

CARACTERIZACIÓN Y BIOCOMPATIBILIDAD DE MATRICES DE COLÁGENO PARA USO EN REGENERACIÓN ÓSEA

A.M. Cortizo¹, G. Ruderman², I.G. Mogilner², E.J. Tolosa²

¹GIOMM, Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

²IFLYSIB (CONICET-UNLP-CIC), La Plata, Argentina

E-mail: cortizo@biol.unlp.edu.ar

Resumen. El colágeno, la proteína más abundante del hueso, juega un rol fundamental en la integridad biológica y estructural del esqueleto. Previamente se han usado membranas de colágeno sin un orden molecular, para fabricar matrices para la regeneración del tejido óseo. El colágeno es así un candidato natural para mejorar o reemplazar tejidos u órganos dañados. El objetivo del presente trabajo es caracterizar matrices de colágeno ordenado o no (con una distribución al azar) y estudiar su biocompatibilidad con células óseas en cultivo. Se estilizó colágeno extraído del tendón de Aquiles bovino, nativo, obtenido en nuestro laboratorio con un grado de pureza de un 98% [Ruderman et al., 2007]. Se fabricaron matrices de colágeno no ordenado y de colágeno ordenado según patentes. Las características de la superficie de membranas fueron observadas por SEM y microscopía óptica (coloración de Sirius red). Las membranas ordenadas mostraron una topografía típica en forma de canales en correlación con un ordenamiento molecular. Se evaluó la biocompatibilidad de células osteoblásticas y macrófagos murinos crecidos sobre los dos tipos de películas de colágeno (No ordenado y ordenado). Se estudió la adhesión, proliferación (conteo de células teñidas con Giemsa) y diferenciación al fenotipo osteoblasto (expresión de fosfatasa alcalina y nódulos de mineralización). Se encontró que las células (osteoblásticas y macrófagos) crecidas sobre las matrices de colágeno ordenado se adhieren más (1.5-1.7 veces) y crecen mejor (2.3-2.6 veces) que sobre las matrices de colágeno no ordenado. Macrófagos Raw 264.7 teñidos con naranja de acridina revelaron mayor cantidad de células muertas sobre las matrices de colágeno no ordenado. Preosteoblastos MC3T3E1 (4 semanas en medio osteogénico) expresaron más fosfatasa alcalina (2.6 veces) y mineral en la matriz de colágeno. Los estudios preliminares sugieren que las matrices preparadas en base a colágeno natural podrían ser aplicadas en la regeneración del tejido.

Palabras Claves: Colágeno, Matrices, Biocompatibilidad, Regeneración ósea, Ingeniería de tejidos.

1. INTRODUCCIÓN

Los grandes defectos óseos debidos a fracturas o resección de tumores son un importante problema en la cirugía esquelética. Para estos fines, la ingeniería de tejidos ha surgido como una alternativa en la estrategia biomédica. Se han desarrollado diferentes tipos de matrices (*scaffolds*) como andamiajes para inducir el crecimiento y regeneración del hueso dañado. Estas matrices están basadas en la composición de la matriz ósea: una red de proteínas fibrosas, principalmente colágeno y elastina, embebidos en un gel de proteoglicanos, glicoproteínas y agua.

El colágeno tipo I es la principal proteína del hueso y el componente de la matriz que soporta la carga. Previamente se ha usado para construir matrices en forma de membranas, esponjas o geles, con aplicación como láminas dérmicas, reconstrucción de cartílago, reconstrucción de corneas, para guiar la regeneración del ligamento periodontal y para la reparación de hueso (Wang et al., 2007). Existen dos formas de colágeno nativo, como hidrogeles hidratados o como fibras dispersas con una organización de tipo red (Glowacki & Mizuno, 2008). El colágeno nativo se ha establecido así como un biomaterial prometedor que forma las bases de varios productos comerciales. Sin embargo, hasta ahora, la mayor parte de los trabajos usan este material no presenta un ordenamiento u orientación del colágeno a nivel molecular. Esto es importante a la hora de diseñar una matriz para uso en reemplazos óseo y mejorar sus propiedades mecánicas y de osteoinducción. Así, el objetivo del presente trabajo

fue desarrollar y caracterizar matrices de colágeno ordenado y compararlas con matrices de colágeno con una distribución al azar o no ordenada, e investigar sus propiedades de biocompatibilidad en modelos de células óseas en cultivo.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Preparación y caracterización de las matrices de colágeno

Se prepararon soluciones de colágeno nativo con un grado de 98% de pureza, provenientes de tendón de Aquiles bovino (Grigera *et al.*, 1999). Utilizando dos métodos alternativos, previamente descritos en uno de nuestros laboratorios (Grigera *et al.*, 1999, Grigera *et al.*, 2006) se prepararon membranas ordenadas a nivel molecular y otras con un ordenamiento al azar (no ordenadas). Las membranas de colágeno ordenadas o no-ordenadas, se han caracterizado previamente (Ruderman *et al.*, 2007).

En el presente trabajo, la caracterización de la superficie de membrana se realizó por microscopía electrónica de barrido y por microscopía óptica. En el primer caso, las membranas previamente cubiertas con una delgada película de oro, se analizaron utilizando un microscopio electrónico Phillips SEM 505, (Holland), con una aceleración de voltaje de 20 kV. Las imágenes se analizaron usando un programa de imágenes ADDAII. En el segundo caso, las membranas se tiñeron con un colorante específico de colágeno tipo I (Sirius red) según la técnica descrita previamente (Tullberg-Reinert, & Jundt 1999) y luego se observaron con un microscopio Nikon Eclipse E400 y una cámara digital Nikon Coolpix 4500 (Nikon Tokio, Japon).

2.2 Cultivos celulares e incubaciones

Se utilizaron células UMR106 de osteosarcoma de rata, células MC3T3E1 derivadas de calvaria de ratón y células monolitos/macrófagos Raw264.7, crecidas según protocolos estándares en nuestro laboratorio (Cortizo *et al.*, 2006, Molinuelo *et al.*, 2005). En el caso de la línea pre-osteoblástica MC3T3E1, esta fue inducida a diferenciarse en un medio osteogénico que contenía 5mM β -glicerol-fosfato (β GP) y 25 μ g/ml ácido ascórbico (AA) durante 2 o 4 semana de cultivo (Cortizo *et al.*, 2006). Para los diferentes experimentos, una membrana de colágeno de 1 cm² se colocó dentro de un disco de 35 cm². Se agregó una dilución de células en medio DMEM-10% suero fetal bovino y se cultivaron por diferentes períodos de tiempo según se describe en la leyenda de las figuras.

2.3 Estudios de Biocompatibilidad

La capacidad de los osteoblastos para crecer y expresar marcadores de diferenciación asociados con la formación del hueso se evaluó por medio de diferentes ensayos (Cortizo *et al.*, 2008). Se estudió la **adhesión** (1 h de incubación) y **proliferación** (24 h de cultivo) de células crecidas sobre matrices de colágeno ordenado o no-ordenado, al final del período de incubación las células se lavaron con PBS, se fijaron y colorearon con Giemsa durante 10 min. Se evaluó el número de células sobre las matrices/campo usando un microscopio Nikon E400 y un objetivo de 40x.

La **diferenciación osteoblásticas** se investigó analizando la actividad de fosfatasa alcalina y la mineralización del cultivo. Para el ensayo de **Fosfatasa Alcalina** (FA), los pre-osteoblastos MC3T3E1 cultivados durante 2 semanas en un medio osteogénico, sobre las diferentes membranas de colágeno, se lavaron con PBS y se solubilizaron con Tritón X-100 1%. Se usó una alícuota de este extracto para determinar el contenido de proteínas por el

método de Bradford (Bradford 1976). La FA se evaluó espectrofotométricamente determinando la hidrólisis de *para*-nitrophenyl-phosphato (p-NPP) a *para*-nitrophenol (p-NP) a 37 °C durante 10 minutos de incubación. La **mineralización** del cultivo (deposición de calcio en la matriz extracelular) se evaluó después de 4 semanas de cultivo en presencia de un medio osteogénico, usando la tinción con rojo de Alizarina S (Ueno *et al.*, 2001). Los cultivos así teñidos fueron observados y fotografiados usando un microscopio Nikon E400 y cámara de fotos digital Nikon Coolpix 4500.

La posible **citotoxicidad** de las membranas se evaluó usando la línea de macrófagos murinos Raw264.7, crecidas durante 24h. Al final de este periodo de cultivo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con naranja de acridina (10 mg/ml) y ioduro de propidio (10 mg/ml), 1:1 en PBS por 5 minutos. Finalmente, las matrices con las células se colocaron sobre portaobjetos y se observaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX51 con un sistema de videoimágenes Controlador DP (Sien *et al.*, 2007). Las células vivas se tiñen con naranja de acridina mostrando una fluorescencia verde, las células apoptóticas se observan con citoplasma naranja, un núcleo verde pero con cromatina condensada y globulaciones (*blebbing*) de membrana plasmática. Por el contrario, las células necróticas se observan rojas con el ioduro de propidio con cromatina picnótica dispersa alrededor del núcleo.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Las membranas de colágeno no ordenadas u ordenadas que se usaron en este trabajo se observaron por SEM y microscopia óptica. Como puede observarse en la Figura 1 A y C, la membrana no-ordenada de colágeno mostró una superficie lisa, sin poros o rugosidades. Por el contrario, en la membrana ordenada (Figura 1 B y D) puede observarse una superficie rugosa con una estructura plegada o en forma de canales.

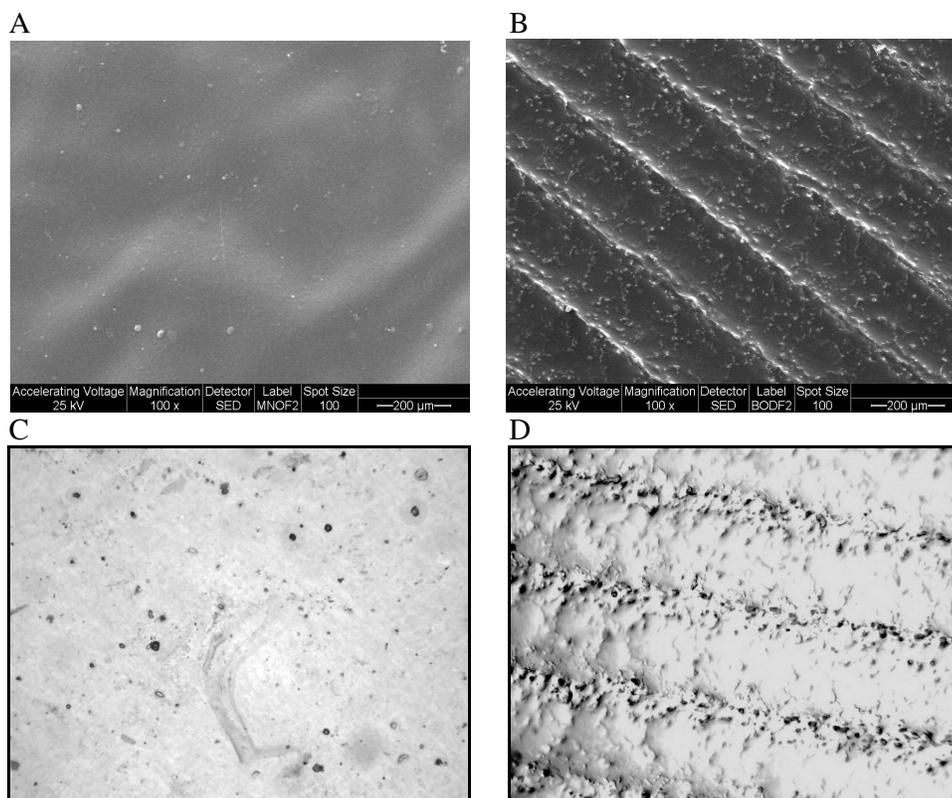


Figura 1. Imagen de SEM (A y B) y de microscopia óptica de membranas de colágeno no ordenada (A,C) u ordenada (B,D). Magnificación de 100x (A,B). Imágenes teñidas con Sirius red. Obj. 10x.

Se estudió la biocompatibilidad de las membranas respecto a la adhesión, crecimiento y diferenciación de osteoblastos en cultivo. Las células mostraron una mayor adhesión a las membranas ordenadas luego de 1h de incubación, comparada con las membranas no ordenadas (1.5 – 1.7 veces) (Fig 2 A y B). Asimismo, cuando los cultivos se prolongaron durante 24h (evaluación de la proliferación celular), los osteoblastos crecieron bien en ambas membranas de colágeno, mostrando expansión y desarrollo de extensiones citoplasmáticas (Fig 2 C y D). Sin embargo, el número de células crecidas al final de este periodo de cultivo fue mayor en las membranas ordenadas que en las no ordenadas (2.5-2.6x).

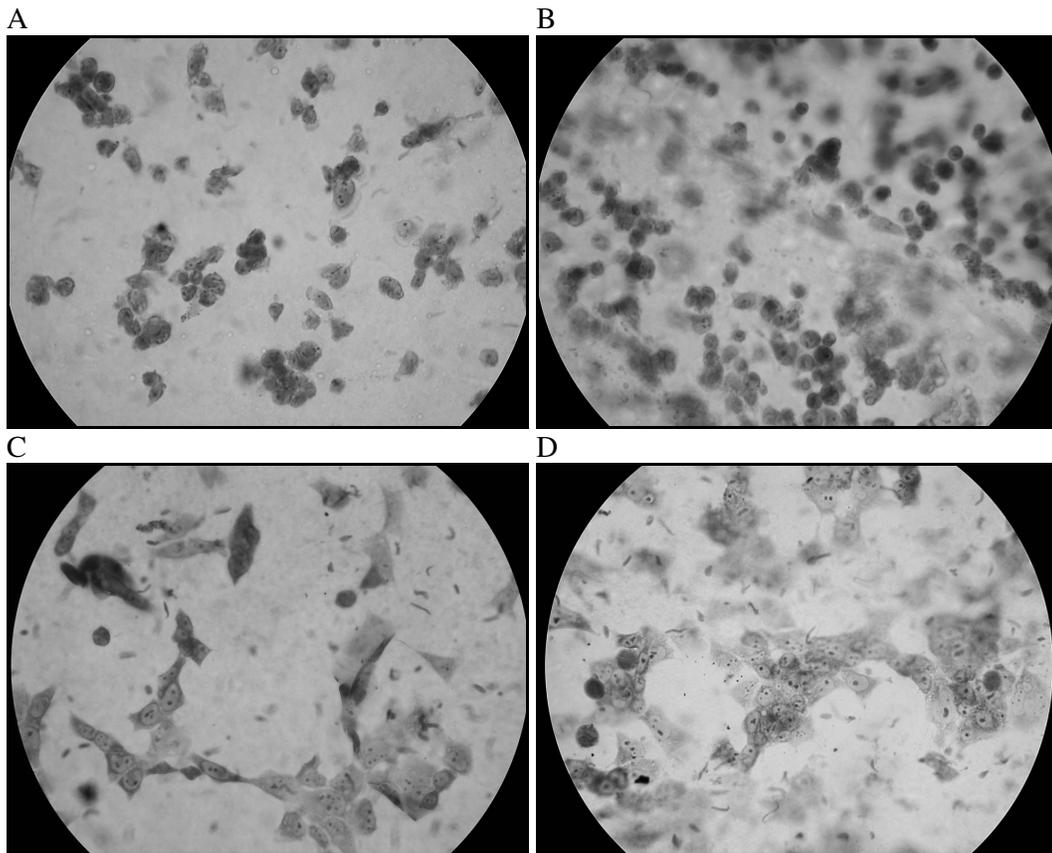


Figura 2. Imagen de microscopia óptica de osteoblastos incubados durante 1 h (A y B) o 24h (C y D) sobre membranas de colágeno no ordenada (A) u ordenada (B) teñidas con Giemsa. Obj. 40x.

Se investigó también la posible citotoxicidad de las membranas usando la línea de macrófagos murinos Raw264.7 crecidas durante 24h en ambos tipos de membranas. Se pudo corroborar que el número de células sobre las membranas ordenadas fue alrededor del doble que las crecidas sobre las membranas no ordenadas. Más aún, usando la técnica de naranja de acridina/ioduro de propidio, se encontró que en el cultivo de macrófagos cultivados en las membranas ordenadas, solo el 10% mostraban fluorescencia naranja indicando apoptosis. Por

el contrario, en el cultivo sobre las membranas no ordenadas, este porcentaje ascendió a un 25%, indicando algún grado de citotoxicidad.

Finalmente, investigamos la capacidad de las células pre-osteoblásticas MC3T3E1 para diferenciarse al fenotipo osteoblasto, expresando marcadores típicos de este tejido. Luego de 4 semanas en presencia de un medio osteogénico, las células se diferenciaron a osteoblastos expresando mayor actividad específica de fosfatasa alcalina sobre las membranas ordenadas que sobre las membranas de colágeno no ordenado (Fig 3 A). Además, estas células fueron capaces de mineralizar la matriz, depositando fosfato y calcio, este ultimo detectado a través de la coloración de Rojo de Alizarina. Como puede observarse en la Figura 3 B y C, se produjo mayor mineralización sobre la matriz de colágeno ordenado.

A

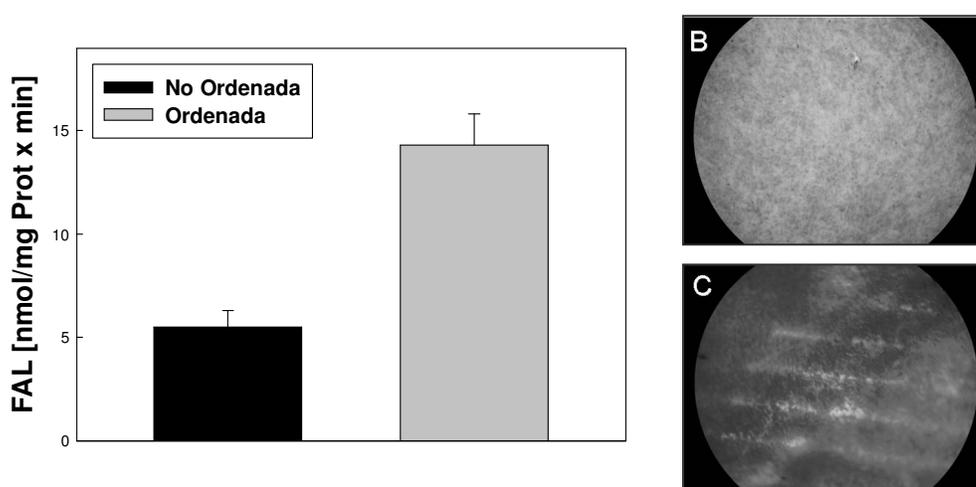


Figura 3. Pre-osteoblastos MC3T3E1 se cultivaron sobre membranas de colágeno no ordenado (B) u ordenado (C) durante 4 semanas en un medio osteogénico. Al final del período de cultivo, se evaluó la actividad específica de fosfatasa alcalina (A) y la mineralización (B y C). Imágenes de microscopía óptica con Obj. 10x.

CONCLUSIONES

Nuestros estudios preliminares sugieren que las membranas preparadas en base a colágeno natural muestran una buena compatibilidad con las células osteoblásticas. El desarrollo de membrana con un orden molecular usando la metodología previamente descrita, sugiere que estas matrices son más convenientes y podrían ser de aplicación en la reparación de lesiones óseas.

AGRADECIMENTOS

Este trabajo fue parcialmente subsidiado por la Facultad de Ciencias Exactas, la Universidad Nacional de La Plata, la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA) y la Agencia Nacional de Ciencias y tecnología (ANPCYT) (PAE22398) y CONICET. AMC es miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de la CICPBA; GR es miembro de la Carrera del investigador del CONICET; IGM es miembros de la Carrera del Profesional de Apoyo del CONICET y EJT es profesor de la Universidad Tecnológica Nacional.

REFERENCIAS

- Bradford, M.M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Cortizo, A.M., Molinuevo, M.S., Barrio, D.A., e Bruzzzone, L. (2006), "Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanisms of action", *Int J Biochem Cell Biol*. 38, 1171-80.
- Cortizo MS, Molinuevo MS, Cortizo AM. (2008), "Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering". *J Tissue Eng Regen Med*.;2:33-42
- Grigera, J.R., Mogilner, I.G., Monachesi, S.N., Ruderman, G., López, R., e Tolosa, E.J. AR Patent 253249, 30 April 1999: "Membranas de Colágeno Orientado, útiles como matriz ordenadora de tejidos biológicos en los procesos de regeneración in vivo y el procedimiento para obtenerlas".
- CICBA, CONICET, UNLP, Grigera, J.R., Mogilner, I.G., Ruderman, G., e Tolosa E.J. AR Patent 048387, 26 April 2006: "Membranas de Colágeno Orientado que reproducen un patrón geométrico, útiles como matriz ordenadora de tejidos biológicos en los procesos de regeneración in - vivo, y procedimiento para obtenerlas".
- Glowacki, J., e Mizuno, S. (2008), "Collagen scaffolds for tissue engineering". *Biopolymers*, 89, 338-344.
- Molinuevo, M.S., Etcheverry, S.B., Cortizo, A.M., (2005), "Macrophage activation by a vanadyl-aspirin complex is dependent on L-type calcium channel and the generation of nitric oxide", *Toxicology*. 210, 205-12.
- Ruderman, G., Mogilner, I.G., Tolosa E.J., Massa, N.E., Grigera, J.R., e Garavaglia, M. (2007), "Disorder/order and asymmetry/symmetry transitions observed in laboratory produced collagen membranes" *Forma y Simetría: Arte y Ciencia Congreso de Buenos Aires*, pp 420-423.
- Siew, E.L., Rajab, N.F., Osman, A.B., Sudesh, (2007), "In vitro biocompatibility evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer in fibroblast cells", *J Biomed Mater Res.*, 81A, 317-25.
- Tullberg-Reinert, H., & Jundt, G. (1999), "In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius red-based colorimetric microassay: Effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate", *Histochemistry and Cell Biology.*, 112, 271-276.
- Ueno, A., Kitase, Y., Moriyama, K., e Inoue, H. (2001), "MC3T3-E1-conditioned medium-induced mineralization by clonal rat dental pulp cells", *Matrix Biol.*, 20, 347-355.
- Wang, Y., Cui, F.Z., Hu, K., Zhu, X.D., Fan, D.D., (2007), "Bone regeneration by using scaffold based on mineralized recombinant collagen", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 86, 29-35.

CHARACTERIZATION AND BIOCOMPATILITY OF COLLAGEN MATRIX FOR BONE REGENERATION

A.M. Cortizo¹, G. Ruderman², I.G. Mogilner², E.J. Tolosa²

¹GIOMM, Departamento de Ciencias Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

²IFLYSIB (CONICET-UNLP-CIC), La Plata, Argentina

E-mail: cortizo@biol.unlp.edu.ar

Abstract. Collagen, the more abundant bone matrix protein, plays a fundamental role in the biological and structural integrity of skeleton. Collagen membranes without a molecular order has been previously use to perform scaffolds for bone tissue regeneration. Thus, collagen is a natural candidate to improve damaged organs or tissues. The aim of the present work is to characterize collagen scaffolds with or without a molecular order and study their biocompatibility to bone cells in culture. A native collagen of 98% purity, from bovine Aquiles tendon was used [Ruderman et al., 2007]. Collagen membranes, with no molecular order, or ordered membranes were prepared (according to patented in 1999 and 2007). Surface membrane characterization was performed by SEM and optic microscopy (Sirius red staining). Ordered membranes showed a typical topography like striates or pleated sheets, correlating with a molecular ordering. Biocompatibility of osteoblasts and murine machophages growing on non ordered and ordered collagen films was evaluated. Adhesion, proliferation (Giemsa stained-cell counting cells) and differentiation to osteblastic phenotype (alkaline phosphatise expression and nodules of mineralization) were assessed.

Cell growing on ordered collagen matrix adhered more (1.5-1.7 fold) and grown better (2.3-2.6 fold) than that on the non-ordered collagen matrix. Acridine orange staining-macrophages demonstrated more dead cells on the no-ordered collagen. Pre-osteoblasts MC3TE1 (4 weeks in osteogenic media) expressed more alkaline phosphatase (2.6 fold) and mineral in the ordered collagen matrix. Preliminary studies suggest that the natural collagen-prepared matrix could be useful in the bone tissue regeneration.

Keywords: *Collagen, Scaffolds, Biocompatibility, Bone regeneration, Tissue engineering*