



PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE MATRICES POROSAS Y NO POROSAS DE PCL/PFIP

Fernández, JM^{1, 3}; Abraham, GA²; Cortizo, SM¹; Cortizo, AM³

¹ INIFTA, CCT-La Plata, UNLP-CONICET, Argentina

² Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA), (UNMDP-CONICET), Mar del Plata, Argentina

³ Bioquímica Patológica, Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP. La Plata, Argentina
E-mail: jmfernandez33@yahoo.com.ar

Resumen. Actualmente existe un alto interés en el estudio de polímeros sintéticos biodegradables para su aplicación como andamiajes biocompatibles en distintas áreas de ingeniería de tejidos. Poli(ϵ -caprolactona) (PCL) y poli(diisopropilfumarato) (PDIPF) han demostrado ser buenos sustratos para la adhesión, el crecimiento y la diferenciación de dos líneas de células osteoblásticas, MC3T3E1 derivadas de células de calvaria ratón y UMR106 osteosarcoma de rata, sugiriendo que estos polímeros pueden ser útiles en la regeneración de tejido óseo. Para obtener un material con buenas propiedades mecánicas y una tasa de degradación intermedia entre ambos homopolímeros se ha preparado una mezcla de PCL y PDIPF compatibilizada por ultrasonido de alta intensidad. Esta mezcla ha demostrado poseer mejores propiedades mecánicas y mayor biocompatibilidad que los homopolímeros correspondientes.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad de células UMR106 frente a matrices porosas y no porosas de la mezcla de PCL-PFIP compatibilizadas. Las matrices porosas se obtuvieron mediante electrospraying de una solución de la mezcla en cloroformo. Las matrices no porosas se obtuvieron por casting de una solución en cloroformo. Las películas obtenidas se evaluaron por SEM y microscopía óptica, usando el software "Image J" para caracterizarlas morfológicamente. En ambas matrices se realizaron ensayos de adhesión (a 1h), proliferación (a 24 h) y actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP) (a 24 y 48 h, control: superficie de placa de cultivo).

La técnica de electrospraying permitió la obtención de matrices porosas formadas por microgotas tal como se observa mediante SEM. La adhesión y proliferación y la actividad de ALP de las células crecidas sobre las películas aumentó significativamente sobre la matriz porosa respecto a la matriz no porosa. El aumento del área superficial proporcionada por la estructura porosa incrementó los marcadores de actividad celular.

Palabras Claves: Electrospraying, células, polímeros, matrices porosas.

1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejido óseo es un campo de la ciencia interdisciplinario que utiliza principios de distintas ciencias con el fin de obtener materiales que ayuden en la reparación o regeneración ósea [Burg, 2000; Kellomäki, 2000]. Con tal fin, se utilizan diversos materiales tales como polímeros naturales (p.e.: colágeno, quitosano) o sintéticos (p.e.: poli(ácido láctico, poli(ϵ -caprolactona), sustancias inorgánicas (p.e.: hidroxiapatita, fosfato tricálcico) o materiales compuestos [Hutmacher, 2000]. En trabajos previos se ha demostrado que los polímeros poli ϵ -caprolactona (PCL) y polifumarato de diisopropilo (PFIP) pueden emplearse para la preparación de andamiajes para ingeniería de tejidos [Cortizo, 2008]. También se ha

demostrado que la mezcla compatibilizada por ultrasonido de la mezcla PCL-PFIP, aumenta las propiedades osteoinductoras y mejora las propiedades mecánicas de las matrices producidas respecto a los homopolímeros por separado [Fernández, 2010].

Una de las condiciones importantes en el desarrollo de una matriz es que estas sean porosas [Karageorgiou, 2005] con el fin de aumentar la osteoconducción, es decir, una buena entrada de nutriente como ser glucosa, aminoácidos y oxígeno y salida de desechos metabólicos como dióxido de carbono hacia y desde el seno de las matrices respectivamente. Se espera también que esta propiedad favorezca tanto la migración celular al interior de la matriz y la generación de vasos sanguíneos que lleven los nutrientes y elimine las toxinas. Con esta finalidad se han desarrollado una extensa variedad de técnicas para obtener las matrices porosas, entre las que se encuentran las técnicas de electrospinning y electrospraying. Brevemente, esta técnica consiste en flujo de una solución polimérica por una boquilla a la cual se le aplica una alta tensión (Fig. 1), produciendo la proyección de chorros continuos o discontinuos que se colectan en un electrodo que se encuentra conectado a tierra.

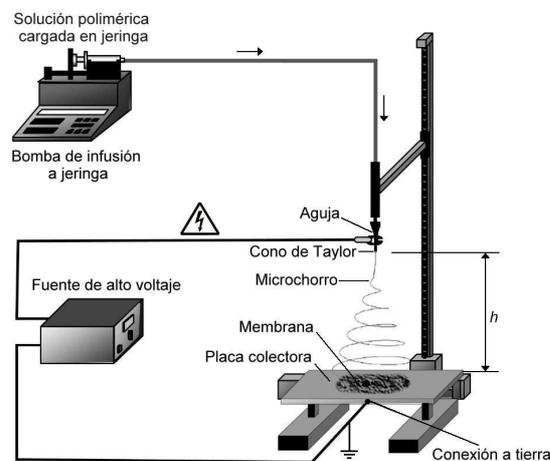


Figura 1: Esquema básico de un equipo de electrospinning/electrospraying

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la porosidad sobre la actividad de células UMR106 crecidas en matrices de la mezcla de PCL-PFIP compatibilizadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de la mezcla compatibilizada fue realizada por ultrasonido y disuelta en cloroformo en una concentración de 4 % p/v [Fernández, 2010]. Las películas no porosas fueron obtenidas por el método de casting. Para esto se depositó la solución en cajas de petri de 5.5 cm de diámetro y dejó evaporar del solvente en condiciones ambientales, luego de lo cual fue expuesta al vacío hasta llegar a peso constante. Con el fin de obtener las películas porosas, otra solución de igual concentración de la mezcla fue procesada en un equipo de electrospinning con un flujo de 1.5 ml/h y un voltaje aplicado de 0.7 kV/cm y recolectada sobre portaobjetos de dimensiones 2.6 cm de largo x 1.8 cm de ancho.

Las películas obtenidas se evaluaron por SEM y microscopía óptica, usando el software "Image J" para caracterizarlas morfológicamente. Para ello se utilizó un microscopio electrónico de barrido Phillips505 (Holland) con un voltaje de aceleración de 20 kV y las imágenes se analizaron mediante el Soft Imaging System ADDAII. La microscopía óptica se realizó empleando un instrumento NIKON eclipse e400 y analizadas usando el software Image J.

Las células UMR106 fueron cultivadas en DMEM con FBS 10%, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml de penicilina y una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 °C. Las células se sembraron en frascos de 75 cm² y sub-cultivadas con tripsina-EDTA. Para los diferentes experimentos, las células se sembraron en la matriz polimérica y se incubaron en el 10% FBS-DMEM.

Adhesión y Proliferación: Las células UMR106 cultivadas sobre las películas durante 1 o 24 hs, se lavaron con PBS, se fijaron con metanol y se tiñendo con Giemsa. El número de células se evaluó contando las células por campo con en 10 campos/film usando un microscopio invertido con un objetivo de 40x.

Producción de Colágeno tipo 1: Sobre las células sembradas en las matrices, se evaluó la producción de Colágeno tipo 1 luego de 24 y 48 hs de cultivo. Brevemente, las células fueron fijadas con solución de Bouin, teñidas con colorante Sirius Red y luego, el material teñido fue extraído con NaOH 0.1N, analizando la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm.

Actividad de Fosfatasa Alcalina: las células UMR106 cultivadas durante 24 y 48 hs sobre las distintas películas se extrajeron con Triton X100 0.1%. Sobre alícuotas del extracto se determinó el contenido de proteínas mediante la técnica de Bradford [Bradford 1976] y en otra alícuota se evaluó espectrofotométricamente (longitud de onda de 405 nm) la cantidad del sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) hidrolizado a p-nitrofenol (p-NP) a 37 °C en 10 minutos. Los controles de los experimentos se realizaron sobre cajas de petri de plástico para cultivo celular.

Los resultados se expresan como la media ± SEM obtenidos a partir de los experimentos. Las diferencias entre los grupos fueron evaluadas por un modelo lineal con la prueba de Tukey post-hoc utilizando GraphPad en la versión Est. 3,00 (Gráfico Pad Software, San Diego, California, EE.UU.). Un valor de p <0,05 fue considerado significativo para todos los análisis estadísticos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La microscopía de SEM (Fig.2) muestra la morfología de las películas obtenidas por el método de electrospraying (Fig.2 A,B) y por el método de casting (Fig. 2C,D).

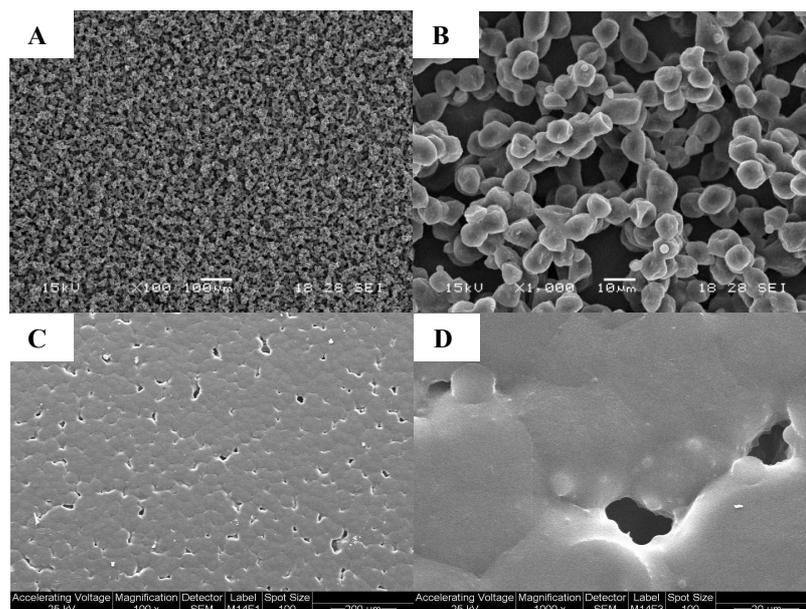


Figura 2: Micrografía SEM de la película obtenida de la mezcla obtenida por electrospinning (A:100X; B:1000X) y película de mezcla obtenida por casting (C:100X; B:1000X)

En estas fotos, se puede observar las diferencias morfológicas de las membranas obtenidas por los dos métodos. Las películas obtenidas por el método de casting muestran una superficie con pocos poros. Por el contrario, las membranas obtenidas por el método de electrospinning consisten en una estructura altamente porosa, con poros interconectados, formados por microgotas del polímero de un tamaño $6.7\mu\text{m} \pm 0.1\mu\text{m}$. Esta morfología es característica de una variable del método de electrospinning, llamada electrospinning siendo muy distintas a las películas obtenidas por el método de electrospinning (Fig.3), las cuales están formadas por un entramado de nanofibras [Caracciolo, 2009].

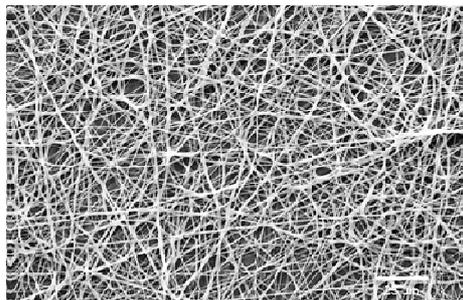
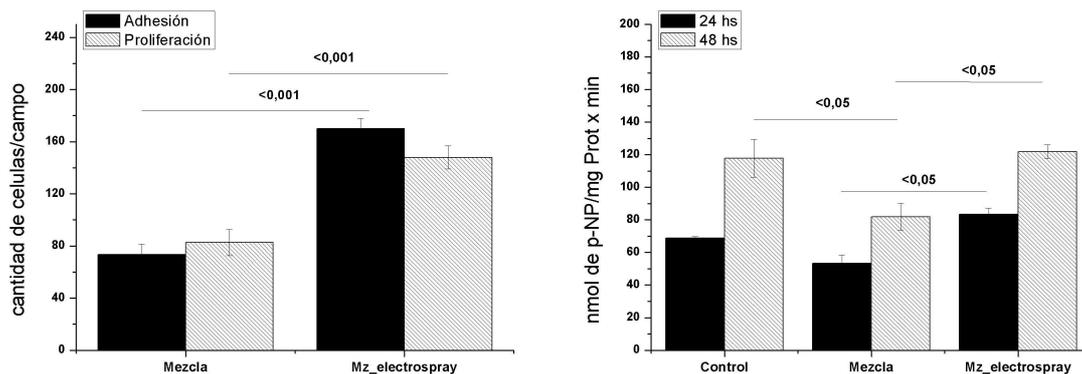


Figura 3: Micrografía obtenida por electrospinning de una solución de poliuretano [Caracciolo, 2009].

Los estudios de biocompatibilidad demostraron que tanto la adhesión y proliferación celular, como los marcadores osteoblasticos (Fosfatasa Alcalina y producción de Colágeno) (Fig.4) aumentaban en forma significativa en las células cultivadas sobre la matriz porosa respecto a la no porosa.



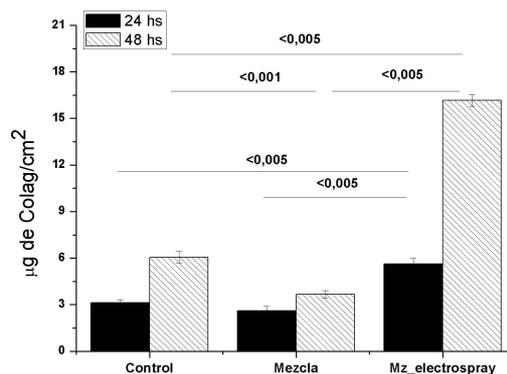


Figura 4: (Sup. Izquierda) Adhesión y proliferación de las células sobre las membranas. (Sup. Derecha) Actividad de Fosfatasa alcalina a 24 y 48 h. (Inferior) Producción de Colágeno tipo 1 a 24 y 48 h.

De las figuras anteriores se puede observar que la introducción de poros en una membrana lleva a un aumento de la actividad celular, en este caso aumentando en forma significativa tanto la adhesión y proliferación como los otros dos parámetros de diferenciación osteoblastica.

4. CONCLUSIONES

Mediante este trabajo se puede comprobar que las matrices de la mezcla compatibilizada por ultrasonido de los polímeros PCL/PFIP obtenidos por el método de electrospinning, poseen buena biocompatibilidad y mayor estimulación del crecimiento y diferenciación osteoblastica.. Esto se debe a un aumento del área superficial proporcionada por la estructura de la matriz la cual posee mejores características morfológicas para funcionar como sitios de anclaje tridimensional para las células, como así también un aumento de la capacidad de entrada de nutrientes y salida de desechos tóxicos de las células que han crecido en el interior de los andamiajes. De esta forma, las matrices obtenidas por deposición de microgotas mediante el método de electrospinning permiten obtener estructuras poliméricas degradables de interés en el campo de la ingeniería de tejido óseo.

REFERENCIAS

- Burg, K.J.L., Porter, S. e Kellam, J.F. (2000), "Biomaterial developments for bone tissue engineering", *Biomaterials*, 21, 2347-2359.
- Caracciolo, P.C., Thomas, V., Vohra, Y.K, Buffa, F e Abraham, G.A. (2009) "Electrospinning of novel biodegradable poly(ester urethane)s and poly(ester urethane urea)s for soft tissue-engineering applications". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (10) 2129-2137
- Cortizo, M.S., Molinuevo, M.S. e Cortizo, A.M. (2008), "Biocompatibility and biodegradation of polyester and polyfumarate based-scaffolds for bone tissue engineering", *J Tissue Eng Regen Med.*, 2, 33-42.
- Fernandez, J.M, Molinuevo, M.S, Cortizo, A.M., McCarthy, A.D. e Cortizo, M.S. (2009), "Characterization of poly-ε-caprolactone/polyfumarate blends as scaffolds for bone tissue Engineering", *Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition*, en prensa.
- Hutmacher, D.W. (2000), "Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage" *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
- Karageorgiou, V. e Kaplan, D. (2005), "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis" *Biomaterials*, 26, 5474-5491.
- Kellomäki, M., Niiranen, H., Puumanen, K., Ashammakhi, N., Waris, T. Pertti Tormälä, P. (2000) "Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation" *Biomaterials*, 21, 2495-2505.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF POROUS AND NON POROUS MATRICES OF PCL / PFIP

Fernández, JM^{1, 3}; Abraham, GA²; Cortizo, SM¹; Cortizo, AM³

¹ INIFTA, CCT-La Plata, UNLP-CONICET, Argentina

²Instituto de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de Materiales (INTEMA), (UNMDP-CONICET), Mar del Plata, Argentina

³Bioquímica Patológica, Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP. La Plata, Argentina
E-mail: jmfernandez33@yahoo.com.ar

Abstract. *Currently there is a high interest in the study of synthetic biodegradable polymers for use as biocompatible scaffolds in different areas of tissue engineering. Poly (epsilon-caprolactone) (PCL) and poly (diisopropilfumarato) (PDIPF) have proven to be good substrates for adhesion, growth and differentiation of two osteoblastic cell lines, MC3T3E1 calvaria cells derived from mouse and rat osteosarcoma UMR106, suggesting that these polymers can be useful in bone tissue regeneration. For a material with good mechanical properties and degradation rate intermediate between the two homopolymers was prepared a mixture of PCL and made compatible PDIPF high intensity ultrasound. This mix has proved to have better mechanical properties and greater biocompatibility than the corresponding homopolymers.*

The aim of this study was to evaluate the activity of UMR106 cells compared to porous and non porous matrices of mixed PFIP PCL-compatible. The porous matrices were obtained by electro spraying a solution of the mixture in chloroform. The non-porous matrices were obtained by casting a chloroform solution. The obtained films were evaluated by SEM and optical microscopy, using the software "Image J" to characterize morphologically. In both matrices was tested adhesion (1h), proliferation (24 h) and alkaline phosphatase activity (ALP) (24 and 48 h, control: culture plate surface).

Electro spraying technique allowed them to produce porous matrices formed by droplets as observed by SEM. The adhesion and proliferation and ALP activity of cells grown on the films increased significantly over the porous matrix on the porous matrix. The increased surface area provided by the porous structure increased markers of cellular activity.

Keywords: *Electro spraying, cells, polymers, porous matrices.*