



Metodología de nanomodificación y caracterización de micro-transportadores de titanio para su aplicación en la medicina regenerativa de huesos.

¹ Andrés de J. Nieves P.

¹ Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP); Laboratorio de investigación de materiales avanzados y de alta tecnología (CREA Lab), Panamá, Panamá

revista.ciencia@up.ac.pa

RESUMEN

El objetivo general del presente estudio es la generación de conocimiento y el desarrollo de nuevas herramientas de biotecnología y ciencia de los materiales para la medicina regenerativa que, a largo plazo, ayude a mejorar el entendimiento y el tratamiento de la osteoporosis en Panamá.

El objetivo específico de este proyecto fue crear nanoestructuras en la superficie de partículas de titanio (también llamados microtransportadores porque en futuros estudios transportarán a las células a las superficies del hueso) a través de técnicas de tratamiento hidrotérmico (e.g., ataque ácido usando ácido nítrico, oxálico y fórmico) a ciertas concentraciones y temperaturas que—según evidencia de microscopía—podrían haber logrado modificar la superficie de dichas partículas.

Nuestros resultados no lograron ser concluyentes, pero muestran el potencial de nanomodificación de partículas de titanio 99.9% puras en los protocolos desarrollados durante nuestros estudios, y a la vez detallan las metodologías para caracterizar de manera efectiva estos microtransportadores con el uso de herramientas de análisis superficial disponibles en Panamá, como el microscopio electrónico de barrido.

PALABRAS CLAVES

Nanoestructuras, Osteoporosis, Ataque ácido, Microscopio Electrónico de Barrido.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo económico de Panamá ha permitido mejorar la esperanza de vida de la población (Figura 1). Esto a su vez a permitido que se manifiesten algunas enfermedades propias de los países más desarrollados como por ejemplo enfermedades crónicas (Figura 2). Un ejemplo es la osteoporosis. Contraloría General De La República, 2010; Gittens, RA, 2017.

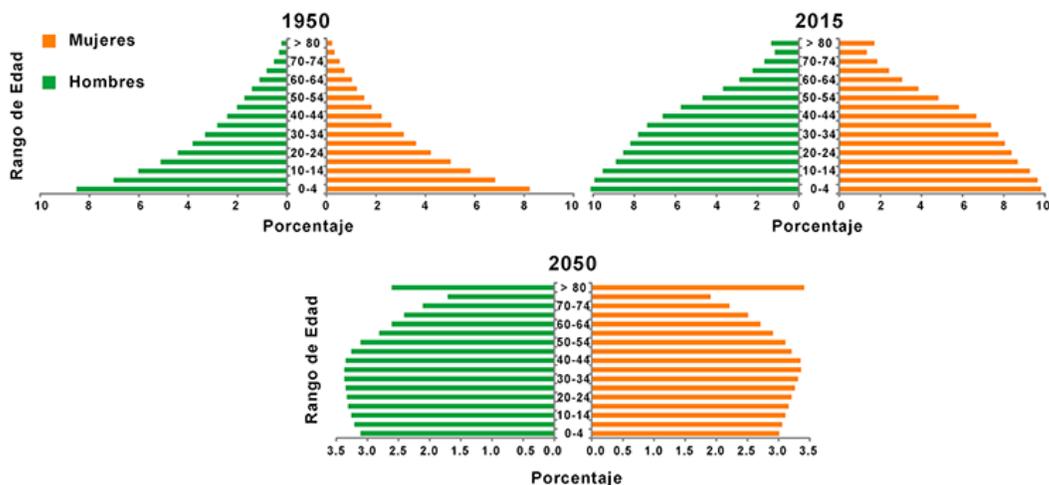
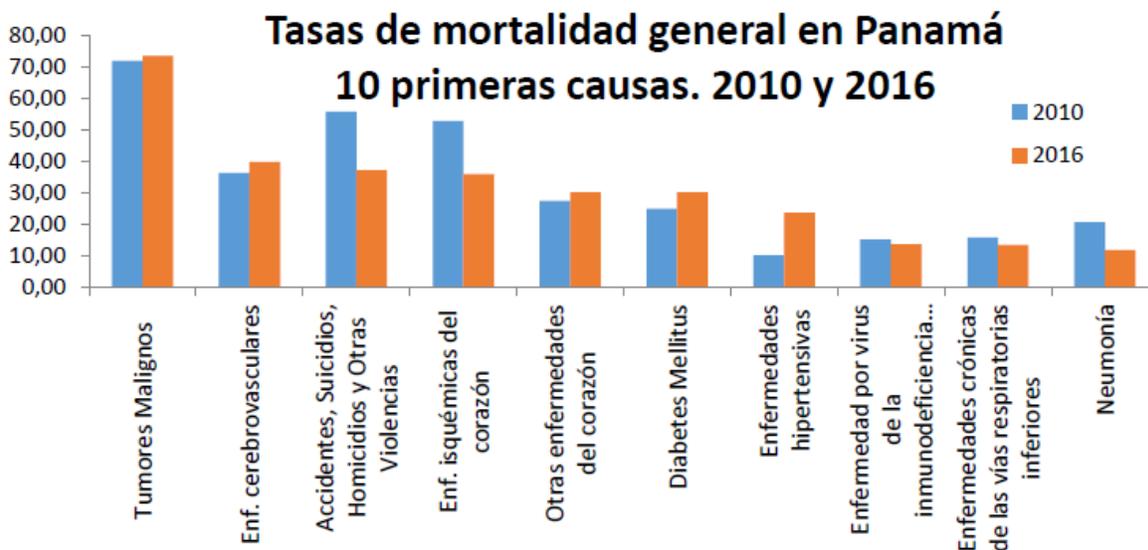


Figura 1: Pirámide de la población del país, por sexo y grupos de edad para los años 1950, 2015 y 2050. Contraloría General de la República. (2010).



Fuente: Datos de DIPLAN - MINSA

Figura 2: Tasa de mortalidad general en Panamá . Las diez primeras causas. 2010 y 2016. Ministerio de Salud.

La osteoporosis es una enfermedad musculoesquelética caracterizada por la baja densidad de los huesos y causa un incremento del riesgo de deterioro de su estructura aumentando la posibilidad de fracturas (Figura 3). En Panamá se cuenta con poca información epidemiológica sobre la osteoporosis. Zanchetta (2012).

Los componentes estructurales del hueso son los osteoblastos, osteoclastos y osteocitos (Figura 4). Los osteoblastos ayudan a la formación y mineralización del hueso. Los osteoclastos ayudan a la re-absorción de los minerales del hueso. Los osteocitos son osteoblastos maduros y son formados a partir de éstos, Redlich, Smole (2012)

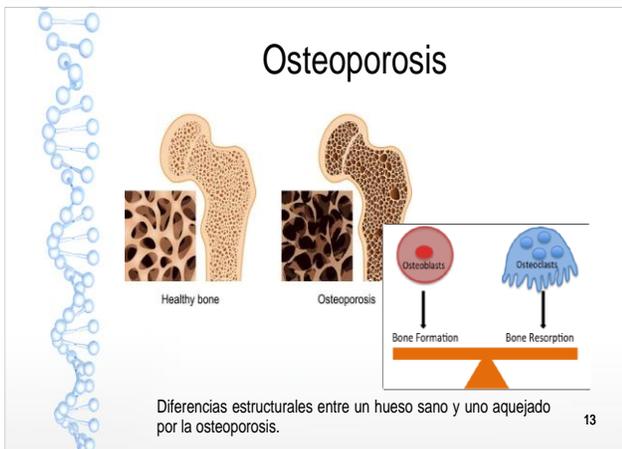
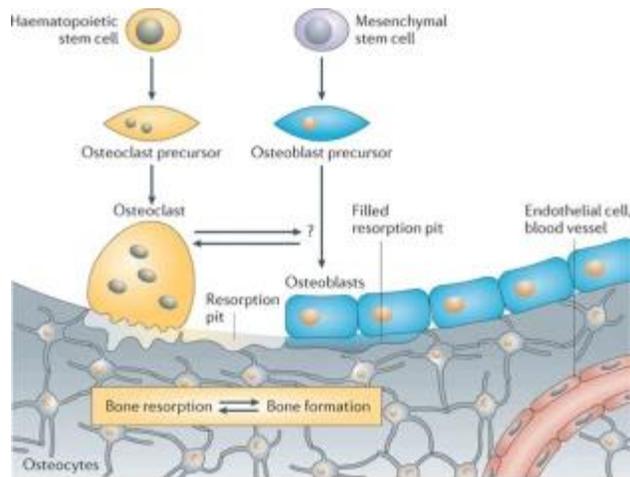


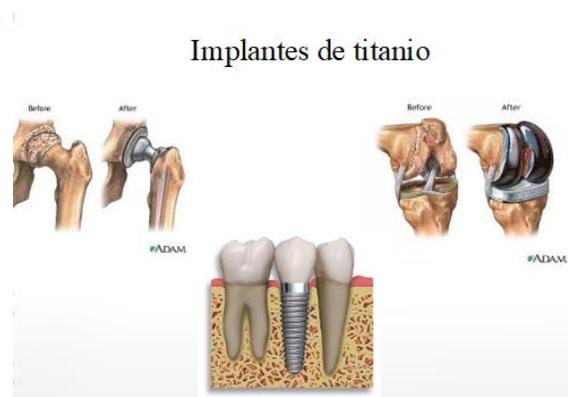
Figura 3. Diferencias estructurales entre un hueso sano y uno aquejado por la osteoporosis. Gittens *et al.* 2012.



Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 4. Componentes estructurales del hueso. Redlich *et al.* 2012.

El titanio es un metal que tiene una relación favorable entre peso, fuerza y buen rendimiento biológico en huesos en cuanto a su rugosidad y química (Figura 5). Gittens (2012)



Propiedades del titanio

Buen peso
Buena fuerza específica
Resistente a la corrosión
Material bio-compatibile
No propiedades magnéticas
Duradero
Gran disponibilidad



Figura 5: Propiedades del titanio que lo llevan a ser bio-compatibles para los implantes. Gittens (2012)

En algunos estudios se ha comprobado que existen células como las células MG63 (osteoblastos inmaduros) (Figura 6) que responden a nano-estructuras en micro-rugosidades de titanio (Ti) indicando que las células inmaduras tienen la propiedad de diferenciarse a células óseas en los

implantes de titanio que contienen esta combinación jerárquica de rugosidad Gittens (2012) (Figura 7).

Para crear estas nano estructuras existen diferentes métodos: a) acidificación (acid etching), b) chorreado abrasivo (grit blasting) y c) tratamiento de calor. (Figura 8).

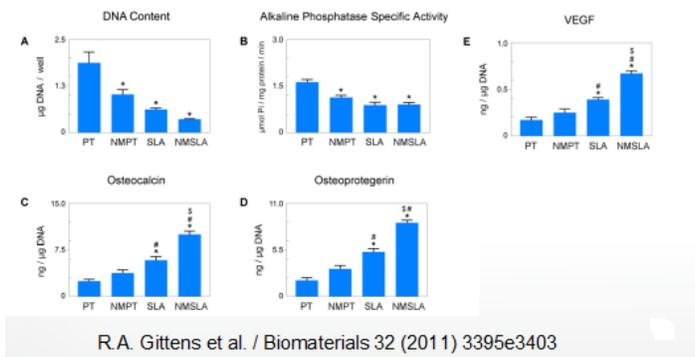
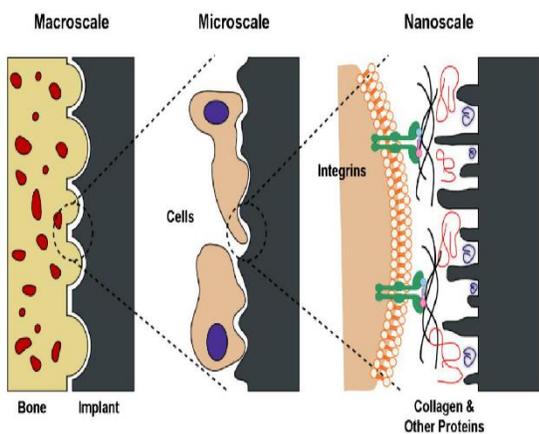


Figura 6: Las células MG63 provienen del osteo-sarcoma humano. Expresan características fenotípicas similares a los osteoblastos inmaduros. Responden a nano-estructuras en la superficie de Ti.



Importancia de la Estructura Superficial del Hueso

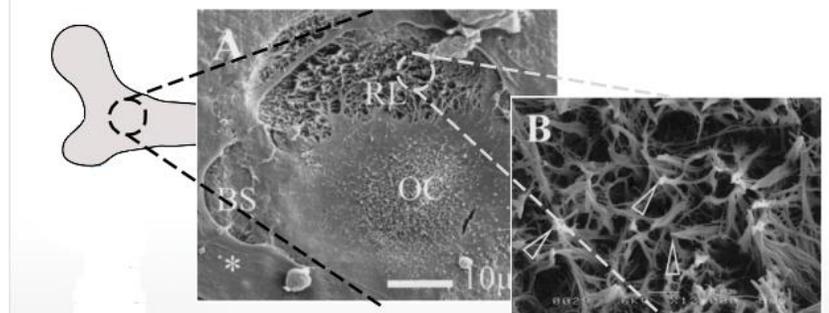


Figura 7: Interacciones entre hueso y la superficie del implante a diferentes escalas. Gittens *et al.* 2012; Mulari M.T.K., et al., Calcif Tissue Int (2004) 75: 353.

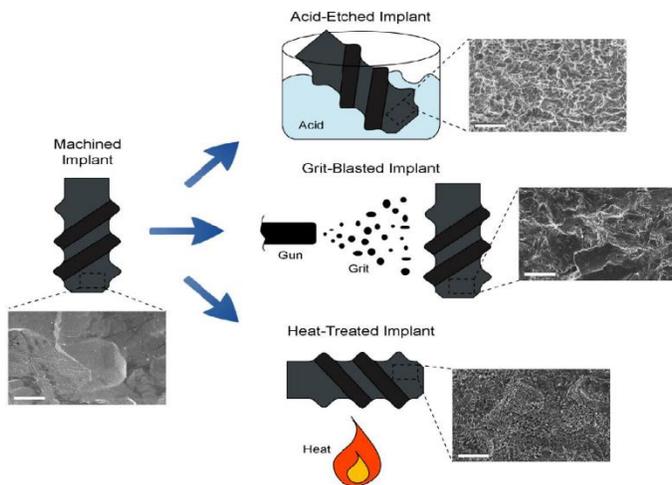


Figura 8. Esquema de métodos y resultados (con imágenes SEM) en superficies de titanio en estudios como los Gittens *et al.* 2012. Las modificaciones incluyen proceso de acidificación (acid etching), chorreado abrasivo (grit blasting) y tratamiento de calor. En nuestro estudio se realizó el proceso de acidificación.

PARTE EXPERIMENTAL

Filtración de partículas de titanio

- Suspender partículas en agua y pasar por filtro para separar partículas grandes ($> 40 \mu\text{m}$) de las más pequeñas ($< 40 \mu\text{m}$). (Figura 9).

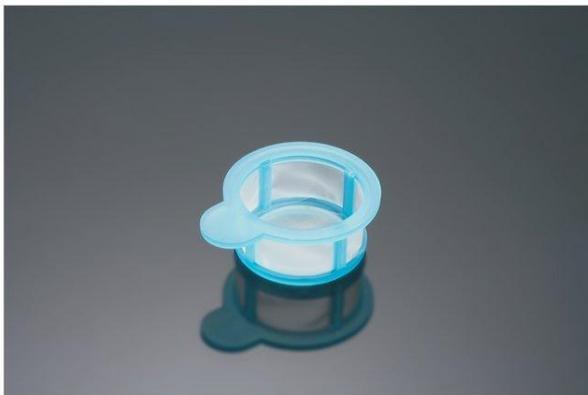


Figura 9: Filtración de las partículas/microtransportadores de titanio.

Nano modificación de partículas con ácidos

- Pre-lavado (tratamiento con el sonicador) de muestras. Este tratamiento es para separar las partículas entre sí y que sea más fácil filtrarlas más adelante. (Figura 10).
- Tratamiento ácido a diferentes temperaturas para crear nano estructuras (Figura 11). Se escogieron los ácidos oxálico y fórmico. (Figura 12).



Figura 10: Sonicador



Figura 11: Plato caliente para hacer el tratamiento térmico en las partículas

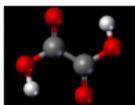
Muestras

Muestras 1: Ácido Fórmico y Ácido Oxálico al 10%, 75 minutos.

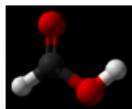
Muestras 2: Ácido Fórmico y Ácido Oxálico al 10%, 120 minutos.

Muestras 3: Ácido Fórmico y Ácido Oxálico al 20%, 75 minutos.

Muestras 4: Ácido Fórmico y Ácido Oxálico al 20%, 120 minutos



Ácido Oxálico



Ácido Fórmico



El Ácido Fórmico
El veneno de las hormigas que ayuda a comer

Figura 12: Ácidos utilizados para modificar la superficie de las partículas.

Muestras:

1. Partículas de Titanio sin tratamiento
2. Partículas de Titanio + 10% ácido fórmico y oxálico por 45 min
3. Partículas de Titanio + 10% ácido fórmico y oxálico por 90 min
4. Partículas de Titanio + 20% ácido fórmico y oxálico por 45 min
5. Partículas de Titanio + 20% ácido fórmico y oxálico por 90 min

Protocolo:

- Sonicar muestras por 30 minutos en Liquinox soap (Alconox)
- Sonicar muestras (2 x) 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en NaOH (20 g/L) y peróxido de hidrógeno (20 g/L) a 80°C por 30 minutos.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en 65% ácido nítrico líquido a 100 °C por 30 min.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Dejar las muestras secando al menos 24 horas para asegurar la estabilidad de la capa de óxido.
- El bañando en ácido es realizado en diferentes concentraciones y por diferentes tiempos a 80°C:
 - o Ácido Fórmico y Ácido oxálico a un rango de 50% cada una por 45 minutos a concentraciones de 10% y 20% w/v.
 - o Ácido Fórmico y Ácido oxálico a un rango de 50% cada una por 90 minutos a concentraciones de 10% y 20% w/v.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Sumergir las partículas en 65% ácido nítrico líquido a 100 °C por 30 min.
- Sonicar muestras por 5 minutos en agua destilada a 25°C.
- Dejar las muestras secando al menos 24 horas para asegurar la estabilidad de la capa de óxido.

Repetimos este experimento esta vez con los tiempos cambiados en la etapa de la aplicación de los ácidos oxálicos y fórmico: 75 y 120 minutos.

Observación y medición de partículas de titanio

- Microscopio Electrónico Evo 40 (STRI, Panama)(Figura 13).
- Fiji (ImageJ) para análisis de imágenes. (Figura 14).



Figura 13: Fiji (ImageJ) para análisis de imágenes.

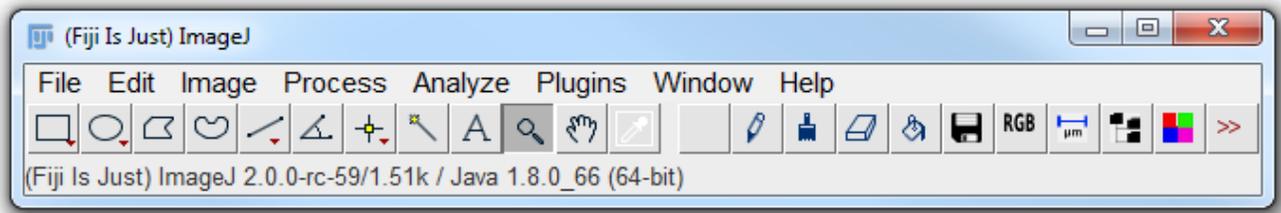


Figura 14: Menú del programa Image J.

Estadísticas

- Histograma de tamaño de partículas:

Utilizando el programa Image J (figura 14) nosotros pudimos medir el diámetro de las partículas de titanio. (Figura 15).

Gracias a estas mediciones pudimos crear un histograma del tamaño de las partículas (Figura 16) con lo cual pudimos determinar si tenían el tamaño adecuado para el experimento.

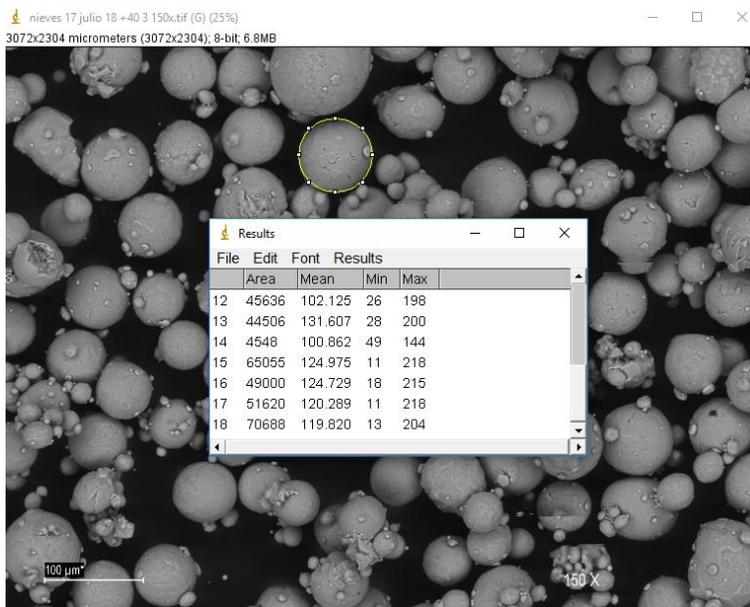


Figura 15: Utilización del programa Image J para medir los diámetros de las partículas.

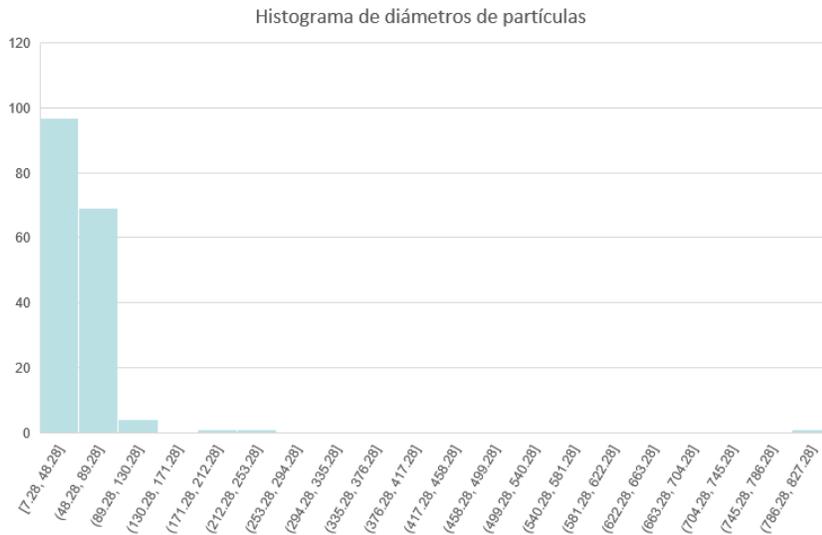


Figura 16: Histograma de diámetros de partículas.

Toda la parte experimental se realizó en el laboratorio CREA de INDICASAT AIP.

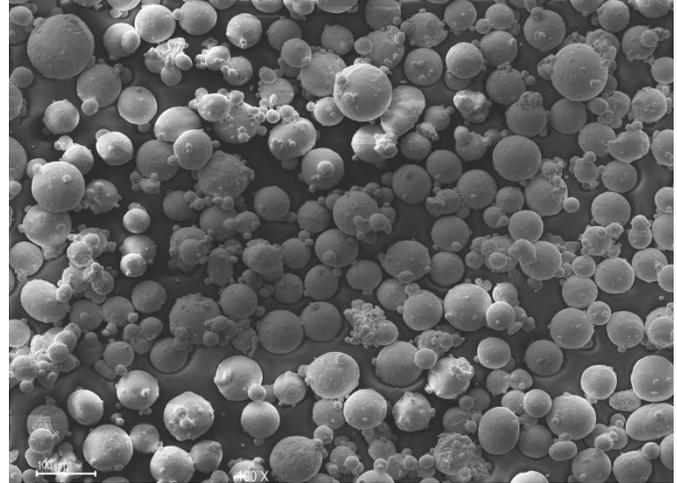
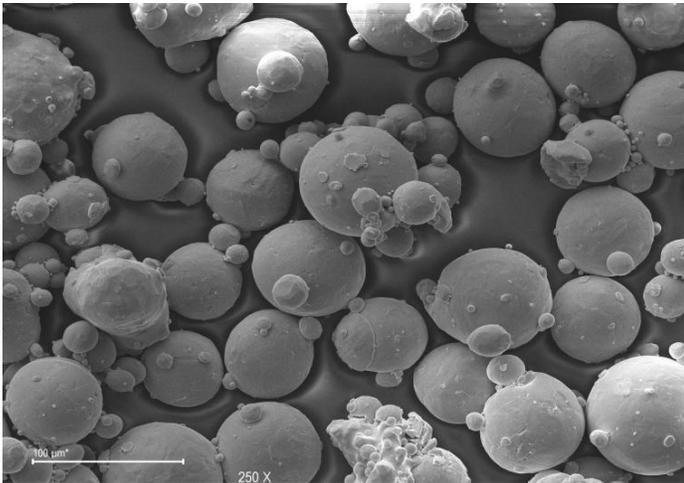
Solamente la parte de la observación de las imágenes en el microscopio electrónico (SEM) fue realizado en el departamento de microscopía del Instituto Smithsonian.

El experimento duró 6 meses, de julio a diciembre de 2018.

RESULTADOS

Caracterización del tamaño de las partículas de Titanio

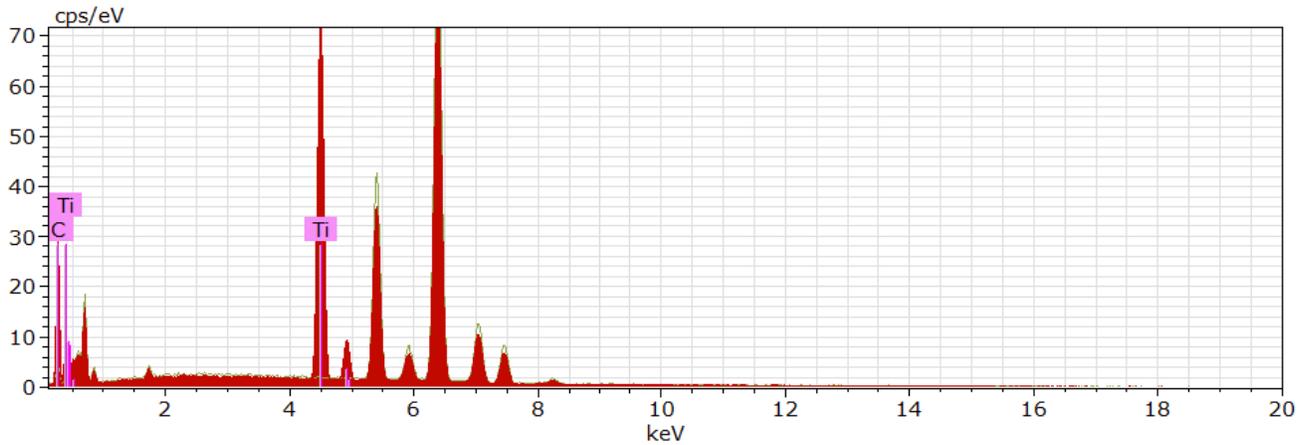
Las partículas fueron filtradas con filtros de membranas de nylon de 40 micrómetros. Como se puede observar en el histograma, la mayor cantidad de partículas se encuentran en el rango entre 7.28 y 48.28 micrómetros de diámetro. Partículas de diámetros mayores de 130 micrómetros virtualmente fueron inexistentes. La presencia de partículas de menos de 40 micrómetros se puede deber a partículas pequeñas adheridas a otras mucho más grandes y por ello no pasaron el filtro. (Figuras 17 y 18)



Figuras 17 y 18: Partículas de titanio no modificadas, pero si filtradas con filtros de membrana de nylon.

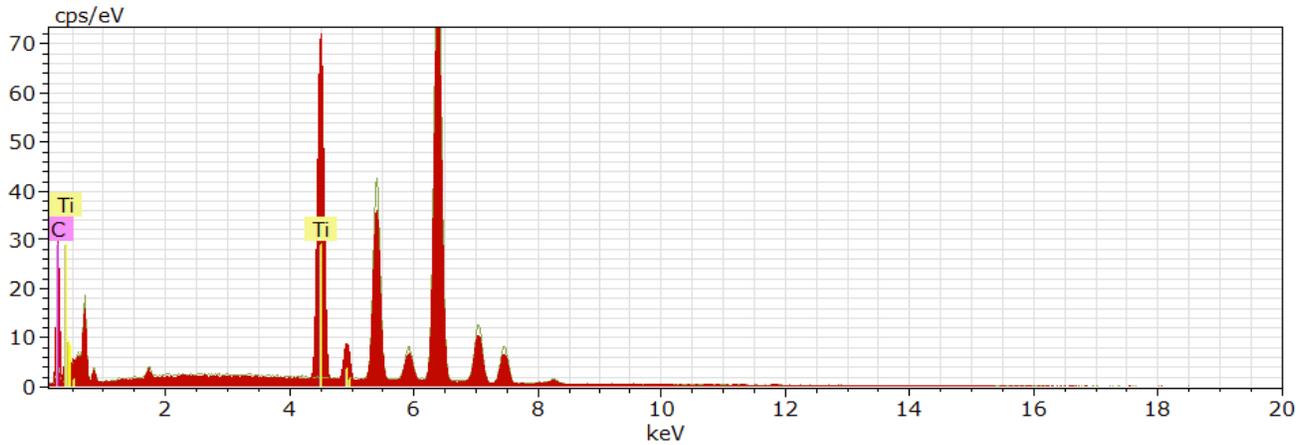
Caracterización de la composición química de las partículas de titanio 99.9% puras

Utilizando la tecnología del microscopio electrónico de barrido pudimos determinar el porcentaje de pureza de las partículas filtradas y nanomodificadas. (Figura 19, 20, 21 y 22).



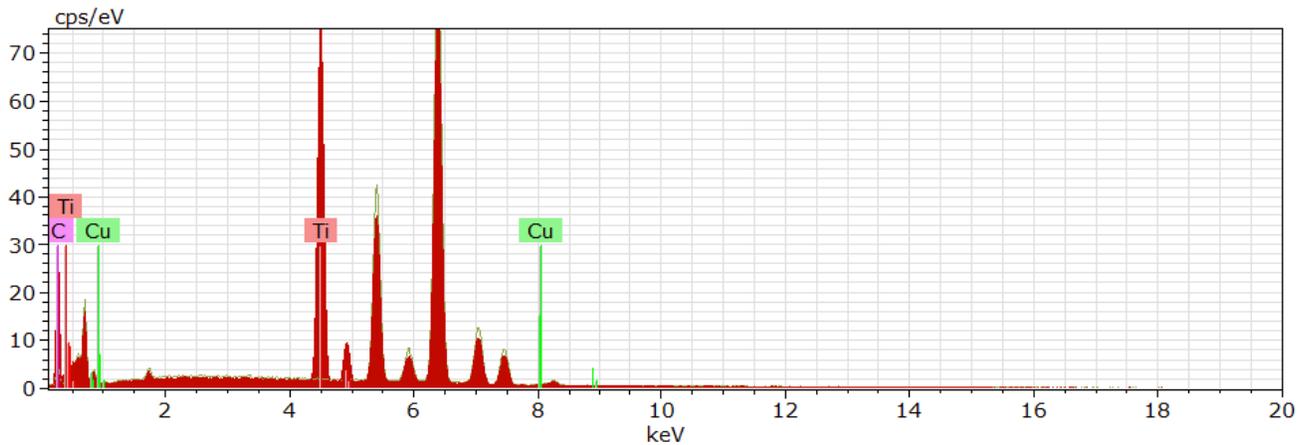
Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	5.1983349	5.0231403026	17.41202543
Titán	22	K-series	98.289415	94.976859697	82.58797457
		Sum:	103.48775	100	100

Figura 19. Muestra 1: Ácido fórmico y Ácido oxálico al 10%, 75 minutos



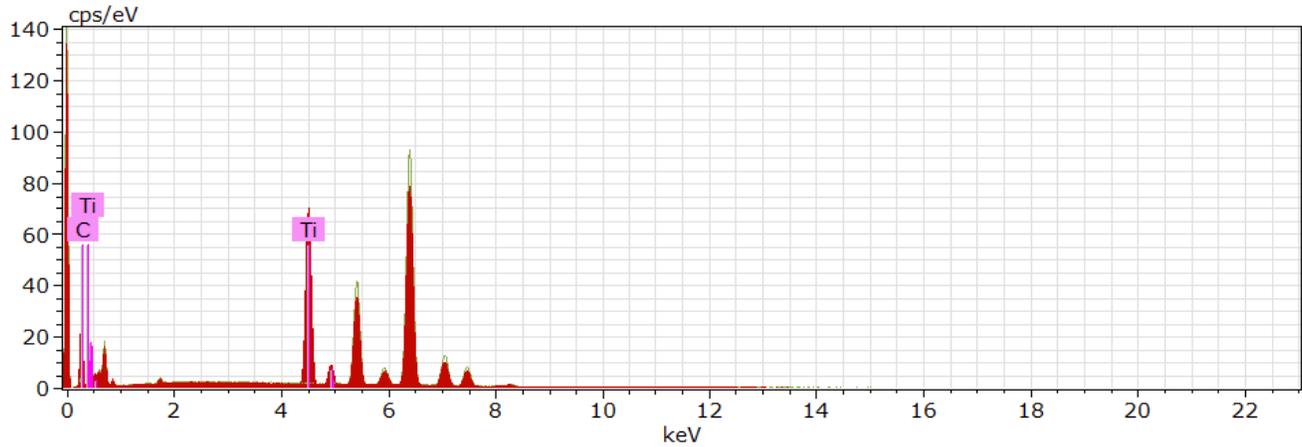
Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	4.778184	3.8074790733	13.62832644
Titán	22	K-series	120.7165	96.192520927	86.37167356
Sum:			125.4947	100	100

Figura 20. Muestra 2: Ácido fórmico y Ácido oxálico al 20%, 120 minutos



Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	4.5444507	3.3152526185	12.045059381
Titán	22	K-series	131.52461	95.949401072	87.449959448
Cobre	29	K-series	1.0079911	0.7353463093	0.5049811704
Sum:			137.07706	100	100

Figura 21. Muestra 3: Ácido fórmico y ácido oxálico al 10%, 75 minutos



Element	AN	series	[wt.%]	[norm. wt.%]	[norm. at.%]
Carbono	6	K-series	4.2274292	3.1447532562	11.45984342
Titán	22	K-series	130.20058	96.855246744	88.54015658
		Sum:	134.42801	100	100

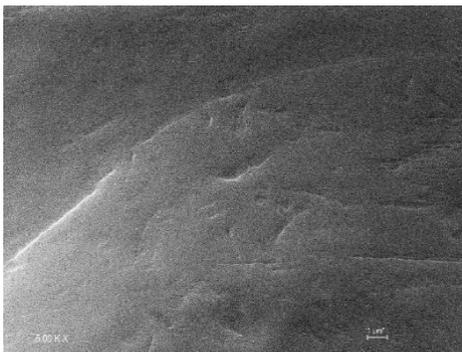
Figura 22. Muestra 4: Ácido fórmico y ácido oxálico al 20%, 120 minutos

El paso siguiente es el de demostrar si es posible crear nanomodificaciones a las partículas de titanio con semejante pureza.

Nanomodificación de partículas de Titanio 99.9% puras

Los resultados sugieren que es posible modificar la superficie de las partículas de titanio a base de calor y de ácidos (nítrico, fórmico y oxálico).

Cierto tipo de marcas o surcos fueron halladas en las partículas con los ácidos al 10% por 90 minutos (figura 23, 24) que no fueron halladas en partículas con otros tiempos y concentraciones de ácidos sugiriendo que quizá la nanomodificación trabaja mejor en concentraciones más bajas (10%) que en concentraciones más altas de ácidos (20%).



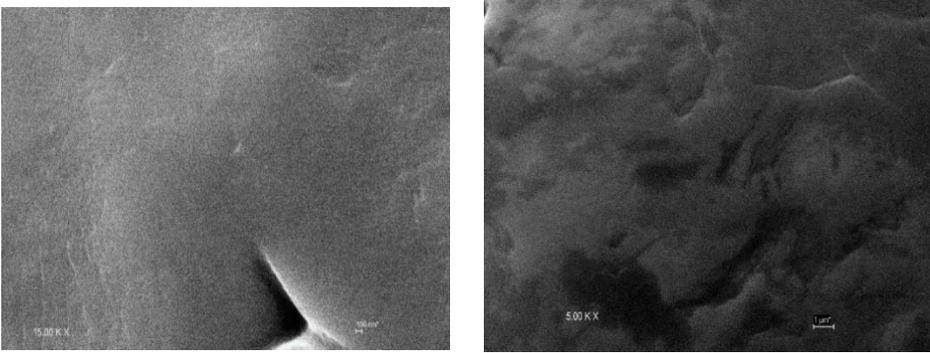


Figura 23: Partículas de titanio nanomodificadas a base de ácido fórmico y ácido oxálico al (A) 10% por 45 minutos, (B) 10% por 90 minutos (C) 20% por 45 minutos y (D) 20% por 90 minutos.

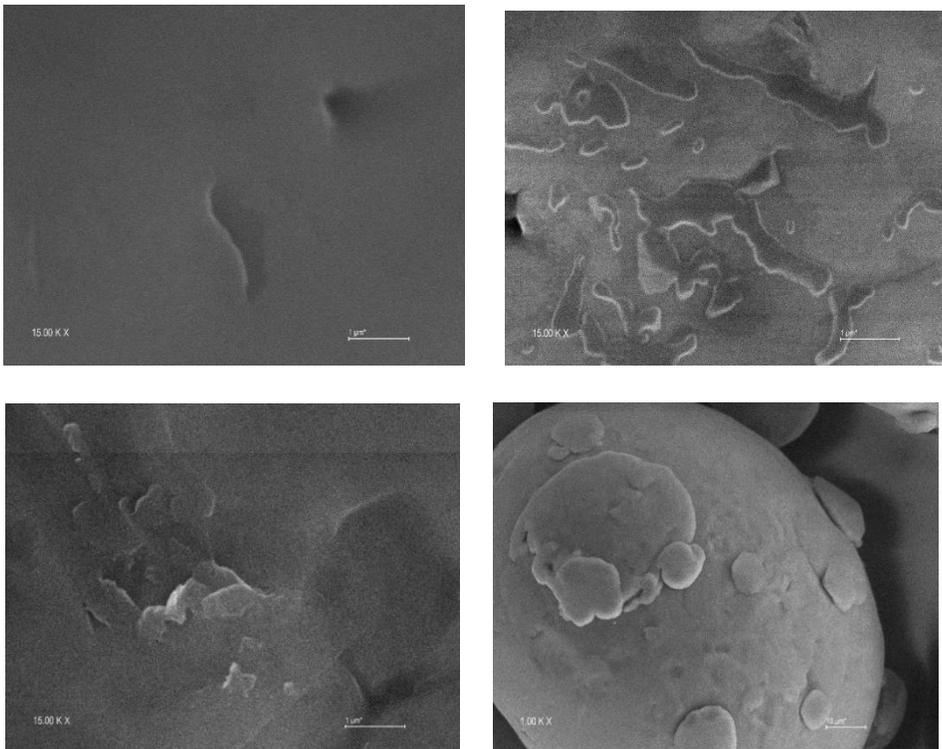


Figura 24: Partículas de titanio nanomodificadas a base de ácido fórmico y ácido oxálico al A) 10% por 75 minutos, (B) 10% por 120 minutos, (C) 20% por 75 minutos y (D) 20% por 120 minutos.

DISCUSIÓN

La microscopía electrónica, específicamente la microscopía electrónica de barrido, SEM, es una herramienta muy útil para caracterizar diferentes tipos de muestras, incluyendo las micro y nanomodificaciones en microtransportadores de titanio destinados a la medicina regenerativa.

Investigando la literatura se ha podido evidenciar que el SEM es útil para observar tanto superficies de discos de titanio, superficies de discos de aleaciones de Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti6Al4V) y

partículas de Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti90Al6V4). En este estudio se ha podido evidenciar que el SEM también funciona para partículas de Titanio 99.9% puras (Figuras 8 y 9).

También ha sido muy útil a la hora de dilucidar la composición química tanto de las partículas de Ti90Al6V4 como las de titanio 99.9% gracias a la espectrometría de rayos x por energía dispersiva (EDX) para determinar la composición atómica cercana a la superficie. (Figuras 4, 5, 6, 7).

Salvo en estudios mencionados en la sección Antecedentes, como los de Gittens, donde el titanio es utilizado en discos como superficies donde son sembrados las células madres, prácticamente en ningún otro estudio se utiliza ácidos con el objetivo de nanomodificar partículas de titanio. (tabla 1).

Tabla 1:

	Uso de técnica de microscopía	Características de las partículas	Ácidos utilizados	Concentración de los ácidos	tiempo	Reacción entre Células y partículas
Wang et al., 2002	SEM	Titanio comercialmente puro (cp Ti) < 1 µm ZrO2 < 1 µm	Ácido nítrico para asepsia	Ácido nítrico 25% a 70° C.	1 hora	-↓Células viables -↓BSP -CpTi tiene toxicidad para hMSC (human mesenquimal stem cells)
Jiang Wu et al., 2011	No mencionado	Partículas de Ti 0.9µm, 2.7µm, 6.9µm.	No utilizados	No aplica	No aplica	↓marcadores iniciales, medios y finales del linaje osteogénico
Lee et al., 2011	Observación de células teñidas	Diámetro < 10 µm	No utilizados	No aplica	No aplica	Ti provoca que macrófagos y SOSTs supriman formación de hueso.
Hou et al., 2013	MET para caracterizar partículas	TiO2 Sintetizados hidrotermalmente	No utilizados	No aplica	No aplica	TiO2: ↓viabilidad celular ↓proliferación ↓ciclo de vida de MSC
Jiang et al., 2013	SEM	Ti-6Al-4V 0.6 µm	No utilizados para nanomodificar	No aplica	No aplica	TiO2: ↓crecimiento ↓maduración ↓ciclo de vida de osteoblastos
Ping et al., 2017	No mencionado	95% fueron < 4µm	No utilizados para nanomodificar	No aplica	No aplica	Ti produce osteólisis ↑osteoclastos

Gu et al.,2017	Para ver células teñidas de solución ARS	No mencionan dimensiones de las partículas	No utilizados para nanomodifica	No aplica	No aplica	Ti produce inhibición osteogénica. Ti induce pérdida de huesos via regulación de señales de GSK-3 β y β -catenin. \downarrow GSK-3 β la inhibición de la diferenciación osteogénica producida por Ti
Zhu et al.,2018	Microscopio invertido para ver el crecimiento y la morfología de las células osteoblásticas de ratones MC3T3-E1.	Las partículas de titanio $\leq 5 \mu\text{m}$, 0.1 wt%	No utilizados para nanomodificar	No aplica	No aplica	Inhibición de MSCs, BSP, proliferación celular, mineralización de la matriz, producción de colágeno tipo I.

NOTA: Incremento: \uparrow , Disminución: \downarrow .

Prácticamente en todos los artículos el titanio era visto como un *debris* (tabla 1), incluso en artículos más recientes, dando fe del carácter innovador de nuestra investigación al querer utilizar las partículas de titanio como superficies no planas y por lo tanto, más bio compatibles con las formas del hueso, para el crecimiento de células osteoblásticas.

El tamaño de las partículas fue tomado en cuenta en varios artículos aquí analizados, la mayoría decía que partículas menores o similares al micrón eran las más peligrosas, mientras que otros estudios mencionaban lo citotóxicas de partículas mucho más grandes que el micrón. Nosotros deberemos comprobar si el tamaño de aproximadamente $40 \mu\text{m}$ es adecuado para nuestros objetivos al utilizar células madres en futuros estudios.

Observando en artículos de otros investigadores hay moléculas que estimulan la osteo-diferenciación como la icariin o la aucubina, algunas veces estimulando las vías de señalización. Esta información debe tomarse en cuenta para etapas futuras de investigación en caso de que al utilizar partículas de titanio, las células madres se diferencien células óseas.

CONCLUSIÓN

1-Es necesario pre-tratar las micropartículas de titanio para eliminar los residuos de partículas que están por debajo del diámetro de $45 \mu\text{m}$, ya que éstas pueden ser internalizadas por las células y esto pudiera comprometer su comportamiento y viabilidad.

2-Los parámetros del tratamiento de nanomodificación deben ser optimizados para obtener mayor nano-estructuración de la superficie.

3-El Microscopio electrónico de barrido es útil para la caracterización de posibles modificaciones en partículas de titanio.

4-El Microscopio electrónico de barrido es útil para la caracterización del porcentaje de pureza química de las partículas de titanio.

5-Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (figuras 8 y 9) sugieren que los ácidos nítrico, fórmicos y oxálico pueden crear modificaciones en superficies y en partículas de aleaciones de titanio y en titanio con una gran pureza.

6-También sugieren que es posible hacer modificaciones de titanio en partículas de 40 μm .

SUMMARY

The main objective is the generation of knowledge and the development of new tools in the biotechnology and science in the materials for the regenerative medicine that, a long way, will help to better the learning and treatment of the osteoporosis in Panama.

The specific objective of this project is create nanostructures in the surface of the particles of titanium (micro-transportation) through the techniques of hydrothermal treatment (e.g. acid attack using nitric, oxalic and formic acids) in some concentrations and temperatures we modified the surface of these particles.

Our results don't achieve to be conclusive, but also shows the potential of surface nanomodification of 99.9 % pure titanium particles of the protocols developed during the studies, and in the same time details the methodologies to characterize in effective way these micro-transporters with the use of tools of surface analysis available in Panama, as the scanning electronic microscope (SEM)

KEYWORDS:

nano-structures, osteoporosis, acid attack, scanning electronic microscope.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA. 2010. Panamá CGdIRd. Panamá: Estimaciones y proyecciones de la población total de la república según sexo y edad: 1950-2050 (cuadro 14). In: Censo INdEy, editor. Instituto Nacional de Estadística y Censo: Contraloría General de la República de Panamá.

GITTENS, R.A. 2017. Microtransportadores de titanio nanoestructurados como vehículo de células madre para el tratamiento de osteoporosis. Informe técnico financiero 83-2016-4-ITE15-016 de 2017.

GITTENS, R.A. 2012. The role of nanostructural and electrical surface properties on the osteogenic potential of titanium implants. Tesis doctoral, Georgia Institute of Technology, Estados Unidos.

GU, Y.; WANG, Z.; SHI, J.; WANG, L.; HOU, Z.; Guo, X.; TAO, Y.; WU, X.; ZHOU, W.; LIU, Y.; ZHANG, W. ;XU, Y.;YANG, H.; XUE, F.; GENG, D. Titanium particle-induced osteogenic inhibition and bone destruction are mediated by the GSK-3 β / β -catenin signal pathway. Cell Death & Disease.

HOU, Y.; CAI, K; LI, J.; CHEN, X.; LAI, M.; HU, Y., LUO, Z.; DING, X., XU, D. 2013. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. Int J Nanomedicine. ;8:3619-30. doi: 10.2147/IJN.S38992.

JIANG W. et al., "Effect of Titanium Particle Size on Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells", Key Engineering Materials, Vols. 474-476, pp. 1939-1942, 2011.

- JIANG, Y.; JIA, T.; GONG, W.; WOOLEY, P.H.; YANG, S.Y. 2013. Titanium particle-challenged osteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of periprosthetic osteolysis. *Acta Biomater.* 2013 Jul;9(7):7564-72. doi: 10.1016/j.actbio.2013.03.010.
- LEE, S.S.; SHARMA, A.R.; CHOI, B.S.; JUNG, J.S.; CHANG, J.D.; PARK, S.; SALVATI, E.A.; PURDUE, E.P.; SONG, D.K.; NAM, J.S. 2012. The effect of TNF α secreted from macrophages activated by titanium particles on osteogenic activity regulated by WNT/BMP signaling in osteoprogenitor cells. *Biomaterials.* Jun;33(17):4251-63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.005.
- PING, Z.; HU, X.; WANG, L.; SHI, J.; TAO, Y.; WU, X.; HOU, Z.; GUO, X.; ZHANG, W.; YANG H.; XU, Y.; WANG, Z.; GENG, D. 2017. Melatonin attenuates titanium particle-induced osteolysis via activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Acta Biomater.* Mar 15;51:513-525. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.034.
- REDLICH, K.; SMOLEN, J. 2012. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature Reviews Drug Discovery* volume 11, pages 234–250.
- WANG, ML, NESTI, LJ, TULI, R, LAZATIN, J, DANIELSON, KG, SHARKEY PF, TUAN, RS. 2002. Titanium particles suppress expression of osteoblastic phenotype in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 20(6):1175-84.
- ZANCHETTA, S. M. The Latin American region audit: epidemiology, costs & burden of osteoporosis 2012 in: J. Stenmark, L. Misteli (Eds.) International Osteoporosis Foundation, Buenos Aires, Argentina, 2012, pp. 1-67.
- ZHU, Z; XIE, Q.; HUANG, Y.; ZHANG, S.; CHEN, Y. 2018. Aucubin suppresses Titanium particles-mediated apoptosis of MC3T3-E1 cells and facilitates osteogenesis by affecting the BMP2/Smads/RunX2 signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 18: 2561-2570.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Rolando A. Gittens y el Instituto de Investigación INDICASAT AIP.
 Instituto Smithsonian, especialmente al Sr. Jorge Ceballos, encargado del laboratorio del microscopía.
 Vicerrectoría de la Universidad de Panamá. Especialmente a el Dr. Tomás Diez y el Dr. Janzel Villalaz.