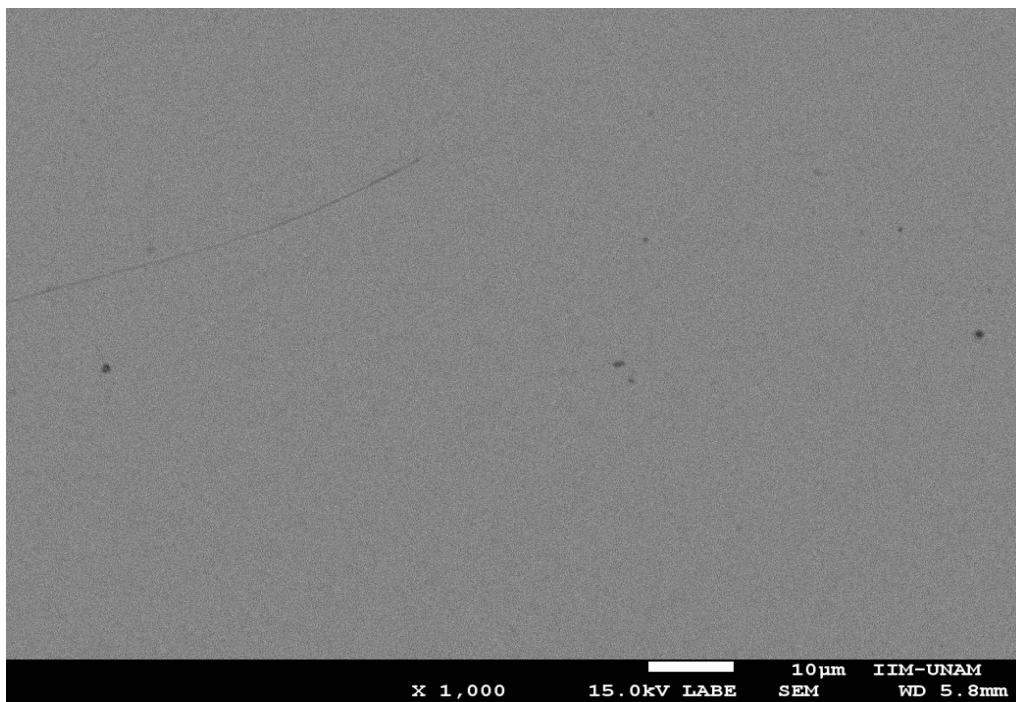


Figura 5.6 Micrografía de la cara lisa tomada a 1000X

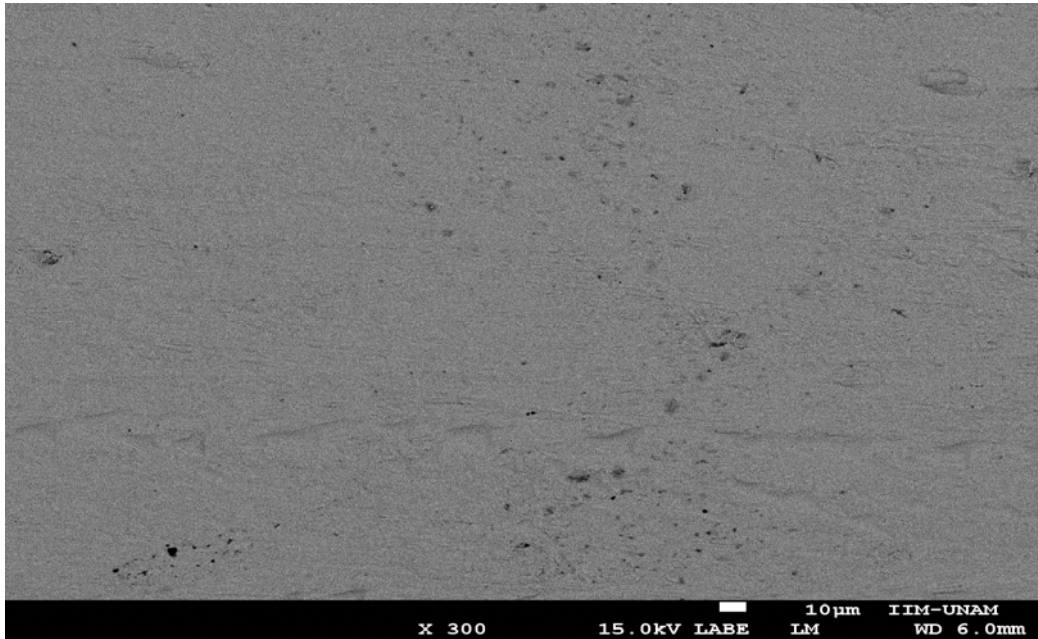


Figura 5.7 Micrografía de la cara rugosa tomada a 300X

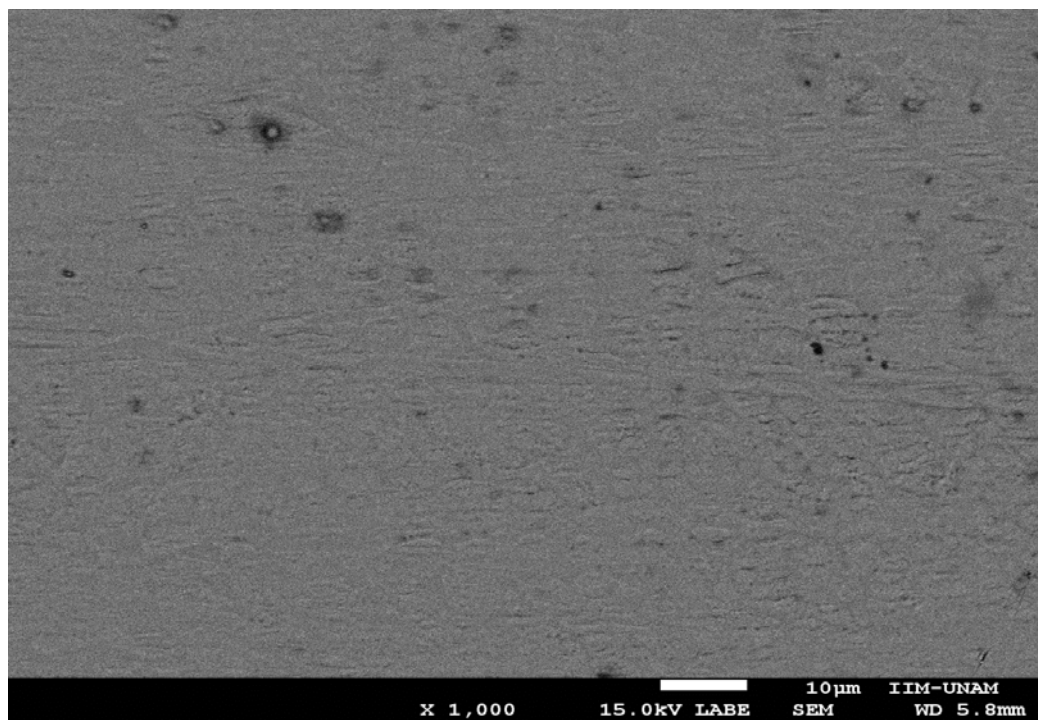


Figura 5.8 Micrografía de la cara rugosa tomada a 1000X

## 5.5 Ensayos de citotoxicidad

A continuación se presentan los resultados obtenidos para los ensayos de viabilidad celular y de índice mitótico en linfocitos humanos, así como la discusión de las imágenes obtenidas mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido de los macrófagos cultivados en presencia de la aleación en estudio.

### 5.5.1 Viabilidad celular en linfocitos humanos

Se estudió el efecto del material propuesto sobre la viabilidad y proliferación de linfocitos humanos en cultivo.

Al finalizar las 48 horas de exposición, los cultivos del lote testigo y el lote experimental no presentaron una diferencia cualitativa que pudiera indicar inicialmente que las células se dañaron. Se puede apreciar en la figura 5.9 que la apariencia de los cultivos es prácticamente igual en ambos lotes.



Figura 5.9 Cultivos de linfocitos después de 48 horas de exposición a la aleación, correspondientes al lote testigo (izquierda) y al lote experimental (derecha).



En la tabla 5.1 se muestran los resultados promedio de la lectura de densidad óptica correspondiente al producto de la reducción del MTT por las células metabólicamente activas.

**Tabla 5.1 Efecto de la aleación Ni<sub>60</sub>Nb<sub>20</sub>Zr<sub>20</sub> sobre la viabilidad de linfocitos humanos en cultivo.**

| <b>DONADOR</b>       | <b>DENSIDAD ÓPTICA<br/>LOTE TESTIGO</b> | <b>DENSIDAD ÓPTICA LOTE<br/>EXPERIMENTAL</b> | <b>DENSIDAD ÓPTICA LOTE<br/>CONTROL POSITIVO</b> |
|----------------------|---|--|--|
| AA                   | 0.123 ± 0.026                           | 0.130 ± 0.050                                | 1.011 ± 0.636                                    |
| AR                   | 0.096 ± 0.007                           | 0.135 ± 0.057                                | -----  |
| BL                   | 0.105 ± 0.040                           | 0.090 ± 0.021                                | 0.842 ± 0.514                                    |
| JR                   | 0.077 ± 0.023                           | 0.077 ± 0.007                                | -----  |
| LE                   | 0.099 ± 0.034                           | 0.111 ± 0.040                                | 1.951 ± 0.283                                    |
| DG                   | 0.089 ± 0.019                           | 0.093 ± 0.022                                | -----  |
| LM                   | 0.111 ± 0.039                           | 0.194 ± 0.095                                | 0.743 ± 0.396                                    |
| RM                   | 0.084 ± 0.026                           | 0.288 ± 0.022                                | -----  |
| VN                   | 0.118 ± 0.066                           | 0.091 ± 0.023                                | 0.287 ± 0.089                                    |
| SE                   | 0.091 ± 0.025                           | 0.090 ± 0.023                                | -----  |
| <b>PROMEDIO ± EE</b> | <b>0.099 ± 0.005</b>                    | <b>0.130 ± 0.020</b>                         | <b>0.967± 0.273</b>                              |

Los datos obtenidos de densidad óptica indican que tanto en el lote testigo como en el experimental hubo actividad metabólica mitocondrial, ya que el reactivo MTT que es de color amarillo fue transformado a formazán de color azul y se obtuvieron lecturas de absorbancia superiores a la lectura del blanco. Por lo anterior se infiere que no se afectó la integridad de las mitocondrias ya que estas están activas; esto es señal de que las células no sólo permanecen vivas después de haber estado expuestas al material, sino que también siguen llevando a cabo procesos metabólicos de manera normal.

En el caso del lote control positivo, las lecturas de absorbancia son considerablemente mayores a las de los lotes testigo y experimental, sin embargo esto no se debió a una mayor transformación de MTT a formazán sino a que por efecto del cobre, los cultivos tomaron un color café oscuro lo cual dificultó poder tomar la muestra de glóbulos blancos, además de que se observó también la presencia de un precipitado café que fue muy difícil de retirar, en algunos tubos se presentaba más que en otros. Lo anterior fue una importante fuente de error que interfirió en la lectura de densidad óptica de las muestras.

Debido a que las diferencias entre los lotes testigo y experimental no son estadísticamente significativas (de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Tukey,  $p > 0.05$ ), pudiera ser que existe aproximadamente la misma cantidad de células en los dos lotes y por lo tanto la aleación no afecta la viabilidad celular, es decir, las células no se mueren por el contacto con el material.

### 5.5.2 Índice mitótico en linfocitos humanos

En la tabla 5.2 se reportan los resultados promedio obtenidos en el ensayo de índice mitótico para los lotes de cada donador.

**Tabla 5.2 Efecto de la aleación  $Ni_{60}Nb_{20}Zr_{20}$  sobre el índice mitótico de linfocitos humanos en cultivo**

| DONADOR | IM LOTE TESTIGO | IM LOTE EXPERIMENTAL | IM LOTE CONTROL POSITIVO |
|---------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| AA      | 5.38 ± 0.95     | 3.87 ± 0.39          | 1.34 ± 0.69              |
| AR      | 3.64 ± 0.62     | 3.18 ± 0.51          | -----                    |
| BL      | -----           | -----                | -----                    |
| JR      | 1.67 ± 0.71     | 2.08 ± 0.79          | -----                    |
| LE      | 5.07 ± 1.53     | 4.92 ± 1.04          | 2.62 ± 0.72              |
| DG      | 4.79 ± 0.98     | 4.11 ± 0.62          | -----                    |
| LM      | 5.35 ± 0.55     | 4.48 ± 0.82          | 2.85 ± 0.98              |

|                      |                    |                    |                    |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| RM                   | 5.40 ± 1.35        | 5.03 ± 0.87        | -----              |
| VN                   | 0.56 ± 0.18        | 0.64 ± 0.23        | 0                  |
| SE                   | 1.46 ± 0.96        | 1.77 ± 0.84        | -----              |
| <b>PROMEDIO ± EE</b> | <b>3.70 ± 0.65</b> | <b>3.34 ± 0.51</b> | <b>1.70 ± 0.65</b> |

Los resultados de IM indican que las células se encuentran viables, los datos se analizaron mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey y no se encontró una diferencia significativa entre los lotes testigo y experimental ( $p > 0.05$ ) por lo que se puede decir que no se afectó la fase M (mitosis) del ciclo celular como ocurre en el caso del las células del lote control positivo para el cual la prueba estadística arrojó que difiere del lote testigo y experimental. Las células continúan proliferando sin que haya una alteración relevante; esto además sugiere que la duración del ciclo celular se conserva ya que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de células en mitosis en los lotes testigo y experimental.

### 5.5.3 Adhesión celular de macrófagos peritoneales de ratón

Después de 24 y 72 horas de que los macrófagos estuvieron expuestos a la aleación (lote experimental figura 5.11), se obtuvieron imágenes en el microscopio óptico de contraste de fases, las cuales se compararon con los cultivos de macrófagos que no fueron expuestos a ningún material (lote testigo, figura 5.10), los que fueron expuestos a acero inoxidable 316L (lote control negativo, figura 5.12) y los que fueron expuestos a cobre (lote control positivo, figura 5.13).

Cuando los macrófagos se encuentran bien adosados a la superficie del pozo, la morfología que se observa es alargada como se puede observar para los lotes testigo, experimental y control negativo. Las células redondas y pequeñas que se observan en las imágenes corresponden a algunos eritrocitos que quedaron en el medio.

En algunos macrófagos se observa que no sólo su morfología es extendida sino que incluso han comenzado a formar prolongaciones que reciben el nombre de

podosomas. Los podosomas son estructuras ricas en actina, formadas por la extensión del citoesqueleto que permiten que la célula se adhiera a la superficie y se desplace. Las zonas negras de las figuras 5.11 y 5.12 corresponden al material,  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  y acero inoxidable 316L respectivamente, se observa que las células comienzan a migrar hacia el material. La microscopía óptica de contraste de fases no permite saber si éstas se adhieren o no al material, esto se observará en los resultados de microscopía electrónica de barrido.

En la imagen 5.13 que corresponde al lote control positivo, se observa a diferencia de los lotes anteriores que los macrófagos que han sido expuestos a cobre tienden a encogerse, el fondo de la imagen se ve muy sucio debido a que por la citotoxicidad del cobre las células entran en el proceso de apoptosis (muerte celular), debido a esto lo que se observa son restos celulares.

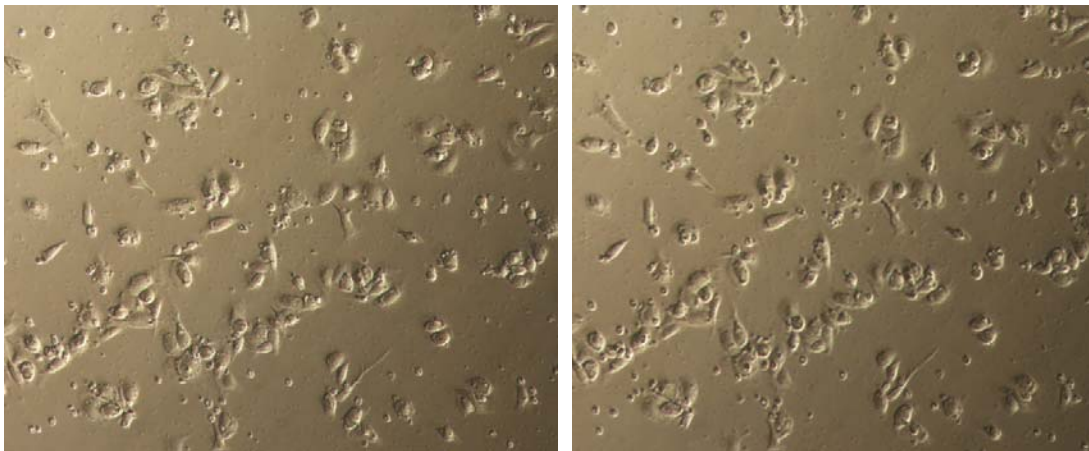


Figura 5.10 Lote testigo. Macrófagos normales, 24 horas de cultivo, 20X.

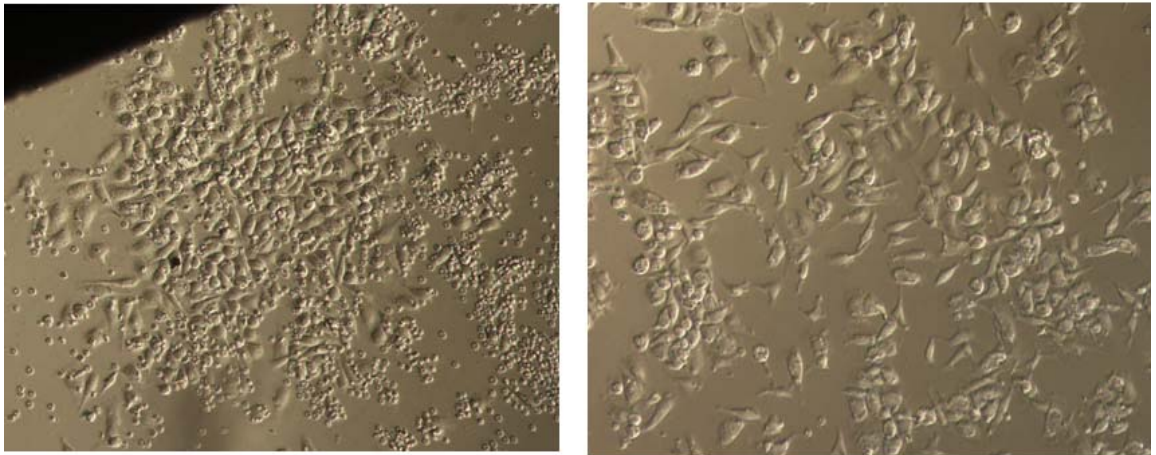


Figura 5.11 Lote experimental. Macrófagos expuestos durante 24 horas a la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ , 20X.

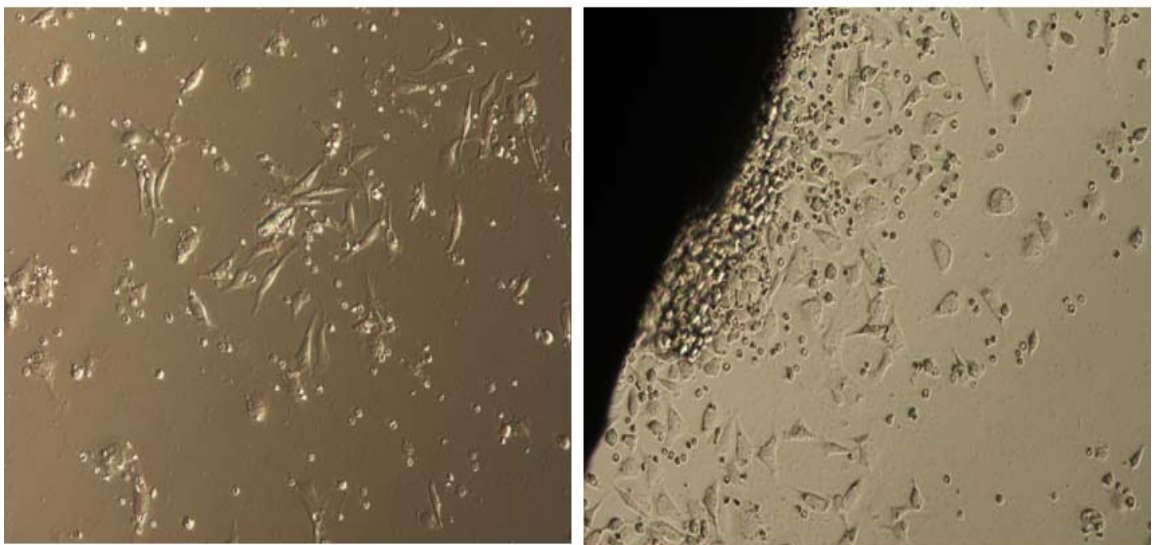


Figura 5.12 Lote control negativo. Macrófagos expuestos durante 24 horas a acero inoxidable 316L, 20X.

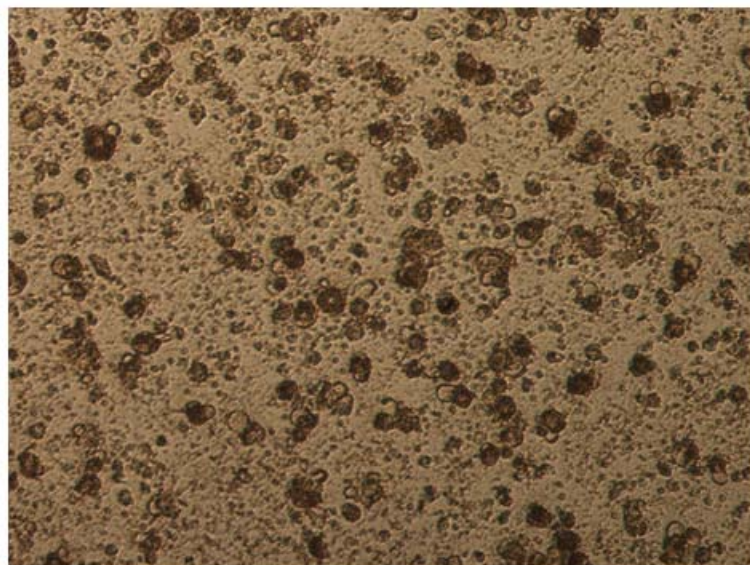


Figura 5.13 Lote control positivo. Macrófagos expuestos durante 24 horas a cobre, 20X.

Las imágenes 5.14 y 5.15 muestran la morfología de los macrófagos después de 72 horas de exposición a  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  y a acero inoxidable. No se observa un cambio en la morfología que pudiera sugerir un efecto citotóxico como es evidente en el caso del cobre. Los macrófagos se mantienen adosados en la superficie de vidrio.

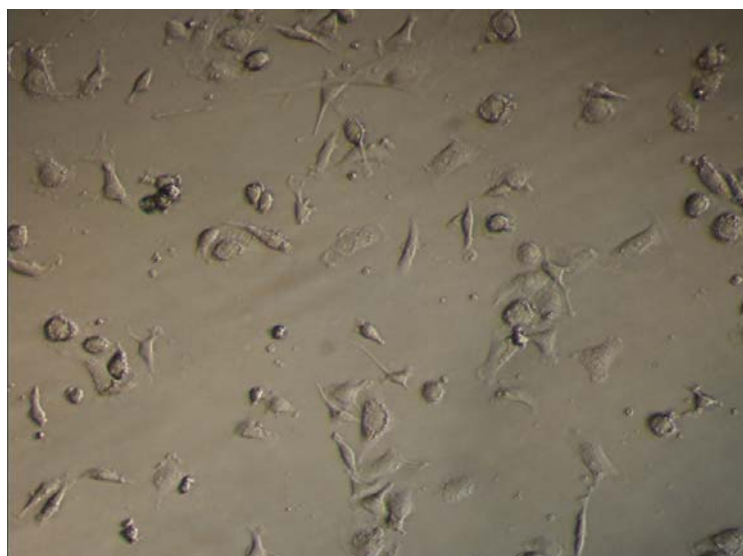


Figura 5.14 Lote experimental. Macrófagos expuestos durante 72 horas a la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ , 20X.

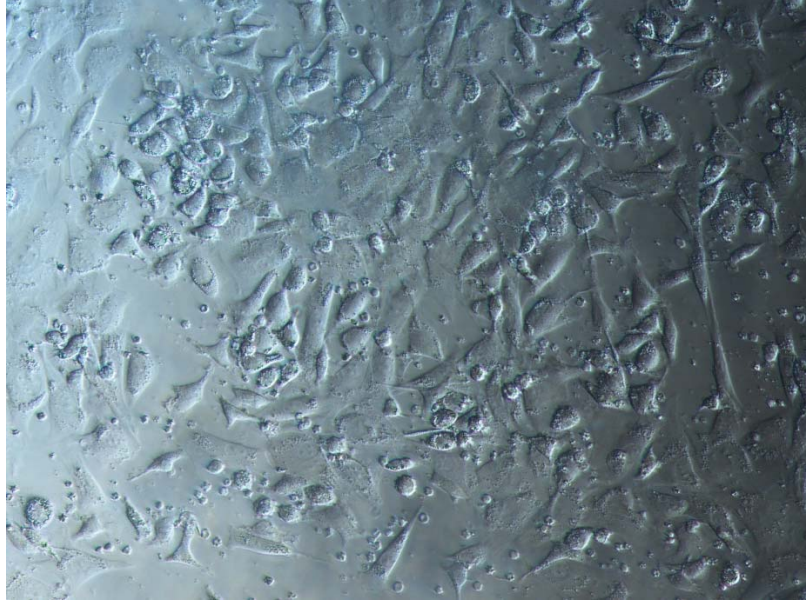


Figura 5.15 Lote control negativo. Macrófagos expuestos durante 72 horas a acero inoxidable 316L, 20X.

Después de exponer a los macrófagos durante 72 horas a la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  y a acero inoxidable 316L, se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido para observar si las células se encontraban adheridas en ambos materiales o si presentaban algún daño estructural.

Las figuras 5.16 y 5.17 corresponden a los macrófagos que fueron expuestos a la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  y a acero inoxidable 316L respectivamente. Se observa que las células se adosan sobre la superficie del material mediante prolongaciones de la membrana plasmática. Estas prolongaciones además de intervenir en la adhesión, funcionan también como un mecanismo de movilidad de la célula y de esta manera poder realizar un barrido de la superficie del material y determinar si es potencialmente dañino. Las células permanecen íntegras después del tiempo de contacto, no se detectaron alteraciones en la morfología.

En la imagen 5.17 se observa que la superficie de la muestra de acero inoxidable es más rugosa que la de la cinta de  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$ . Esta rugosidad influye positivamente en la adhesión celular ya que como se puede ver, las células

extienden su membrana citoplasmática preferentemente entre los surcos del material quedando así mejor adheridas.

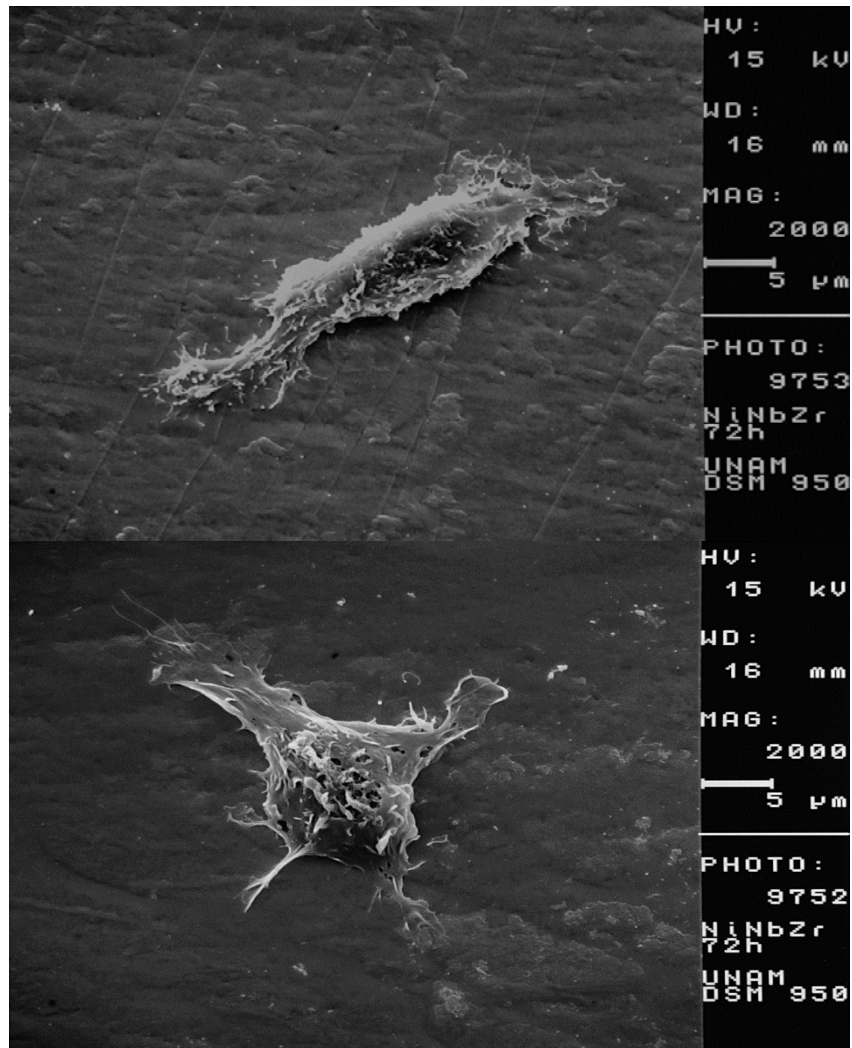


Figura 5.16 Micrografías de MEB de macrófagos adosados a la superficie de la aleación  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  después de 72 horas de cultivo, 2000X.



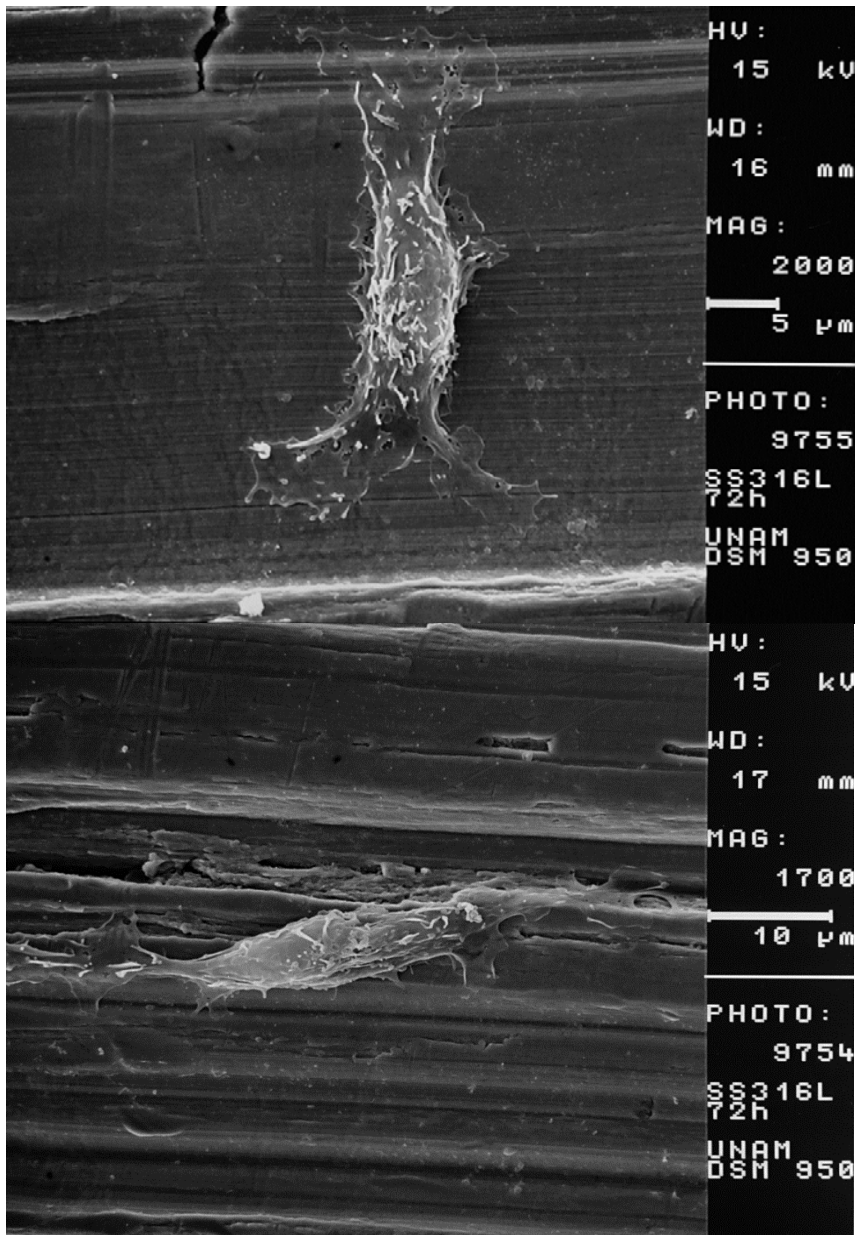


Figura 5.17 Micrográficas de MEB de macrófagos adheridos en acero inoxidable 316L después de 72 horas de cultivo, 2000X.

# CONCLUSIONES

---

Se obtuvieron cintas de la aleación amorfa con composición  $\text{Ni}_{60}\text{Nb}_{20}\text{Zr}_{20}$  mediante la técnica de *melt spinning*, las cuales presentaron geometría uniforme y lustre metálico. El método de procesamiento hizo que tuvieran una cara lisa y otra ligeramente rugosa. Su estructura amorfa fue confirmada mediante el análisis por difracción de rayos X y microscopía electrónica de transmisión.

Utilizando como modelo experimental linfocitos humanos de sangre periférica, se realizaron dos pruebas de citotoxicidad como primera etapa de la evaluación de la biocompatibilidad de esta aleación. Con el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad celular mediante la actividad metabólica mitocondrial mientras que el índice mitótico sirvió como un parámetro para confirmar viabilidad celular y además para investigar si había alteraciones en la proliferación de las células.

Se realizó también si el material afectaba la adhesión y la morfología de macrófagos peritoneales de ratón, encontrando que los macrófagos presentan una morfología normal y se extienden sobre el material mediante podosomas después de 24 y 72 horas de exposición.

De los ensayos anteriormente mencionados, se puede concluir que hasta el momento la aleación no presenta un efecto citotóxico en linfocitos y puede ser considerado como un posible biomaterial.

# TRABAJO FUTURO

---

Los ensayos *in vitro* son el primer paso para probar la biocompatibilidad de cualquier material, en este trabajo se realizaron dos pruebas de citotoxicidad que indicaron que las células sobreviven, mantienen su capacidad de proliferación y su actividad metabólica. Sin embargo, al ser pruebas biológicas en las que hay tantas variables que no se pueden controlar y pueden influir en los resultados, es necesario realizar el ensayo con un mayor número de donadores para tener una muestra más representativa y obtener una mejor estadística de la interacción entre las células y el material.

Sabiendo que la aleación no presenta un efecto tóxico a nivel celular, es posible realizar una evaluación de genotoxicidad, los estudios que se proponen son más específicos ya que se puede obtener información de la toxicidad a nivel subcelular utilizando como biomarcador la frecuencia aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales producidas por errores durante la división celular o por fallas en los procesos de reparación del ADN; se propone también evaluar la toxicidad a nivel molecular mediante electroforesis unicelular alcalina o ensayo cometa (por la forma que adquieren los núcleos dañados), en este ensayo se puede determinar si las cadenas de ADN presentan fragmentación ya que esto altera la migración de la molécula durante la electroforesis. La ventaja del ensayo cometa es que se puede conocer el daño al material genético por núcleo con un alto grado de sensibilidad, además de que ha sido utilizada frecuentemente como un biomarcador en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica.

Es importante realizar también pruebas de hemocompatibilidad si la aleación estará en contacto con la sangre ya sea directamente o indirectamente, para evaluar los efectos del material cuando este interacciona con la sangre ya que no debe interferir en los

procesos de coagulación, alterar el pH, modificar el transporte de oxígeno y de nutrientes o en el desecho de metabolitos y la respuesta inmune.

Debido a que la corrosión es una de los principales procesos que causan problemas cuando se utilizan materiales metálicos dentro del cuerpo, se propone hacer una evaluación de la resistencia a la corrosión de la aleación en medio biológico, ya que bajo ambientes hostiles, se pueden desencadenar procesos electroquímicos que provocan que los elementos que componen la aleación se liberen en forma de iones y que estos puedan viajar a través de los fluidos del cuerpo, aumentando la posibilidad de desarrollar efectos tóxicos según la concentración que alcancen en el organismo o en algún órgano en particular interfiriendo en su funcionamiento normal. Se puede tener una idea de la concentración de iones metálicos que libera la aleación después de un determinado tiempo de inmersión en el medio de cultivo haciendo una cuantificación mediante la técnica de absorción atómica.

Una vez que se haya probado la inocuidad de esta aleación mediante ensayos *in vitro*, se procederá a realizar pruebas preclínicas (*in vivo*) ya que a diferencia de las primeras, estas permiten estudiar respuesta inmune, procesos inflamatorios así como la respuesta del material dentro de un ambiente que se vuelve más complejo debido a que intervienen varios tipos de células, matriz extracelular, fluidos fisiológicos etc.

# REFERENCIAS

---

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. (2002) *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega, Barcelona, España.
- Anderson, J.M. (2000) Multinucleated giant cells. *Curr. Opin. Hematol.* 7, 40 – 47.
- Ashby, M.F. y Jones, D.R. (2009) *Materiales para ingeniería 2. Introducción a la microestructura, el procesamiento y el diseño*. España: Editorial Reverté.
- Askeland, D.R. (2004) *Ciencia e Ingeniería de los Materiales*. 3º edición International Thompson Editores, México
- Axinte, E. (2011) Glasses as engineering materials: A review. *Materials & Design*, 32 (4), 1717 – 1732.
- Berton, G. & Lowell, C. A. (1999) Integrin signaling in neutrophils and macrophages. *Cell. Signal.* 11, 621 – 635.
- Duwez, P.; Willens, R.H.; Klement, W. (1960) Continuous series of metastable solid solutions in silver – copper alloys. *J. Appl. Phys.* 31, 1136.
- Gil, F.; Pla, A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *J. Appl. Toxicol.* 21, 245-255. 2001
- Greco, R.S. (1994) *Implantation Biology. The host responses and biomedical devices*. Florida, USA: CRC Press, Inc.
- Horton, H.R. et. al. (2004) *Principios de Bioquímica*. 4º edición, Pearson educación. Pp. 634 – 635.

- Jutras, I.; Desjardins, M. (2005) Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptative immunity. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21, 511- 527.
- Klement, W., Willens, R.H. y Duwez, P. (1960) Non-crystalline structure in solidified gold – silicon alloys. *Nature.* 187, 869-870.
- Kupcsik, L. (2011) Estimation of Cell Number based on Metabolic activity: The MTT reduction assay en: Mammalian cell viability. Methods and protocols. Humana Press, Suiza.
- Moya, J.A. Vidrios metálicos y aleaciones nanocristalinas: Nuevos materiales de estructura avanzada. *Cuadernos de la facultad.* 4, 9 -21. 2009. Consultado en línea: <http://www.ucasal.net/templates/unid-academicas/ingenieria/apps/4-p9-Moya.pdf> el 28 de mayo de 2012.
- Norma ISO 10993, *Evaluación biológica de dispositivos médicos.*
- Ostrosky, P y Gonsebatt, M.E. El tejido linfocitario en la evaluación de biomarcadores de efecto. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. (No editado)
- Park, J. y Lakes, R.S. (2007) *Biomaterials, an introduction.* 3° edición, Springer: USA.
- Ramírez Brizuela, Claudia. Influencia de la rugosidad de películas de carbono amorfo en la adhesión de osteoblastos. Tesis de licenciatura en física. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 2005.
- Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E. (2006) *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine.* Academic Press: San Diego, USA.

- Rode, H.J. (2008). *Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation*. Mannheim, Alemania. Roche Applied Science.
- Santillán García, Lizeth. *Biocompatibilidad del titanio utilizado en odontología: revisión bibliográfica*. Tesis de licenciatura en Odontología (Cirujano Dentista). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Odontología. 2005.
- Sastre, Roberto; De Aza, Salvador. (2004) *Biomateriales*. CYTED. Faenza Editrice Ibérica. Italia.
- Schroers, J.; Kumar, G.; Hodges, T.M.; Chan, S.; Kyriakides, T.R. (2009) Bulk metallic glasses for biomedical applications. *JOM*. 61 (9) pp.21-29.
- Schwab, M. *Encyclopedic Reference of Cancer*. (2001) Editorial Springer, Italia,
- Sibilía, John P. A (1988) *Guide to materials characterization and chemical analysis*. VCH Publishers, New York, USA.
- Silver, F.H.; Christiansen, D. L. (1999) *Biomaterials science and biocompatibility*. Springer – Verlag New York Inc., USA.
- Watson, J.D.; Baker, T.A.; Bell, S.P.; Gann, A. Levine, M.; Losick, R. (2008) *Biología molecular del gen*. 5º edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.
- Williams, D. (1986) *Definitions in biomaterials*. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society For Biomaterials. Elsevier: Inglaterra.