

INVESTIGACIÓN

# Matriz para ingeniería de tejido óseo: modificación superficial con zinc

## Estudio preliminar

CRISTIAN MARTÍNEZ,<sup>\*</sup> DANIEL OLMEDO<sup>\*\*</sup> y ANDRÉS OZOLS<sup>#</sup>

<sup>\*</sup>Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Cuyo, <sup>\*\*</sup>Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, <sup>#</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad de Buenos Aires

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un método de síntesis de matrices para ingeniería de tejidos, capaces de acelerar los procesos reparativos y disminuir el riesgo de infección, destinadas a cirugías reconstructivas que involucren el tejido óseo. A este fin se emplea la fase mineral de hueso bovino, la hidroxiapatita, conservando su estructura tridimensional. Esta se obtiene a partir de un proceso de lavado químico, seguido de un proceso térmico que elimina todos los componentes orgánicos. Esta matriz es modificada superficialmente con óxido de zinc (ZnO), elemento reconocido por su acción en diversos procesos biológicos y su acción antibacteriana. El procedimiento involucra la intrusión de dispersiones de ZnO en solución de alcohol-1,2,3 propanotriol, efectuadas en un baño térmico y el ulterior sinterizado a alta temperatura. El grado de fijación y la concentración del Zn sobre la matriz de hidroxiapatita se determinan por medio de microscopía electrónica y espectrometría en energías. La difracción de rayos X muestra que la incorporación de los iones de Zn en la superficie forma fosfatos de Zn. El original proceso desarrollado permite modificar, en forma sencilla, injertos óseos sintéticos, otorgando capacidad antibacteriana y osteoproliferativa al sustrato osteoconductor.

**PALABRAS CLAVE:** Ingeniería de tejidos. Hidroxiapatita. Matrices. Zinc.

**SCAFFOLD FOR BONE TISSUE ENGINEERING: SUPERFICIAL MODIFICATION WITH ZINC. PRELIMINARY STUDY**

Recibido el 26-5-2013. Aceptado luego de la evaluación el 3-9-2013.

Correspondencia:

Dr. CRISTIAN MARTÍNEZ  
cm10\_10@hotmail.com

### ABSTRACT

The aim of this study is to develop a method of matrix synthesis for tissue engineering, capable of accelerating reparative processes and reducing the risk of infection, destined to reconstructive surgeries involving bone tissue. For this purpose the bovine bone mineral phase, hydroxyapatite, was used while retaining its dimensional structure. This is obtained from a chemical wash process followed by a thermal process that removes the entire organic components. This matrix is superficially modified with zinc oxide (ZnO), element known for its action in various biological processes and its antibacterial action. The procedure involves the intrusion of ZnO dispersions in alcohol solution-1,2,3-propanetriol, made in a thermal bath and the subsequent high temperature sintering. The degree of attachment and the Zn concentration on the hydroxyapatite matrix is determined by electron microscopy and energy spectrometry. X-ray diffraction shows that the incorporation of Zn ions in the surface forms Zn phosphates. The developed original process allows modifying in a simple way synthetic bone grafts, by providing antibacterial and osteoproliferative properties to the osteoconductive substrate.

**KEY WORDS:** Tissue engineering. Hydroxyapatite. Scaffolds. Zinc.

### Introducción

La regeneración ósea involucra una serie de complejos e intrincados eventos biológicos que implican señales moleculares, factores de crecimiento y células en el sitio de la lesión.<sup>1</sup> La ingeniería de tejidos para este fin utiliza matrices degradables (*scaffolds*) para promover la regeneración del hueso. Estas matrices deben poder ser reemplazadas por el tejido del huésped, deben ser porosas para permitir

la vascularización y no deben producir una respuesta inmunogénica en el paciente.<sup>2</sup>

La hidroxiapatita (HA;  $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) es un biomaterial ampliamente utilizado para reemplazo del tejido óseo, debido a su excelente biocompatibilidad.<sup>2</sup> Este fosfato de calcio es el elemento constituyente inorgánico principal del tejido óseo y, a su vez, es el reservorio más importante de calcio y fósforo del organismo. Una matriz biodegradable basada en este biomaterial, con macro y microporosidad interconectadas similares a las del tejido óseo, otorga un microambiente adecuado para su vascularización y la ulterior regeneración del tejido.<sup>3</sup>

El zinc (Zn) es conocido por sus propiedades antibacterianas y es un elemento metálico indispensable para la proliferación celular y el remodelado de la matriz extracelular.<sup>4-7</sup> La evidencia actual sostiene que el Zn desempeña un papel importante en la mineralización:<sup>8-13</sup> actúa como catalizador de las metaloproteinasas de la matriz para su remodelado, induce a la apoptosis a los osteoclastos maduros e inhibe su formación, y estimula la proliferación de osteoblastos.<sup>6-7</sup> Estas propiedades convertirían al Zn en un elemento que aceleraría el proceso reparativo del tejido óseo.

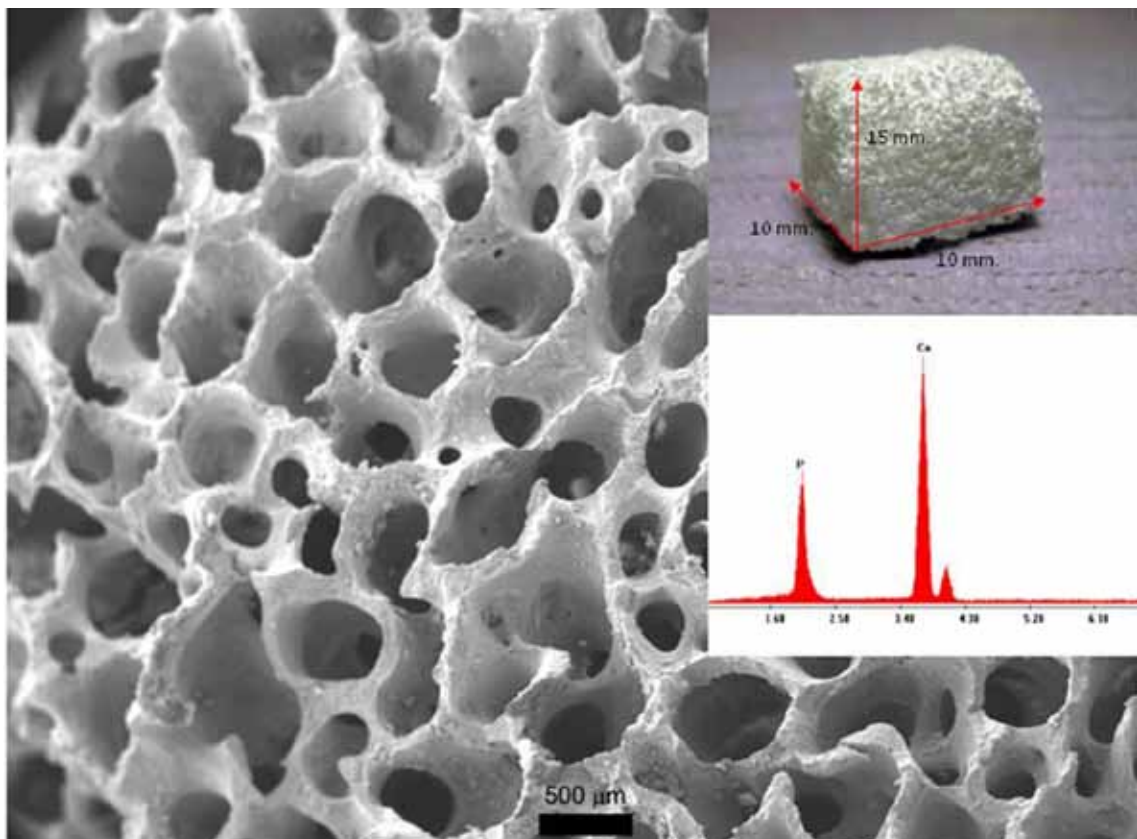
Los antecedentes referidos motivan este trabajo preliminar, que propone la síntesis de una matriz de estructura tridimensional modificándola superficialmente con Zn.

La técnica propuesta involucra la intrusión de una dispersión orgánica de partículas de ZnO en la matriz, a fin de lograr su anclaje superficial y, luego, fomentar la unión química del compuesto con la HA mediante un proceso de tratamiento térmico a alta temperatura (sinterizado).

## Materiales y métodos

### Fabricación de las matrices

La preparación de las matrices se realizó a partir de hueso esponjoso fresco de 5 cabezas femorales bovinas, que fueron cortadas en cubos de  $15 \times 10 \times 10 \text{ mm}^3$ . Se prepararon 50 piezas para ser divididas posteriormente en cinco grupos de acuerdo con la temperatura de sinterizado (900, 1000, 1100 y  $1200^\circ\text{C}$ ) y un grupo sin tratamiento. Las muestras fueron sometidas a secuencias reiteradas de lavados con soluciones acuosas de ácido acético y peróxido de hidrógeno al 1% (en peso) en agua bidestilada (Química Oeste, Argentina) y enjuagues en agua bidestilada pura, a fin de desengrasar y evitar la fijación de hemoglobina al hueso. Estas piezas fueron secadas en estufa y llevadas a un horno eléctrico (ORL, Argentina) para el pirolizado lento ( $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) de los restos orgánicos bajo flujo de aire, hasta alcanzar  $900^\circ\text{C}$ , temperatura mantenida durante 2 horas, hasta obtener cubos de hueso blanco y libre de cualquier mancha de color (Fig. 1).



**Figura 1.** Micrografía de la matriz natural de hidroxiapatita, microscopia electrónica de barrido, aumento x300. *Margen superior derecho:* Imagen macroscópica con las dimensiones de la matriz. *Debajo:* Espectro resultante del análisis elemental con espectrometría dispersiva en energía, donde se evidencia la presencia de calcio y fósforo, elementos constituyentes de la hidroxiapatita.

### **Preparación de la dispersión con partículas de ZnO**

Se prepararon 500 ml de una dispersión de partículas ZnO, de tamaño inferior a 2  $\mu\text{m}$  (Anedra, Argentina) y concentración del 2% (en peso), en una solución orgánica, constituida por una solución de 50% (en peso) de propanotriol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ) (Saporiti, Argentina) y agua bidestilada (Química Oeste, Argentina). La homogeneidad y la estabilidad de la dispersión fueron mantenidas un vaso de precipitado por medio de un agitador magnético (Decalab, Argentina) a 100 rpm y a 90°C.

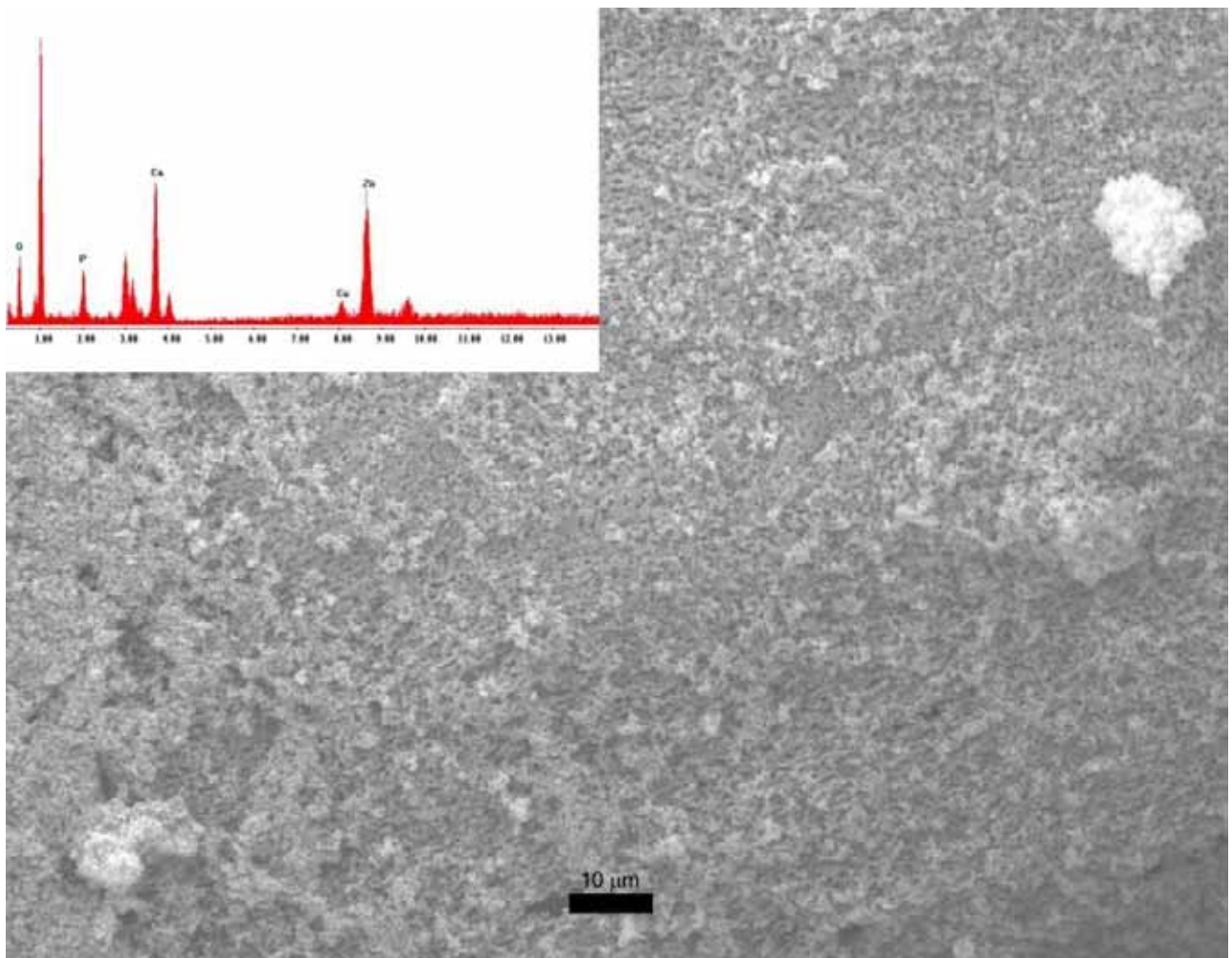
### **Preparación de la matriz funcionalizada**

Las matrices de HA fueron inmersas en una solución de ácido fosfórico (Química Oeste, Argentina) al 30% durante 20 segundos, a fin de generar una superficie más reactiva (con enlaces químicos libres), y enjuagadas en agua bidestilada (para eliminar los fosfatos solubles). Luego, las matrices fueron inmersas en la

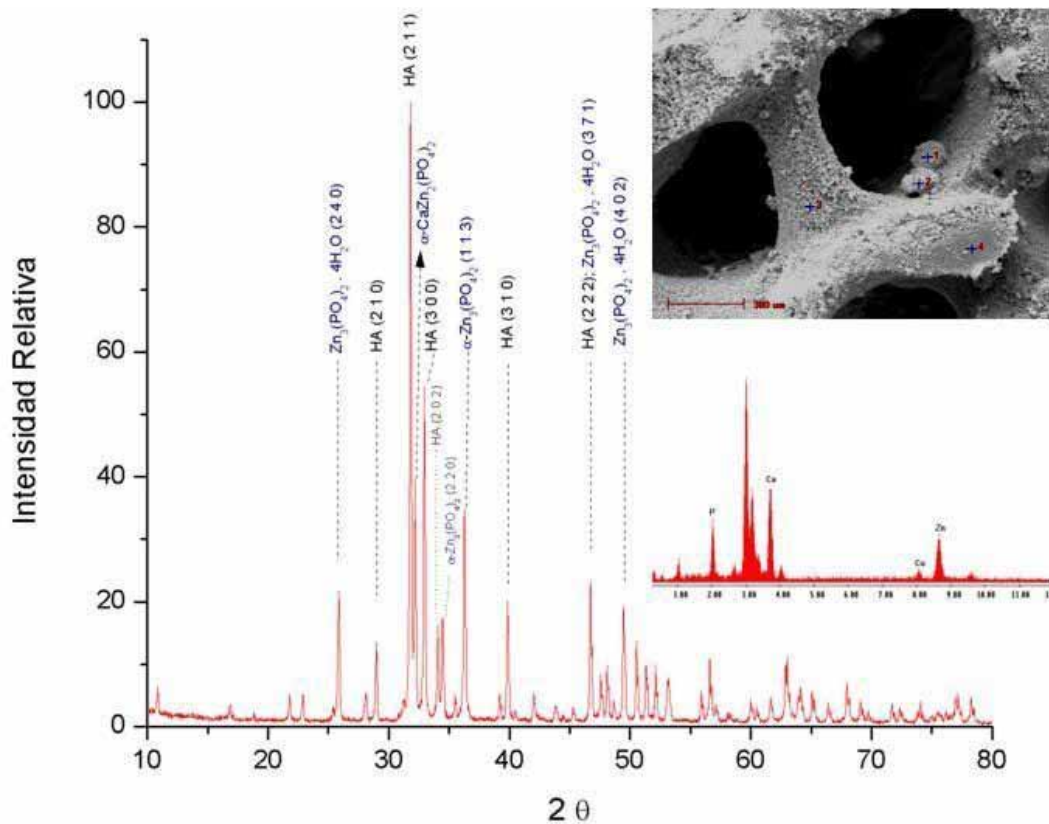
dispersión de partículas de ZnO, que es mantenida a 90°C bajo agitación, durante 20 segundos. Finalmente, los cubos fueron secados en estufa y sometidos a calentamiento lento (5°C/min), hasta las temperaturas de sinterizado a 900, 1000, 1100 y 1200°C en aire, donde permanecieron durante 2 horas.

### **Microestructura, composición química local y análisis de fases**

La microestructura y la composición química local fueron analizadas por medio de un microscopio electrónico de barrido (Philips 505, Alemania) y con un espectrómetro de rayos X (EDX, EDAX 9100, Alemania), respectivamente. Las fases cristalinas de las matrices modificadas superficialmente fueron determinadas por difracción de rayos X (XRD, Rigaku, Japón), empleando radiación de  $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$  ( $\lambda = 0,1542$  nanómetros) con filtro de Ni, utilizando un goniómetro vertical con un ángulo de barrido  $2\theta$  de 20-70° y con un paso de 0,2°.



**Figura 2.** Micrografía de la pared de la matriz tridimensional de hidroxiapatita para ingeniería de tejido óseo. Se observa la distribución uniforme de las partículas de ZnO, microscopía electrónica de barrido, aumento  $\times 1000$ . Margen superior izquierdo: Espectro resultante del análisis elemental con espectrometría dispersiva en energía, que evidencia la presencia de calcio, fósforo y zinc sobre la superficie.



**Figura 3.** Difracción de rayos X, donde se puede evidenciar la formación de compuestos hidratados y no hidratados de fosfato de zinc sobre la superficie de la matriz para ingeniería de tejido óseo. *Margen superior derecho:* Microscopia electrónica de barrido, aumento x500. Se observan las matrices modificadas en la superficie. *Margen derecho al centro:* Espectro resultante del análisis elemental con espectrometría dispersiva en energía, que evidencia la presencia de calcio, fósforo y zinc.

## Resultados

Las observaciones de las matrices en el microscopio electrónico de barrido exhiben un tamaño de poro de hasta 350-500  $\mu\text{m}$ , integrando una estructura tridimensional de porosidad interconectada. Los grupos de matrices sinterizadas a 900, 1000, 1100 y 1200°C no muestran diferencias sustanciales en la incorporación y distribución, relativamente uniforme, de las partículas con Zn de acuerdo con las comparaciones efectuadas con microscopia electrónica de barrido con la muestra sin tratamiento térmico. La concentración promedio de Zn, medida por espectrómetro de rayos X, en varias regiones de 100 x 100  $\mu\text{m}^2$  de cada tipo de matriz resulta  $(1,01 \pm 0,11)\%$  (en peso) (Fig. 2). Sin embargo, la diferencia entre las muestras sinterizadas con la no sinterizada radica en la capacidad de fijación de las partículas al sustrato de la matriz. El tratamiento térmico logra este objetivo por medio de la reacción en estado sólido del ZnO con la HA, formando un compuesto identificado como fosfatos de Zn hidratado  $[\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  y no hidratado  $[\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2]$ , además de la matriz de HA, de acuerdo con el análisis de difracción

de rayos X efectuado sobre las matrices de cada una de las temperaturas de sinterizado (Fig. 3). Esto marca una diferencia con las matrices no sinterizadas, que solo exhiben el ZnO sobre la matriz de HA.

## Discusión

El método propuesto permitió lograr una distribución relativamente uniforme de las partículas con Zn sobre las paredes de los poros de la matriz para ingeniería de tejidos, garantizando su unión química con el sustrato. El sinterizado ha permitido la formación de una nueva fase, el fosfato de Zn  $[\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2]$  o su forma hidratada  $[\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ , conocida como hopeita o parahopeita,<sup>14,15</sup> que es anclada en la superficie de la matriz, preservando la arquitectura y la estructura cristalina de la HA. Estos fosfatos son perfectamente biocompatibles, solubles en medio fisiológico<sup>16</sup> y cuentan con una disponibilidad biológica mayor que la alcanzada con procesos de síntesis química, que incorporan al Zn dentro de la estructura cristalina de la HA, y no en la superficie. Esta característica

limita seriamente la disponibilidad biológica de los iones  $Zn^{+2}$ , debido a la conocida baja solubilidad de la HA en el organismo.

La síntesis química se basa en la coprecipitación de precursores de iones de  $Ca^{+2}$ ,  $PO_4^{-3}$  y  $Zn^{+2}$ , proceso que depende del pH, la temperatura y el tiempo de reacción en soluciones acuosas,<sup>15-18</sup> donde el  $Zn^{+2}$  entra en la celda cristalina de la HA por medio de la sustitución de iones de  $Ca^{+2}$  por iones de  $Zn^{+2}$  (energéticamente desfavorable y del orden de 0,01% molar) y la ocupación de vacancias de  $Ca^{+2}$ .<sup>17</sup> Los procesos de síntesis química solo permiten la obtención de productos granulados sin estructura porosa. Esto es diferente de lo que ocurre con el sinterizado, donde se produce una reacción química de estado sólido, que favorece la unión química del  $Zn^{+2}$  a los iones  $PO_4^{-3}$ , mediada por la difusión atómica y la descomposición térmica parcial de la HA. Esta reacción ocurre solo en los cristales superficiales de la matriz, preservando la estructura porosa tridimensional, lo que resulta ventajoso desde el punto de vista biológico.

El método de sinterizado, además, permite ajustar la concentración de Zn, la cual depende de la preparación de la dispersión. En la elaboración de la matriz modificada superficialmente, se obtuvo una concentración de Zn ( $1,01 \pm 0,11$ )% (en peso). En los procesos químicos, en cambio, la concentración de Zn está limitada por la estequiometría de la HA, caracterizada por una fracción molar de Ca/P próxima a 1,67. De este modo, la incorporación

de Zn en la fracción molar (Ca+Zn)/P conduciría a un contenido molar de Zn inferior al 11,6%,<sup>17,18</sup> que equivale a un máximo de 2,5% en peso de la HA. La importancia de la concentración radica en que, según esta, variará su efecto biológico. Concentraciones inferiores al 1,5% permiten la diferenciación de osteoblastos y su proliferación, mientras que su incremento produce citotoxicidad en el tejido.<sup>19,20</sup>

En la actualidad, no hay productos comerciales que expresen estas características, por lo que estos resultados muestran un proceso efectivo de síntesis haciendo uso de un material de origen natural, abundante en nuestro país, que provee un sustrato adecuado, a bajo costo. El paso futuro implicaría el ensayo biológico que corrobore la potencialidad de esta matriz para ingeniería de tejidos.

## Conclusión

El presente trabajo demostró la capacidad de implementar, en forma sencilla, un método de síntesis de matrices tridimensionales, modificadas con Zn, con potenciales propiedades osteoconductoras, antimicrobianas y aceleradoras del proceso reparativo del tejido óseo. Este resultado es alentador a la hora de proponer un material de reemplazo óseo que disminuya el riesgo de infección y tenga una elevada bioactividad, en comparación con los biomateriales disponibles en la actualidad.

## Bibliografía

1. Henkel K, Gerber T, Dörfling P, Gundlach K, Bienengraber V. Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;33:45-9.
2. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Chem Eng Research Design* 2007;85:1051-64.
3. Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials* 2010;31:1465-85.
4. Ronen A, Semiat R, Dosoretz CG. Antibacterial efficiency of a composite spacer containing zinc oxide nanoparticles. *Proc Engineering* 2012;44:581-2.
5. Wang T, Zhang J, Chen Y, Xiao P, Yang M. Effect of zinc ion on the osteogenic and adipogenic differentiation of mouse primary bone marrow stromal cells and the adipocytic trans-differentiation of mouse primary osteoblasts. *J Trace Elem Med Biol* 2007;21:84-91.
6. Hie M, Iitsuka N, Otsuka T, Nakanishi A, Tsukamoto I. Zinc deficiency decreases osteoblasts and osteoclasts associated with the reduced expression of Runx2 and RANK. *Bone* 2011;49:1152-9.
7. Yang L, Perez-Amodio S, Barrère-de Groot F, Everts V, Blitterswijk C, Habibovic P. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. *Biomaterials* 2010;31:2976-89.
8. Peretz A, Papadopoulos T, Willems D, Hotimsky A, Michiels N, Siderova V, et al. Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men. *J Trace Elem Med Biol* 2001;15:175-8.
9. Ito A, Otsuka M, Kawamura H, Ikeuchi M, Ohgushi H, Sogo Y, Ichinose N. Zinc-containing tricalcium phosphate and related materials for promoting bone formation. *Current Applied Physics* 2005;5:402-6.
10. Storrie H, Stupp S. Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials* 2005;26:5492-9.

11. **Wanga X, Ito A, Sogo Y, Li X, Oyane A.** Zinc-containing apatite layers on external fixation rods promoting cell activity. *Acta Biomaterialia* 2010;6:962-8.
12. **Nagata M, Lönnnerdal B.** Role of zinc in cellular zinc trafficking and mineralization in a murine osteoblast-like cell line. *J Nutr Biochem* 2011;22:172-8.
13. **Toledano M, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Osorio R.** A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *J Dent* 2012;40:756-65.
14. **Pawlig O, Trettin R.** Synthesis and characterization of  $\alpha$ -hopeite,  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ . *Materials Research Bulletin* 1999;34:1959-66.
15. **Chao GY.** Refinement of the crystal structure of parahopeite. *Zeits Krist* 1969;130:261-6.
16. **Anusavice KJ.** Dental cements for bonding applications. En: Anusavice KJ, Phillips RW. *Phillips' Science of Dental Materials*, 11a ed. Philadelphia: *Saunders*; 2003:565-7.
17. **Gomes S, Nedelec JM, Renaudin G.** On the effect of temperature on the insertion of zinc into hydroxyapatite. *Acta Biomater* 2012;35:1180-9.
18. **Mayer I, Featherstone JD.** Dissolution studies of Zn-containing carbonated hydroxyapatites. *J Crystal Growth* 2000;219:98-101.
19. **Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi N.** Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000;50:178-83.
20. **Bandyopadhyay A, Withey EA, Moore J, Susmita B.** Influence of ZnO doping in calcium phosphate ceramics. *Materials Science and Engineering* 2007;27:14-17.