



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

***EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA DE ALEACIONES DE  
MAGNESIO FUNCIONALIZADAS***

***TESIS***

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

C.D. DANIELA MORQUECHO MARÍN

TUTORA: DRA. PHAEDRA SURIEL SILVA BERMÚDEZ

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd.Mx.

NOVIEMBRE, 2019



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.

Cada etapa que finaliza en la investigación es un nuevo comienzo. Pero, la investigación de mayor trascendencia es la que se realiza en sí mismo.

-Anónimo

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre Cristina, por apoyarme y ayudarme incondicionalmente en mis decisiones. Estaré eternamente agradecida contigo, todo lo que soy es por ti.

A mi hermano Miguel Ángel, gracias por tus sabios consejos y por todo el apoyo que me permitió poder concluir esta etapa en mi vida profesional. Ante la distancia siempre estaremos juntos.

A mi novio Edson, gracias por estar en todo momento, por buscar siempre mi bienestar y ayudarme incondicionalmente, sin ti, esto no sería posible. Pero sobre todo, gracias por motivarme, por creer en mí y por comprender mis ausencias. Te amo.

A mi padre Eduardo, por motivarme día con día y a pesar de la distancia siempre estar conmigo. Izazacia.

A mis amigos Íñigo, Paola, Lucía, Diana y José Luis, por hacer tan divertidas las clases, y por ser unos excelentes compañeros durante la maestría.

A mi amigo Alfonso, por las asesorías en bioquímica y biología molecular, pero sobre todo por motivarme y ayudarme a no rendirme a pesar de la adversidad.

Al Lic. Edgar Olvera y la Dra. Paola Leal, por todo el apoyo que me brindaron antes y durante el desarrollo de esta etapa profesional.

A la Dra. Diana Martínez, por todo el apoyo laboral y académico que me brindó durante el desarrollo de esta etapa.

A la Dra. Phaedra Silva, gracias por permitirme formar parte de este gran proyecto de investigación, por la paciencia para enseñarme, por su calidez humana y por todo el apoyo que me brindó para que pudiese concluir este trabajo.

Al personal académico y compañeros del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación, por compartir sus conocimientos conmigo, asesorarme y facilitarme las instalaciones para la realización de este trabajo. A la Tec. Lab. Xochitl Guerrero por su apoyo con las tareas diarias del laboratorio, a la Biol. Julieta García López por todo su apoyo y asesoría para realizar los ensayos de inmunocitoquímica y al M. en C. Valentín Martínez López por todo su apoyo principalmente con la realización y asesoría respecto de las citometrías de flujo.

A los profesores que contribuyeron en mi formación académica durante la maestría, en especial al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez, por su excelencia como profesor y ser humano.

A la Dra. Sandra Rodil y al Instituto de Investigaciones en Materiales UNAM, por facilitarme las instalaciones para el desarrollo de este proyecto de investigación.

A CONACYT, por brindarme el apoyo económico durante el desarrollo de esta investigación.

## Contenido

1. RESUMEN.....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1. TEJIDO ÓSEO.....	13
4.2. CÉLULAS ÓSEAS.....	15
4.2.1. CELULAS OSTEOPROGENITORAS Y DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA.....	16
4.2.2. OSTEOBLASTOS .....	17
4.2.3. OSTEOCITOS.....	18
4.2.4. OSTEOCLASTOS.....	19
4.3. REGENERACIÓN ÓSEA.....	20
4.3.1. FASES DEL REMODELADO ÓSEO .....	20
4.4. LESIONES ORTOPÉDICAS Y BIOMATERIALES.....	21
4.5. MAGNESIO.....	24
4.5.1. PROPIEDADES DEL MAGNESIO.....	24
4.5.2. PROCESO DE CORROSIÓN DEL MAGNESIO.....	25
4.6. ALEACIONES DE MAGNESIO-ZINC-CALCIO.....	28
4.7. TRATAMIENTO DE LA SUPERFICIE DE ALEACIONES DE MAGNESIO...29	
5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVO GENERAL.....	31
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
7. MÉTODOS.....	32

7.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICA-QUÍMICA DE ALEACIONES DE MAGNESIO CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE TiO <sub>2</sub> .....	32
7.1.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	32
7.1.2.	DEPÓSITO DE PELÍCULAS DE TiO <sub>2</sub> .....	34
7.1.3.	ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD.....	35
7.1.4.	ÁNGULO DE CONTACTO.....	37
7.1.5.	MEDICIÓN DEL pH DEL MEDIO EN CONTACTO CON LAS ALEACIONES.....	37
7.1.6.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	38
7.2.	EVALUACIÓN BIOLÓGICA.....	39
7.2.1.	OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TRONCALES DE TEJIDO ADIPOSO.....	39
7.2.2.	CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TRONCALES .....	40
7.3.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE ALEACIONES DE MAGNESIO CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE TiO <sub>2</sub> .....	41
7.3.1.	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT.....	41
7.3.2.	INMUNOCITOQUÍMICA.....	44
7.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
8.1.	BIODEGRADABILIDAD.....	46
8.2.	ÁNGULO DE CONTACTO.....	57
8.3.	MEDICIÓN DE pH.....	58
8.4.	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	60
8.5.	CÉLULAS METABÓLICAMENTE ACTIVAS; ENSAYO DE MTT.....	70
8.6.	INMUNOCITOQUÍMICA.....	75
9.	CONCLUSIONES.....	81
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	82

## 1. RESUMEN

Los materiales más utilizados en implantes para osteosíntesis son metales como el acero inoxidable o el titanio y sus aleaciones, principalmente debido a sus propiedades mecánicas, resistencia a la corrosión y biocompatibilidad. No obstante, estos materiales algunas veces deben ser retirados después de la remodelación ósea, lo cual implica una segunda cirugía y posoperatorio para el paciente. Esto puede resolverse empleando implantes biodegradables, que se desintegren/eliminen mientras promueven la remodelación ósea. Las aleaciones de magnesio (Mg-Zn-Ca) de ultra alta pureza tienen un comportamiento biológico adecuado para su uso en implantes metálicos biodegradables. Sin embargo, su rápida velocidad de degradación en medios acuosos ricos en cloro provoca que el material se degrade y debilite y pierda sus propiedades físicas y mecánicas antes de que el tejido óseo esté reparado.

De acuerdo con lo observado en otros materiales, los recubrimientos de  $\text{TiO}_2$  amorfo sobre aleaciones de Mg podrían promover la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico y funcionar como una capa protectora disminuyendo la velocidad de corrosión.

En este trabajo, se realizó la caracterización físico-química de superficie de aleaciones de Mg-Zn-Ca de ultra alta pureza con y sin recubrimiento de  $\text{TiO}_2$ . Se caracterizó la viabilidad de células troncales mesenquimales expuestas a las aleaciones recubiertas y sin recubrir (MTT) y se evaluaron las propiedades de osteoinducción y osteogénesis de las aleaciones por medio de inmunocitoquímicas. En oposición a lo esperado, el recubrimiento favoreció la degradación de las aleaciones, disminuyendo la viabilidad celular en comparación con aleaciones no recubiertas. En las muestras no recubiertas se observó la expresión celular de Runx-2, Colágena-I y Osteocalcina. Probablemente la estructura intrínseca micro-columnar de las películas permitió el paso del medio hacia la interfase aleación-recubrimiento, donde el  $\text{TiO}_2$  pudo haberse reducido (Ti) y formar un par galvánico con el Mg, acelerando el proceso de corrosión de las aleaciones.

## 2. ABSTRACT

The most commonly used implants materials for osteosynthesis are metals such as stainless steel or titanium and its alloys, due to their mechanical properties, corrosion resistance and biocompatibility. However, these materials sometimes must be removed after the bone remodeling, which involves a second surgery and postoperative procedures. This can be solved by using biodegradable implants materials, which disintegrate/bioabsorb while promoting bone remodeling. Mg alloys (Mg-Zn-Ca) of high purity have adequate biological behavior for their use as biodegradable implant materials for osteosynthesis. However, their rapid degradation in aqueous media rich in chlorine causes the material to rapidly degrade and lose their physical and mechanical properties before the bone tissue has been appropriately repaired. According to what has been observed in other materials, TiO<sub>2</sub> coatings on Mg alloys could promote cell differentiation towards the osteoblast phenotype and function at the same time as a protective layer slowing corrosion. The physical-chemical and structural properties Mg-Zn-Ca alloys coated and uncoated with TiO<sub>2</sub> thin films were characterized. Mesenchymal stem cells viability at different days of cell exposure coated and uncoated alloys lixivates was characterized by MTT. Evaluation of potential osteoinduction and osteogenesis properties of the coated and uncoated alloys were evaluated by immunocytochemistry. Contrary to the initial expectations, the coatings favored the degradation of the Mg alloys, which reduced cell viability for the coated alloys in comparison the uncoated alloys. Cells exposed to uncoated alloys lixivates positively expressed Runx-2, Collagen-I and osteocalcin. Probably the intrinsic micro-columnar growth structure of thin films deposited by magnetron sputtering allowed the passage of the medium to the interface TiO<sub>2</sub> coating-Mg alloy, where TiO<sub>2</sub> might be reduced to Ti in contact with Mg and then may form a galvanic couple accelerating the corrosion of the alloys.



### 3. INTRODUCCIÓN

Las lesiones por traumatismos, en general, se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, afectando a la población económicamente activa y generando diversos problemas, desde daños leves hasta problemas incapacitantes (1). En Estados Unidos, cada año, alrededor de 50 millones de personas reciben tratamiento debido a una fractura, lo que genera un gasto aproximado de 400 billones de dólares (2). La incidencia de fracturas es multifactorial y está asociada a factores como edad, género, estilo de vida y ocupación (3). Sin embargo, los accidentes automovilísticos se colocan como la primer causa de fracturas, seguido de las caídas, y la violencia física en tercer lugar (4). En relación a las regiones anatómicas afectadas, casi siempre se involucra alguna extremidad y en casi la mitad de los pacientes se presenta alguna lesión de la región craneofacial (5).

Los biomateriales utilizados habitualmente para el desarrollo de implantes ortopédicos para osteosíntesis o tratamiento de fracturas abiertas como placas, clavos, tornillos o mallas son principalmente materiales metálicos como el acero inoxidable o el titanio y sus aleaciones. Esta selección de materiales está basada en sus propiedades mecánicas, su resistencia a la corrosión y su biocompatibilidad en el tejido óseo. Sin embargo, estos materiales algunas veces deberían ser retirados una vez producida la consolidación y remodelación ósea, dado que no son bioabsorbibles.

Este problema puede ser resuelto empleando implantes hechos de materiales biodegradables, los cuales se desintegren, disuelvan y eliminen gradualmente a medida que la regeneración ósea ocurre. Esto evitaría las implicaciones y complicaciones trans y post quirúrgicas de una segunda cirugía que podría ser necesaria algunas veces para remover los implantes no biodegradables. Los materiales biodegradables más usados son los polímeros; sin embargo,

estos tienen características mecánicas inferiores al tejido óseo, lo que limita su uso como materiales para implantes de osteosíntesis para tratamientos ortopédicos.

El Magnesio (Mg) y sus aleaciones son materiales particularmente útiles en el desarrollo de implantes de osteosíntesis para cirugía ortopédica ya que son materiales biodegradables con módulos de Young (41 - 45 GPa) mucho más cercanos al del hueso (10 - 20 GPa) (6). A diferencia de otros materiales metálicos como el titanio (100 - 105 GPa) o el acero inoxidable (193 GPa) que no son biodegradables y que tienen módulos de Young significativamente mayores a los del tejido óseo (6). El uso de materiales con resistencia mecánica significativamente mayor a la del tejido óseo puede generar un fenómeno denominado “apantallamiento de tensiones” el cual acelera la resorción ósea alrededor del implante, debido a la eliminación de la transferencia de estímulos mecánicos hacia el tejido óseo nativo y de *novo* que rodea al implante (7,8). Esto ha favorecido que las aleaciones de Magnesio tengan un auge en futuras aplicaciones quirúrgicas, sustentadas en sus propiedades físicas, químicas y sus características mecánicas.

Además, el Mg es el cuarto catión más abundante en el cuerpo humano, entre el 50% y el 60% de los iones fisiológicos, y constituye uno de los iones más importantes de la matriz extracelular inorgánica del tejido mineral óseo (9). El Mg está involucrado en un gran número de reacciones y mecanismos biológicos, tales como la síntesis de proteínas, la activación de una variedad de enzimas y la regulación de la actividad del sistema neuromuscular y nervioso central con el fin de garantizar la contracción del miocardio normal y la termorregulación (7,10). Por otro lado, el exceso de Mg puede ser excretado de manera natural por vía urinaria. Así, el Mg es considerado como biocompatible y bioabsorbible (8,10).

Sin embargo, uno de los principales problemas para la aplicación del Mg como biomaterial para

implantes de osteosíntesis es la poca resistencia a la corrosión que presenta en medios acuosos con presencia de iones cloro, lo que favorece su rápida velocidad de degradación al estar en contacto con medios fisiológicos, provocando que el material se biodegrade de forma acelerada antes de que el tejido óseo haya sido reparado (6,7,9). La rápida biodegradación que experimenta el Mg provoca que los implantes pierdan sus propiedades mecánicas de manera temprana, provocando también osteólisis del tejido de *novo*, comprometiendo la remodelación ósea.

Con base en lo anterior, se ha propuesto el diseño de aleaciones de magnesio para mejorar su resistencia a la corrosión en medios fisiológicos. Estudios previos *in vivo* (11,12) han demostrado que diversas aleaciones de magnesio tienen un comportamiento biológico adecuado que las hace candidatas para su aplicación como implantes metálicos biodegradables. Diferentes elementos han sido propuestos para dichas aleaciones, entre ellos zinc y calcio, que son dos de los principales elementos metálicos contenidos en el cuerpo humano (11-14), por lo que se consideran generalmente como los aditivos más biocompatibles introducidos en las aleaciones de magnesio.

El calcio (Ca) es el quinto elemento más abundante en la corteza terrestre. También forma parte del cuerpo humano al ser el componente principal de huesos y dientes. Dentro de las aplicaciones ortopédicas, la liberación del Ca favorece el proceso de reparación y regeneración ósea. Y a su vez, en el proceso de elaboración de aleaciones de magnesio, la adición de Ca alivia la oxidación durante el proceso de elaboración de la aleación, tanto en la fusión como en la fundición durante el tratamiento térmico, y también puede contribuir a refinar los granos y así mejorar la resistencia mecánica (14).

Sin embargo, el uso exclusivo de Ca como aleante puede causar fragilidad, alta sensibilidad a

la oxidación y una degradación rápida de la aleación de Mg en el cuerpo humano, por lo que muchas veces se añade Zn a la mayoría de las aleaciones Mg-Ca como catalizador para retardar la degradación de estos elementos. El zinc también posee un efecto estimulante sobre la formación de hueso, al ser el tejido óseo el reservorio del 28% del zinc total contenido en el cuerpo. A su vez el zinc participa en múltiples funciones metabólicas como la síntesis de proteínas, el mantenimiento y estructura de la membrana celular, la síntesis de ADN, la mitosis y proliferación celular. Así mismo, al incorporarse el zinc a la estructura de la hidroxiapatita, este le otorga propiedades de cristalinidad y antimicrobianas (15).

La modificación de la superficie es una estrategia eficaz para mejorar la resistencia a la corrosión de las aleaciones basadas en Mg sin cambiar sus propiedades mecánicas. Por lo que también se ha propuesto el uso de diferentes recubrimientos con la finalidad de controlar la velocidad de degradación del Mg y sus aleaciones, para tratar de empatar dicha velocidad de degradación con el tiempo requerido para lograr la regeneración y remodelación ósea. Entre los diferentes recubrimientos posibles, el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es un material con propiedades favorables para constituir un recubrimiento adecuado para el Mg y sus aleaciones. Ante la presencia de titanio en un medio fisiológico, este se pasiva, es decir, forma una delgada capa de óxido de titanio (3 - 6 nm de espesor) en su superficie, y es a la formación de esta capa de óxido nativo a la cual se le atribuye gran parte de la biocompatibilidad y respuesta favorable de los implantes de titanio. Cuando el titanio es implantado en el hueso, la capa bioactiva de  $\text{TiO}_2$ , de carácter amorfo, facilita la osteointegración del implante mediante una serie de reacciones superficiales con el medio. En estas reacciones se produce, entre otras cosas, la formación de una capa de hidroxiapatita amorfa que termina cristalizando y favoreciendo la integración del tejido con el material (13).

Se ha demostrado que las películas delgadas de óxido de titanio producidas por “magnetron sputtering” promueven la diferenciación celular de células troncales mesenquimales hacia el fenotipo osteoblástico, modulando también la producción de interleucinas y moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria de dichas células; donde las películas de óxido de titanio amorfo ( $a\text{TiO}_2$ ) presentan mejores propiedades de osteogénesis que sus contrapartes cristalinas (16). También se ha demostrado que al recubrir una superficie metálica mediante magnetron sputtering con películas delgadas de óxidos se puede también aumentar la resistencia a la corrosión y en consecuencia reducir la liberación de iones metálicos y retardar la degradación del material. Por otro lado, el depósito de películas por “magnetron sputtering” sobre diversos materiales en volumen ofrece ventajas respecto a otras formas de modificación de superficie, como alta uniformidad, conformalidad, control del espesor y un depósito preciso sobre la superficie (17).

Con base en lo anterior, conjuntando aleaciones de Mg de alta pureza con Zn y Ca recubiertas con una película de  $\text{TiO}_2$  amorfo, se esperaría obtener un biomaterial mejorado con potencial para ser usado en el desarrollo de implantes biodegradables para osteosíntesis. Esperando mejorar resistencia a la corrosión en medios fisiológicos y a su vez, favorecer la formación de tejido óseo de *novo* (regeneración ósea) al promover la diferenciación celular hacia un fenotipo osteoblástico.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 TEJIDO ÓSEO

El hueso, desde un punto de vista histológico, es un tejido conjuntivo mineralizado vascularizado e innervado. Es un tejido duro que posee varias funciones, entre las cuales destacan ser el principal componente del esqueleto, permitir el movimiento, proteger los órganos al soportar grandes cargas cíclicas, funcionar como sostén y anclaje de los músculos y servir como almacenamiento de elementos inorgánicos, como el calcio, que son esenciales para el metabolismo óseo y que son liberados de acuerdo con las necesidades del organismo (18).

El hueso está formado por una fase inorgánica, una fase orgánica y una porción celular. La fase inorgánica o mineral representa el 65% del peso óseo y está formada principalmente por iones calcio, fosfato y carbonato, y en menor proporción por iones magnesio, sodio, potasio, manganeso y flúor. Los iones calcio, fosfato y carbonato en conjunto forman cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). La fase orgánica del hueso o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo y está formada principalmente por proteínas, entre las que destaca la colágena (90%); Tabla 1 (19). La colágena de la matriz extracelular orgánica del hueso está constituido predominantemente por colágena tipo I (>95%) y tipo V (<5%), aunque también existe la presencia de pequeñas proporciones de colágena tipo III relacionado con las fibras de Sharpey, y de colágena tipo XII formado bajo estrés mecánico. Además de la colágena tipo I, la matriz extracelular orgánica del hueso tiene proteoglicanos, glicoproteínas y ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico, responsable de la organización estructural. Es en esta matriz orgánica en donde se hallan inmersas las células óseas. El hueso contiene también entre un 5 y un 8% de agua (20).

TABLA 1. PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR MODIFICADA DE (19)

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	
COLÁGENO	TIPO I,III,V,XII
PROTEOGLICANOS	CONDROITÍN SULFATO DECORINA HIALURONANO BIGLICANO
PROTEÍNAS CON ÁCIDO CARBOXIGLUTÁMICO	OSTEOCALCINA PROTEÍNAS DE LA MATRIZ CON ÁCIDO CARBOXIGLUTÁMICO.
GLICOPROTEÍNAS	OSTEONECTINA FOSFATASA ALCALINA PROTEÍNAS CON RGD: FIBRONECTINA, OSTEOPONTINA, VITRONECTINA, SIALOPROTEÍNAS ÓSEAS
PROTEÍNAS DEL PLASMA	ALBÚMINA
FACTORES DE CRECIMIENTO	FACTOR DE CRECIMIENTO DE INSULINA I Y II (IGF-I Y II) FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF- $\beta$ ) FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)

Existen dos tipos de hueso: esponjoso y compacto. El hueso esponjoso se encuentra en el interior de los huesos y se compone por trabéculas que forman un patrón reticulado, lo que le otorga la propiedad de soportar cargas de tensión y de soportar peso. Estas estructuras reticuladas están llenas de células osteoprogenitoras y rellenas de medula ósea. El hueso compacto o cortical, forma la cubierta externa del hueso y tiene una matriz calcificada que lo hace más denso. Los huesos tienen elementos esponjosos y compactos; sin embargo, sus proporciones varían de acuerdo con su localización en el organismo y también varían en composición dentro del mismo hueso (20,21).

Los huesos están cubiertos de periostio, excepto en sus extremos articulares. El periostio posee una capa fibrosa externa, vasos sanguíneos y una capa interna que contiene células osteoprogenitoras necesarias para el crecimiento y desarrollo del hueso. El periostio también actúa como punto de fijación para los vasos de entrada y salida del hueso. Por otro lado, el endostio es una membrana que recubre los espacios del hueso esponjoso, las cavidades

medulares, y los canales de Havers del hueso compacto. Se forma principalmente de células osteoprogenitoras que contribuyen al crecimiento y remodelación ósea (20,21).

Según el grado de madurez, el tejido óseo se clasifica en fibrilar y laminar. El hueso fibrilar se considera hueso inmaduro y se deposita con mayor rapidez que el hueso laminar. Tiene escasa resistencia a la tensión y sirve de estructura temporal para dar soporte. Habitualmente se encuentra en los embriones en desarrollo, en los recién nacidos, en la región de la metáfisis de los huesos en crecimiento, en las áreas que rodean tumores, y como parte de una fractura durante el período de remodelación y consolidación ósea. El hueso laminar es una forma sólida y madura de hueso y tiene una estructura organizada. Se forma lentamente un mes después del nacimiento a partir del proceso de remodelación del hueso fibrilar. El hueso laminar se encuentra en el hueso esponjoso y cortical del esqueleto de los adultos (20,21).

Los huesos se clasifican por su forma en largos, cortos, planos e irregulares. Los huesos largos se encuentran en las extremidades superiores e inferiores, y se componen de una capa de hueso esponjoso entre dos capas de hueso compacto. Los huesos cortos son huesos irregulares que se ubican en la muñeca y el tobillo, y excepto por su cubierta de hueso compacto, estos huesos son esponjosos en toda su extensión. Los huesos irregulares no pueden clasificarse como huesos cortos o largos debido a sus formas diversas. Este grupo incluye las vértebras y la mandíbula (18).

## 4.2 CÉLULAS ÓSEAS

En el tejido óseo existen 4 diferentes tipos de células, células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, las cuales participan en la formación y mantenimiento del tejido óseo.



#### 4.2.1 CÉLULAS OSTEOPROGENITORAS Y DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA.

Las células osteoprogenitoras son células indiferenciadas localizadas en el periostio, el endostio y la placa epifisiaria del hueso en crecimiento. Derivan de las células troncales mesenquimales de la médula ósea y tienen la capacidad para diferenciarse en diversos linajes celulares, entre ellos, adipocitos, fibroblastos, miocitos y osteoblastos (22).

La diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico está controlada por genes pertenecientes a la familia Hedgehog, dentro de los cuales destacan: *Ihh* (Indian hedgehog) y *Shh* (Sonic hedgehog) (19). También existen factores de transcripción que promueven la transcripción de genes que dan origen a proteínas clave en la señalización celular, entre ellos se encuentran *Runx-2* y las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), que a su vez regulan la diferenciación osteoblástica desde las células troncales mesenquimales (23).

A medida que las células troncales mesenquimales se van diferenciando expresan en la membrana celular proteínas específicas de su función o marcadores. La expresión de *Runx-2* es la primera evidencia de la diferenciación osteogénica, cuyo máximo nivel se alcanza en los pre-osteoblastos. La colágena I y la osteopontina (OPN), se expresan de forma temprana en las células osteoprogenitoras. La fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que se cree podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblásticas. La sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación del pre-osteoblasto al osteoblasto y aparecen cuando se inicia la mineralización. La expresión de estas proteínas resulta útil como marcadores osteogénicos en los estadios finales de la diferenciación osteoblástica (19).

#### 4.2.2 OSTEOLASTOS

Los osteoblastos son células grandes (20 - 30  $\mu\text{m}$ ) de forma poliédrica, que construyen hueso y secretan matriz ósea a un ritmo de 2 a 3  $\mu\text{m}$  por día. Los osteoblastos expresan fosfatasa alcalina (ALP), una enzima que permite la mineralización ósea a un ritmo de 1 a 2  $\mu\text{m}$  por día (19). Su origen procede de las células troncales mesenquimales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares. Los osteoblastos poseen procesos citoplasmáticos que se dirigen a la matriz extracelular, los cuales les permiten comunicarse con los osteocitos y los osteoclastos. Esta comunicación se da a través de proteínas transmembranales e integrinas, las cuales funcionan como anclaje entre las células y la matriz extracelular, permitiendo así el paso de elementos mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas (24). Dentro de las principales funciones que poseen los osteoblastos están: 1) sintetizar colágena tipo I y proteínas no colágenas de la matriz orgánica del hueso que forman el osteoide; 2) dirigir la disposición de las fibras de la matriz extracelular; 3) iniciar el proceso de mineralización de la sustancia osteoide mediante la secreción de fosfatasa alcalina; 4) intervenir en la reabsorción ósea, dirigida por los osteoclastos, a través de la síntesis de citoquinas específicas; y 5) sintetizar factores de crecimiento (25). La vida media de los osteoblastos humanos es de 1 a 10 semanas, al término de la cual pueden desaparecer por mecanismos de apoptosis, transformarse en células limitantes o de revestimiento ("bone lining cells") o transformarse en osteocitos ( $\approx 15\%$  del total de osteoblastos) (26). Los osteoblastos pueden expresar marcadores osteoblásticos como sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina y fosfatasa alcalina, así como el receptor de parathormona (PTH) (19).

### 4.2.3 OSTEOCITOS

El osteocito es la célula más abundante del tejido óseo, posee una forma estrellada y conforma cerca del 95% del componente celular del hueso. Deriva de los osteoblastos que han detenido la producción de matriz ósea y han quedado incorporados dentro de lagunas en el interior del hueso recién formado. Una de las principales funciones del osteocito es la capacidad de sensor los estímulos mecánicos y transformarlos en señales biológicas, fenómeno conocido como mecanotransducción. Estas señales son las que dirigirán los cambios necesarios en la arquitectura ósea (27). Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide. La ubicación de los osteocitos en el interior de la matriz ósea, hace que sean candidatos para detectar la necesidad de remodelación, durante la adaptación funcional a las cargas y la reparación de microfracturas, y en ambos casos, transmitir señales a las células efectoras encargadas de la formación y reabsorción óseas (28).

### 4.2.4 OSTEOCLASTOS

El osteoclasto es una célula grande (100  $\mu\text{m}$ ) multinucleada que ha sido considerada como una célula con una función exclusivamente de remodelación del hueso, al reabsorberlo. Dentro de la membrana de los osteoclastos, existen proteínas integrinas que le ayudan a anclarse a la matriz extracelular del hueso, y así permitir su desplazamiento hacia el sitio que requiere ser reparado. Los osteoclastos favorecen la secreción de enzimas proteolíticas como colagenasas, metaloproteasas y catepsina K, entre otras. Las cuales a su vez favorecen la degradación de la matriz extracelular del hueso, inicialmente y después de la fase mineralización del hueso al crear un medio ácido (19).

### 4.3 REGENERACIÓN ÓSEA

El hueso es un tejido dinámico en el que simultáneamente se llevan a cabo procesos de formación y reabsorción ósea, permitiendo así el mantenimiento del volumen óseo y la reparación del daño tisular. Este proceso equilibrado, denominado proceso de remodelado, permite la renovación de un 5% del hueso cortical y de un 20% del hueso trabecular al año. Así, la renovación del hueso es aproximadamente de un 5 - 10% del hueso total al año (19).

#### 4.3.1 FASES DEL REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo se recambia constante, este proceso se denomina remodelado óseo, lo que permite que el hueso se renueve y responda a mediano y largo plazo a las necesidades mecánicas y metabólicas del organismo. El remodelado óseo se lleva a cabo mediante el acoplamiento de los procesos de reabsorción (realizado por osteoclastos) y formación (realizado por osteoblastos), estos procesos a su vez se desarrollan a través de 5 fases (29):

I) Fase quiescente.

En esta fase el hueso se mantiene en un estado de reposo.

II) Fase de activación.

El comienzo del proceso de remodelación surge cuando los osteocitos sienten, a través de un estímulo mecánico u hormonal, algún defecto en el tejido óseo. Estas células secretan RANKL (RANK ligando), proteína que activa al receptor RANK (receptor activador del factor nuclear kappa  $\beta$ ) en los preosteoclastos. La interacción entre RANK y RANKL permite la diferenciación y maduración de osteoclastos activos capaces de reabsorber el tejido óseo.

III) Fase de reabsorción.

En esta fase, los osteoclastos se adhieren a la superficie del hueso a través de moléculas de adhesión. Posteriormente, en una fase inicial, los osteoclastos disuelven la matriz mineral gracias a un bombardeo de iones  $H^+$  en el medio ambiente, lo cual crea un pH ácido (pH 4). En una fase secundaria, la matriz orgánica del hueso es degradada a través de metaloproteinasas secretadas por los osteoclastos.

IV) Fase de formación.

Los preosteoblastos se agrupan alrededor de las zonas de reabsorción, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz extracelular degradada, los cuales actúan como quimiotácticos y además estimulan la proliferación de los preosteoblastos. Los preosteoblastos sintetizan proteínas morfogenéticas óseas, responsables de la diferenciación osteoblástica. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados sintetizan la sustancia osteoide que rellenará las zonas donde hubo reabsorción ósea. Posteriormente, los osteoblastos son reclutados en el sitio de remodelación, dirigidos por estímulos de diversos factores de crecimiento y secretan una nueva matriz orgánica (osteoide). Luego de 11 días el osteoide comienza a mineralizarse, y esto continúa hasta que se rellena totalmente la cavidad (aproximadamente 2 o 3 meses), completándose la remodelación ósea (30).

V) Fase de mineralización.

A los 30 días del depósito del osteoide comienza la mineralización, la cual finalizará a los 90 días en el hueso trabecular y a los 130 días en el hueso cortical. Finalmente, comienza de nuevo la fase quiescente o de descanso.

La regeneración tisular es la respuesta del tejido ante un traumatismo, ante el cual se genera un tejido con las mismas características al original, a diferencia de la reparación, en donde se obtiene tejido cicatrizal con características diferentes.

#### 4.4 LESIONES ORTOPÉDICAS Y BIOMATERIALES

Las fracturas óseas pueden producirse en cualquier etapa de la vida, desde el nacimiento hasta la vejez, y presentar diferentes características, localización y severidad. La presencia de fracturas en distintas etapas de la vida está determinada por diversas circunstancias, como las características intrínsecas del individuo, patologías, y factores nutricionales, metabólicos, ocupacionales o endocrinológicos (31).

En México, una de cada 12 mujeres y uno de cada 20 hombres mayores de 50 años sufre una fractura de cadera por osteoporosis (32); sin embargo, se estima que debido al envejecimiento de la población, la tendencia de pacientes que sufran fracturas incrementará. Estudios epidemiológicos realizados en México sobre fracturas, abarcando seis diferentes instituciones y conjuntando sus resultados, encontraron que de un total de 3,755 fracturas que requirieron manejo quirúrgico, 2,733 se presentaron en las extremidades pélvicas y 1,022 en las torácicas, con una relación de 2.6:1 a favor de las primeras (31,33). Si a ello se suman todas aquellas fracturas que no requirieron manejo quirúrgico, es muy posible que el número se triplique (34).

El tratamiento quirúrgico convencional está indicado en el tratamiento de fracturas abiertas. La fijación interna de fracturas también se recomienda cuando las fracturas están asociadas a algunos problemas como lesión vascular o nerviosa, pacientes obesos, fractura bilateral de húmero y múltiples heridas (35). Los biomateriales empleados en este tipo de tratamiento de

fracturas pueden ser clasificados de acuerdo con su naturaleza, como cerámicos, poliméricos o metálicos.

Los materiales cerámicos son ampliamente utilizados en cirugía ortopédica y odontología. Dentro de las características que presentan están: altas temperaturas de fusión y baja conductividad eléctrica y calorífica. La principal desventaja de estos materiales es que tienden a ser duros y frágiles, lo que pudiera llevar a una fractura del material al presentar baja resistencia al impacto. La alúmina, la zirconia, los fosfatos cálcicos y ciertos vidrios son biomateriales cerámicos comúnmente usados en ortopedia. Así, por ejemplo; la alúmina, es muy resistente a la corrosión, no tóxica y biocompatible; y los fosfatos y los vidrios cerámicos son materiales bioactivos capaces de inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor (36).

Los materiales poliméricos suelen ser usados como dispositivos biomédicos debido a su biocompatibilidad y propiedades de degradación, y a que algunas de sus propiedades físicas y mecánicas se asemejan a las de ciertos tejidos ricos en proteínas y polisacáridos. Sin embargo, sus propiedades mecánicas respecto a las del hueso son menores en comparación a las propiedades de otros materiales, como los materiales metálicos. Algunos polímeros usados en el campo de los biomateriales, son los polímeros reabsorbibles, entre ellos destacan el poli (ácido láctico) (PLA) o el poli (ácido glicólico) (PGA), principalmente empleados en suturas quirúrgicas y en algunos materiales de osteosíntesis (clavos, placas, tornillos, etc.) (36).

Los materiales metálicos son actualmente los únicos capaces de soportar cargas elevadas y los que ofrecen propiedades mecánicas más cercanas a las del tejido óseo, como alto módulo y límite elástico, ductilidad y resistencia a la fractura. Esto hace que los materiales metálicos sean el material de elección donde las necesidades mecánicas prevalecen frente a las demás.

Algunos metales, como el titanio o el acero inoxidable, han sido empleados con la finalidad de reemplazar el tejido óseo permanente o temporalmente, ya sea como prótesis de cadera o rodilla, o bien como implantes para osteosíntesis como placas, tornillos y clavos que ayudan a consolidar las fracturas. Una desventaja de los materiales metálicos es que al ser más rígidos que el tejido óseo, pueden conllevar al fenómeno conocido como apantallamiento de tensiones o “stress-shielding”, que es causado por la diferencia del valor del módulo mecánico de Young entre el material y el tejido óseo. Esto trae como consecuencia la pérdida de masa ósea y la atrofia del hueso u osteopenia alrededor del implante metálico. Lo cual debilita enormemente al hueso e incrementa el riesgo de fractura de éste e incluso del implante. Aunado a esta desventaja, está el hecho de que en el caso de los implantes temporales para permitir y promover la osteosíntesis en pacientes de edad no muy avanzada y en niños, podría ser necesaria una segunda intervención quirúrgica para retirar este tipo de implantes metálicos una vez que la fractura se ha consolidado (37).

En este contexto, el magnesio (Mg) y sus aleaciones pueden ser biomateriales idóneos, porque conjugan su capacidad de degradación con las propiedades mecánicas de los metales. Entre las características y ventajas del Mg y sus aleaciones, están que sus valores de densidad ( $1.74 \text{ g/cm}^3$ ), módulo elástico (44 GPa a  $20^\circ\text{C}$ ), resistencia a la compresión y resistencia a cargas cíclicas son más cercanos a los del hueso que en el caso de otros materiales empleados actualmente. Además, el magnesio es un elemento necesario para la incorporación del calcio al hueso y para la estimulación del crecimiento de nuevo tejido, no se le conoce toxicidad y se metaboliza por el riñón y se excreta por la orina (38).



## 4.5 MAGNESIO

### 4.5.1 PROPIEDADES DEL MAGNESIO

Debido a la necesidad de biomateriales de última generación para aplicaciones médicas, en la actualidad se ha optado por usar materiales susceptibles de corrosión en medios fisiológicos para desarrollar dispositivos médicos para aplicaciones ortopédicas donde se requieren andamios que brinden soporte temporal, sólo durante el proceso de regeneración tisular, pero que deben ser reabsorbidos durante la consolidación o una vez consolidada la regeneración tisular. También es importante mencionar que los subproductos de la corrosión que se liberan deben ser biocompatibles y no causar reacciones inmunológicas significativas.

El magnesio es un elemento reactivo, que se encuentra como un catión bivalente  $Mg^{2+}$  o bien formando sales o minerales. Es el 4º elemento más abundante del cuerpo humano y es el catión intracelular que se encuentra en mayor proporción (36). Además de su importancia en la formación de ATP, el magnesio juega un importante papel en la síntesis de proteínas al ser un cofactor que inicia la transcripción del material genético, la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana celular, contribuyendo a la modulación de los iones intracelulares y en los procesos de estabilización y traslación celular (39). El Mg se une a fosfatos y así su presencia influye en la mineralización del tejido óseo, a través del control de la formación de hidroxapatita. El Mg es eficazmente controlado en el cuerpo a través de mecanismos homeostáticos y su toxicidad no es, en general, un problema, ya que puede ser excretado a través de la orina (36).

Así, en la actualidad, ha aumentado la investigación referente al Mg y las aplicaciones clínicas ortopédicas debido a la biocompatibilidad, sus propiedades mecánicas similares a las del hueso, y a su capacidad de degradación en medios fisiológicos. Sin embargo, a pesar del potencial del Mg como biomaterial para el desarrollo de implantes biodegradables para aplicaciones

ortopédicas, una de sus principales limitaciones es su rápida e incontrolada degradación en ambientes fisiológicos, además de la rápida liberación de burbujas de hidrógeno que ocurre durante dicha degradación que retrasan el proceso de curación (9,40).

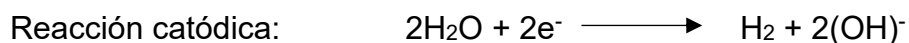
El Mg puro fue implantado en el cuerpo humano por primera vez en la década de 1940, pero más tarde fue abandonado como biomaterial debido a la constatación de que la integridad mecánica del Mg puro se mantenía sólo durante 6 - 8 semanas, mientras que el gas de hidrógeno se acumulaba durante el proceso de corrosión incontrolada favoreciendo la inflamación (41).

#### 4.5.2 PROCESO DE CORROSIÓN DEL MAGNESIO

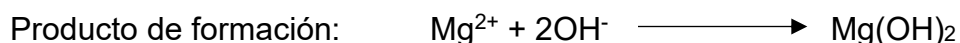
La corrosión es un efecto superficial y el medio en el que se coloca el material influye en gran medida en los parámetros y el grado en que se produce la corrosión. El Mg y sus aleaciones se corroen y degradan en materiales acuosos a través de reacciones de oxidación-reducción que son influenciadas por los elementos de la aleación. En general, en este proceso de corrosión se producirán un medio acuoso clorado, hidróxido de magnesio, gases de hidrógeno como subproductos, y alcalinización del medio como un resultado de la producción de iones hidroxilo durante la reacción de corrosión.

La baja resistencia a la corrosión del magnesio se debe principalmente a su bajo potencial de reducción que le hace descomponer el agua y formar pares galvánicos con otros metales, sobre todo ante la presencia de impurezas de Fe, Cu y Ni. Estas impurezas actúan como pequeños cátodos en presencia de un medio corrosivo y crean microceldas con la matriz anódica del Mg, por lo que el ataque por corrosión se localiza en la matriz de Mg adyacente a estas fases.

Se ha observado que la corrosión del magnesio en agua forma una capa de hidróxido de magnesio (poco soluble en medios acuosos) en la superficie del material (42). La reacción de corrosión en medios acuosos generalmente aceptada para el Mg es:

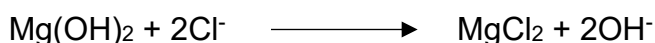


Formándose así una capa protectora en la superficie del magnesio según la fórmula (43,44):



La reacción general catódica-anódica produce grupos  $\text{OH}^{-}$  y por tanto el pH incrementa y desplaza la reacción a la derecha, es decir, hacia la formación de  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  (45).

Si el medio corrosivo contiene cloruros en concentraciones superiores a 30 mmol/l, el hidróxido de magnesio formado se convertirá en cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), un compuesto altamente soluble en medios acuosos (42). En un medio que contiene iones  $\text{Cl}^{-}$  como el medio fisiológico, el  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  reacciona con los iones  $\text{Cl}^{-}$  para formar  $\text{MgCl}_2$ , el cual se disuelve en el medio dejando nuevamente expuesto el sustrato metálico al ataque del medio corrosivo. Así, en el caso de fluidos biológicos donde las concentraciones de cloruro son de aproximadamente 150 mmol/l, la corrosión por picaduras en la superficie se observa frecuentemente. La reacción que se presenta corresponde al ataque por cloruros:



Como consecuencia, aparecen picaduras sobre el sustrato de magnesio, lo que acelera el proceso de corrosión (43).

La corrosión del magnesio depende de ciertos parámetros como la composición de la aleación de Mg, los tratamientos metalúrgicos, el tipo de tratamiento de superficie, la composición electrolítica del medio en el que se encuentra, el pH del entorno y su capacidad para funcionar como tampón, las propiedades mecánicas a la compresión y a la torsión, el entorno biológico como la presencia de proteínas y los fenómenos de transporte asociados con los reactantes o los productos de corrosión (43,44).

Existen diversas alternativas para controlar la velocidad de degradación de las aleaciones de magnesio, entre ellas destacan mejorar su composición y por ende la resistencia a la corrosión y sus propiedades. Otra alternativa, es la colocación de recubrimientos y tratamientos de superficie que protejan la aleación, y que además de mejorar la resistencia a la corrosión al ser aplicados, inferirían en la compatibilidad y actividad biológica (funcionalidad) de los implantes.

En la actualidad se han estudiado diversas aleaciones de magnesio, determinando que, si presentan elementos como Fe, Ni, Cu o Co la corrosión se verá incrementada, y por el contrario si se adiciona Zr, Ca, Sr, Mn o tierras raras, la velocidad de corrosión podrá ser controlada. La adición de manganeso logra reducir los efectos nocivos de las impurezas al inactivar a los átomos de Fe actuando como cátodos locales. La adición de Zn en la aleación reduce la presencia de gas hidrogeno. Por otra parte, al añadir Ca aumenta la resistencia a la corrosión en soluciones cloruradas y de acuerdo con su concentración, varía la velocidad de la corrosión.

Para aplicaciones biomédicas, la selección de composiciones elementales para las aleaciones de magnesio debe cumplir ciertos requisitos específicos, entre ellos que los componentes de la aleación y los subproductos de corrosión no tengan efectos adversos en el organismo durante el proceso de degradación; es decir, que sean biocompatibles. Los materiales que componen

minerales y oligoelementos ya existentes dentro del cuerpo, como el Zn y el Ca, son altamente ventajosos para tales propósitos; es decir, como biomateriales.

#### 4.6 ALEACIONES DE MAGNESIO-ZINC-CALCIO.

A pesar de que se han propuesto diversas aleaciones de magnesio que buscan reducir y controlar la velocidad de corrosión, se ha demostrado que las aleaciones Mg-Zn, Mg-Ca o Mg-Zn-Ca son ventajosas porque mejoran las propiedades físicas y químicas de la aleación, pero además son biocompatibles (al ser el Zn y el Ca elementos nutrientes junto con el manganeso, estaño y estroncio), no tóxicos, y al disolverse pueden ser absorbidos fácilmente por los tejidos circundantes y ser excretados (46).

El calcio juega un papel vital en el cuerpo humano y tiene numerosas funciones esenciales. Por ejemplo, el hueso se forma a partir de una matriz compleja de proteínas dentro de la cual se depositan calcio y otros minerales. Los huesos contienen un 99.5% del total de calcio en el cuerpo humano. El calcio, el fosfato y el magnesio son los minerales más importantes y abundantes en el hueso, con el calcio y el fosfato formando parte de la combinación del complejo cristalino, hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ . Este complejo proporciona la estructura dura y rígida del hueso que es esencial para su función en el apoyo de los tejidos blandos y como depósito de calcio para otras funciones del cuerpo. El Ca define la microestructura y mejora las propiedades de resistencia y de fluencia del Mg debido a la formación de fases intermetálicas estables. Sin embargo, las fases intermetálicas son frágiles, por lo que pueden iniciar la formación de grietas y acelerar así la degradación de la aleación Mg-Ca debido a la

corrosión galvánica. El Ca es un elemento biofuncional y el nivel de aceptabilidad de biocompatibilidad cuando se adiciona Ca a las aleaciones de Mg es  $\leq 1$  wt.% (47).

Por otro lado, el zinc es uno de los elementos nutrientes esenciales en el cuerpo humano y más del 85% de Zn en el cuerpo humano está presente en los músculos y los huesos. El Zn proporciona refuerzo mecánico en solución sólida y controla el envejecimiento de las aleaciones de Mg. El zinc también ayuda a superar el efecto corrosivo perjudicial de las impurezas de hierro y níquel que pueden estar presentes en las aleaciones de magnesio. Además de que reduce el desprendimiento de gas hidrógeno durante el proceso de corrosión (47).

#### 4.7 TRATAMIENTO DE LA SUPERFICIE DE ALEACIONES DE MAGNESIO

Mediante el tratamiento de superficie, se busca crear una barrera física para aislar la matriz de Mg de los medios corrosivos y facilitar el mantenimiento de la integridad de los implantes por más tiempo durante el proceso de resolución de las lesiones óseas. Con el fin de reducir y controlar la velocidad de degradación de las aleaciones de Mg se ha planteado la aplicación de recubrimientos y/o tratamientos de modificación superficial. Los cuales deben tener como requisito una elevada resistencia a la corrosión, uniformidad, adherencia y, además, dado que su aplicación potencial es de carácter biomédico en implantes temporales, éstos deben ser no tóxicos para el cuerpo humano y biocompatibles (48).

El titanio y sus aleaciones se consideran materiales ideales para ortopedia y odontología debido a su estabilidad química, biocompatibilidad y capacidad de osteointegración. Estas propiedades están determinadas en gran medida por las propiedades de su capa de óxido nativo (49), sin olvidar la influencia de la rugosidad del sustrato. *In vitro*, ha sido demostrado que el TiO<sub>2</sub>, junto

con la rugosidad de la superficie, regula la expresión de proteínas del hueso como la proteína morfogenética 2 (BMP-2) necesaria para la diferenciación osteoblástica, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que induce la angiogénesis, y la osteoprotegerina que regula la osteoclastogénesis y el recambio óseo (50). Así mismo, el ordenamiento atómico del  $\text{TiO}_2$  también tiene un efecto sustancial en algunas propiedades de la superficie que influyen en la respuesta biológica, como la energía de superficie, la carga superficial, y la estabilidad química de la capa superficial más externa, pero se sabe menos sobre su efecto específico en el comportamiento celular. En este sentido, trabajos anteriores han analizado el efecto sobre la adhesión y proliferación celular de la fase cristalina de recubrimientos de  $\text{TiO}_2$  depositados como películas delgadas, confirmando que la energía superficial y la nanotopografía del recubrimiento amorfo de  $\text{TiO}_2$  están relacionadas con la promoción de la diferenciación de células troncales mesenquimales, la expresión de integrinas y la producción de un microambiente celular asociado con la regeneración ósea (16).

A la par de que el recubrimiento de  $\text{TiO}_2$  amorfo funciona como un osteoinductor, los resultados electroquímicos que se han hecho en películas de óxidos de titanio amorfo y cristalino han mostrado que el óxido amorfo es más resistente, ya que no requiere calentamiento como su contraparte cristalina (51).

Las películas de óxido delgado pueden depositarse por varios métodos, como el depósito químico en fase vapor, por evaporación de haz de electrones, pulverización catódica asistida por plasmas (magnetron sputtering), depósitos por arco, depósitos de capas atómicas y sol-gel (17). En el caso de la técnica de "magnetron sputtering" o técnica de pulverización catódica, especialmente los métodos pulsados, han ganado recientemente un gran interés porque permiten la creación de condiciones para el crecimiento de películas delgadas que son difíciles

(o imposibles) de lograr en procesos de pulverización estándar. Dentro de las ventajas de realizar el depósito de  $\text{TiO}_2$  por medio de la técnica de pulverización catódica en magnetron sputtering es que puede emplearse sobre diferentes sustratos, existe control acerca del grosor de la película, es una técnica limpia ya que no se requiere ningún tipo de químico para realizar el depósito, y que los depósitos pueden realizarse de forma homogénea y conformal.

## **5. HIPÓTESIS**

Las aleaciones de Mg (Mg-Zn-Ca) de alta pureza constituirán materiales biocompatibles con velocidades de biodegradación más lentas que las velocidades de degradación reportadas para Mg de ultra alta pureza en la literatura. A su vez, los recubrimientos de óxido de titanio amorfo depositados sobre las aleaciones de magnesio de alta pureza disminuirán la velocidad inicial de degradación de las aleaciones y promoverán la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico. Por lo cual se espera que los biomateriales desarrollados, constituidos por una aleación de Mg-Zn-Ca de alta pureza recubierta de óxido de Ti, tendrán el potencial para ser usados en una futura aplicación como implantes ortopédicos temporales, al presentar *in vitro* una velocidad de biodegradación adecuada y promover la diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la respuesta *in vitro* de materiales biodegradables y biofuncionales, desarrollados con base en aleaciones de magnesio (Mg-Zn-Ca) con diferentes microestructura y recubrimientos en forma de películas delgadas de óxido de titanio con potencial aplicación quirúrgica y ortopédica.



## **6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar las propiedades físicas-químicas, estructurales y de superficie de las aleaciones de Mg con dos microestructuras diferentes, con y sin recubrimiento de óxido de titanio.
- Optimizar el proceso de depósito de películas de óxido de titanio sobre las muestras de aleaciones de Mg en ambas caras de la superficie de las muestras.
- Evaluar la degradación de las muestras con y sin recubrimiento de óxido de titanio en condiciones fisiológicas.
- Evaluar la biocompatibilidad de los materiales a través del estudio de la viabilidad, funcionalidad metabólica celular, y proliferación de células troncales mesenquimales cultivadas en presencia de los residuos de degradación de los materiales de estudio a diferentes tiempos de cultivo.
- Evaluar la expresión de proteínas de mineralización ósea (Runx-2, osteopontina, osteocalcina, y colágena I) por inmunocitoquímica, de células troncales mesenquimales cultivadas en presencia de los residuos de degradación de los materiales de estudio, como marcadores de diferenciación celular hacia el fenotipo osteoblástico.

## **7. MÉTODOS.**

### **7.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA-QUÍMICA DE ALEACIONES DE MAGNESIO CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE TiO<sub>2</sub>**

#### **7.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Las aleaciones de magnesio que fueron usadas en este trabajo de investigación fueron desarrolladas por el Helmholtz-Zentrum Geesthacht en Alemania por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Dietmar Letzig. Las aleaciones fueron nombradas como Mg1 y Mg2. Ambas

aleaciones tenían la misma composición química y eran aleaciones de Mg de ultra alta pureza (99.5%) que contienen Zinc (0.3%) y Calcio (0.2%). La principal diferencia entre las aleaciones Mg1 y Mg2 es la temperatura a la que fueron recocidas, con lo cual se obtuvo un tamaño de grano cristalino diferente para cada aleación. Un mayor tamaño de grano cristalino para Mg2 (aleación recocida a 450°C) respecto de Mg1 (aleación recocida a 350°C); Figura 1.

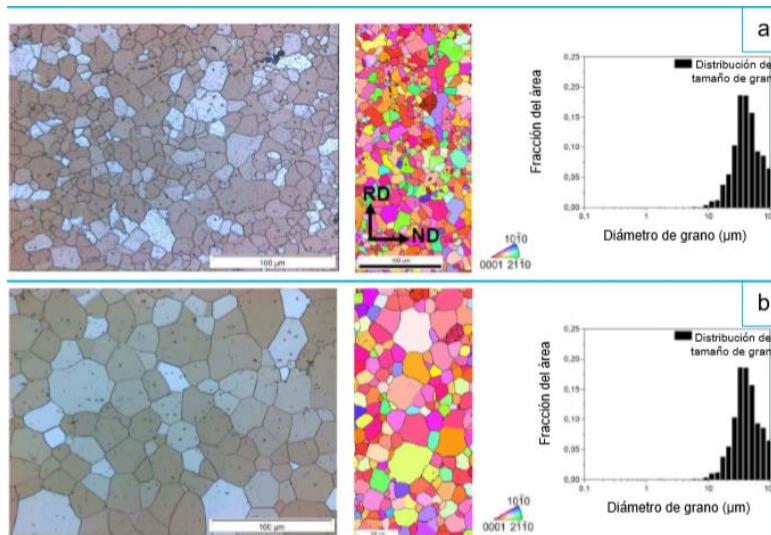


Figura 1. Caracterización microestructural e histograma del tamaño de grano de las aleaciones (a) Mg1 y (b) Mg2, usadas en el presente trabajo.

Se obtuvieron muestras de 1x1 cm<sup>2</sup> con 1.8 mm de espesor. Las muestras de las aleaciones fueron limpiadas con acetona pura y secadas con aire a presión con la finalidad de eliminar impurezas y grasa que se generan debido al proceso de fabricación. Después, fueron desbastadas manualmente con lijas de 6 diferentes tamaños de grano, 360, 400, 600, 1200, 1500 y 2000. Cada una de las lijas se usó en cada una de las muestras en un orden ascendente respecto del tamaño de grano, y en contrasentido, hasta obtener una superficie lisa, mas no de acabado espejo, con el propósito de mejorar la adhesión celular a través de una superficie rugosa. Después del desbaste, las muestras fueron sumergidas en Nital (alcohol y ácido nítrico

al 3%) durante 10 s, generando un ataque químico que contribuyó a revelar las características estructurales de las muestras. Posteriormente, las muestras fueron enjuagadas con agua desionizada, secadas con aire a presión y almacenadas en bolsas de plástico herméticas. Estas muestras fueron usadas para todos los experimentos posteriores.

### 7.1.2 DEPÓSITO DE PELÍCULAS DE TiO<sub>2</sub>

Las películas de óxido de titanio fueron depositadas sobre las muestras de las aleaciones de Mg preparadas con el protocolo mencionado anteriormente. Las películas delgadas de óxido de titanio amorfo fueron depositadas mediante la técnica de evaporación catódica en magnetron sputtering durante 45 minutos para obtener un depósito de TiO<sub>2</sub> con un espesor de 60 - 80 nm. Para obtener el depósito en la primera cara de las muestras (cara desbastada), las muestras fueron colocadas en un porta-substratos con cinta de carbono de doble cara (Figura 2a), el cual fue previamente limpiado con acetona y aire a presión. Posteriormente las muestras fueron ingresadas a la cámara de depósito para depositar el recubrimiento de las películas de TiO<sub>2</sub> sobre las muestras (Figura 2b) bajo las siguientes condiciones (Tabla 2)

Tabla 2. Condiciones de depósito de las películas delgadas de TiO<sub>2</sub>

DEPÓSITO DE PELÍCULAS TiO <sub>2</sub>	
PRESIÓN BASE	2.6 x10 <sup>-6</sup> Torr
PRESIÓN DE TRABAJO	20 - 25 x10 <sup>-3</sup> Torr
POTENCIA INCIDENTE (FUENTE DE RADIOFRECUENCIA)	200 W
POTENCIA REFLEJADA	0.8 W
FLUJO DE ARGÓN	8.0 sccm
FLUJO DE OXÍGENO	2.0 sccm
TIEMPO DE DEPÓSITO	45 minutos

Después de realizado el depósito (Figura 2c), las muestras fueron limpiadas con acetona para eliminar el adhesivo de la cinta de carbono y colocadas en un dispositivo de sujeción (Figura 2d) para el depósito de las películas delgadas de óxido de titanio amorfo en la segunda cara de la aleación (Figura 2e), bajo las mismas condiciones del primer depósito. Las muestras recubiertas por ambas caras fueron nombradas como Mg1-TiO<sub>2</sub> o Mg2-TiO<sub>2</sub>, dependiendo de la aleación base (Mg1 o Mg2) que se haya recubierto, y almacenadas en bolsas hermética.

---

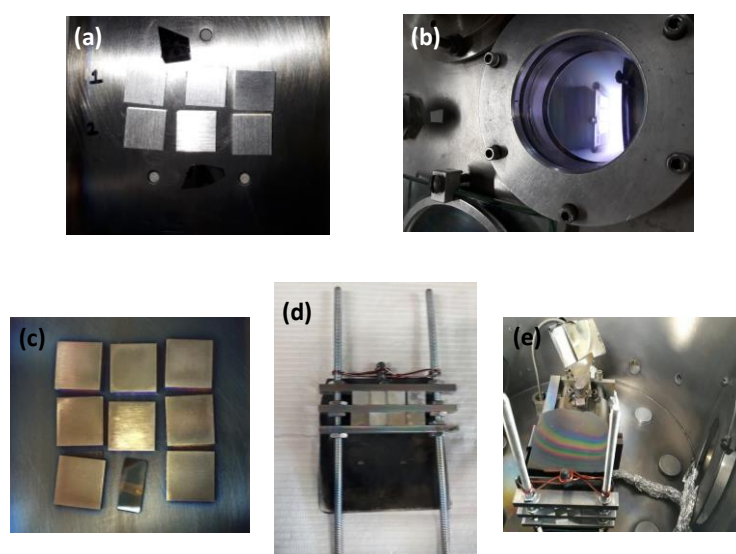


Figura 2. Esquema del proceso de recubrimiento (TiO<sub>2</sub>) sobre las aleaciones de a) Mg durante b) el proceso recubrimiento de c) la primer cara d) y el d) dispositivo de sujeción para e) recubrir la segunda cara.

### 7.1.3 ENSAYO DE DEGRADACIÓN

Para este ensayo se utilizaron muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>. Cada una de las muestras fue pesada en una balanza analítica (Ohaus), determinando así su peso inicial ( $W_0$ ). Las muestras fueron esterilizadas con luz UV (UVC Cross Linker 500 Hoefer) durante 15 minutos por ambas caras y fueron colocadas de forma individual en pozos de una caja de 24 pocillos (Costar 3524, Corning). Después se agregaron 1000  $\mu$ L de DMEM-F12 (Gibco) o PBS

1X (Gibco) a cada uno de los pozos que contenían las aleaciones y la caja de pozos fue colocada en un incubador celular con un ambiente a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. El ensayo fue realizado de forma independiente para DMEM-F12 o para PBS como medio de incubación para cada una de las muestras estudiadas.

Se realizaron mediciones del peso de las muestras a diferentes intervalos de tiempo de incubación (4, 15, 26, 61, 89 y 103 días). Cabe señalar que, durante los intervalos de medición de peso, se realizó cambio del medio de incubación (DMEM-F12 o PBS 1X) cada 7 días con la finalidad de evitar la saturación de los solutos o subproductos de degradación en el medio. En cada intervalo de tiempo establecido para pesar las muestras, estas fueron retiradas de los pozos, secadas con papel y pesadas en la balanza, obteniendo así la medición del peso  $W_x$ , donde x corresponde a los días de incubación de la muestra en DMEM-F12 o en PBS desde el inicio del experimento de degradación. Posteriormente las muestras fueron sumergidas en ácido sulfúrico por 3 segundos para eliminar los subproductos de degradación formados/depositados en la superficie de las aleaciones. Subsiguientemente, las muestras fueron enjuagadas con agua desionizada, secadas con papel y pesadas nuevamente ( $W_{x,lavado}$ , donde x corresponde a los días de incubación de la muestra en DMEM-F12 o en PBS desde el inicio del experimento de degradación) para determinar el peso de las muestras libres de los productos de degradación que se formaron y depositaron de manera natural en la superficie de las muestras. Finalmente, las muestras fueron esterilizadas en luz UV durante 15 minutos por ambas caras, y colocadas nuevamente en una caja de 24 pozos, agregando 1000 µL de DMEM F12 o PBS, según correspondiera a cada pozo. El ensayo de degradación fue continuado nuevamente hasta el siguiente tiempo de medición del peso de las muestras. El ensayo de degradación descrito anteriormente fue realizado por triplicado.

Se usó la siguiente ecuación para determinar la pérdida de peso de las muestras en porcentaje (A) en cada tiempo de medición, en donde B es la medición del peso inicial de cada una de las muestras y C es la medición del peso que se hizo en cada de uno de los intervalos de tiempo para cada muestra.

$$A = \frac{C * 100}{B}$$

#### 7.1.4 ÁNGULO DE CONTACTO

La mojabilidad es la capacidad de los sólidos para formar interfases con los líquidos al entrar en contacto con ellos, y se determinada mediante la medición del ángulo de contacto. El ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con una superficie sólida se denomina ángulo de contacto y su valor depende de la relación que hay entre las fuerzas adhesivas del líquido con el sólido y las fuerzas cohesivas del propio líquido (52).

La medición del ángulo de contacto para determinar la mojabilidad de las muestras estudiadas fue llevada a cabo en un goniómetro (Dataphysics OCA 15EC) donde fue colocada 1 gota sésil de 4  $\mu$ L de agua desionizada sobre las muestras. Se realizaron cinco mediciones por cada una de las muestras, colocando una gota de agua sobre diferentes zonas de la superficie de las muestras (Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>). El ángulo de contacto fue determinado por el software SCA20\_U. Se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los ángulos de contacto observados para cada muestra.

#### 7.1.5 MEDICIÓN DEL pH DEL MEDIO EN CONTACTO CON LAS ALEACIONES.

Las muestras (Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2-TiO<sub>2</sub>) fueron colocadas individualmente en un tubo de 15 mL, agregando 4 mL de DMEM-F12. Inmediatamente después de la colocación de la

aleación, el pH del medio fue medido con un potenciómetro (O 340PH/TEMP METTER). La medición del pH del medio se realizó posteriormente a diferentes intervalos de tiempo: 30 minutos, 1 h, 3 h, 24 h, 48 h y 120 h, respecto al tiempo inicial de contacto del medio con la aleación. Los resultados fueron reportados como la media  $\pm$  la desviación estándar.

#### 7.1.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La microscopía electrónica de barrido aporta imágenes que se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre un haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre la topografía y composición elemental de las muestras (53). Así, la microscopía electrónica de barrido es una técnica que sirve para analizar la morfología de materiales sólidos de todo tipo (metales, cerámicos, polímeros, biológicos, etc.), con excepción de muestras líquidas. El microscopio utilizado cuenta con la técnica de Espectroscopía de Dispersión de Energía (EDS) que sirve para hacer el análisis elemental de la composición de las muestras.

Mediante la técnica de SEM-EDS se observaron las muestras de las aleaciones no recubiertas, después del desbaste y al ser lavadas con agua y con nital a dos diferentes tiempos de lavado con nital: 10 segundos y 1 minuto. También, para corroborar que el depósito de óxido de titanio estuviera presente en las muestras recubiertas, estas se analizaron por SEM y EDS.

Muestras recubiertas y no recubiertas (Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2-TiO<sub>2</sub>) que habían estado durante 24 horas, 48 horas y 7 días en contacto con DMEM-F12 (experimento de viabilidad celular ante exposición a los productos de degradación de las muestras), y las muestras al final de los experimentos de degradabilidad, fueron también analizadas a través de SEM con el fin

de conocer la topografía de superficie de las mismas y a su vez se realizaron caracterizaciones por EDS para conocer la composición elemental de las mismas.

## 7.2 EVALUACIÓN BIOLÓGICA.

### 7.2.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TRONCALES.

Muestras de 20 mg de tejido adiposo de remanentes de cirugías de abdominoplastia, las cuales se obtuvieron con previo consentimiento informado de los pacientes (INR 90/17), se colocaron con 20 mL de PBS (Gibco) al 10% con antibiótico-antimicótico (Gibco) en un tubo estéril de 50 mL, el cual fue llevado a la incubadora orbital a 37 °C (orbital shaker incubator MRC) durante 5 minutos con la finalidad de lavar y desinfectar las muestras. Se retiró con precaución la fase acuosa de PBS y se colocaron 300 µL de colagenasa tipo II (Gibco) y 10 mL de DMEM-F12 (Gibco) dentro del tubo. Después el tubo fue llevado al incubador orbital por 40 minutos a 250 rpm y 37 °C para desintegrar la matriz extracelular y recuperar las células.

Después de verificar la separación de fases; la fase acuosa fue filtrada en un colador (70 µm de diámetro de poro) hacia otro tubo estéril de 50 mL, con la finalidad de que el tejido graso no digerido se quedara en el colador. Las células que fueron filtradas se centrifugaron (Centrifuge 5810 R eppendorf) a 1500 rpm durante 5 minutos, el medio excedente se decantó y se obtuvo el pellet celular, el cual fue disgregado en DMEM-F12 y sembrado en una caja T25 (Corning, costar) colocando 5 mL de medio de cultivo (DMEM-F12 complementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) 1% v/v antibiótico-antimicótico). A las 24 h de la siembra se recambió el medio de cultivo para eliminar las células no adherentes como los eritrocitos presentes y otras células de origen hematopoyético.



## 7.2.2 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES TRONCALES.

La caracterización de las células obtenidas fue realizada mediante citometría de flujo. Para ello se utilizaron las células en pase 1 (P1), las cuales fueron cultivadas por 15 días en DMEM-F12 complementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% v/v antibiótico-antimicótico en cajas T25 hasta llegar a 80 - 90% de confluencia. Las células fueron despegadas de la caja de cultivo usando una solución de tripsina en PBS, 1:4. Las células fueron cultivadas en presencia de esta solución durante 7 minutos a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se agregó 1.5 mL de DMEM-F12 complementado para inactivar la tripsina, las células recolectadas de la caja de cultivo fueron colocadas en un tubo de 15 mL y fueron centrifugadas (Centrifuge 5810 R eppendorf) por 12 minutos a 1500 rpm para recuperar el botón celular del fondo del tubo. Después de haber realizado el decantado, el botón celular se traspasó a otro tubo y se adicionó DMEM-F12 complementado para disgregar manualmente el botón celular. Se realizó el conteo de las células en cámara de Neubauer. Posteriormente, a cada tubo para citometría se le adicionaron 250,000 células y 2 mL de PBS. Los tubos fueron centrifugados a 1500 rpm durante 8 minutos, el excedente de PBS se eliminó mediante decantación, el botón celular fue resuspendido en DMEM-F-12 complementado y posteriormente se agregaron 3 µL de los diferentes anticuerpos con su respectivo fluoróforo como se muestra en la Tabla 3 y los tubos fueron leídos en el citómetro de flujo (FACSCalibur Becton Dickinson).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el ensayo de Citometría de flujo.

TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4
SIN ANTICUERPOS (CONTROL)	CD9 FITC	CD44 FITC	CD45 FITC
	CD105 PE	CD34 PE	CD166 PE
	HLA APC	CD73 PAC	CD14
			CD90

### 7.3 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE LAS ALEACIONES DE MAGNESIO CON Y SIN RECUBRIMIENTO DE TiO<sub>2</sub>

#### 7.3.1 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR CON MTT

El ensayo de MTT es un método colorimétrico cuantitativo para determinar la supervivencia y capacidad de proliferación de las células. Se emplea para medir la función metabólica de las células usando sales de tetrazolio. Este método se basa en la reducción del (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5 bromuro difeniltetrazolio). Este colorante amarillo pálido soluble en agua es reducido tempranamente a cristales insolubles de formazán, en células viables por componentes de la cadena respiratoria, fundamentalmente por la respiración (deshidrogenasas mitocondriales) y su flujo de electrones (54).

Las células en Pase 1 - Pase 2, fueron sembradas en una caja T25 con medio DMEM-F12 complementado (DMEM-F12 complementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino 1% v/v antibiótico-antimicótico) y cultivadas durante 15 - 21 días para su expansión, haciendo recambio del medio complementado cada tercer día hasta lograr una confluencia celular del 80 - 90%. Las células fueron despegadas de la caja de cultivo incubándolas con tripsina 4:1 por 7 minutos en condiciones de cultivo (37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>). Después, la suspensión celular fue inactivada con medio complementado y centrifugada (Centrifuge 5810 R eppendorf) a 1200 rpm por 12

minutos. El medio fue decantado y el pellet celular obtenido fue re-suspendido en medio de cultivo nuevo y el número de células obtenidas fue contado en una cámara de Neubauer.

Posteriormente, se sembraron las células a una densidad de 5,260 células por  $\text{cm}^2$ , en una caja de cultivo de 6 pozos (Corning, Costar), agregando 1400  $\mu\text{L}$  de DMEM complementado a cada pozo y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$

Al día siguiente de la siembra, se recambió el medio complementado y fueron colocados en cada uno de los pozos, un inserto (transwell de policarbonato 0.4  $\mu$  Thermo Fisher) y sobre ellos las muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> o Mg2-TiO<sub>2</sub>, cada muestra en un pozo de manera independiente. Las muestras previamente fueron esterilizadas con luz UV durante 15 minutos por cada cara. Se adicionaron a los pozos de cultivo 1300  $\mu\text{L}$  de medio complementado con la finalidad de obtener un volumen total de 2700  $\mu\text{L}$  de DMEM-F12 complementado para cubrir por completo a la aleación (Figura 3).

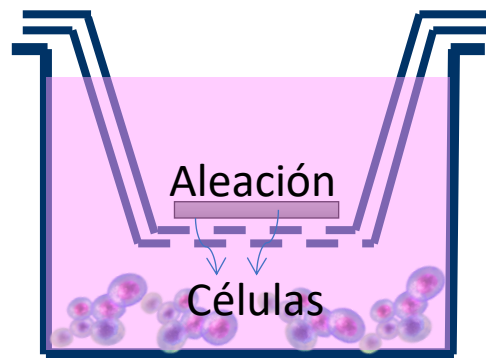


Figura 3. Colocación de muestras de Mg sobre los insertos para el ensayo de MTT.

Cada 24 h fue realizado el recambio del medio complementado, y las mediciones de viabilidad celular (ensayo de MTT) fueron obtenidas a diferentes intervalos de tiempo de cultivo celular en pozos de cultivo independientes para cada muestra y tiempo de incubación estudiado, esto es 24 h, 48 h y 6 días de incubación de las células en presencia de los productos de degradación de las aleaciones de Mg con y sin recubrimientos.

Para la medición de la viabilidad celular, el inserto y la muestra de la aleación fueron retirados de los pozos, posteriormente el pozo fue lavado dos veces con 2 mL de PBS, se agregaron 1700  $\mu$ l de solución DMEM-F12 complementado con MTT, 10:1, y los cultivos celulares fueron incubados nuevamente por 3 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tiempo de incubación, la solución de DMEM-F12 complementado con MTT fue retirada de los pozos y se agregó una solución de 2-propanol-dimetilsulfóxido (ISO:DMSO, 1:1 v/v, Sigma Aldrich) para disolver los cristales de formazán formados por la metabolización del MTT por las células. Finalmente, se tomaron 3 alícuotas de 100  $\mu$ l de la disolución de formazán por cada pozo, así como del control positivo, que correspondió al ensayo de MTT realizado en células que habían sido incubadas en presencia de los insertos pero sin muestras de aleación durante el mismo tiempo de incubación respectivo a cada ensayo. Las alícuotas fueron colocadas de forma independiente en una caja de cultivo de 96 pozos (Costar) y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Sinergy-HTX multi -mode reader Biotek) a  $\lambda = 570$  nm.

Los resultados del ensayo se reportan como el porcentaje de viabilidad celular ( $v\%$ ) calculado mediante la siguiente fórmula, en donde la absorbancia del grupo control corresponde a las células que fueron cultivadas únicamente en presencia de insertos sin muestras de las aleaciones, y la absorbancia de la muestra corresponde a la medición de la absorbancia de los

ensayos en células que fueron cultivadas en presencia de insertos con muestras de las aleaciones estudiadas a los mismos días de cultivo.

$$v(\%) = \left( \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del grupo control}} \right) \times 100$$

### 7.3.2 INMUNOCITOQUÍMICA.

Para los ensayos de inmunocitoquímica, células en P1-P2 fueron recolectadas de las cajas de cultivo de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente y contadas en una cámara de Neubauer. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pozos a una densidad de 5,250 células por cm<sup>2</sup> e incubadas bajo las mismas condiciones descritas para los ensayos de MTT. Las células dentro de los pozos fueron cultivadas por 8 días con los insertos y las aleaciones, con recambio de DMEM-F12 complementado cada 24 h. Al día 8 de incubación, fueron retirados los insertos y las aleaciones, se retiró el medio de cultivo y se efectuaron lavados de los cultivos celulares con PBS. Las células fueron fijadas colocando una solución de PBS con PFA (paraformaldehído) al 2% durante 25 minutos a temperatura ambiente. Después de transcurrido este tiempo, los pozos fueron lavados y almacenados con PBS en refrigeración a -4 °C hasta su estudio por inmunocitoquímica.

Al día siguiente, el PBS de los pozos fue retirado y se realizaron 3 lavados con agua destilada a temperatura ambiente durante 30 segundos. Después fue colocado peróxido de hidrógeno al 0.9% a temperatura ambiente durante 10 minutos, tiempo en el cual, las cajas fueron protegidas de la luz. Posteriormente fue retirado el peróxido de hidrógeno, se realizaron 3 lavados con PBST (PBS 1X pH 7.4-Tween 20 al 0.1%) a temperatura ambiente con un intervalo de tiempo de 4 minutos entre cada lavado. Se colocó solución de bloqueo (300 µL de suero de bloqueo

KIT VECTOR en 20 ml de PBS 1X; pH 7.4) a temperatura ambiente a cada pozo por 30 minutos. Después se colocaron los anticuerpos primarios especificados en la Tabla 4, en pozos independientes para cada pozo de células incubado con cada diferente muestra estudiada, y se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

Tabla 4. Descripción de anticuerpos para el ensayo de inmunocitoquímica

ANTICUERPO	LOCALIZACIÓN	NÚMERO DE CATÁLOGO	DILUCIÓN
<b>RUNX-2</b>	Núcleo	AB 76956 mouse	<b>1:100</b>
<b>OSTEOPONTINA</b>	Matriz extracelular	AB 8448 rabbit	<b>1:1000</b>
<b>OSTEOCALCINA</b>	Matriz extracelular	FL 100 SC 30044 rabbit	<b>1:50</b>
<b>COLÁGENA I</b>	Matriz extracelular	AB 6308 ratón	<b>1:1000</b>

Después de la incubación del anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados con PBST durante 4 minutos cada uno, y posteriormente se usó el KIT ABC (Reactivo A Avidin, Reactivo B (Biotinylated Horseradish Peroxidase H KIT VECTOR) y PBS 1X pH 7.4 el cual fue preparado 30 minutos antes de usarse. Después se realizaron 3 lavados con PBST y se colocó una solución de DAB sustrato-DAKO (Diaminobencidina 1 gota de 20 µL y 1mL de Buffer; DAKO). Después de colocada la solución de DAB se monitorearon los pozos al microscopio durante 4 minutos hasta el revelado de la tinción de la inmunocitoquímica y se lavaron los pozos con agua destilada. Finalmente, se realizó la contratinción de las células con Hematoxilina de Meyer por 1 minuto, y se realizaron lavados con agua corriente monitoreando las células al microscopio para verificar que las células presentaran una tonalidad morada. Después se colocó alcohol ácido (alcohol etílico 70% con ácido clorhídrico 0.5%) en cada pozo, el cual fue retirado inmediatamente tras su colocación, para evitar que degradara por completo el viraje de color de

la contratinción. Posteriormente se verificó en el microscopio que los núcleos de las células se vieran de color morado o azul.

Se tomaron fotografías en microscopio invertido (Axiovert 25 HBO 50) a diferentes aumentos (10X, 20X y 40X) para verificar la presencia o ausencia y la localización (en caso de expresión positiva) de Runx-2, Osteocalcina, Osteopontina y Colágena I en las células.

#### 7.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los ensayos de viabilidad celular fue realizado mediante la prueba estadística ANOVA de una vía con la corrección de Bonferroni estableciéndose el nivel de significancia en el 95% de los casos ( $p < 0,05$ ) utilizando el programa Origin 8.1.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 ENSAYO DE DEGRADABILIDAD

La Figura 4, muestra la medición de porcentaje de pérdida de peso de las muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, las cuales fueron colocadas independientemente en PBS 1X. Su peso fue obtenido a diferentes intervalos de tiempo de incubación; la primera medición por cada toma de peso se hizo sin realizar lavados con ácido sulfúrico. En la Figura 4 se observa que a partir del día 0 y hasta el día 26 todas se observó un pequeño incremento en el peso en ambas muestras, debido a una temprana acumulación de productos de corrosión que forman un hidróxido de protección en la superficie del magnesio (55), o bien, al estar en contacto con el medio de incubación, los componentes de este favorecen la nucleación de depósitos de

productos de degradación sobre la superficie de las muestras, siendo mayor el incremento de peso en ambas muestras recubiertas con  $\text{TiO}_2$ , respecto a las muestras no recubiertas.

A partir del día 61 y hasta el término del experimento, en general todas las muestras presentaron un decaimiento en el porcentaje de pérdida de peso, a pesar de que los productos de degradación siguen depositándose sobre las superficies. Esto debido a que las muestras a este intervalo de tiempo se degradan, corroen y los productos de degradación formados van disolviéndose más rápido en el medio de incubación, por tanto, existe una pérdida en la masa de las muestras aun cuando el peso reportado corresponde al peso antes del lavado ácido en cada medición de tiempo. A la par de que las muestras recubiertas con  $\text{TiO}_2$  presentaron mayor aumento en el depósito de productos de degradación sobre su superficie en los primeros días de inmersión en DMEM-F12 (0-26 días), las muestras que perdieron mayor porcentaje de peso después del día 26, cuando los productos de degradación comienzan a disolverse o desprenderse, fueron  $\text{Mg1-TiO}_2$  y  $\text{Mg2-TiO}_2$  en solución de PBS.

La Figura 5 representa el porcentaje de pérdida de peso de las muestras  $\text{Mg1}$ ,  $\text{Mg1-TiO}_2$ ,  $\text{Mg2}$  y  $\text{Mg2-TiO}_2$  que estuvieron en PBS, y a las que se les realizaron lavados con ácido sulfúrico, y posteriormente un enjuague con agua desionizada en cada periodo de medición del peso con la finalidad de retirar los productos de degradación (sales e hidróxidos de magnesio principalmente) depositados sobre la superficie de las muestras y que así, estos no interfirieran en la medición del peso de cada aleación, para establecer qué muestra se biodegradó más rápido respecto a las demás, y a su vez, determinar el porcentaje de peso real que perdieron las muestras a través del tiempo.

Las muestras con recubrimientos de  $\text{TiO}_2$ , son las que mostraron el mayor porcentaje de pérdida de peso, respecto a las muestras no recubiertas. Sin embargo, y a pesar de que después del



lavado con ácido sulfúrico, se esperaba una tendencia decreciente respecto a la pérdida del porcentaje de peso, Mg1 y Mg2-TiO<sub>2</sub> tuvieron un incremento en el peso, a los días 15 y 26 respectivamente, debido a que ante la presencia de magnesio, sobre la superficie se forma una capa uniforme de productos de corrosión (56), y que a la par del paso del tiempo, ante la corrosión de las muestras, los productos de degradación quedaban incrustados en las grietas o defectos más profundos de las mismas, siendo más difícil retirarlos con el lavado ácido, ya que como tal sólo se hizo un enjuague, más no permanecieron mucho tiempo en contacto con el ácido sulfúrico para evitar que este favoreciera o acelerara la degradación persé de las muestras.

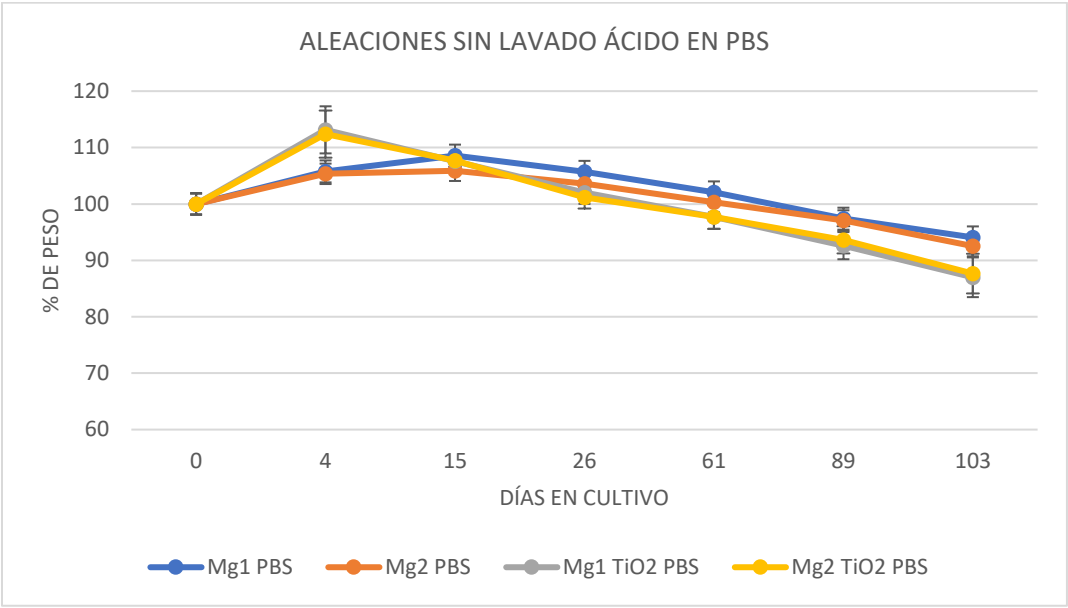


Figura 4. Porcentaje de pérdida de peso, de acuerdo con los pesos de las muestras observados antes del lavado con ácido sulfúrico de las muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> que estuvieron inmersas en PBS.

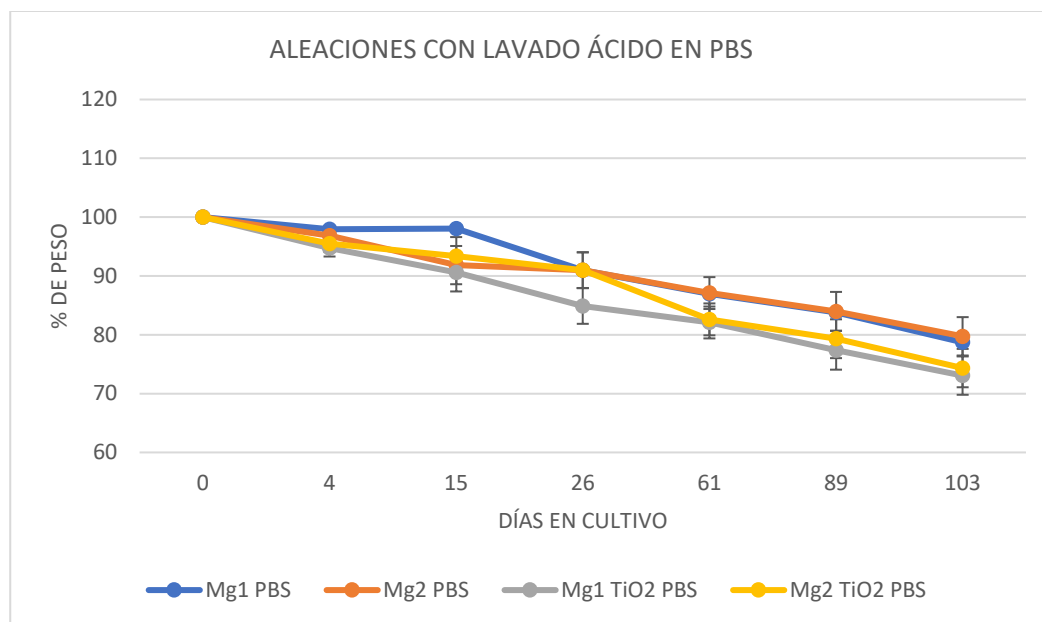


Figura 5. Porcentaje de pérdida de peso de las muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> que estuvieron inmersas en PBS, de acuerdo con la determinación del peso de las muestras posterior al lavado con ácido sulfúrico en cada tiempo de medición.

En ambas condiciones de medición, es decir las muestras en PBS sin lavado ácido y con lavado ácido, Mg1-TiO<sub>2</sub> fue la muestra que más porcentaje de peso perdió, respecto a la otra muestra recubierta (Mg2-TiO<sub>2</sub>) y a las muestras no recubiertas (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentajes de pérdida de peso al concluir el experimento (día 103) de degradación después del lavado con ácido sulfúrico, para las muestras Mg1, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2 y Mg2-TiO<sub>2</sub> que fueron inmersas en PBS.

Muestra	% de peso de pérdida final (respecto del peso inicial de las muestras)
Mg1-PBS	21.29 ± 8.4
Mg2-PBS	20.67 ± 7.08
Mg1-TiO <sub>2</sub> -PBS	26.93 ± 9.59
Mg2-TiO <sub>2</sub> -PBS	25.65 ± 9.38

La Figura 6 muestra el porcentaje de pérdida de peso en las muestras que estuvieron en medio de cultivo DMEM-F12, a las cuales se les realizó la medición de peso sin haber realizado antes un lavado con ácido sulfúrico. Entre el día 4 y el día 26, no hubo un aumento considerable del porcentaje de pérdida de peso; sin embargo, para las mediciones de estadíos finales del experimento, que corresponden a los días 61, 89 y 103, las muestras presentaron una pérdida de masa, debido muy probablemente una mayor corrosión, siendo mayor en las muestras con recubrimiento de  $\text{TiO}_2$ , al igual que en la tendencia observada en las muestras que estuvieron en PBS.

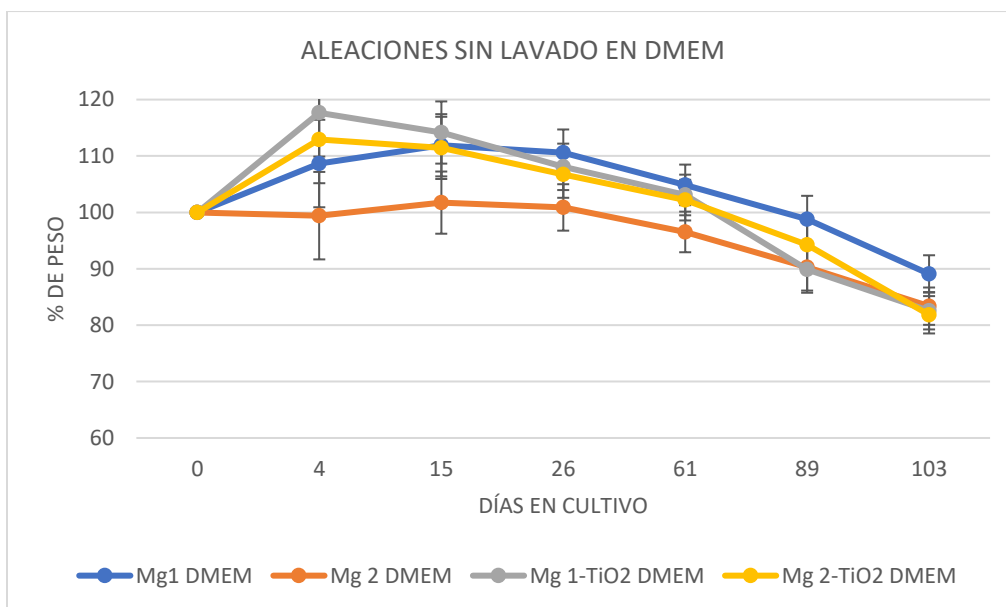


Figura 6. Porcentaje de pérdida de peso antes del lavado con ácido sulfúrico de las muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> que estuvieron inmersas en DMEM-F12.

En la Figura 7 se observan las muestras que estuvieron inmersas en DMEM-F12, de las cuales se midió el peso después de un lavado con ácido sulfúrico. Desde el día 4 y hasta el día 103 las muestras mostraron un comportamiento similar a las muestras que estuvieron inmersas en PBS; sin embargo, en DMEM-F12, la muestra que mayor porcentaje de peso perdió fue Mg2-

TiO<sub>2</sub>. En este caso la pérdida de peso en porcentaje al día 103 de la muestra Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> fue mayor también en comparación con las muestras no recubiertas Mg<sub>1</sub> y Mg<sub>2</sub> (Tabla 6).

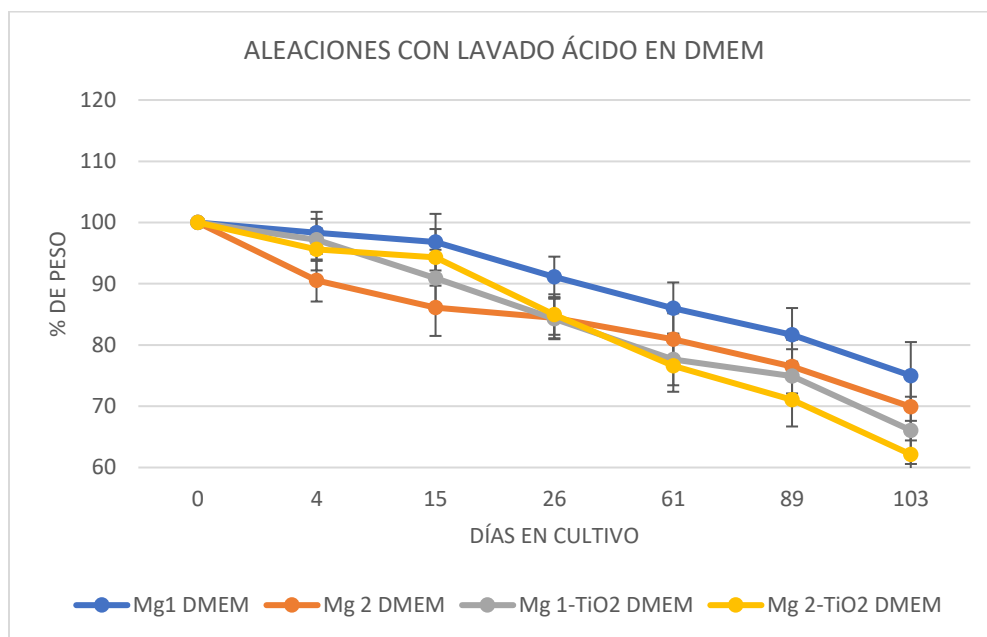


Figura 7. Porcentaje de pérdida de peso acorde a la medición después de haber realizado el lavado con ácido sulfúrico de las muestras Mg<sub>1</sub>, Mg<sub>2</sub>, Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> y Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> que estuvieron inmersas en DMEM-F12.

Tabla 6. Porcentajes de pérdida de peso al concluir el experimento (día 103) después del lavado con ácido sulfúrico para las muestras Mg<sub>1</sub>, Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> y Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> inmersas en DMEM F-12.

Muestra	% de peso de perdida final (respecto del peso inicial de las muestras)
Mg <sub>1</sub> -DMEM-F12	25.01 ± 9.37
Mg <sub>2</sub> - DMEM-F12	30.09 ± 9.72
Mg <sub>1</sub> -TiO <sub>2</sub> - DMEM-F12	33.93 ± 12.38
Mg <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> - DMEM-F12	37.87 ± 14.12

Con base en este experimento se pudo concluir que la modificación estructural de la superficie de las muestras respecto al recubrimiento de  $\text{TiO}_2$  no funcionó como una película protectora de la muestra, sino por el contrario las muestras recubiertas perdieron más peso en el mismo lapso al estar en contacto con DMEM-F12, en comparación con las muestras no recubiertas.

La pérdida prematura del recubrimiento de óxido de titanio en este estudio, podría ser una causa probable de la rápida degradación y de la no protección de las muestras recubiertas con óxido de titanio. Esta pérdida temprana del recubrimiento podría resultar como consecuencia de diferentes factores, por ejemplo, inicialmente respecto al espesor de la misma película depositada, ya que el depósito sobre la aleación es una capa delgada que sería susceptible a degradarse durante la manipulación de las muestras, susceptibilidad al rayado. A su vez al estar en contacto con ácido sulfúrico después del primer periodo de inmersión en PBS o en DMEM-F12, por más mínimo que fuera este tiempo de contacto, existiría la posibilidad de que favoreciera o acelerara el proceso de degradación de la película y por ende de la muestra. Por lo tanto, ante la pérdida del recubrimiento, la aleación de Mg quedaría “desprotegida” y por lo tanto se presentaría de forma habitual el proceso de corrosión por picadura que ya se ha reportado (44), favoreciendo así, la degradación de las muestras. Sin embargo, desde un inicio (en el primer tiempo de pesado de las muestras) ya se observaba un mayor porcentaje de pérdida de peso para las aleaciones recubiertas en comparación con las no recubiertas.

Por otro lado, si el recubrimiento favorece la nucleación de productos de degradación sobre la superficie de la muestra, como se observó mayoritariamente en las muestras inmersas en DMEM-F12, debido a los componentes propios del medio de cultivo como las sales orgánicas o inorgánicas que contiene (sodio, potasio y calcio) (57) esto podría potencializar el proceso de degradación en las muestras recubiertas.

Las muestras que fueron usadas en el experimento de viabilidad celular, desde las 24 h y hasta el día 6, tiempo en el que concluyó el experimento, fueron observadas en un estereoscopio, con la finalidad de visualizar cambios en la estructura de la superficie de las muestras, en comparación a los diferentes medios en las cuales fueron incubadas (Figuras 8 y 9).

En la Figura 8, observamos muestras de Mg1, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2 y Mg2-TiO<sub>2</sub>, a diferentes tiempos (24 h, 48 h y 6 días) de incubación/inmersión en DMEM-F12 complementado con 10% de Suero Fetal Bovino, y 1% de antibiótico-antimicótico; a estas muestras no se les realizó ningún lavado de ácido intermedio entre los diferentes tiempos de observación. Mg2 a las 24 h de incubación, presenta en la superficie más productos de degradación respecto a Mg1. A las 48 h, tanto Mg1 como Mg2 presentan núcleos de depósito de productos de degradación aislados sobre la superficie de la muestra.

La adsorción de proteínas resulta ser un elemento esencial para la degradación de las aleaciones de magnesio sin recubrimiento, ya que el Suero Fetal Bovino proporciona un conjunto de proteínas al medio, por ejemplo albumina; las cuales pueden favorecer el proceso de corrosión, al inhibir la formación de la capa de óxido nativo estable en la superficie de magnesio. O bien, al formar un par galvánico entre la proteína y el magnesio (58).

En la Figura 9, se observa que Mg1 incubada en DMEM-F12 presenta productos de degradación de mayor tamaño, de color blanquecino, los cuales se incrustan en huecos de mayor profundidad, que se crearon en la superficie de la muestra a partir del proceso de corrosión. Por el contrario; Mg1 incubada en PBS presenta huecos con menor profundidad, en los cuales hay menor cantidad de productos de degradación, las cuales a su vez son de menor tamaño, y

se localizan de forma más superficiales, por ende, se puede asumir que el proceso de corrosión y biodegradación de Mg1 es menor en PBS en comparación con DMEM-F12.

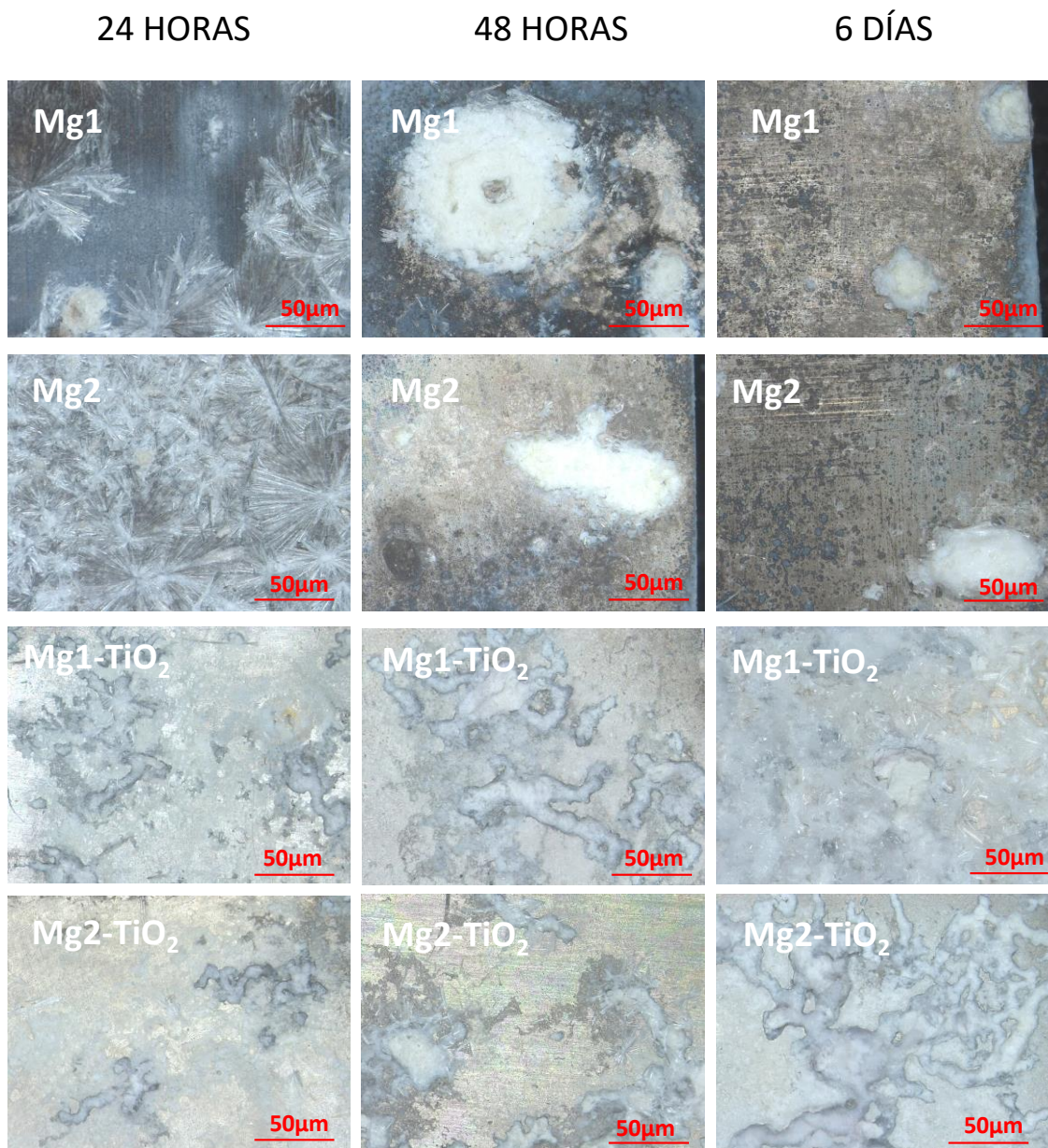


Figura 8. Muestras de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> a las 24 h, 48 h y 6 días de inmersión en DMEM-F12, sin lavado ácido entre los diferentes tiempos de observación.



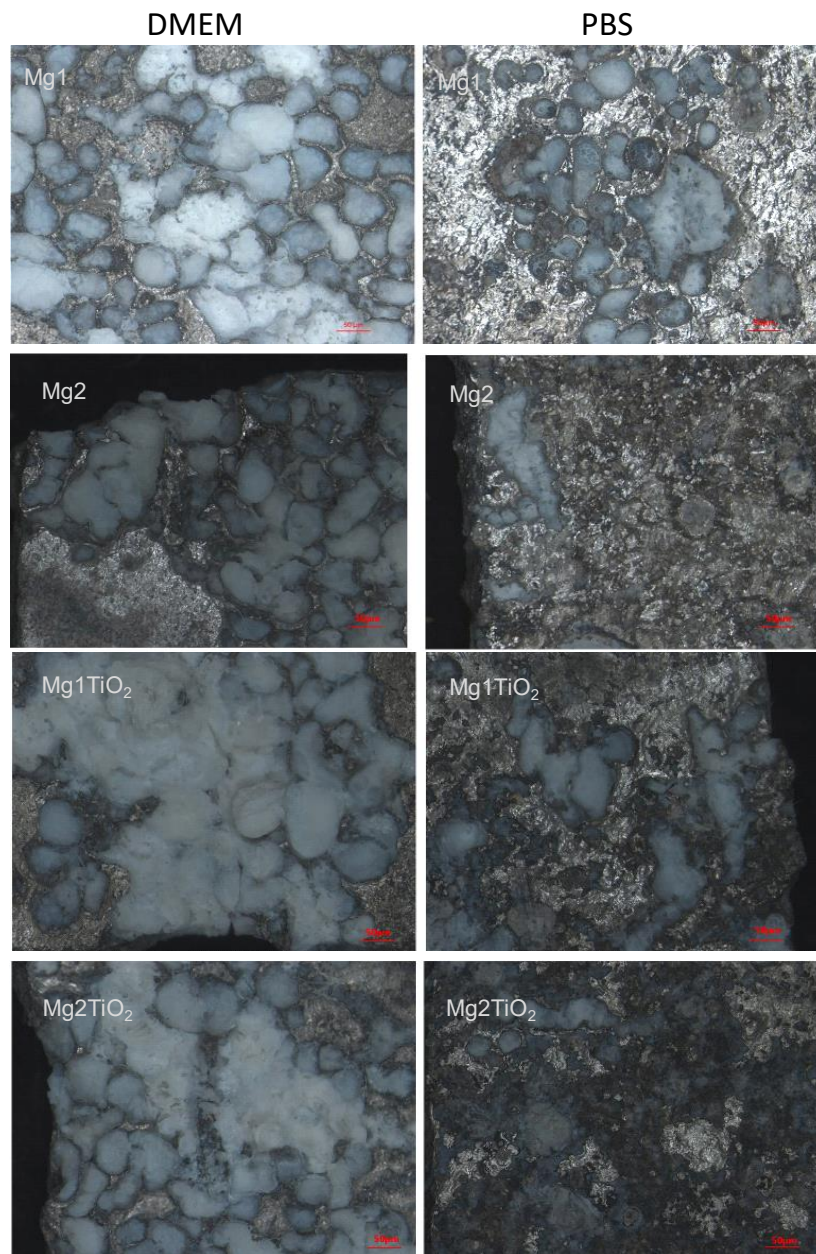


Figura 9. Muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> en solución de DMEM-F12 y PBS al día 104 del experimento de degradabilidad.

Mg2 en DMEM-F12, presenta mayor pérdida de la estructura respecto a Mg2 en PBS. Podemos observar que, en las esquinas de la muestra, el proceso de degradación se ve acelerado,



favoreciendo la presencia de huecos sobre la superficie, que sirven de retención para el alojamiento de productos de degradación, los cuales son de mayor tamaño y cantidad, respecto a Mg<sub>2</sub> en PBS. Mg<sub>2</sub> en PBS presenta una superficie uniforme, depósitos de productos de degradación aislados sobre la misma, los cuales son de tamaño menor, respecto a los que presenta Mg<sub>2</sub> en DMEM-F12.

Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> DMEM-F12 presenta una superficie menos uniforme y con presencia de productos de degradación de mayor tamaño y cantidad, respecto a Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> y Mg<sub>1</sub> inmersos en PBS. La pérdida de la estructura de la aleación favorece que los productos de degradación se incrusten y que sean más difíciles de quitar al realizar el lavado con ácido sulfúrico. Sin embargo, la creación de estos huecos favorece una mayor degradabilidad de la muestra y, por ende, la pérdida de peso es también mayor.

Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> PBS presenta una superficie más uniforme respecto a Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> DMEM-F12, dado que los productos de degradación sobre la misma son de menor tamaño y en menor cantidad. Sin embargo, observamos que el proceso de degradabilidad para ambas muestras se intensifica en los bordes de las muestras, donde existe una pérdida de la continuidad de la aleación.

Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> en DMEM-F12 tiene sobre la superficie productos de degradación de mayor tamaño y cantidad, respecto a Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> en PBS, los bordes de la aleación han perdido continuidad, por tanto, la degradabilidad es mayor también. Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> en PBS presenta una estructura uniforme en la superficie, productos de corrosión aislados sobre la misma, teniendo menor porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo.

Al comparar las muestras inmersas en los mismos medios de cultivo, existieron diferencias consistentes, ya que las muestras que estuvieron inmersas en PBS mostraron una corrosión

menor en todos los casos, y a su vez los productos de corrosión sobre la superficie de igual forma fueron menores, respecto a las mismas muestras inmersas en DMEM-F12.

Las imágenes obtenidas con el estereoscopio fueron útiles para confirmar que Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> fue la muestra que mayor pérdida de peso tuvo, y a su vez que Mg<sub>2</sub> en PBS fue la muestra que menor pérdida en porcentaje de peso tuvo.

## 8.2 ÁNGULO DE CONTACTO

Los ángulos de contacto (°) medidos para las muestras Mg<sub>1</sub>, Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub>, Mg<sub>2</sub> y Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> después de depositar una gota de agua desionizada en la superficie de las aleaciones se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Mediciones de ángulos de contacto; media ± desviación estándar para las muestras Mg<sub>1</sub>, Mg<sub>2</sub>, Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> y Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>.

MUESTRA	ÁNGULO DE CONTACTO (°)
Mg <sub>1</sub>	138.03 ± 5.70
Mg <sub>2</sub>	121.37 ± 4.37
Mg <sub>1</sub> -TiO <sub>2</sub>	111.65 ± 1.02
Mg <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub>	117.77 ± 2.40

Las mediciones del ángulo de contacto para las muestras Mg<sub>1</sub>, Mg<sub>2</sub>, Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> y Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> fueron mayores a 90°, por lo que todas las muestras mostraron una superficie hidrofóbica. Sin embargo, Mg<sub>1</sub> y Mg<sub>2</sub> presentaron un ángulo de contacto mayor en comparación con las muestras que tenían recubrimiento de TiO<sub>2</sub>, por lo tanto, estas últimas presentaron mayor mojabilidad.

### 8.3 MEDICIÓN DE pH

La medición del potencial de hidrógeno (pH) de los medios que estuvieron en contacto con las muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> a diferentes intervalos de tiempo (5 s, 15 minutos, 30 minutos, 1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 50 h y 120 h) se observa en la Figura 10. Al tiempo cero, correspondiente a la primera medición, todos los medios que estuvieron en contacto con las muestras tuvieron pH = 7 (fisiológico), el cual se atribuye al pH del DMEM-F12, el cual se usó como solución para realizar la medición. Dentro del intervalo de 1 a 3 h posteriores al contacto de las aleaciones con DMEM-F12, el pH del medio incrementó a pH = 8. A las 24 h, el pH para todas las muestras aumentó. Mg1 y Mg2 tuvieron pH = 9, en cambio el medio en contacto con Mg1-TiO<sub>2</sub> mostró un mayor aumento con un pH = 10 y Mg2-TiO<sub>2</sub> mostró un pH = 11. A las 48h, las mediciones anteriores se mantuvieron. Cabe señalar que, desde las 24 h, ambas muestras con recubrimiento de TiO<sub>2</sub> formaban productos de degradación sobre la aleación, los cuales aumentaron en cuanto tamaño y cantidad, y a su vez se liberaron y se integraron al sobrenadante. A las 50 h se realizó cambio de DMEM-F12 por medio fresco y por ende el pH de las muestras Mg1 y Mg2 bajó a pH = 7 nuevamente. Sin embargo, al recambio de medio, el medio nuevo en contacto con Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> volvió a mostrar un pH = 10 a los pocos minutos. En la última medición (120 h) Mg1 y Mg2 tuvieron un pH = 8 y Mg1-TiO<sub>2</sub> un pH = 10 y Mg2-TiO<sub>2</sub> un pH = 11.

Con base en lo anterior, podemos deducir que la reactividad de las muestras no recubiertas va decreciendo con el tiempo de inmersión, puesto que, al cambio de medio, el pH alcanzado posterior a este cambio es menor que el máximo pH alcanzado para el medio en contacto con estas muestras durante el primer tiempo de medición. Sin embargo, en las muestras recubiertas esta reactividad no parece decrecer con el tiempo de inmersión y el medio fresco (después del

cambio de medio) en contacto con las muestras vuelve a mostrar un aumento súbito del pH, un aumento de la misma magnitud que durante el contacto inicial muestras-medio.

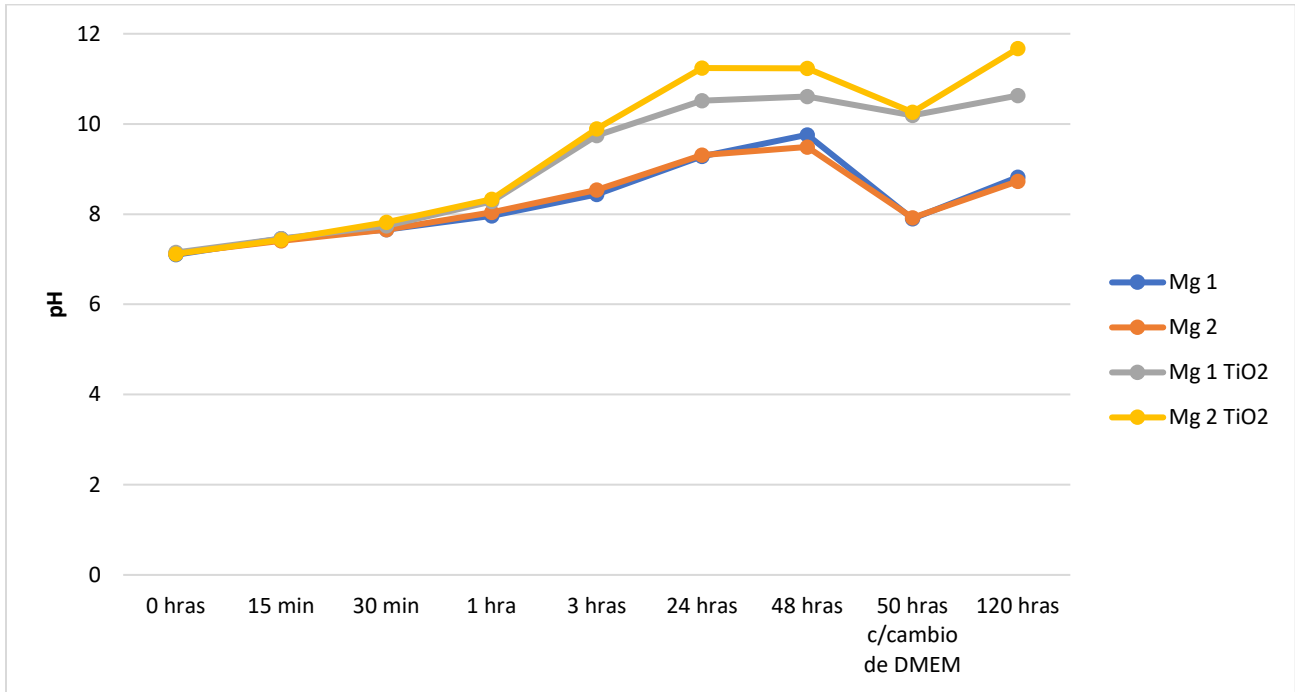


Figura 10. Medición de pH para las muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> en solución DMEM- F12 a diferentes intervalos de tiempo, 0, 15 min y 30 min y 3, 24, 48, 50 y 120 h.

El incremento del pH en las muestras recubiertas y no recubiertas y el desprendimiento de hidrógeno excesivo, acompañada de una tasa de degradación rápida son perjudiciales para la recuperación del tejido que rodea el implante, debido a que a un pH = 8, la corrosión del magnesio, crea una pérdida de entre 3 y 6  $\mu\text{m}$  por día, lo que resulta en la pérdida de la aleación antes de que el tejido óseo dañado haya sido reparado, aunado a la excesiva liberación de gas hidrógeno a los tejidos circundantes lo que favorecería un ambiente inflamatorio y

comprometería la regeneración(59). Además de que es estudios *in vitro* (60,61), se ha observado que el aumento del pH a través de la formación de Mg (OH)<sub>2</sub> dificulta la adhesión y el crecimiento celular.

#### 8.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Mediante esta técnica se analizaron las muestras con y sin recubrimiento de TiO<sub>2</sub>, con la finalidad de evaluar la microestructura de las aleaciones sin recubrimiento y la microestructura posterior al recubrimiento con TiO<sub>2</sub>. Al mismo tiempo se estudió la composición de las muestras por EDS, para confirmar, la obtención del recubrimiento de TiO<sub>2</sub> sobre las muestras, así como para estudiar la homogeneidad del recubrimiento (Figura 11 y 12).

El análisis por EDS de las muestras recubiertas corroboró la presencia de titanio, oxígeno y magnesio, siendo este último el elemento con mayor cantidad. Lo anterior se debe a que el grosor del recubrimiento es muy delgado, en comparación con la profundidad que ofrece el EDS, por lo tanto, gran parte de lo que se observa (en proporción al perfil de TiO<sub>2</sub>-Mg) en esa profundidad de análisis es la aleación de Mg.

Se realizó el análisis del depósito de TiO<sub>2</sub> sobre la superficie de la muestra de Mg1, en la figura 11 se observa una superficie con características de una disposición irregular, así como estructuras amorfas. También se observa que la superficie de la aleación presenta varios huecos poco profundos y algunos huecos muy profundos que probablemente no lograron ser recubiertos por la película delgada de TiO<sub>2</sub>. A pesar de que el recubrimiento es conformal, seguramente en huecos muy delgados y profundos el plasma ya no logra penetrar y por tanto

no son recubiertos de  $\text{TiO}_2$ . Estos poros muy profundos podrían servir como guías para favorecer el inicio de la corrosión y degradación de la aleación.

### SEM/EDS Mg1-TiO<sub>2</sub>

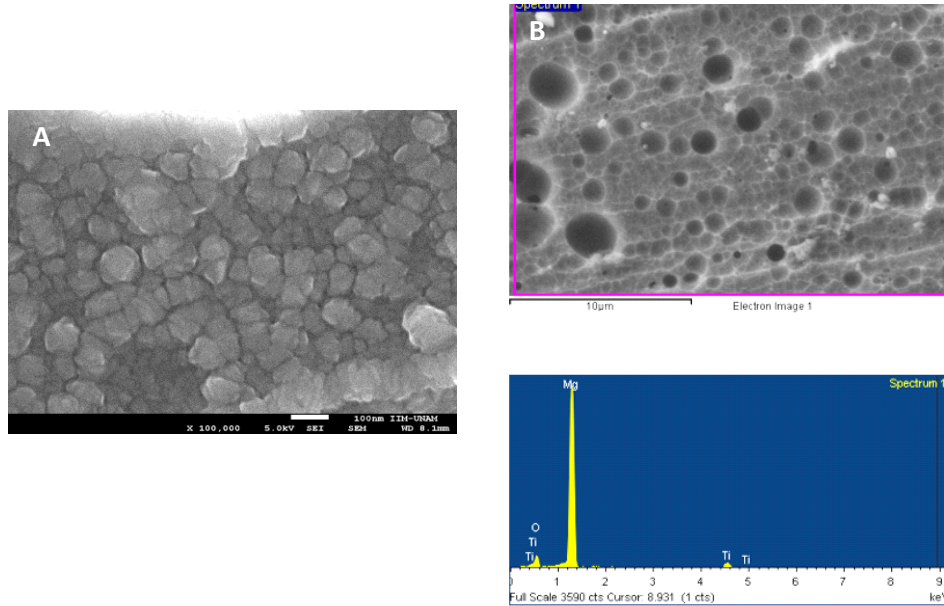


Figura 11. SEM/EDS de Mg1-TiO<sub>2</sub>.

A su vez se realizó el análisis de Mg2-TiO<sub>2</sub> por EDS (Figura 12), donde se observa la presencia de Mg, como elemento principal, Ti y O, y la presencia de un menor número de poros menor pero de mucho mayor profundidad, a lo largo de las fronteras de grano, que las hendiduras o huecos observadas en Mg2/TiO<sub>2</sub>. Lo cual concuerda con los resultados del experimento de degradabilidad, en donde Mg2-TiO<sub>2</sub> fue la muestra que a lo largo de 103 días y en contacto con DMEM-F12 perdió más porcentaje de peso, respecto a Mg1, Mg2 y Mg1-TiO<sub>2</sub>.

## SEM/EDS Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>

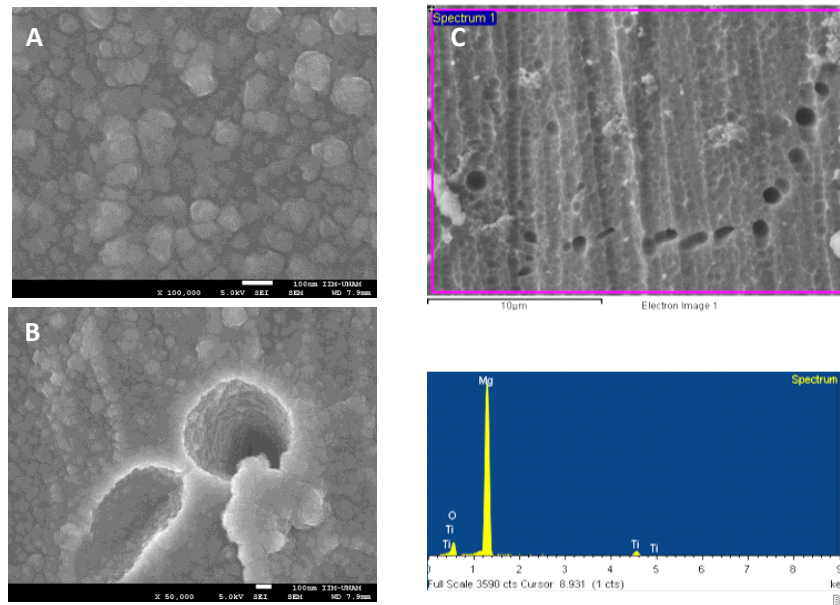


Figura 12. SEM/EDS de Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub>.

Mediante microscopía electrónica de barrido, se analizaron las superficies de las muestras después de haber sido desbastadas, así como la composición de Mg1 y Mg2 las cuales fueron sometidas a diferentes lavados con agua y Nital con dos intervalos de tiempo para el caso del Nital, 10 segundos y 1 minuto.

La muestra correspondiente a Mg1 lavada solamente con agua desionizada, Figura 13, presentó mayor cantidad de partículas sobre su superficie. Sólo algunas de estas partículas fueron provenientes de la lija (silicio). Se observan rayas horizontales sobre la superficie, causadas por la lija que se utiliza para el desbaste, la cual no crea un acabado espejo sobre la misma. En un acercamiento de la superficie de la muestra Mg1 lavada con H<sub>2</sub>O (Figura 13), se observa la diversidad de partículas existentes sobre la superficie, así como pequeños huecos,

localizados entre las fronteras de grano, los cuales predisponen a zonas donde fácilmente, por la pérdida de la estructura, puede iniciarse el proceso de degradación.

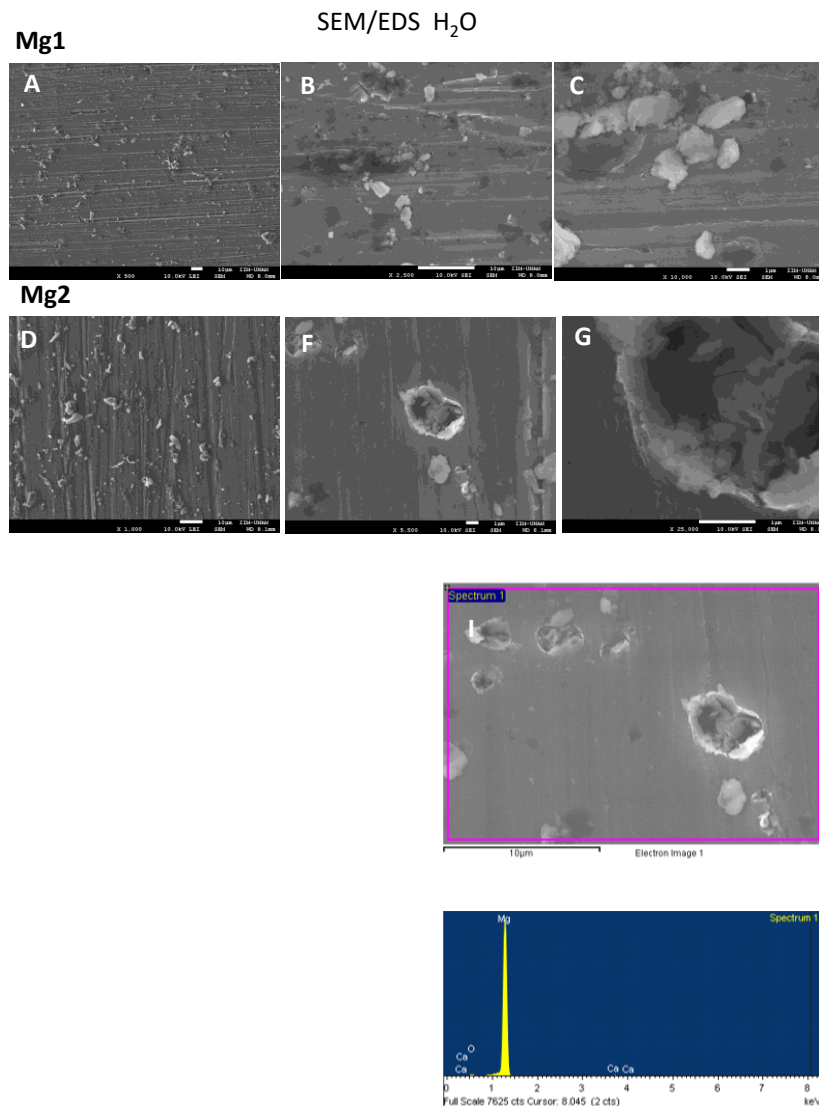


Figura 13. SEM/EDS de muestras Mg1, Mg2 que fueron lavadas con H<sub>2</sub>O

La superficie de Mg2 fue analizada en EDS (Figura 13), donde se observó que su composición elemental era Ca, O, y Mg, y estructuras similares a lo observado en Mg1 lavada con agua. La muestra de Mg2 enjuagada con agua desionizada, al ser analizada por SEM (Figura 13), revela



que al igual que Mg1 bajo el mismo tratamiento, no logra eliminar las partículas sobre la superficie.

La superficie de la muestra Mg1 que fue lavada con Nital durante 10 segundos, fue analizada por SEM. En la Figura 14 se observa que hay menor cantidad de partículas sobre la superficie debido al ataque químico del nital, el cual a su vez crea poros en mayor cantidad y profundidad a comparación de Mg1 lavada con agua desionizada (Figura 13). De igual forma, los poros localizados sobre la frontera de grano favorecerían que la aleación pueda corroerse más rápido. También se realizó EDS de esta muestra, para conocer los componentes que existen sobre la superficie de la aleación. Se observa en la Figura 13 que hay Mg correspondiente al componente principal de la aleación. En el espectro también se observa que hay presencia de O y Ca, también existen partículas de sílice provenientes del desbaste manual realizado con lijas, los cuales se incrustan sobre la superficie de la muestra, y a pesar del ataque químico con Nital por 10 segundos, no es suficiente para que estas partículas puedan ser eliminadas.

Al analizar las muestras de Mg1 (Figura 14, G, H e I) que fueron expuestas a Nital por 1 minuto, a través de SEM se observó que los poros que se crean son de mayor tamaño y profundidad respecto a Mg1 que fue enjuagado con Nital durante 10 segundos (Figura 14, A, B, y C). Por lo tanto, el tratamiento químico con Nital 1 minuto, influye en la susceptibilidad a la corrosión, ya que, desde el acondicionamiento de la muestra, se crean un número importante de poros en la frontera de grano, los cuales favorecen la aceleración del proceso de corrosión/biodegradación. Por lo tanto, todas las muestras utilizadas en la evaluación biológica solo fueron limpiadas 10 segundos con Nital.

La muestra de Mg2 que fue sometida a lavado con Nital por 10 segundos, posteriormente al ser analizada en SEM (Figura 14 D, E, F), presenta pérdida de algunas de las partículas expuestas

sobre la superficie, así como zonas localizadas donde hay poros, al igual que Mg1 que recibió el mismo tratamiento.

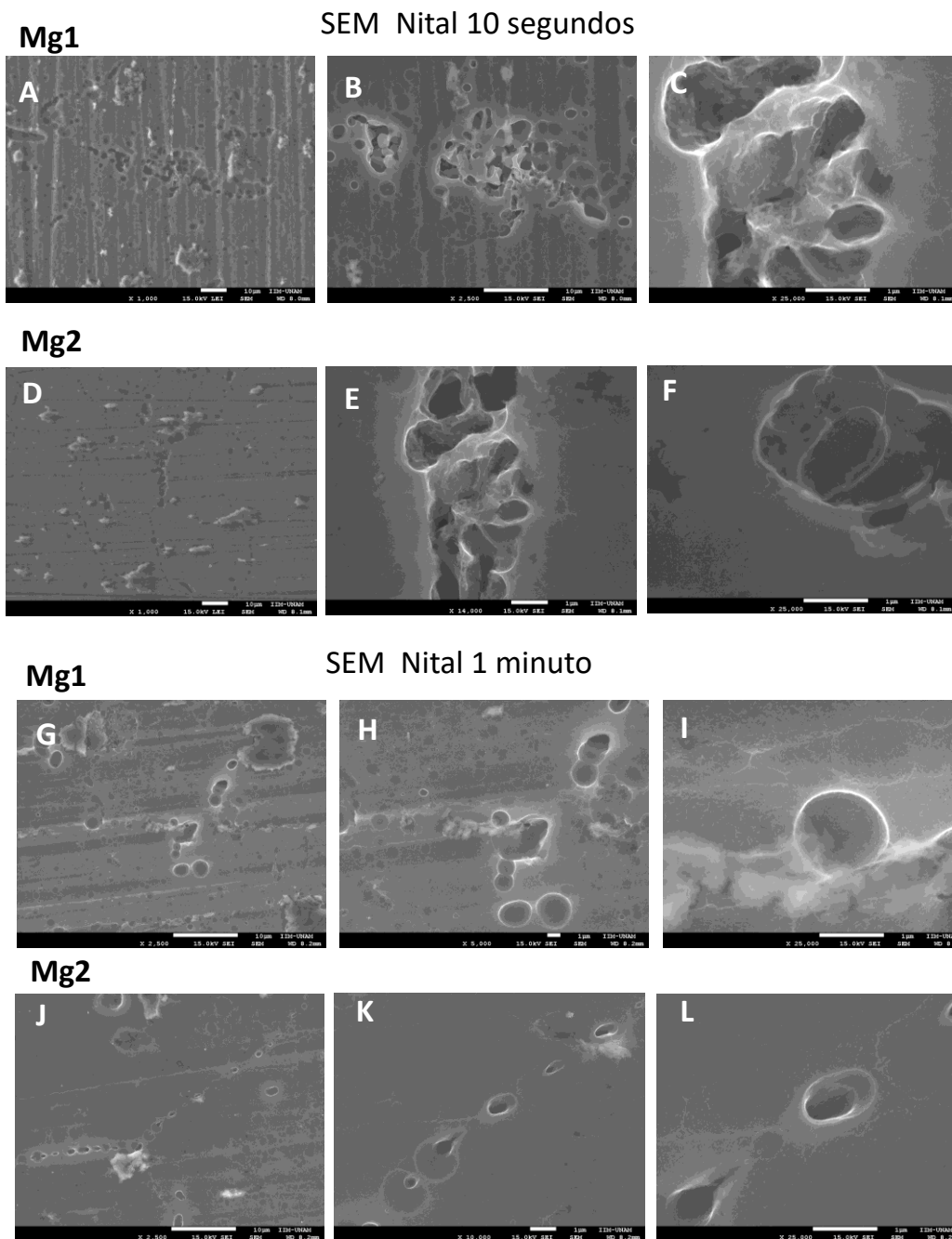


Figura 14. Resultados de SEM/EDS de muestras Mg1, Mg2 que fueron lavadas con Nital durante 10 segundos y 1 minuto.

La muestra de Mg<sub>2</sub> que fue sometida al enjuague con nital durante 1 minuto (Figura 14 J, K, L), presenta poros de mayor profundidad en comparación con Mg<sub>2</sub> nital 10 segundos y Mg<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O; los poros observados siguen la trayectoria de las fronteras de grano (Figura 14 K). Por lo tanto, el tiempo de exposición al nital podría influir significativamente en el proceso de corrosión, acelerándolo.

Estos poros también podrían favorecer la formación de un núcleo de sales y minerales provenientes de fluidos o tejidos circundantes, sobre los cuales se seguirían depositando iones y así se podría crear un andamio mineral que favorecería la migración celular y que contribuiría la osteointegración; sin embargo, aun así, la degradación debe ser controlada.

En la Figura 15, se observó el análisis de composición elemental por EDS acoplado a SEM de las muestras que fueron usadas en el experimento de degradabilidad inmersas en DMEM-F12 al día 103 del experimento, tiempo en el que se concluyó el experimento de degradación. En A, B y C de la Figura 15, se observa que Mg<sub>1</sub> que estuvo inmersa en DMEM, presentó tres estructuras diferentes respecto de su topografía. En A se observa una superficie con grietas, en B, una superficie pilosa, y en C, una superficie rugosa. Estas diferentes estructuras difieren también en su composición elemental (Tabla 8). En Mg<sub>2</sub> se observaron dos diferentes estructuras, una rugosa (D y F), y otra pilosa (E). En Mg<sub>1</sub>-TiO<sub>2</sub> se observan dos estructuras diferentes, en H una con grietas en la superficie y en I una estructura rugosa. Para Mg<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> se observaron 3 estructuras diferentes; en K una superficie con grietas, en L y M una superficie pilosa y rugosa. Las muestras recubiertas y no recubiertas presentaron las mismas estructuras en la superficie de las muestras.

# DMEM

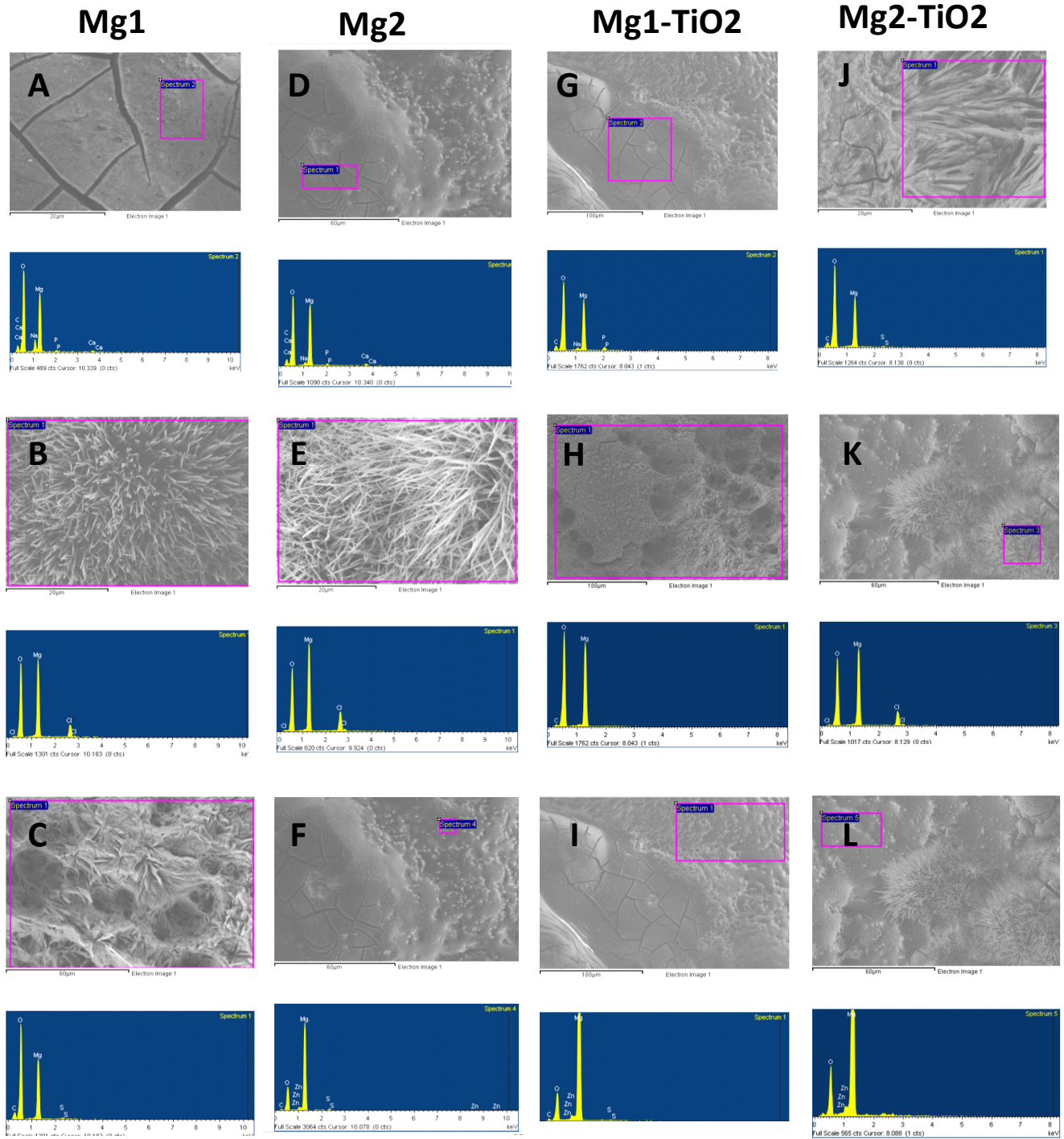


FIGURA 15. SEM/EDS muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> en DMEM-F12 al día 103 de degradabilidad.

Las muestras recubiertas y no recubiertas que fueron inmersas en PBS (Figura 16), solo presentaron dos estructuras en su superficie, una estructura con grietas (Figura 16 S, T, Q y R) y otra estructura rugosa (Figura 16 M, P, N, W, O). A diferencia de las muestras que fueron inmersas en DMEM-F12, en la cuales además de estas dos estructuras, se muestran las estructuras pilosas. Cabe mencionar que la composición elemental de las muestras inmersas en PBS y DMEM-F12 también fue diferente, ya que las que estuvieron en contacto con DMEM-F12, y de acuerdo a los productos de corrosión formados sobre la superficie, esta era rica en iones Mg, O, Ca, Zn, P, el cual concuerda con lo que ya ha sido reportado anteriormente (56).

La composición elemental de las muestras, obtenida por EDS se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Composición elemental de la superficie de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> al día 103 de experimento de biodegradabilidad.

MUESTRA	COMPOSICIÓN ELEMENTAL
Mg1 DMEM F-12	Mg, O, C, Ca, P, Cl, S, Na
Mg2 DMEM F-12	Mg, O, C, Ca, P, Cl, S, Na, Zn
Mg1-TiO <sub>2</sub> DMEM F-12	Mg, O, C, P, Cl, S, Na, Zn
Mg2-TiO <sub>2</sub> DMEM F-12	Mg, O, C, P, Cl, S, Na, Zn
Mg1PBS	Mg, O, C, P, S
Mg2PBS	Mg, O, C, P, S
Mg1-TiO <sub>2</sub> PBS	Mg, O, C, P, S, Zn, Na
Mg2-TiO <sub>2</sub> PBS	Mg, O, C, P, S

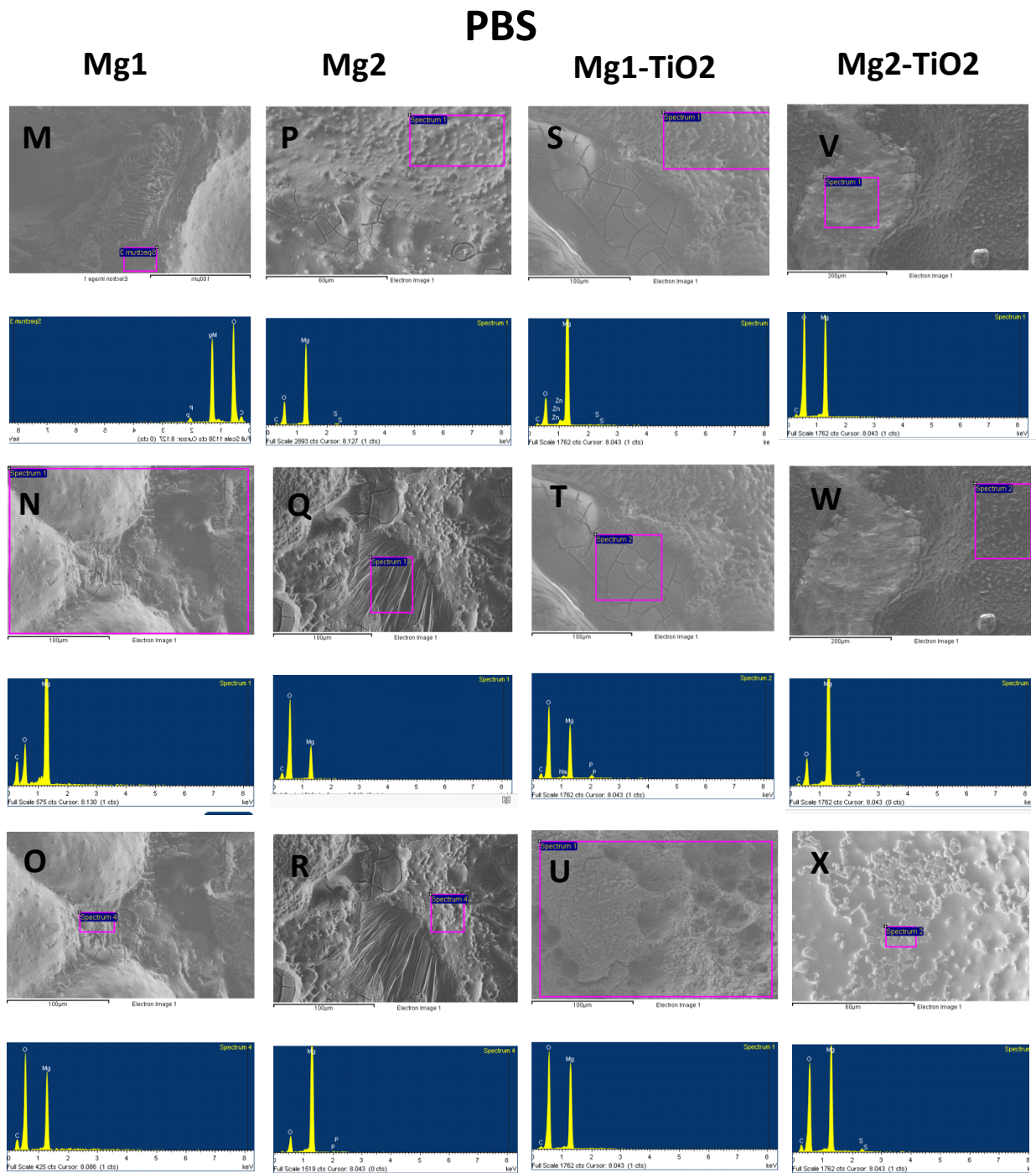


FIGURA 16. SEM/EDS muestras Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> en PBS al día 103 de degradabilidad.

## 8.5. CÉLULAS METABÓLICAMENTE ACTIVAS; ENSAYO DE MTT.

Al evaluar las células troncales mesenquimales metabólicamente activas (según el ensayo de MTT) a las 24 h después de estar en contacto indirecto con la aleación (Figura 17), observamos que en Mg1, el porcentaje de células metabólicamente activas a este tiempo se vio ligeramente incrementado al igual que en reportes previos de aleaciones de Mg (62), sin embargo, este incremento no fue significativo. En Mg2 se mantuvo igual el porcentaje de viabilidad respecto al control (100%), que corresponde a las células que no estuvieron en contacto con ninguna aleación. Las células en contacto indirecto con las muestras recubiertas con TiO<sub>2</sub> presentaron un decremento significativo en el porcentaje de células metabólicamente activas respecto al control; siendo 60% el porcentaje de células metabólicamente activas para Mg2-TiO<sub>2</sub> y Mg1-TiO<sub>2</sub>, respecto del control.

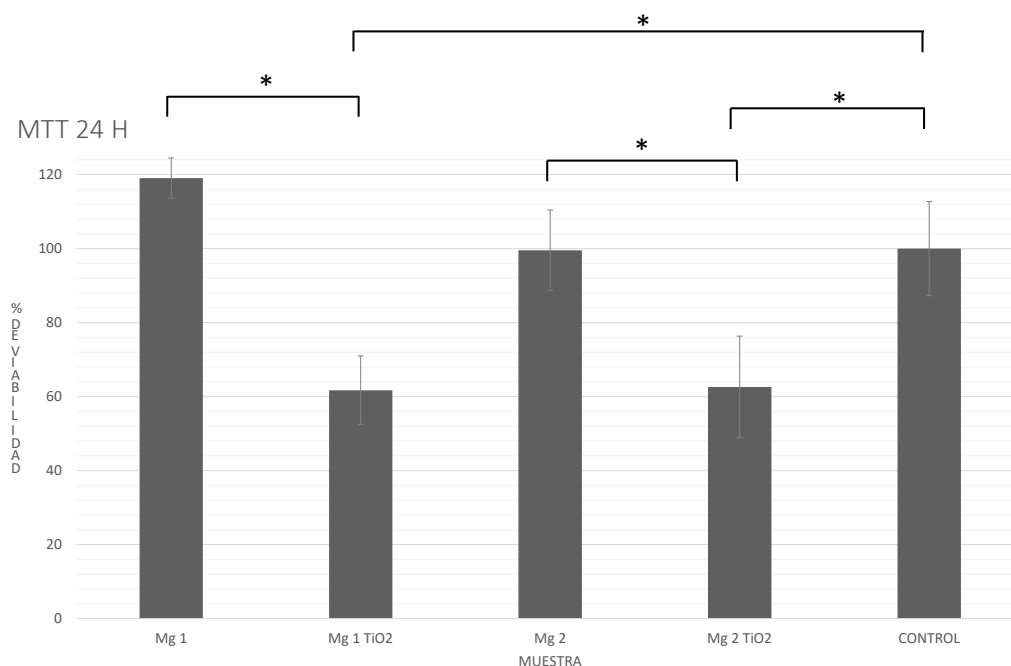


Figura 17. Porcentaje de células metabólicamente activas, respecto del control, a las 24 horas del contacto indirecto de las células con Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2-TiO<sub>2</sub>. \*p < 0.05

Posteriormente, la viabilidad fue evaluada a las 48 h del contacto de las muestras con las células (Figura 18), cabe mencionar que a las 24 h hubo cambio de DMEM-F12 complementado (1% anti-anti, 10%SFB), lo que debió haber ayudado a remover las células que no se adhirieron en las 24 h posteriores a la siembra y a disminuir la concentración de iones en el medio.

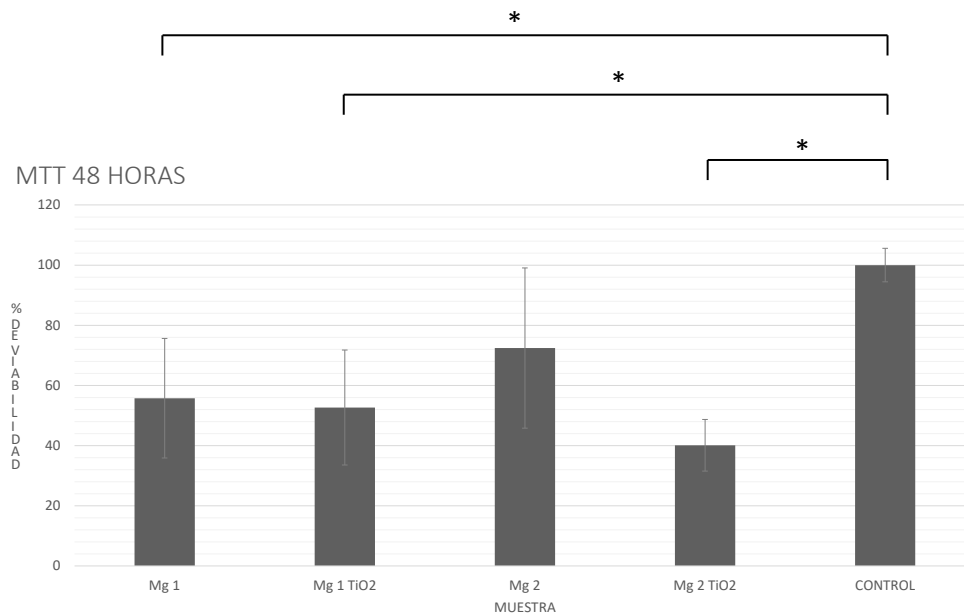


Figura 18. Porcentaje de células metabólicamente activas, respecto del control, a las 48 horas del contacto indirecto de MSC con Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2-TiO<sub>2</sub>. \*p < 0.05.

En general todas las muestras evidenciaron una disminución en el porcentaje de células metabólicamente activas respecto al control, siendo Mg2 la muestra que tiene más porcentaje de células metabólicamente activas (70%) de entre las diferentes muestras estudiadas. Posterior a esta muestra Mg1 presento el mayor porcentaje, un 55% de viabilidad, de entre las muestras estudiadas. Finalmente, las muestras recubiertas con TiO<sub>2</sub> se encontraron por debajo de las no recubiertas, es decir Mg1-TiO<sub>2</sub> tuvo un 50% de células metabólicamente activas con



respecto al control, y Mg2-TiO<sub>2</sub> presentó un porcentaje de viabilidad por debajo del 40% en comparación con el control. Mg1, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> tuvieron diferencias significativas respecto al control.

Posterior a las 48 h de haber realizado la medición de la viabilidad celular, cada 24 h se realizó cambio de medio de incubación, y la medición del porcentaje de células metabólicamente activas se realizó a los 6 días del contacto de las células con las aleaciones. A los 6 días del contacto indirecto de las células con las aleaciones (Figura 19), se observó que hubo una disminución en el porcentaje de células metabólicamente activas en todas las muestras; sin embargo, Mg2 fue la que mayor porcentaje de células metabólicamente activas presentó, respecto del control.

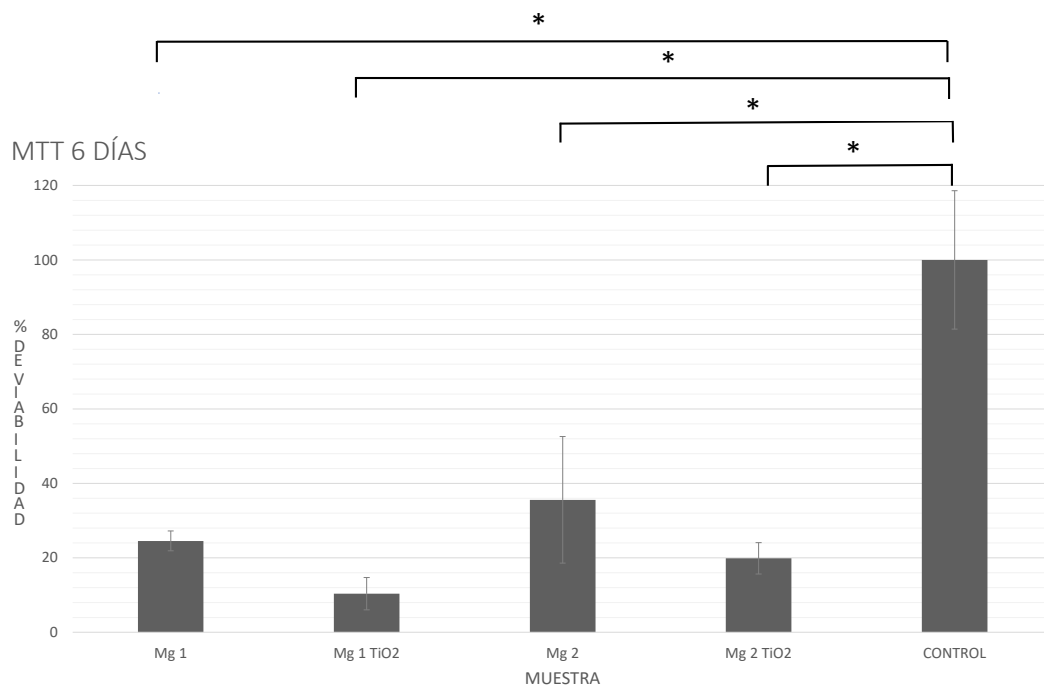


Figura 19. Porcentaje de células metabólicamente activas, respecto del control, a los 6 días del contacto indirecto de MSC con Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub>, Mg2-TiO<sub>2</sub>; \*p < 0.05.

La viabilidad celular en todas las muestras, decayó significativamente por debajo del 40% de células metabólicamente activas respecto del control, siendo Mg2 la muestra que tuvo mayor porcentaje de viabilidad (38%), de entre las diferentes muestras estudiadas, las muestras recubiertas, siguieron el mismo comportamiento respecto a las mediciones realizadas a las 24 y 48 h, donde su porcentaje de células viables fue significativamente menor al porcentaje observado para las aleaciones no recubiertas; Mg1-TiO<sub>2</sub> tuvo 10% de porcentaje de viabilidad y Mg2-TiO<sub>2</sub> tuvo 20% de viabilidad celular respecto del control positivo.

Por lo tanto, al finalizar este experimento, observamos que todas las muestras presentaron una disminución significativa del porcentaje de células metabólicamente activas respecto del control positivo (células incubadas sin muestra). Sin embargo, es muy importante mencionar que esta disminución en el porcentaje de células metabólicamente activas se puede deber a dos situaciones diferentes, una para el caso de las aleaciones no recubiertas y otra para el caso de las aleaciones recubiertas. Al observar las micrografías correspondientes a las células incubadas por 7 días en presencia de las aleaciones para los estudios de expresión de marcadores de diferenciación (Figura 20), se observó que, en el caso de las células incubadas en presencia de las aleaciones no recubiertas, el número de células adheridas fue alto respecto al control de células cultivadas sin presencia de aleación (control negativo ya que no se espera inducir ninguna diferenciación celular, Figura 20). Por lo que en el caso de las aleaciones no recubiertas la diferencia significativa observada en el porcentaje de células metabólicamente activas (de acuerdo con los resultados del ensayo de MTT) respecto del control, quizás no se deba a que la presencia de las aleaciones haya inhibido significativamente la viabilidad celular. Sino que esta disminución respecto del control podría deberse principalmente a una mayor diferenciación de las células hacia el fenotipo osteoblástico en el caso de las células incubadas

en presencia de las aleaciones no recubiertas, con respecto a las células incubadas como control en presencia de ninguna muestra. Durante el proceso de diferenciación las células disminuyen su proliferación y otros ciclos metabólicos (61).

El porcentaje de células metabólicamente activas disminuyó significativamente en las células que estuvieron en contacto con las muestras recubiertas respecto al control y a las células que estuvieron en contacto con las muestras no recubiertas. En este caso, el número de células adheridas a los 7 días de cultivo en presencia de las aleaciones recubiertas de  $\text{TiO}_2$  fue mínimo en comparación con el control (Figura 20-23), esto pudo haber sido, en primera instancia porque se han encontrado menor viabilidad en las células cultivadas sobre muestras policristalinas de  $\text{TiO}_2$  en comparación con los monocristales (63). El recubrimiento de  $\text{TiO}_2$ , al contrario de lo esperado y de los resultados observados para estos recubrimientos aplicados en otros materiales como Ti o acero inoxidable (16), no favoreció la disminución de la velocidad de corrosión. Por tanto, pudo haber creado una liberación abrupta de productos de corrosión en los medios de cultivo al favorecer el recubrimiento una mayor corrosión/biodegradación en comparación con las aleaciones no recubiertas. Esta liberación abrupta y continua de productos de degradación en altas tasas de degradación/corrosión del material, puede alterar la osmolalidad del medio de cultivo celular resultando en daño de la membrana celular (64). Aunado al aumento sostenido en el tiempo del pH de los medios de cultivo (alcalinización), se puede pensar que hubo una alteración en la adhesión y viabilidad celular (60) y por tanto una disminución significativa en el ensayo de MTT, respecto del control, en este caso si provocado por un mínimo número de células viables adheridas a los platos de cultivo en presencia de las aleaciones recubiertas.

Las células que estuvieron en contacto con las muestras recubiertas con  $\text{TiO}_2$ , desde las primeras horas, mostraron una disminución en la viabilidad celular, debido a que al contacto con el recubrimiento, se creó un par galvánico entre el ánodo del Mg y el cátodo del  $\text{TiO}_2$ , por tanto favorece la corrosión del Mg, al acelerar este proceso, hubo liberación de iones Hidrógeno hacia el medio, creando un cambio abrupto y constante del pH y a su vez liberación de productos de corrosión lo que favorecería el daño celular. Para aplicaciones ortopédicas, las burbujas de gas, debido a los procesos de corrosión del material acelerados por el recubrimiento, que se encuentran pueden interferir con la interconectividad de los osteocitos y disminuir la curación del hueso cortical inicial, lo que resulta en la formación de callo, defectos corticales, y la embolia de gas en casos extremos (65,66). Además de que desde un punto de vista de biocompatibilidad, los productos de corrosión pudieran no ser excretados o metabolizados a una velocidad satisfactoria, sino que se acumulan y un exceso de Mg podría alterar la homeostasis mitocondrial, teniendo en consecuencia la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que contribuiría al daño y muerte celular (67).

## 8.6. INMUNOCITOQUÍMICA

Después de realizar el protocolo del ensayo de inmunohistoquímica, se obtuvieron microfotografías con las cuales se identificó la presencia o ausencia, así como localización de algunos marcadores o proteínas que son expresados por las células en su proceso de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico o bien cuando ya se han diferenciado a células del fenotipo osteoblástico.

Al evaluar la expresión de Runx-2 (Figura 20) al contacto con las células que estuvieron con las muestras de Mg, se observó que en todos los casos hubo una expresión positiva; sin embargo,

la localización de este factor de transcripción es nuclear, y en todas las células que estuvieron en contacto con las muestras se observó alrededor del núcleo y con un marcaje más intenso que en el caso del control (células incubadas sin ninguna aleación). En el control donde las células no tuvieron contacto con las muestras, también se observó un marcaje positivo de Runx-2, pero más ligero que en el caso de las células incubadas en presencia de las aleaciones. El control negativo de la técnica (solo anticuerpo secundario) corroboró que la técnica se llevó a cabo de manera adecuada ya que no se observó ningún marcaje inespecífico sino sólo la contratinción de Hematoxilina.

## RUNX-2

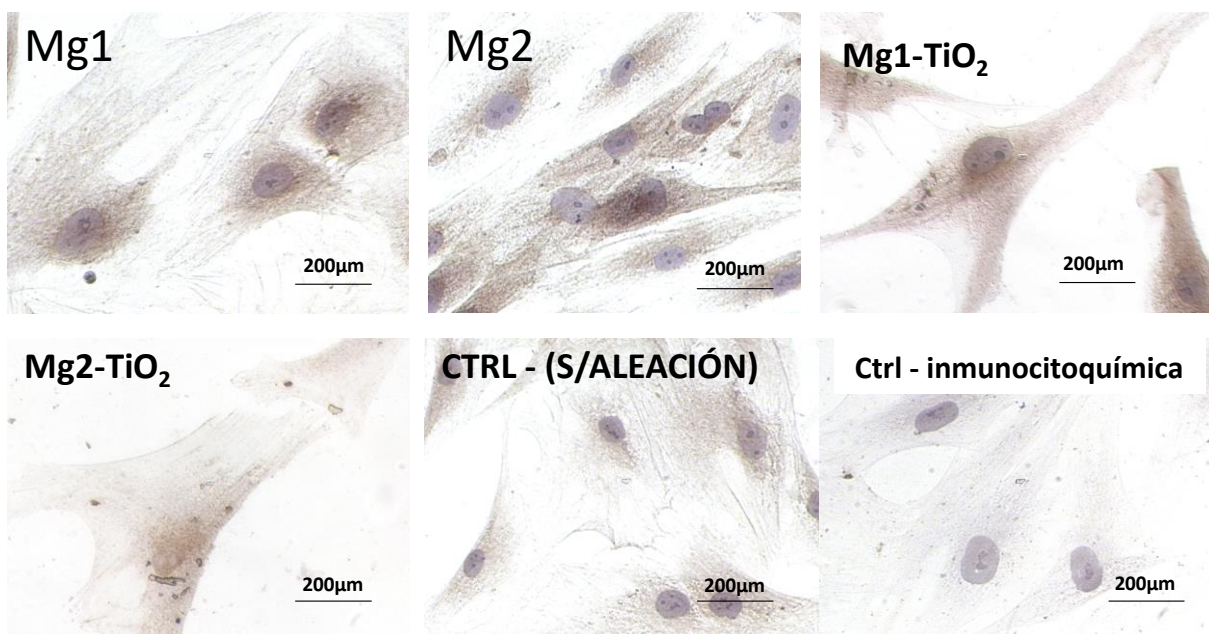


Figura 20. Micrografías correspondientes al ensayo de inmunocitoquímica contra Runx2 de células troncales mesenquimales incubadas por 7 días en presencia de los productos de degradación de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, y en presencia de insertos solamente sin aleación alguna (CTRL-(S/Aleación)). La muestra Ctrl- inmunocitoquímica corresponde a la realización del ensayo de inmunocitoquímica en muestras Ctrl – pero sin la colocación del anticuerpo primario para Runx2.

Las células que estuvieron en contacto con Mg1, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> mostraron una forma romboidal respecto a las células en contacto con Mg2 y a los controles, donde se observó que estas células tenían una forma alargada fibroblastoide.

Se esperaba que Runx-2 al ser un factor de transcripción que promueve la diferenciación hacia osteoblastos, su localización sea en el núcleo; sin embargo, observamos que este marcaje fue más intenso en las células que estuvieron en contacto con Mg1, pero el marcaje se observó alrededor del núcleo (Figura 20) mas no dentro de él, por lo que las células pudieran estar diferenciadas hacia un fenotipo osteoblástico, considerando también la forma poliédrica que presentaron.

Por tanto, el Mg podría estimular una cascada de señalización que inicia el proceso de diferenciación celular. Sin embargo, también se observó una expresión positiva hacia Runx-2 de las células incubadas en presencia de ninguna aleación por lo que la expresión positiva de este marcador no puede ser tomado como una prueba concluyente de diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico inducida por la presencia de las aleaciones. (68).

En la Figura 21, observamos que hubo un marcaje positivo para osteopontina en Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>. Aunque también para el control positivo, en donde las células no estuvieron en contacto con las aleaciones. El control negativo, donde solo fue colocado el segundo anticuerpo solo se observó la tinción con hematoxicilina.

Osteopontina es una proteína de la matriz extracelular que tiene una alta afinidad a la hidroxiapatita, interviene en la interacción de la célula y la matriz extracelular, y a su vez forma parte de la matriz mineralizada. Esta proteína se localiza en la matriz extracelular. En la Figura 21, se observó que su localización fue en el citoplasma, alrededor del núcleo, la coloración de

la contratinción no se torna tan intensa, por lo que podríamos pensar que la proteína tiene una baja expresión, por tanto, las células troncales mesenquimales, con el paso de los días pudieran diferenciarse a osteoblastos por sí mismas, ya que la osteopontina, es un marcador de mineralización temprana.

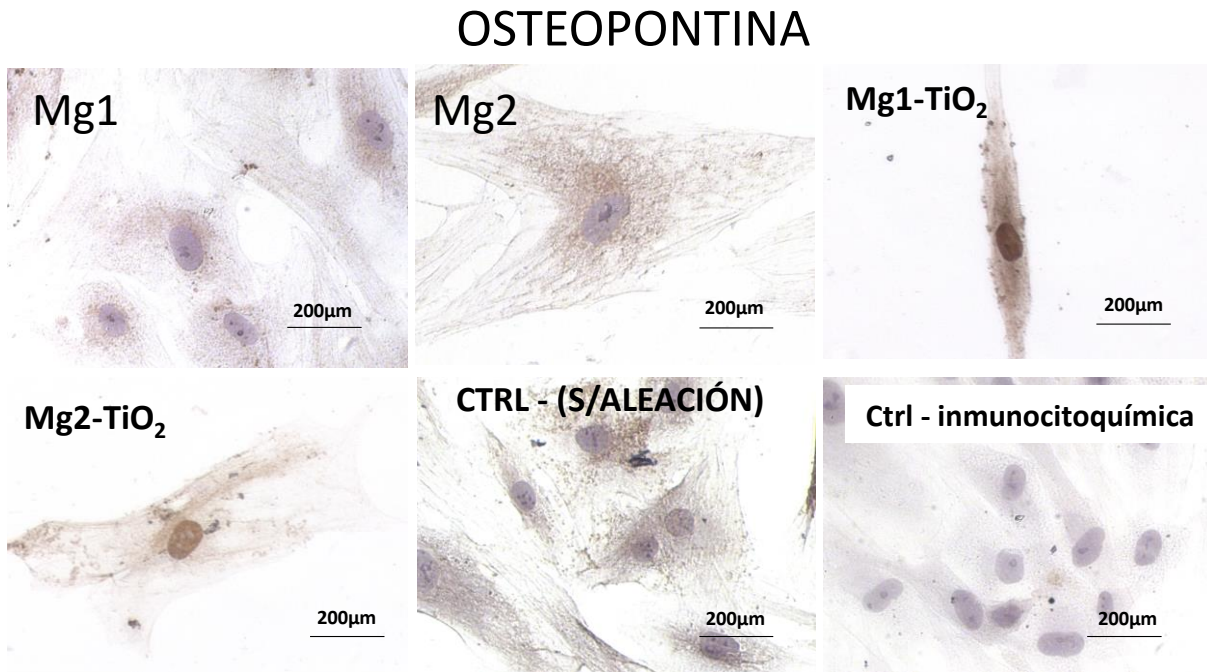


Figura 21. Micrografías correspondientes al ensayo de inmunocitoquímica contra osteopontina de células troncales mesenquimales incubadas por 7 días en presencia de los productos de degradación de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, y en presencia de insertos solamente sin aleación alguna (CTRL-(S/Aleación). La muestra Ctrl- inmunocitoquímica corresponde a la realización del ensayo de inmunocitoquímica en muestras Ctrl – pero sin la colocación del anticuerpo primario para osteopontina.

En la Figura 22, se observa que hubo un marcaje positivo para osteocalcina en el citoplasma de las células que estuvieron en contacto con Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, este marcaje

se observó de forma más intensa respecto la evaluación que se hizo con Runx-2 y osteopontina, y las células del control presentaron un marcaje negativo a osteocalcina. En el control del experimento (células incubadas sin aleación, pero incubadas con anticuerpo primario y secundario durante el ensayo de inmunocitoquímica) sólo se observó la tinción con hematoxicilina.

## OSTEOCALCINA

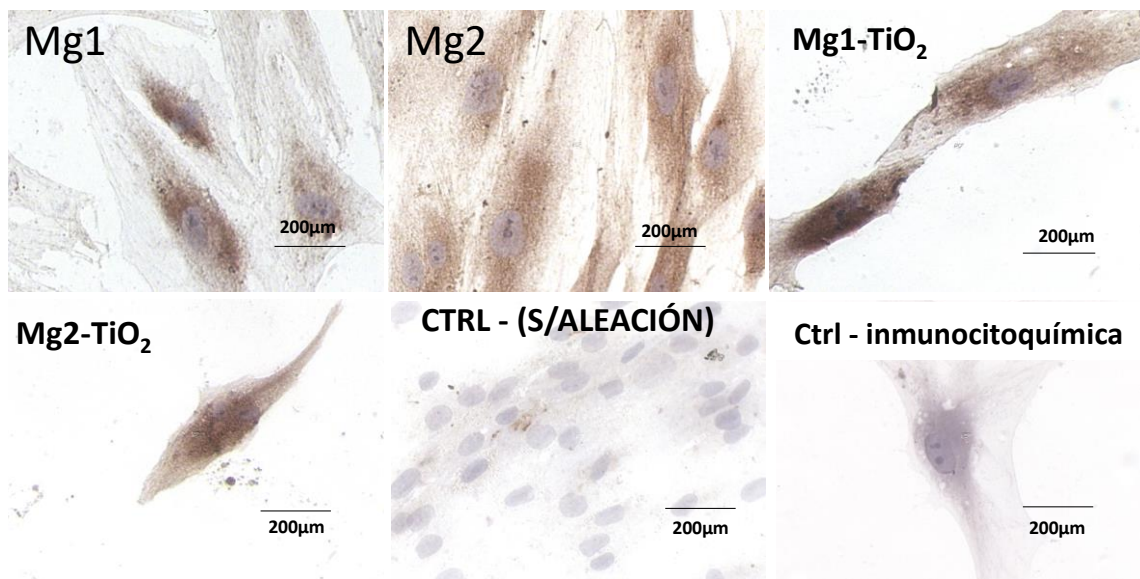


Figura 22. Micrografías correspondientes al ensayo de inmunocitoquímica contra osteocalcina de células troncales mesenquimales incubadas por 7 días en presencia de los productos de degradación de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, y en presencia de insertos solamente sin aleación alguna (CTRL-(S/Aleación)). La muestra Ctrl- inmunocitoquímica corresponde a la realización del ensayo de inmunocitoquímica en muestras Ctrl – pero sin la colocación del anticuerpo primario para osteocalcina.

La osteocalcina es una proteína que se localiza en la matriz extracelular, que indica una diferenciación de un pre-osteoblasto a osteoblasto, su localización es en la matriz extracelular.



Con base en los resultados obtenidos en este ensayo (Figura 22), podríamos inferir que las células que estuvieron en contacto con Mg1 y Mg2, se encuentran ya en un proceso de mineralización tardío a los 7 días de incubación.

La Figura 23, muestra el marcaje para colágena I. En Mg1 hubo un marcaje positivo para las células que estuvieron en contacto con la aleación; sin embargo, para Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub> hubo un marcaje negativo.

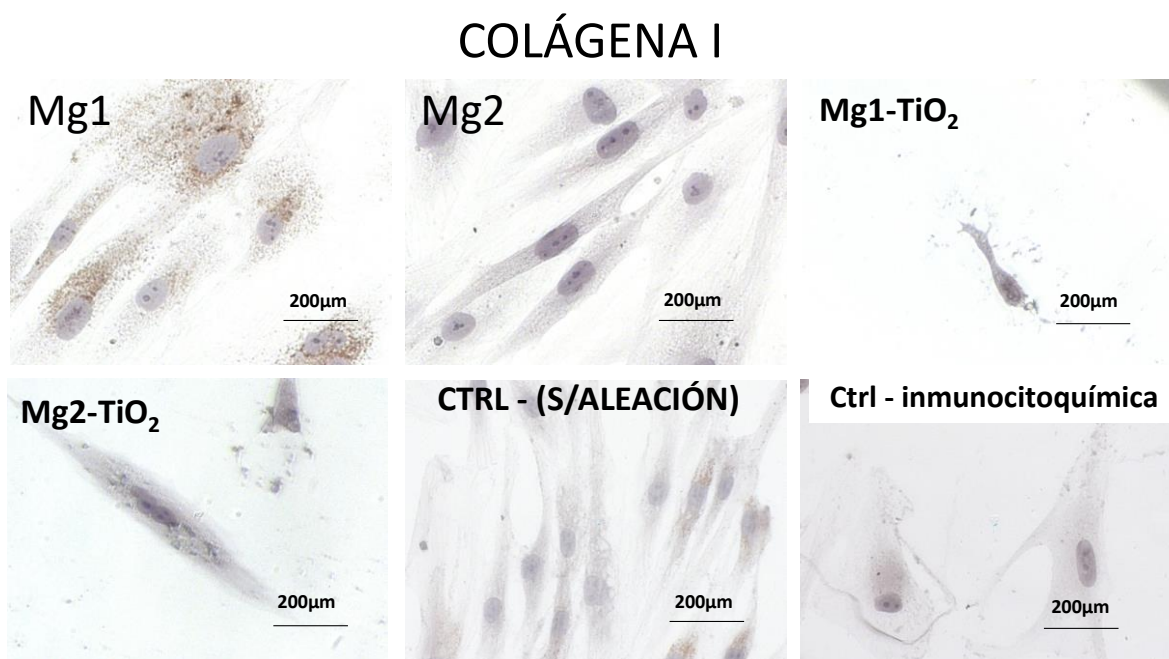


Figura 23. Micrografías correspondientes al ensayo de inmunocitoquímica contra colágena I de células troncales mesenquimales incubadas por 7 días en presencia de los productos de degradación de Mg1, Mg2, Mg1-TiO<sub>2</sub> y Mg2-TiO<sub>2</sub>, y en presencia de insertos solamente sin aleación alguna (CTRL-(S/Aleación)). La muestra Ctrl- inmunocitoquímica corresponde a la realización del ensayo de inmunocitoquímica en muestras Ctrl – pero sin la colocación del anticuerpo primario para colágena I.

La forma de las células que estuvieron en contacto con las muestras y los controles se observaron de forma alargada, a excepción de Mg1, donde algunas de las células tuvieron una forma más ovoide.

La colágena tipo I, se localiza en la matriz extracelular. Al ser una proteína, colágena en el tejido óseo brinda soporte estructural y celular. Con base a los resultados de este ensayo, podríamos inferir que las células que estuvieron en contacto con Mg1 pudieran estar en un proceso de diferenciación celular.

## 9. CONCLUSIONES

- La resistencia a la corrosión no mejoró con la película de TiO<sub>2</sub>.
- El recubrimiento de TiO<sub>2</sub> pareció disminuir la reacción de corrosión durante las primeras horas de inmersión de las muestras en DMEM-F12.
- Después de una inmersión más prolongada en DMEM-F12, el recubrimiento de TiO<sub>2</sub> pareció aumentar la corrosión.
- La exposición a aleaciones recubiertas de TiO<sub>2</sub> disminuyó la viabilidad celular ( $\approx$  25%; 6 días de cultivo) en comparación con las aleaciones no recubiertas correspondientes.
- Las células troncales mesenquimales que estuvieron en contacto con las aleaciones, mostraron un marcaje positivo para Runx-2, Osteopontina, y Osteocalcina, también se observó que la forma de las células cambió, de ser alargada a romboidal, por lo que podríamos inferir que hubo una diferenciación hacia un fenotipo osteoblástico.
- El recubrimiento necesita ser mejorado en el caso del presente estudio.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernandez J. Epidemiología del trauma en la ciudad de México. 2003;6:40–3.
2. Aitken SA, Rodrigues MA, Duckworth AD, Clement ND, McQueen MM, Court-brown CM. Determining the Incidence of Adult Fractures : How Accurate Are Emergency Department Data. 2012;2012:1–8.
3. Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fractures: A review. Injury. 2006 Aug;37(8):691–7.
4. Lee K. Global trends in maxillofacial fractures. Craniomaxillofacial trauma Reconstr. 2012;5(4):213–22.
5. Brasileiro BF, Passeri LA. Epidemiological analysis of maxillofacial fractures in Brazil: A 5-year prospective study. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Jul;102(1):28–34.
6. Brar HS, Platt MO, Sarntinoranont M, Martin PI, Manuel M V. Magnesium as a biodegradable and bioabsorbable material for medical implants. Jom. 2009;61(9):31–4.
7. Xiangmei L, Yang Q, Zhaoyang L, Yuan W, Cui Z. Surface Science applied to magnesium alloy strength AZ31. 2018;434:1101–11.
8. Adachi T, Osako Y, Tanaka M, Hojo M, Hollister SJ. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration. 2006;27:3964–72.

9. Kuhulmann J, Bl et al. Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants. *Acta Biomater.* 2013;8714–21.
10. Li N, Zheng Y. Novel Magnesium Alloys Developed for Biomedical Application : A Review. *J Mater Sci Technol.* 2013;29(6):489–502.
11. Baulin O, Fabrègue D, Kato H, Liens A, Wada T. A new , toxic element-free Mg-based metallic glass for biomedical applications. *J Non Cryst Solids.* 2018;481:397–402.
12. Wu L, Luthringer BJC, Feyerabend F, Schilling AF, Willumeit R. Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts. *Acta Biomater.* 2014;10(6):2843–54.
13. Carballo M. Cerámica y Vidrio Una revisión del uso del TiO<sub>2</sub> en terapias e ingeniería tisular. *Tissue Eng.* 2009;(January 2014):321–8.
14. Zheng Y. *Magnesium Alloys as Degradable Biomaterials.* 2015.
15. Iqbal N, Kadir MRA, Mahmood NH, Salim N, Froemming GRA, Balaji HR, et al. Characterization, antibacterial and in vitro compatibility of zinc-silver doped hydroxyapatite nanoparticles prepared through microwave synthesis. *Ceram Int.* 2014;40(3):4507–13.
16. Silva Bermúdez P. E al. Enhancing the osteoblastic differentiation through nanoscale surface modifications. *J Biomed Mater Res Part A.* 2017;105,:498–509.
17. Constantin DG, Apreutesei M, Arvinte R, Marin A, Andrei OC, Munteanu D. *Magnetron Sputtering Technique Used for Coatings Deposition ; Technologies and Applications.*

Recent. 2011;12(March):24–6.

18. Porth C. Fundamentos de fisiopatología. 2011. 1081–1087.
19. Hernández-Gil IF, Angel M, Gracia A, Pingarrón C, et al. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo. 2005(1):47–51.
20. García Bodelón Ó. Biomateriales Metálicos Endoprotésico: Biocompatibilidad Y Biodegradación. 2015.
21. Davies, J.H. M. Bone Formation and Healing: Histodynamics of Endosseous Wound Healing, in Bone Engineering. JE, Ed. 1999;1–15.
22. AJ: F. Precursor cells of mechanocytes. Int Rev Cytol. 1976;47:327–55.
23. Yamaguchi A, Komori T ST. Regulation of osteoblast differentiation mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. EndocrREv. 200AD;21:393–411.
24. Civitelli R, Beyer EC, Warlow PM, Robertson AJ, Geist ST, Steinberg TH. Connexin43 Mediates Direct Intercellular Communication in Human Osteoblastic Cell Networks. 1993;91(May):1888–96.
25. W.SSimonet WJb. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. Cell. 1997;89(2):309–19.
26. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol. 2015;(July):899–910.
27. Delgado-Calle, J. Riancho JA. Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo. Revi

osteoporos Metab Min. 2013;1:51–6.

28. Bozal C. Biología del osteocito. Actual osteol. 2006;2(1):19–21.
29. Fernandez-Tresguerres Hernandez-Gil I, Alobera Gracia MA, Del Canto Pingarrón M, Blanco Jerez L. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II. El proceso de remodelado. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11(2):92–8.
30. Mandalunis PM. Remodelación ósea. Exp Toxicol Pathol. 2006;2(1):16–8.
31. Díez P, Israel S, Hernández M, Pérez ER, Arias DDC. Características epidemiológicas de pacientes adultos atendidos por fracturas en el Instituto Nacional de Rehabilitación. 2013;51–4.
32. Singer BR, McLauchlan GJ, Robinson CM, Christie J. Epidemiology of fractures in 15 000 adults. J Bone Joint Surg Br. 1998;80-B(2):243–8.
33. Meneses-gonz F, Rea R, Hernandez-avila M. Rufz-MAMs, M.D., ESP. 1993;(I).
34. León D, Gerardo L, Gasca D, Luis S, Villaseñor O. Asociación para el Estudio de la Osteosíntesis en el. 2017;(4):275–86.
35. Luis MM. Osteosíntesis con placa puente en fracturas diafisarias conminutas de húmero. Rev Med Hered 18. 2007;18(4):200–4.
36. Iglesias C. Estudio in vitro e in vivo de materiales metálicos de base magnesio microestructurados reabsorbibles y multifuncionales para la osteosíntesis de fracturas. 2015;183.

37. Kraus T, Fischerauer SF, Hänzi AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF WA. Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: In vivo studies of their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater Acta Mater.* 2012;8, no:1230–8.
38. Medizinischen G Der, Hannover H. Characterisation of Cell Growth on Titanium Scaffolds Made By Selective Laser Melting for Tissue Engi-. 2013;58(I):15–6.
39. Kammer C. Magnesium Taschenbuch. Aluminum-verlag, editor. 2000. 784 p.
40. Meysam H. Mechanical characteristics of biodegradable magnesium matrix composites: A review. *J Magnes Alloy.* 2017;5(2):189–201.
41. McBride ED. Magnesium screw and nail transfixion in fractures. *South Med.* 1938;31:508–15.
42. Persaud-Sharma D, McGoron A. Religiously-motivated conflict, intolerance, oppression, unjustified discrimination, extremism, etc. *J Biomimetics, Biomater Tissue Eng.* 2012;12:25–39.
43. Song Guang Ling S. A possible biodegradable magnesium implant material. *Advanced Engineering Materials.* 2007;9, no:298–302.
44. Atrens, Andrej et al. Review of recent developments in the field of magnesium corrosion. *Adv Eng Mater.* 2015;17, n:400–53.
45. Song GL. Recent progress in corrosion and protection of magnesium alloys. *Adv Eng Mater.* 2005;7, no:563-586.

46. Xuenan Gu. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials*. 2009;Volume 30(Issue 4):484–98.
47. Radha R, Sreekanth D. Insight of magnesium alloys and composites for orthopedic implant applications – a review. *J Magnes Alloy*. 2017;5(3):286–312.
48. Henry A. Briceño, Ludwing F. Cáceres, Juan C. Joya, Juan D. Barajas Fernando Viejo AEC. Aleaciones de magnesio: Una alternativa potencial en la fabricación de implantes biomédicos. *Rev Colomb Mater*. 2013;5:256–61.
49. Williams D. The golden anniversary of titanium biomaterials. *Med Device Technol*. 2001;12(7):8–11.
50. Olivares Navarrete et. al. Rough titanium alloys regulate osteoblast production of angiogenic factors. *spine J*. 2013;13(11):1563–70.
51. Fonseca García A, Rodil Posada SE. Modificaciones inducidas en titanio y óxido de titanio por la inmersión en soluciones ricas en peróxido de hidrógeno. 2017. p. 150.
52. Rodríguez Á. Estudio del ángulo de contacto y de la mojabilidad a alta temperatura de fases líquidas en la sinterización de metales. 2010.
53. Ipohorski M, Bozzano P b. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): en la Caracterización de Materiales. *Cienc Invest*. 2013;63(3):43–53.
54. Meerloo J Van, Kaspers GJL, Cloos J. Cancer Cell Culture: Cell sensitivity assays: The MTT assay. 2011;731(July 2015):237–45.



55. Adekanmbi I, Mosher CZ, Lu HH, Riehle M, Kubba H, Tanner KE. Mechanical behaviour of biodegradable AZ31 magnesium alloy after long term in vitro degradation. *Mater Sci Eng C*. 2017;77:1135–44.
56. Bakhsheshi-Rad HR, Hamzah E, Low HT, et al. Fabrication of biodegradable Zn-Al-Mg alloy: Mechanical properties, corrosion behavior, cytotoxicity and antibacterial activities. *Mater Sci Eng C*. 2017;73:215–9.
57. Arora M, Carbajal A. Medios de cultivo celular: una revisión. Labome. 2013;
58. Ian Johnson, Jiang Wensen HL. The effects of serum proteins in Magnesium Alloy Degradation In Vitro. *Sci Rep*. 2017;
59. W.F. Ng FTC. Effect of pH on the in vitro corrosion rate of magnesium degradable implant material. *Mater Sci Eng C*. 2010;30(6):898–903.
60. Bakhsheshi-Rad HR, Hamzah E, Ismail AF, Aziz M, Daroonparvar M, et al. In vitro degradation behavior, antibacterial activity and cytotoxicity of TiO<sub>2</sub>-MAO/ZnHA composite coating on Mg alloy for orthopedic implants. *Surf Coatings Technol*. 2018;334:450–60.
61. Yin, Qingshui T. The beneficial influence of microarc oxidation-coated magnesium alloy on the adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Mater Lett*. 2014;137:362–5.
62. Bian D, Zhou W, Deng J, Liu Y, Li W, Chu X, et al. Development of magnesium-based biodegradable metals with dietary trace element germanium as orthopaedic implant

applications. *Acta Biomater.* 2017;64:421–36.

63. Moreno B, Carballo M, Jurado JR, Chinarro E. Una revisión del uso del TiO<sub>2</sub> en terapias e ingeniería tisular. *Bol la Soc Esp Ceram y Vidr.* 2009;48(6):321–8.
64. T. S. N. Sankara Narayanana MHL. A simple strategy to modify the porous structure of plasma electrolytic oxidation coatings on magnesium. *RSC Adv.* 2016;(19):16100–14.
65. Li HF, Xie XH, Zheng YF, Cong Y, Zhou, Qiu KJ, et al. Development of biodegradable Zn-1x binary alloys with nutrient alloying elements Mg, Ca, and Sr. *Scientific reports.* 2015;5:10719.
66. Katarivas Levy G AE. influence of heat treatment temperature on corrosion characteristics of biodegradable EW10X04 Mg alloy coated with Nd. *Adv Eng Mater.* 2015;18(2):269–76.
67. Martin Kolisek, Rhian M. Touyz, Andrea Romani MB. Magnesium and Other Biometals in Oxidative Medicine and Redox Biology. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;
68. LI, Rachel W. et al. The influence of biodegradable magnesium alloys on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res Part A.* 2014;102,:4346–57.