

# Biomíneralización en cerámicas nanoestructuradas de aluminato de cinc

Álvarez-Pérez M.A.\*  
García-Hipólito M.\*\*  
de la Fuente-Hernández J.\*  
Suárez-Franco J.L.\*\*\*  
Juárez-Islas J.A.\*\*  
Álvarez-Fregoso O.\*\*

\* Laboratorio de Bioingeniería Celular,  
Facultad de Odontología, Universidad  
Nacional Autónoma de México, México,  
D.F.

\*\* Instituto de Investigaciones en Materiales,  
Universidad Nacional Autónoma de Méxi-  
co, México, D.F.

\*\* Facultad de Odontología Río Blanco,  
Universidad Veracruzana, Río Blanco  
Veracruz.

Correspondencia:

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez.  
Laboratorio de Bioingeniería Celular. Facultad  
de Odontología, Universidad Nacional Autó-  
noma de México 04510, México, D.F., E-mail:  
marcoalv@servidor.unam.mx

Artículo recibido: 10/octubre/2009

Artículo aceptado: 16/marzo/2010

## Nomenclatura:

ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: aluminato de cinc  
MEC: matriz extracelular  
Ts: temperatura de sustrato  
MEB: microscopio electrónico de barrido  
MFA: microscopio de fuerza atómica  
DMEM: medio de cultivo mínimo esencial de  
Eagle modificado por Dulbecco  
SFB: suero fetal bovino  
PBS: solución amortiguadora de fosfatos  
SDS: dodecilsulfato de sodio  
MET: microscopio electrónico de transmi-  
sión  
XRD: difracción de rayos X  
EDS: espectroscopia de dispersión de  
energía

Este artículo también puede ser consultado en  
versión completa en: <http://www.medigraphic.com/ingenieriabiomedica/>

## RESUMEN

Las cerámicas nanoestructuradas en película delgada se han propuesto como una nueva opción de recubrimientos en implantes ortopédicos y dentales. Con esto en mente, se realizó un estudio para investigar el efecto de la nanotopografía en el proceso de biomíneralización por medio de la preparación de películas delgadas con base en el aluminato de cinc con morfología nanométrica por el método de rocío pirolítico. Los resultados obtenidos al cultivar células osteoblásticas en las nanocerámicas, indicaron que la superficie nanométrica del material propuesto incrementa la adhesión celular cuando se comparan con las superficies del material control. Se puede argumentar que la superficie en rangos nanométricos cambia las propiedades del material cerámico al comportarse como un material con superficie bioactiva. Esta bioactividad se demuestra con el incremento en la biomíneralización de la matriz extracelular y en el incremento ordenado del tejido mineral depositado. Por los resultados obtenidos, se propone al aluminato de cinc nanoestructurado como una cerámica biocompatible que proporciona un ambiente nanoestructurado similar al hueso favoreciendo la formación de mineral y la cual puede aplicarse en un futuro como recubrimiento de materiales de implante en el área dental y ortopédica en México.

**Palabras clave:** Cerámicas nanoestructuradas, películas delgadas, biomíneralización.

## ABSTRACT

In recent years, the nanomaterials have been proposed like a new option to increase the cellular response onto dental and orthopedic implants. With this in mind, it has been developed a study to investigate the effect of the nanotopography of one ceramic compound on the biomíneralization process. In this case we use zinc aluminate films, deposited by spray pyrolysis technique, with nanometer sized morphologies. The obtained results, when culture osteoblastic cells onto nanoceramics, indicated that the nanometer sized surface of the proposed material increased the cellular adherence, as compared with the surfaces of the reference material. From the above-mentioned result, it can be deduced that the nanometer sized surface changes the properties of the ceramic material to behave as a material with a bioactive surface. This bioactivity is manifested with the increment in the biomíneralization of the extracellular matrix and in the orderly rise of the mineral tissue deposited. According to the obtained results, we propose to the zinc aluminate films like a biocompatible ceramic which provides a similar nanometer sized ambient comparable with that of the human bone where biomíneralization is favored. Such films can be applied on the implant materials in the dental and orthopedic area in our country.

**Key words:** Nanostructured ceramics, thin films, biomíneralization.

## INTRODUCCIÓN

Con la tendencia mundial de una mayor expectativa de vida y en consecuencia el aumento de la población adulta en nuestro país, los sustitutos biológicos han tomado una gran relevancia para lograr un aumento o reemplazo funcional de tejidos u órganos del cuerpo humano<sup>1-4</sup>. Con respecto al hueso, los biomateriales metálicos, cerámicos o poliméricos son comúnmente utilizados para restaurar su función, debido a que mejoran las interacciones que existen entre las células osteoblásticas y la superficie del material de implante<sup>5</sup>. Sin embargo, en los últimos años, los trabajos realizados para entender estas interacciones, sugieren que los eventos que controlan la respuesta célula-sustrato pueden delimitarse a dos propiedades importantes: (I) las propiedades fisicoquímicas de la superficie del biomaterial y; (II) la topografía superficial que presenta el biomaterial<sup>6</sup>. De estas propiedades, la que más atención ha recibido por parte de los investigadores del área de la ingeniería de tejidos mineralizados, es la referida a la topografía superficial. Esta propiedad, la cual puede conceptualizarse como la morfología del sustrato en cuanto a tamaño, forma y textura; se ha tornado como uno de los parámetros importantes que afecta la respuesta de los osteoblastos cuando se utilizan biomateriales para sustituir o regenerar el tejido óseo<sup>7-10</sup>.

En años recientes, con los avances en la tecnología, las investigaciones enfocadas a la regeneración del tejido óseo se han centrado con gran interés en explorar la aplicación biomédica de los nanomateriales. En especial, en las nuevas propiedades fisicoquímicas y de topografía superficial que pueden presentar los nanomateriales, cuando se comparan con los materiales convencionales<sup>11,12</sup>.

Lo anterior contrasta con la consideración de que el hueso se visualiza como un material nanoestructurado, compuesto por entidades biológicas tales como: proteínas colágenas y no colágenas y cristales de hidroxiapatita, que poseen dimensiones nanométricas en su matriz extracelular (MEC). Por ejemplo, la dimensión del cristal de hidroxiapatita en el hueso natural es de 50 a 100 nm en longitud y de 1 a 10 nm en diámetro, mientras la colágena tipo I presenta 300 nm en longitud y 0.5 nm de diámetro<sup>13</sup>. Es claro entonces, que las células osteoblásticas están naturalmente acostumbradas a interactuar

con estructuras biológicas y con topografías en la escala de nanómetros. Esto ha llevado a estudiar las nuevas propiedades de los nanomateriales, principalmente las nanocerámicas de alúmina, óxido de titanio e hidroxiapatita<sup>2</sup>; haciendo uso de los cultivos celulares *in vitro*. Los estudios realizados hasta la fecha, reportan que los osteoblastos son células capaces de percibir, sentir y de utilizar la nanotopografía para orientarse y migrar a través de ella<sup>14-17</sup>. Asimismo, los estudios están comparando las geometrías topográficas –*nanoesferas, nanotubos, nanoagujas, nanofibras, nanocolumnas, entre muchas otras*– de las distintas nanocerámicas con la respuesta de los osteoblastos; sugiriendo que la respuesta de los osteoblastos en cuanto a la adhesión se ve afectada dependiendo de la geometría superficial. Aunque se propone que las células podrían reaccionar de la misma forma a topografías con características similares, aun y cuando su composición química sea diferente. Lo cual ha llevado a sugerir que los osteoblastos responderían mejor a geometrías en nanoescalas debido a que mimetizan la estructura de la MEC en el hueso natural. Sin embargo, mientras emergen datos sugiriendo que las células osteoblásticas responden favorablemente a topografías que presenten dimensiones nanométricas y altamente porosas, el mecanismo para entender el papel de la nanotextura superficial en el proceso de biomíneralización *in vitro* aún no ha sido completamente investigado<sup>18-20</sup>.

Con esta interrogante, nuestro laboratorio desarrolló la nanocerámica de aluminato de cinc ( $ZnAl_2O_4$ ); la cual en su fase convencional ha estado utilizándose en el área dental y ortopédica, debido a que es un biomaterial que presenta ventajas en cuanto a su alta resistencia mecánica, su alta resistencia a la fractura y su diferente estructura cristalográfica dependiente de la temperatura. Los estudios realizados muestran que la cerámica nanoestructurada de  $ZnAl_2O_4$  resulta en una topografía con morfología esferoide organizada a escala nanométrica. Por ello, el interés de este trabajo radica en caracterizar la morfología superficial y la composición química de la película delgada de  $ZnAl_2O_4$  depositada por el método de rocío pirolítico ultrasónico y evaluar la adhesión celular de los osteoblastos y su diferenciación celular al ser cultivados sobre las cerámicas de  $ZnAl_2O_4$  en un modelo *in vitro*, para proponerse como una alternativa a futuro de recubrimiento cerámico de implantes de uso dental y ortopédico.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Depósito y caracterización de las cerámicas nanoestructuradas

El proceso de elaboración de las cerámicas en película delgada, se llevó a cabo por la técnica de rocío pirolítico ultrasónico, utilizando soluciones de 0.05 M de acetato de cinc dihidratado + 0.05M de cloruro de aluminio hexahidratado. Esta técnica consiste de un generador ultrasónico que trabaja a 800 kHz, localizado en la parte inferior del contenedor de plástico para producir un fino vapor desde la solución precursora. El vapor es dirigido a un sustrato caliente localizado sobre un baño caliente a través de un tubo que contiene aire filtrado como portador a una velocidad de flujo de  $10\text{ L min}^{-1}$ . La distancia de la boquilla al sustrato fue colocada a 1 cm para el depósito de las películas delgadas. En la elaboración de las cerámicas se controló la temperatura del sustrato ( $T_s$ ) que fue de  $550^\circ\text{C}$ ; lo cual permitió controlar la distribución de la altura y el ancho de las partículas depositadas a un tiempo de 5 minutos. Para el depósito de las películas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  se utilizaron sustratos de vidrio de  $1.5\text{ cm}^2$  (Corning glass 7059). La caracterización estructural de las cerámicas fue por medio de difracción de Rayos X utilizando el equipo Siemens D-5000. Para caracterizar la morfología superficial de las cerámicas (fases nanoestructuradas) se utilizó la técnica de microscopia electrónica de barrido (MEB) por medio del microscopio SEM: Leica-Cambridge 440 y el microscopio de fuerza atómica: Jeol JSPM-4210. Por último, para caracterizar la composición química de las cerámicas se usó la técnica de dispersión de energía (EDS) por medio del microscopio SEM acoplado con el detector Pentafet con microsonda marca Oxford.

### CULTIVO CELULAR

Para caracterizar la biocompatibilidad y la biomineralización sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  se utilizaron células osteoblásticas; las cuales se mantuvieron en un medio de cultivo mínimo esencial de Eagle modificado por Dulbeco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), una solución de antibióticos (penicilina (100 UI/ml), estreptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y fungisona (0.3  $\mu\text{g/ml}$ ), 100mM de aminoácidos no esenciales y 100 mM de piruvato de sodio. Para inducir el proceso de biomineralización, al medio se le adicionó 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato y 50  $\mu\text{g/}$

ml de ácido ascórbico («medio mineralizante»). Para el trabajo experimental se utilizaron cultivos celulares en el 2<sup>do</sup> pasaje. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  en un ambiente con 100% de humedad.

### ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR

Para establecer el efecto de la nanotopografía de las cerámicas sobre la adhesión celular, los osteoblastos fueron cultivados sobre las cerámicas nanoestructuradas en placas de cultivo de 12 pozos a una densidad celular de  $1 \times 10^3$  y se cultivaron durante 24 horas; pasado este tiempo, las células que no se adhirieron a las superficies fueron removidas por medio de tres lavados con buffer de fosfatos (PBS), fijadas con 4% de paraformaldehído por 5 minutos e incubadas con 0.1% de azul de toluidina por 4 horas. Para remover el colorante no específico se realizaron 3 lavados con PBS y posteriormente el colorante fue extraído con 500  $\mu\text{l}$  de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución obtenida se tomaron 100  $\mu\text{l}$  que se colocaron en un pozo de una placa de 96 pozos para obtener su absorbancia a una longitud de onda de 605 nm<sup>21</sup>. Los valores de la absorbancia obtenidos fueron utilizados para obtener el porcentaje de células adheridas a las cerámicas nanoestructuradas normalizadas contra un sustrato de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  igualmente procesado con azul de toluidina sin células para restar el valor obtenido de la lectura de absorbancia. Los cultivos controles fueron las células sembradas sobre sustratos de vidrio. Los experimentos de adhesión celular se realizaron por triplicado repitiéndose al menos tres veces.

### ENSAYO DE BIOMINERALIZACIÓN

Para analizar el efecto de la nanotopografía en el proceso de biomineralización enfocado principalmente en el depósito del mineral, las células osteoblásticas fueron sembradas a una densidad celular de  $2 \times 10^3$  sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  y cultivadas bajo medio inductor de la biomineralización durante 15 días. Al término del periodo experimental, el tejido mineral depositado fue analizado por microscopia de fuerza atómica. Esta técnica se utilizó para determinar el papel que juega la superficie nanométrica de las cerámicas sobre la morfología del mineral depositado por las células osteoblásticas. Se utilizó un microscopio

Jeol JSPM-4210 en modalidad de contacto y modo constante de fuerza de 5 nN. Así mismo la composición elemental del tejido mineral formado por las células osteoblásticas cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM Leica-Cambridge 440) equipado con el aditamento Pentafet y la microsonda para el microanálisis con rayos X (EDS). La evaluación de la biomíneralización se llevó a cabo al realizar mapeos de composición buscando los elementos de calcio (Ca) y fósforo (P) a 20 kV por 300 y 600 segundos. Por último, para determinar las características de la fase mineral formada, el mineral depositado fue extraído levantando con una navaja de un solo filo; centrifugadas con agua bidestilada a 5,000 rpm para obtener limpia la fase mineral y posteriormente lavadas 3 veces con agua desionizada. Esta fase mineral fue colocada sobre rejillas de cobre recubiertas con una delgada capa de carbón para determinar el patrón de difracción electrónico. Los patrones de difracción de los espacios interplanares-D fueron calibrados contra aquéllos obtenidos con el estándar de oro evaporado al vacío sobre rejillas de cobre y en idénticas condiciones de difracción para la hidroxiapatita. La fase mineral fue analizada con un MET Jeol 120 CX a 100 kV.

## RESULTADOS

### Caracterización de las cerámicas nanoestructuradas

Las películas delgadas depositadas a una temperatura de 550°C por 3 minutos fueron caracterizadas por medio de las técnicas mencionadas anteriormente para determinar sus propiedades cristalinas y de morfología superficial. Los patrones de difracción de rayos X (XRD), muestran picos con anchuras considerables debido a las dimensiones nanométricas de los cristallitos que conforman la cerámica de  $ZnAl_2O_4$ . Aquí es bueno indicar que el ensanchamiento de los picos de difracción es debido a los cristallitos más pequeños en la cerámica.

Con dichos patrones de XRD se obtuvieron los parámetros de red cristalina utilizando la ecuación de difracción de Bragg:

$$2d_{hkl} \text{ Sen}\theta = n\lambda, \quad (1)$$

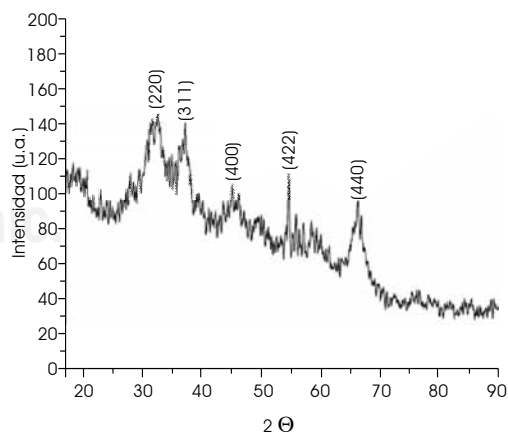
Donde:  $d_{hkl}$  indica los planos de difracción de Bragg,  $\theta$  es el ángulo de difracción,  $n$  es un entero y  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X. El valor del

parámetro de red experimental:  $A = 0.8086$  nm, el cual concuerda con el valor reportado teórico:

$$A = 0.8084 \text{ nm} \quad (2)$$

Para la fase cúbica de la espinela-gahnita de  $ZnAl_2O_4$  (ICCD Card File N°. 5-669)<sup>22</sup>. Por otro lado, utilizando la fórmula de Debye-Scherrer:  $D = 0.9 \lambda / \delta\theta \text{ Cos } \theta$  Donde:  $D$  es el diámetro del cristal asociado al pico de difracción de los patrones XRD y  $\delta\theta$  es el ensanchamiento correspondiente al pico analizado. Con la anterior fórmula junto con el programa WinSize de equipo Siemens de rayos X D5000 se obtuvieron los valores del tamaño de los cristales que conforman a la cerámica de  $ZnAl_2O_4$ . El promedio del diámetro de los cristales se encontró alrededor de 20 a 30 nm a partir de los difractogramas de XRD (Figura 1). Los mapeos topográficos de la superficie de aluminato de cinc con el microscopio de fuerza atómica (MFA) muestran que la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  presenta un arreglo en su superficie de granos a manera de semiesferas uniformemente distribuidas. Por medio del programa de rugosidad del MFA se obtuvieron los tamaños de grano, los cuales indican un tamaño promedio de alrededor de 30 a 85 nm, por esta razón, los granos se consideran como constituidos por dos o más cristales nanométricos del orden de 20 a 30 nm en promedio, como lo indica el difractograma de rayos X (Figura 2).

La composición química de las cerámicas se determinó por medio de la técnica de espectroscopia de dispersión de energía (EDS) que consiste en irradiar con el haz de electrones del SEM la superficie de la cerámica, lo que induce

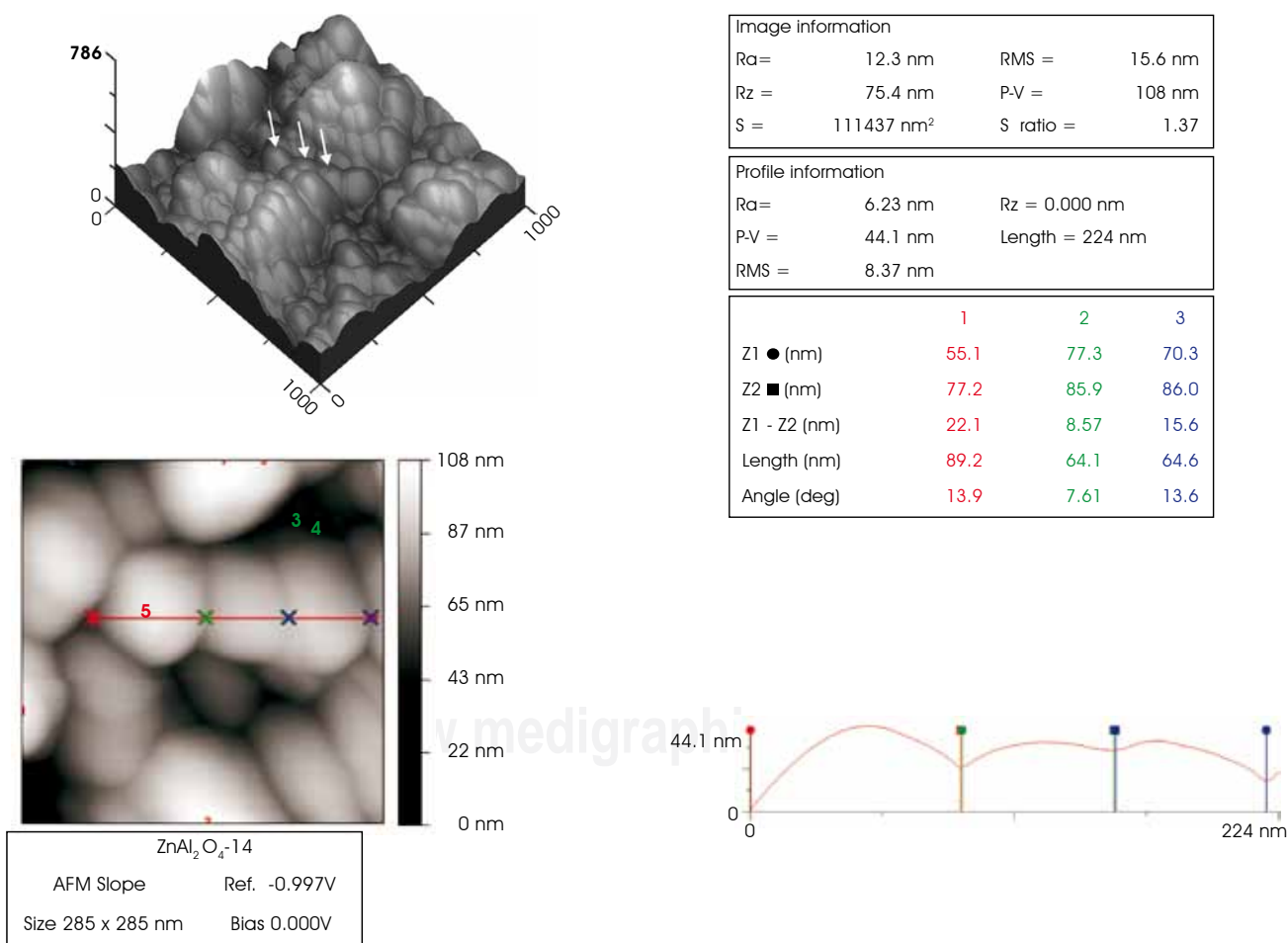


**Figura 1.** Difractograma de Rayos X de la cerámica de aluminato de cinc depositada a una  $T_s$  de 550°C.

transiciones electrónicas en los niveles K, L y M de los átomos que constituyen a la cerámica y en su desexcitación, emiten rayos X en el nivel de energía correspondiente al átomo característico que fue excitado por los electrones del MEB. Los estándares de energía asociados a cada átomo para obtener la composición química se adquirieron del programa: Multi-elementos químicos estándares de referencia Microspec serial 0034, parte N° 8160-53 ubicados en la PC del SEM. La composición química de la película cerámica se determinó a partir del análisis del espectro de EDS. Los resultados experimentales promedio son: 56.49% de oxígeno; 13.57% de cinc; 27.83% de aluminio y 2.11% de cloro, los cuales al compararse con la composición teórica (56% de oxígeno; 14% de cinc y 28% de aluminio), indican una estructura estequiométrica de la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  impurificada con cloro<sup>23</sup>.

### CARACTERIZACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD CELULAR

La caracterización de la biocompatibilidad se realizó con el objeto de investigar si la nanotopografía de la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  afecta la respuesta celular de los osteoblastos, utilizando el sistema de cultivo celular *in vitro*. En las imágenes de microscopía óptica de las células osteoblásticas teñidas con azul de toluidina al 0.1%, para obtener los porcentajes de las células adheridas a las cerámicas de  $ZnAl_2O_4$  con respecto al control, se observa la expansión celular con las prolongaciones citoplásmicas formando un mayor número de contactos del citoesqueleto celular que se adhieren a los granos nanocerámicos (Figura 3B). Por otro lado, en los cultivos control se observa la morfología aplanada y lenticular de las células osteoblásticas (Figura 3A). El número de células osteoblásticas adheridas



**Figura 2.** Imagen de microscopía de fuerza atómica de la morfología nanoestructurada a manera de aglomerados semiesféricos de la cerámica de aluminato de cinc.

a las superficies de  $ZnAl_2O_4$  mostró un incremento del 86% ( $p < 0.05$ ) cuando se comparan con los controles a un tiempo de cultivo celular de 24 horas.

### ENSAYO DE BIOMINERALIZACIÓN

El ensayo de la biomineralización se realizó para determinar el efecto de la nanotopografía de las cerámicas de aluminato de cinc sobre el depósito de tejido mineral. El análisis del tejido mineral depositado por las células osteoblásticas al ser cultivadas sobre las cerámicas nanoestructuradas de  $ZnAl_2O_4$  y sobre los sustratos control a un tiempo de 15 días por microscopia de fuerza atómica, permitió caracterizar la disposición morfológica que adquiere el tejido mineral. En los cultivos controles la disposición del tejido mineral consiste de una delgada capa homogénea que cubre toda la superficie del sustrato (Figura 4A) sin porosidad aparente, mientras que, en la superficie cerámica se observan crecimientos minerales granulares, aglomeraciones del tipo columnar y zonas tipo laja que asemejan a la morfología del hueso esponjoso (Figura 4B). Asimismo, el análisis elemental del tejido mineral depositado sobre la cerámica de aluminato de cinc, se llevó a cabo por un tiempo de análisis de 600 seg, en tres zonas diferentes y pidiendo al programa de multielementos químicos únicamente la composición elemental de calcio y fósforo para obtener la composición de las zonas homogéneas de los nódulos mineralizados en la superficie de  $ZnAl_2O_4$ . Los resultados mostraron un aumento en la composición elemental que se refleja en una mayor razón de Ca/P debido a que el efecto de la nanotopografía fue aumentar la diferenciación celular y con ello aumentar el depósito de tejido mineralizado cuando se comparan con los cultivos control (Cuadro 1).

Por otro lado, para determinar si el proceso de biomineralización celular induce un depósito de mineral del tipo amorfo o cristalino, se procedió a

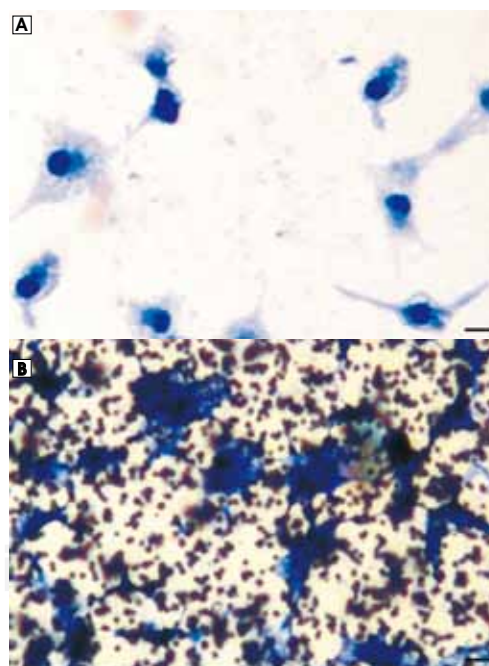
**Cuadro 1.** Valores de la razón Ca/P de la composición elemental del tejido mineral depositado.

Sustrato	Biomíneralización a	
	15 días	Razón Ca/P
Control	35.83 % de Ca	1.48
(sustrato de vidrio)	24.16 % de P	
Cerámica nanoestructurada de $ZnAl_2O_4$	56.11 % de Ca	1.63
	34.27 % de P	

hacer un análisis del patrón de difracción electrónica del tejido mineral depositado por medio de microscopia electrónica de transmisión. En la Figura 5, se ilustra el patrón de difracción correspondiente al mineral depositado sobre los sustratos, el cual indica un patrón de puntos y anillos concéntricos. Estos últimos corresponden a la difracción de los cristalitas en el tejido mineral indicando un material policristalino. Los puntos difractan con un eje de zona [0 0 1] que para un material tipo hexagonal genera el conjunto de índices (h, k, l) mostrado en la Figura 5 y que corresponden a las difracciones generadas por un mineral policristalino de hidroxiapatita hexagonal de grano fino. Los puntos extras de difracción se deben a otros cristalitas del mineral de hidroxiapatita de acuerdo a lo reportado en la tarjeta de difracción<sup>24</sup>: ICCD-09-0432, y al procedimiento de indización reportado por Edington<sup>25</sup>.

### DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluaron diversos procesos celulares involucrados en el proceso de oseointegración como: adhesión celular y mineralización de



**Figura 3.** Imagen de la morfología del citoesqueleto de las células osteoblásticas cultivadas sobre el sustrato control (A) y sobre el material nanoestructurado de  $ZnAl_2O_4$  (B) después de 24 horas de cultivo celular, teñidos con 0.1% de azul de toluidina. El campo de visión de la imagen es de 20X. Barra = 10  $\mu$ m.

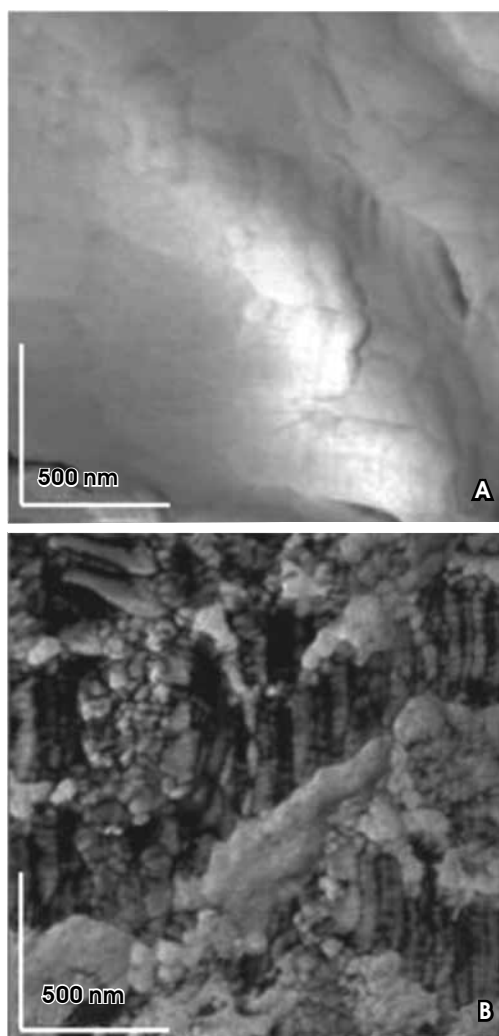
la matriz extracelular de las células osteoblásticas cultivadas sobre superficies nanoestructuradas de aluminato de cinc ( $ZnAl_2O_4$ ) en un modelo de cultivo celular *in vitro*.

Los resultados obtenidos de los ensayos de adhesión celular muestran que la superficie de la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  favorece la adhesión de las células osteoblásticas cuando se comparan con las superficies de vidrio que sirvieron como control. Este incremento en la adhesión celular, indica que las propiedades de superficie de las semiesferas que conforman a la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  aumen-

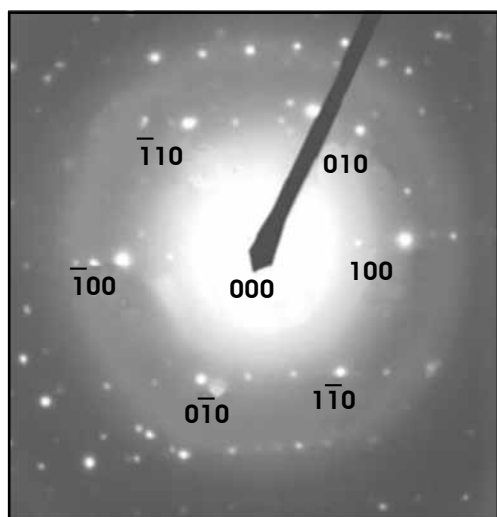
tarían la cantidad de proteínas adheridas a su superficie, incrementando el área de contacto o puntos focales de la célula osteoblástica y con ello la organización más rápida del citoesqueleto sobre la topografía de la cerámica de aluminato de cinc. Esto puede observarse en la imagen de la Figura 3B, donde las células osteoblásticas se encuentran en íntimo contacto con la superficie con un incremento en las prolongaciones citoplasmáticas por área. Esto concuerda con los resultados de investigaciones recientes que reportan que el tamaño de grano juega un papel esencial en mediar la adhesión celular en nanofases cerámicas y que el incremento en la adhesión es dependiente sólo cuando la nanofase presenta un tamaño homogéneo en la superficie topográfica del material<sup>26,27</sup>.

Las superficies como se puede observar en las imágenes topográficas obtenidas por MFA presentaron un tamaño de grano de alrededor de 30-80 nm; por lo cual la superficie presenta una influencia directa sobre la respuesta celular de los osteoblastos. Esta influencia en la interacción célula-nanosuperficie nos proporciona datos sobre si el material puede ser tóxico o bien comenzar a liberar a corto plazo los iones que conforman su fase cristalina, comprometiendo las funciones celulares de los osteoblastos.

Los resultados muestran que la topografía de la cerámica de aluminato de cinc incrementa la adhesión celular, lo cual indica que la rugosidad superficial tiene un efecto positivo, permitiendo a las células osteoblásticas realizar sus funciones metabólicas asociadas a una mayor producción de proteínas de matriz extracelular que juegan un papel primordial en la formación del tejido mineralizado. Por ello, la funcionalidad y la biocompatibilidad celular de las células osteoblásticas se ve influenciada favorablemente por la característica nanométrica de la superficie de la cerámica de aluminato de cinc. Esto último concuerda con los resultados obtenidos al caracterizar los nódulos del tejido mineral depositado por las células osteoblásticas sobre las cerámicas de  $ZnAl_2O_4$ . Dicho tejido mineral al ser sometido a un análisis elemental por EDS mostró en su composición la presencia de calcio y fósforo, con una razón de 1.63, valor reportado similar a la hidroxiapatita biológica. Sin embargo, a diferencia de otros trabajos en los que sólo se ha estudiado la presencia de nódulos mineralizados, en este estudio se determinó la morfología que adoptan los cristales de hidroxiapatita del tejido mineral depositado sobre las cerámicas de  $ZnAl_2O_4$ . Los resultados de los patrones de difracción de



**Figura 4.** Imagen de microscopia de fuerza atómica del tejido mineral depositado por las células osteoblásticas a manera de aglomerados sobre los sustratos control a los 15 días de cultivo celular *in vitro* (A). Morfología del tejido mineral a manera de placas porosas depositado por las células osteoblásticas sobre la cerámica de  $ZnAl_2O_4$  a los 15 días de cultivo celular *in vitro* (B).



**Figura 5.** Patrón de difracción electrónica del tejido mineral depositado a 15 días de cultivo celular con un eje de zona:  $[0\ 0\ 1]$ .

rayos X, junto con las imágenes de MFA; muestran que la superficie de las cerámicas de aluminato de cinc tienen una influencia directa sobre la formación del tejido mineral que crece generalmente entre y sobre la superficie porosa de la cerámica de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ . Sin embargo, es difícil aún explicar la razón por la cual esta nanocerámica favorece la oseointegración del cristal de hidroxiapatita en los tamaños de granos que conforman la estructura de la cerámica de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ . Sin duda, la primera respuesta podría enfocarse a la composición química y/o a las nuevas propiedades de superficie que adopta el nanomaterial. Esta nueva propiedad que adopta la nanocerámica favorece la interacción de las proteínas del medio, incrementando la adhesión celular y con ello la posterior proliferación celular que se refleja en un incremento en la secreción de proteínas de matriz extracelular que se pueden asociar en este estudio al aumento de la biomíneralización celular. Lo cual toma relevancia debido a que existen diversas proteínas que regulan el crecimiento del tejido mineral depositado. La propuesta de cómo podría darse el crecimiento mineral en forma de lajas y columnas del tejido mineral es suponiendo que los osteoblastos podrían estar formando grandes redes nanoestructuradas de fibras de colágena tipo I, en las cuales puede estar asociada la sialoproteína ósea, proteína que podría estar nucleando los cristales de hidroxiapatita sobre esta matriz extracelular nanoestructurada, mientras que la osteocalcina, otra proteína de matriz extracelular, al localizarse principalmente en

las estructuras nodulares, podría estar regulando la forma y el tamaño de los cristales de hidroxiapatita, determinando así su crecimiento granular, de aglomeraciones del tipo columnar y tipo laja sobre la superficie de la cerámica de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  como se observa en la figura 4B<sup>28, 29</sup>. Sin embargo, se necesitan llevar a cabo más estudios enfocados a evaluar la cantidad de proteínas de matriz extracelular que se están expresando, así como las vías de señalización durante la inducción del proceso de biomíneralización de las células osteoblásticas al estar en presencia de la superficie nanométrica de la cerámica de aluminato de cinc.

## CONCLUSIONES

En este estudio se determinó una respuesta favorable de biocompatibilidad de las células osteoblásticas sobre la superficie de cerámicas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$ ; evaluada por medio de la adhesión celular.

La nanotopografía lograda por el método de rocío pirolítico ultrasónico de las cerámicas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  (medida en función del tamaño de grano) influyeron o tienen un efecto directo sobre la biomíneralización de la matriz extracelular depositada por los osteoblastos en el modelo de cultivo celular *in vitro*.

Por último, las películas delgadas de  $\text{ZnAl}_2\text{O}_4$  representan una opción de recubrimiento biocompatible en implantes dentales y ortopédicos de desarrollo nacional, ya que no presentan ningún signo de toxicidad y proveen un medio adecuado para la biocompatibilidad del material cerámico a las células osteoblásticas humanas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores le dan agradecimientos a J. Guzmán, C. Flores, H. Zarco, O. Novelo-Peralta y R. Reyes-Ortiz por su asistencia técnica durante el curso de este estudio. Esta investigación fue financiada por DGAPA-UNAM proyecto IN200808 a MAAP.

## REFERENCIAS

1. Rouahi M, Champion E, Hardouin P, Anselmo K. Quantitative kinetic analysis of gene expression during human osteoblastic adhesion on orthopaedic materials. *Biomaterials* 2006; 27: 2829-2844.
2. Burg K, Porter S, Kellam JF. Biomaterials developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*; 2000, 21: 2347-2359.
3. Meyer U, Joos U, Weissman HP. Biological and biophysical principles in extra corporal bone tissue engineering Part I. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33: 325-332.



4. Storrie H, Stupp SI. Cellular response to zinc-containing organoapatite: An *in vitro* study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials* 2005; 26: 5492-5499.
5. Sakiyama-Elbert SE, Hubbell JA. Functional biomaterials: design of novel biomaterials. *Ann Rev Mat Res* 2001; 31: 183-201.
6. Brunski JB, Puleo DA, Nanci A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; 15: 15-46.
7. Dalby MJ, Di Silvio L, Davies GW, Bonfield W. Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts *in vitro*. *J Mat Sci Mater Med* 2000; 11: 805-810.
8. Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Liu Y, Cochran CD, Dean DD, Schwartz Z. Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 1998; 19: 2219-2232.
9. Masaki Ch, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblasts gene expression. *Clin Oral Impl Res* 2005; 16: 650-656.
10. Dalby MJ, Giannaras D, Riehle MO, Gadegaard N, Affrossman S, Curtis ASG. Rapid fibroblasts adhesion to 27 nm high polymer demixed nano-topography. *Biomaterials* 2004; 25: 77-83.
11. Stevens MM, George JH. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 2005; 310: 1135-1138.
12. Liu H, Webster TJ. Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools. *Biomaterials* 2007; 28: 354-369.
13. Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblasts functions on theta + delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 2005; 26: 953-960.
14. Lenherf S, Meier MB, Meyer U, Chi L, Weissman HP. Osteoblasts alignment, elongation and migration on grooved polystyrene patterned by Langmuir-Blodgett lithography. *Biomaterials* 2004; 26: 563-570.
15. Wang JH, Yao CH, Chuang WY, Young TH. Development of biodegradable polyesterurethane membranes with different surface morphologies for culture of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2000; 15: 761-770.
16. Rice JM, Hunt JA, Gallagher JA, Hanarp P, Sutherland DS, Gold J. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model *in vitro*. *Biomaterials* 2003; 24: 4799-4818.
17. Liu Y, Cooper PR, Barralet JE, Shelton MR. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2007; 8: 1393-1403.
18. Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Agheli H, Sutherland D, Affrossman S, Oreffo RCO. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006; 27: 2980-2987.
19. Price RL, Haberstroh KM, Webster TJ. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. *Med Biol Eng Comput* 2003; 41 (3): 372-375.
20. Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces up regulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 2004; 24: 403-413.
21. Hyman GE, Engvall E, A' Hearn E, Barnes D, Pierschbacher M, Rouslathi E. Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. *J Cell Biol* 1982; 95: 20-23.
22. Power diffraction file card No. 5-669, International Center for Diffraction Data, 1990.
23. García-Hipólito M, Corona-Ocampo A, Alvarez-Fregoso O, Martínez E, Guzmán-Mendoza J, Falcony C. Characterization of ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: Tb luminescent films deposited by ultrasonic spray pyrolysis technique. *Phys Stat Sol (a)*, 2004; 201(1): 72-79.
24. Tarjeta de difracción: Power diffraction file card: ICCD-09-0432, 1997.
25. Edington JW. Practical microscopy in materials science. Ed. MacMillan, Vol. 2, 1975.
26. Webster TJ, Hellenmeyer EL, Price RL. Increased osteoblasts functions on theta+delta nanofiber alumina. *Biomaterials* 2005; 26: 953-960.
27. Landis WJ. An overview of vertebrate mineralization with emphasis on collagen-mineral interaction. *Gravit Space Biol Bull* 1999; 12: 15-26.
28. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21: 667-681.
29. Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanism involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu Rev Mater Res* 2001; 31: 357-371.