

Adhesión de osteoblastos sobre andamios de PLA-PLG-biocerámico-colágeno, fotosensibilizados con luz UV

Osteoblast adhesion on PLA-PLG bioceramic-collagen scaffolds, photosensitized UV light

Adesão de osteoblastos no andaime PLA-PLG-biocerâmica-colágeno, fotossensibilizada com luz UV

Hugo A. Estupiñán Duran^{1*}; Darío Y. Peña Ballesteros²; Nemma M. Martínez²

¹Departamento de Materiales y Minerales, Universidad Nacional de Colombia, calle 75 N° 79A-51 Núcleo Robledo, Medellín Colombia.

²Escuela de Ingeniería Metalúrgica y Ciencia de los materiales, Universidad Industrial de Santander, carrera 27 calle 9 Ciudad Universitaria, Bucaramanga, Colombia.

*haestupinand@unal.edu.co

Fecha Recepción: 27 de diciembre de 2013

Fecha Aceptación: 16 de julio de 2014

Resumen

Empleando simultáneamente, las técnicas de Espectroscopia de Impedancia Electroquímica (EIE) y Microbalanza de Cristal de Cuarzo (MCC) en una celda de tres electrodos, bajo condiciones de bioseguridad y adicionando una concentración de 60000 células/ml de osteoblastos, con 2ml de medio celular, fue evaluada la adhesión celular sobre películas delgadas de polímeros (PLA-PGA) con 10% de biocerámicos de hidroxiapatita y fosfato tricálcico (HAP, TCP- β). Estas películas fueron obtenidas por electrodeposición catódica sobre un sustrato de Ti6Al4V ELI y sobre cristales de cuarzo con Au-Ti. Estos materiales, luego fueron modificados superficialmente con colágeno disuelto, pipeteado homogéneamente sobre la superficie polimérica en concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ y luego, fueron irradiados con luz ultravioleta durante 10 minutos. Observaciones de Microscopía electrónica se llevaron a cabo para estudiar la morfología superficial, comprobando una mayor adhesión por el efecto de la fotooxidación por irradiación UV.

Palabras clave: ingeniería de tejidos, irradiación ultravioleta, adhesión celular, espectroscopia de impedancia electroquímica, microbalanza de cristal de cuarzo.

Abstract

Simultaneously using the techniques of Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) and quartz crystal microbalance (MCC) in a three-electrode cell under conditions of biosafety and adding a concentration of 60000 cells/ml of osteoblasts, with 2ml of medium cell was evaluated cell adhesion on thin films of polymers (PLA-PGA) bioceramic 10% tricalcium phosphate and hydroxyapatite (HAP, TCP- β). These films were obtained by cathodic electrodeposition on ELI Ti6Al4V substrate and quartz crystals with Au-Ti. These materials were then surface modified with dissolved collagen, pipetting homogeneously on the polymer surface at concentrations of 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ and then they were irradiated with UV light for 10 minutes. Electron microscopy observations were carried out to study the surface morphology, ensuring greater adherence by the effect of photo-oxidation by UV irradiation.

Keywords: tissue engineering, ultraviolet irradiation, cell adhesion, electrochemical impedance spectroscopy, quartz crystal microbalance.

Resumo

Simultaneamente, utilizando as técnicas de espectroscopia de impedância electroquímica (EIA) e microbalança de cristal de quartzo (MCC), em uma célula de três eléctrodos em condições de segurança biológica e a adição de uma concentração de 60000 células/ml de osteoblastos, com 2ml de meio de células foi avaliada a adesão celular em filmes finos de polímeros (PLA-PGA) biocerâmica 10% fosfato tricálcico e hidroxiapatita (HAP, TCP - β). Estes filmes foram obtidos por electrodeposição catódica em ELI Ti6Al4V substrato de quartzo e cristais com Au-Ti. Estes materiais foram então superfície modificada com dissolvido colagénio, pipetagem homogeneamente na superfície do polímero em concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/ml}$ e, em seguida, foram irradiadas com luz UV durante 10 minutos. Observações de microscopia eletrônica foram realizados para estudar a morfologia da superfície, garantindo maior aderência pelo efeito da foto-oxidação por irradiação UV.

Palabras-chave: *engenharia de tecidos, a irradiação ultravioleta, adesão celular, espectroscopia de impedância eletroquímica, cristal de quartzo microbalance.*

Introducción

Biomateriales destinados a la fijación y regeneración ósea, presentan un interés creciente en el desarrollo de materiales funcionales e inteligentes capaces de estimular la respuesta biológica necesaria para restablecer las funciones que el tejido ha perdido. En el caso de los materiales para fijación ósea, la idea es crear un material tridimensional que sea capaz de soportar las cargas iniciales y se degrade de forma gradual, transfiriendo las cargas de forma progresiva al nuevo hueso, de manera que su función es, por tanto temporal, ya que el material está llamado a reabsorberse una vez restablecida la función del tejido. En el caso de los materiales para regeneración ósea, el objetivo de estos materiales es interactuar con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, combinando bioreabsorbabilidad y bioactividad dentro del mismo material. Los materiales más utilizados para el desarrollo de las estructuras tridimensionales, son las hidroxiapatitas, los polímeros biodegradables, y algunos polímeros de origen natural como el colágeno o la quitina. En muchos casos las superficies de los materiales son modificadas con diferentes proteínas y factores de crecimiento que estimulan la respuesta celular, y activan los genes responsables de la diferenciación y mineralización del tejido [1,2].

Aproximadamente el 90% de la fase orgánica del hueso vivo está formada por colágeno tipo I, y el 10% restante está formado por otras proteínas que representan una pequeña cantidad en cuanto al volumen total del hueso, pero contribuyen enormemente a las funciones biológicas de éste. El colágeno es una proteína de muy baja solubilidad y

como componente estructural principal de la matriz extracelular ósea, puede ser un material de elección para su uso como almacén celular. Varios estudios han concluido que los almacenes de colágeno pueden tener propiedades bioactivas, promoviendo la migración celular hacia el almacén [3].

Los biocerámicos son compuestos químicos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos, debido a sus enlaces iónicos o covalentes. Sus principales aplicaciones están en el sistema óseo, con todo tipo de implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones dentales, en válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales [4]. Los biocerámicos son compuestos de fosfato de calcio que han venido usándose en Ortopedia y Odontología desde los años 80. La Hidroxiapatita (HA), tiene una estequiometría similar a la del mineral óseo. Las biocerámicas de hidroxiapatita y fosfato tricálcico beta, han sido utilizadas para el relleno de defectos óseos y son biocompatibles y osteoconductoras. El fosfato tricálcico- β no es un componente natural del tejido óseo, y es, al menos en parte, bioreabsorbible, pero no más que la hidroxiapatita, ya que al implantarse en el cuerpo, comienza a disolverse y lentamente se reemplaza por tejido circundante [5].

En el área de biomateriales, hay dos tipos de polímeros sintéticos: no reabsorbibles y reabsorbibles. Los polímeros no absorbibles se han utilizado como materiales clave para la fabricación de órganos artificiales, implantes, y otros dispositivos médicos. En la mayoría de los casos, los polímeros absorbibles no son adecuados en la fabricación de dispositivos permanentes, ya que la absorción o la degradación de los materiales,

implica deterioro de las propiedades del material. Actualmente existen polímeros sintéticos bioabsorbibles utilizados en el campo biomédico, los cuales tienen la capacidad de degradarse debido a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo humano. Después de cierto tiempo de ser implantados dan lugar a productos que no son tóxicos y que pueden ser eliminados por el organismo o metabolizados por éste. Estos son materiales utilizados para formar matrices tridimensionales, que sirven como dispositivos que proporcionan a las células el apoyo necesario para su proliferación, manteniendo sus funciones diferenciadas y generando las señales biológicas requeridas para la conservación de la expresión génica específica; además, definen la arquitectura del tejido. El ácido poli-láctico (PLA) es un polímero sintético absorbible de la familia de los alfa hidroxiácidos o poliésteres alifáticos, el cual es biocompatible y biodegradable en un compuesto inmunológicamente inerte, atóxico y reabsorbible, ya que produce la metabolización del ácido láctico que comienza con la actividad de la enzima Lactado Deshidrogenasa (LDH) sobre el lactato, transformándolo a piruvato, el cual sufre una reacción de descarboxilación oxidativa, generando acetilco, enzima A que se integra en el ciclo del ácido cítrico o Ciclo de Krebs mitocondrial. El resultado de cada ciclo es ATP debido a la fosforilación oxidativa, más H_2O y CO_2 , que son posteriormente, eliminados por la respiración y por la orina.

Puede emplearse como dispositivo de fijación ósea en forma de varillas, planchas o tornillos, y como implante para sustituir fragmentos óseos o como sistema de liberación de medicamentos [6-9].

En esta investigación se evaluó la adhesión e interacción de células osteoblásticas sobre películas delgadas de mezclas de polímeros de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PLG) y biocerámicas de hidroxiapatita (HAP) y fosfato tricálcico beta (TCP- β), cuyas superficies fueron activadas con colágeno y con luz ultravioleta. Las técnicas de caracterización se realizaron combinando los métodos no destructivos de Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM).

Procedimiento experimental

Síntesis de polímeros y biocerámicas

La síntesis de los polímeros biodegradables PLA y PGA, se llevó a cabo a partir de la policondensación de los ácidos láctico y glicólico respectivamente, bajo las condiciones mostradas en las Tablas 1 y 2. Otras caracterizaciones de estos materiales obtenidos, que permitieron compararlos con los de otros autores, se muestran en un trabajo anterior [10].

Biocerámicas bioactivas (hidroxiapatita, fosfato tricálcico- β) fueron obtenidas por la técnica de precipitación acuosa, en la cual se prepararon soluciones de nitrato de calcio y fosfato de amonio. Posteriormente dichas soluciones se basificaron a un pH de 10 y se mezclaron. La mezcla resultante se mantuvo en un proceso de envejecimiento por 144 horas y luego fue decantada a temperatura ambiente. Finalmente, se calentó a $60^\circ C$ durante 24 horas y una calcinación a $1050^\circ C$ por una hora.

Obtención de los recubrimientos

Se obtuvieron películas delgadas de las soluciones mostradas en Tabla 3, disolviendo los polímeros en acetona al 10% en peso de polímero, calentando continuamente hasta la disolución total a $60^\circ C$. Los polímeros disueltos fueron inmovilizados electroquímicamente sobre cristales de cuarzo Au-Ti de 24mm de diámetro previamente esterilizados y en discos de Ti6Al4V ELI de 12mm de diámetro y 2mm de espesor, previamente pulidos hasta papel lija N° 1200 y lavados en acetona en baño de ultrasonido durante 10 minutos. El procedimiento de recubrir las muestras consistió en el empleo de una fuente de potencia, marca *Thermo electron Corporation EC570-90*, un ánodo de acero inoxidable, para aplicar un voltaje de 9 Voltios en un tiempo de 15min (condiciones halladas en pruebas preliminares). Este procedimiento fue llevado a cabo en un ambiente de bioseguridad, dentro de una cámara de flujo laminar, con el fin de mantener la esterilidad en los materiales y en el recubrimiento obtenido.

Tabla 1. Etapas de la Síntesis del PLA.

Etapa	Temperatura (°C)	Presión (mmHg)	Tiempo (h)
Deshidratación	100	760	2-3
Esterificación	180	100	6-7
Oligomerización	180	25	40
Policondensación	180	10	5

Tabla 2. Etapas para la Síntesis del PGA.

Etapa	Temperatura (°C)	Presión (mmhg)	Tiempo (h)	Agitación
1	190	150	1	Si
2	190	30	4	No
3	230	30	0,5	No
4	190	760	20	No

Tabla 3. Soluciones de polímeros y biocerámicas empleados.

Soluciones	PLA-PGA (P/V)	HAP (%P/V)	TCP-β (%P/V)
1	70/30	0	0
2	70/30	10	0
3	70/30	0	10

Se realizó un tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos manteniendo las condiciones de esterilidad, con el fin de mejorar: la morfología, adhesión, integración de los componentes de la mezcla y la eliminación del solvente de la electrodeposición. Seguidamente, para activar superficialmente el recubrimiento, se adicionó colágeno (colágeno tipo C9879 de SIGMA) sobre el mismo. Posteriormente se foto-oxidó la superficie con luz UV con una longitud de onda de 280nm durante 10min.

Para este estudio se empleó la línea celular HOS (ATCC) obtenida de *American Type Culture Collection*, constituida por células osteoblásticas procedentes de un osteosarcoma humano. Se llevó a cabo el cultivo celular en frascos de cultivo Falcon® bajo condiciones estériles a 37°C ± 0,5°C y 5% de CO₂, en medio de cultivo RPMI 1640, con 1% de L-glutamina, 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomina) y suplementado con 10% de SBF (Suero Fetal Bovino), sin fenol rojo, pH=7,2. El medio de cultivo se cambió cada dos días para garantizar suministro adecuado de nutrientes presentes en la placa de cultivo y/o en la celda electroquímica. El Suero Fetal Bovino se adquirió de *Hyclone Laboratories*.

Para los ensayos con medio de cultivo, se usaron 5mL de medio RPMI, para los ensayos con células HOS se empleó 4mL de RPMI y 1mL más de medio con la concentración de células requerido para cada ensayo. Se depositó el medio de cultivo celular RPMI y HOS sobre discos recubiertos de PLA-PGA modificado con hidroxiapatita y colágeno en una cabina de bioseguridad, la cual hace que los osteoblastos estén libres de contaminación por algún agente biológico patógeno.

Mediciones de adherencia complementarias fueron realizadas por epifluorescencia. Se tomaron los discos recubiertos con el polímero a evaluar, luego se irradiaron bajo luz UV durante 30 minutos y se depositaron en una placa de cultivo de 24 pozos. La línea celular HOS (ATCC) fue cultivada en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF). Se tomaron las células en fase exponencial, se colocaron en cada pozo y se dejaron a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂. Las mediciones se realizaron a 72 y 120h. Posteriormente se retiró la probeta del pozo, se lavó y se fijó por 10min. Se coloreó con 1µg/mL de Hoechst por 10min en oscuridad. La lectura se realizó en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400, utilizando el filtro UV2A11. Todos los ensayos se hicieron por duplicado, para cada tiempo de cultivo. Luego se observaron los cambios morfológicos del recubrimiento obteniendo correctos parámetros que indicaron adhesión celular al sustrato.

Mediciones Electroquímicas (EIS) y Gravimétricas (QCM)

Para las mediciones electroquímicas y gravimétricas simultáneas, se empleó una celda estéril de tres electrodos, donde el electrodo de trabajo fue un cristal de cuarzo recubierto, un alambre de platino como contra electrodo y un electrodo de calomel saturado en una solución 3M de KCl como electrodo de referencia. Las curvas de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIE) fueron determinadas usando un potenciostato tipo GAMRY 600 con un rango de frecuencia de 0,01 a 100KHz. Para las mediciones con la microbalanza de Cristal de Cuarzo, se empleó el modelo QCM 200 *Stanford Research Systems*, previamente calibrado. En la Figura 1 se muestra una imagen del montaje empleado.

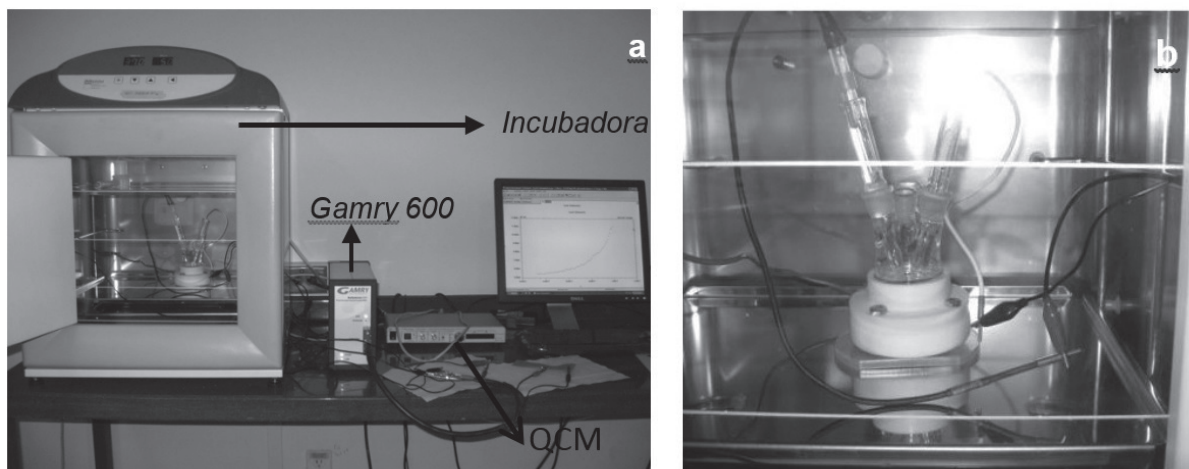


Figure 1. a) Montaje para ensayos electroquímicos y de QCM, b) detalle de la celda empleada.

Resultados y Discusión

Análisis del proceso de adhesión por Espectroscopia de Impedancia Electroquímica EIE

La técnica de EIE fue utilizada para determinar la adhesión celular a partir de la foto-oxidación con UV de la proteína de colágeno sobre recubrimientos de PLA-PGA mezclado con biocerámicas (HAP, TCP- β). Para asegurar la caracterización completa de la interface y de los procesos superficiales, las mediciones de EIE fueron realizadas con siete puntos por década, desde 0,01Hz hasta 100KHz, a un potencial natural de 0,0V respecto al potencial del electrodo. Los espectros de impedancias obtenidos mostraron la presencia de tres constantes de tiempo ($\tau=R \times C$, medida en segundos), donde R es la resistencia asociada al proceso electroquímico medida en ohmios y C es la capacitancia medida en Faradios.

Los espectros obtenidos, fueron ajustados a un modelo de circuitos equivalentes propuesto por los autores de este trabajo, como se muestra en la Figura 2 y simulados en el software Zview2, el cual permitió describir la explicación física del fenómeno de adhesión de las células, en tres procesos electroquímicos en interfaces fijas entre: cristal-recubrimiento, recubrimiento-células y células-electrolito (medio de cultivo: R_{pmi}). Estos procesos, se representan mediante constantes de relajación de la transferencia de carga, relacionadas por capacitancias y resistencias.

Las constantes de tiempo están relacionadas entre sí, en paralelo, debido a la similitud en las constantes conductivas, mostrando que los

espectros se traslapan. Esta configuración en el modelo propuesto en este trabajo se relaciona con una resistencia en serie que representa la oposición a la transferencia de carga del electrolito (R_{rpm}). Así mismo, C_{cells/rpm} y R_{cells/rpm}, corresponde a la capacitancia y la resistencia que corresponde a la relajación de la transferencia de carga en la interfase que forman las células con el medio fisiológico correspondiente; C_{cells/poli} y R_{cells/poli}, representa la capacitancia y la resistencia que corresponde a la relajación de la transferencia de carga en la interfase que forman las células con el polímero. Complementariamente, el modelo representa también la capacitancia y la resistencia que corresponde a la interfase entre el polímero y los electrodos de trabajo (en este caso los cristales de cuarzo) y se representan con el circuito en paralelo C_{poli/crist} y R_{poli/crist}. Este modelo propuesto, se ajusta al comportamiento presentado por las películas poliméricas depositadas sobre los sustratos de Ti6Al4V ELI.

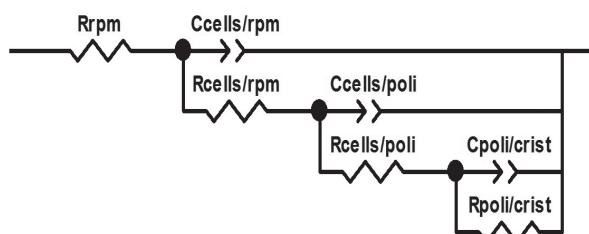


Figura 2. Modelo de circuitos equivalentes que describe la adhesión celular al recubrimiento.

El error en los ajustes realizados en las simulaciones, en términos estadísticos de χ^2 , fue menor de 10^{-4} entre los datos obtenidos y los

simulados. En la Figura 3 se muestra un caso típico de los ajustes realizados (comprobado en la coincidencia aproximada del espectro obtenido

experimentalmente y el espectro obtenido por simulación).

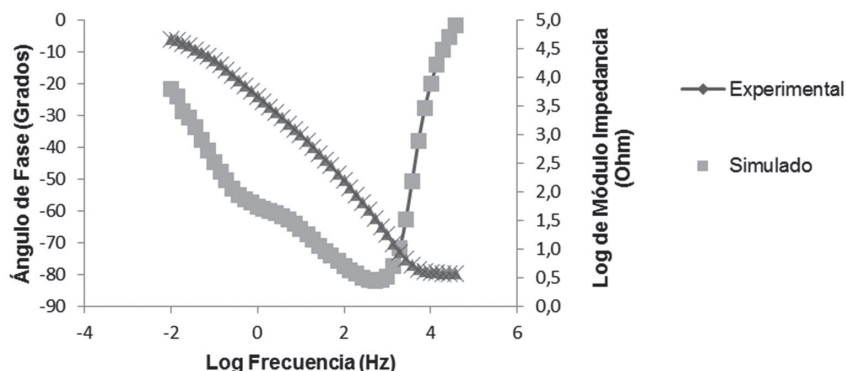


Figura 3. Representación del ajuste de los espectros de Bode mediante simulación en el software Zview.

En estos espectros de ángulo de fase, módulo de impedancia y frecuencia, se observa que para altas y bajas frecuencias el sistema se vuelve más resistivo. Si esa caída de potencial es menor que la resistencia a la transferencia de carga, la corriente circulará por el capacitor, iniciándose un decremento en el ángulo de fase, lo cual se observa para frecuencias intermedias. El análisis de la resistencia a la transferencia de carga obtenida por simulación del modelo de circuitos equivalentes propuesto, donde este valor, en la interfase células-recubrimiento permite determinar la mayor o menor adhesión celular. A medida que aumenta

el tiempo, existe un aumento en la resistencia a la transferencia de carga células-polímero, lo que implica que con el tiempo, las células pasan a ser más resistivas, oponiéndose más al paso de la corriente. El aumento significativo en la resistencia indica que las células se encuentran en un estado de isquemia, debido probablemente a la muerte o estresamiento de las mismas.

En la Figura 4 se muestra el comportamiento de la transferencia de carga entre las células y el recubrimiento polimérico en un periodo de tiempo de 24 horas para las mezclas de polímero PLA-PLG con los TCP y HAP y colágeno empleados.

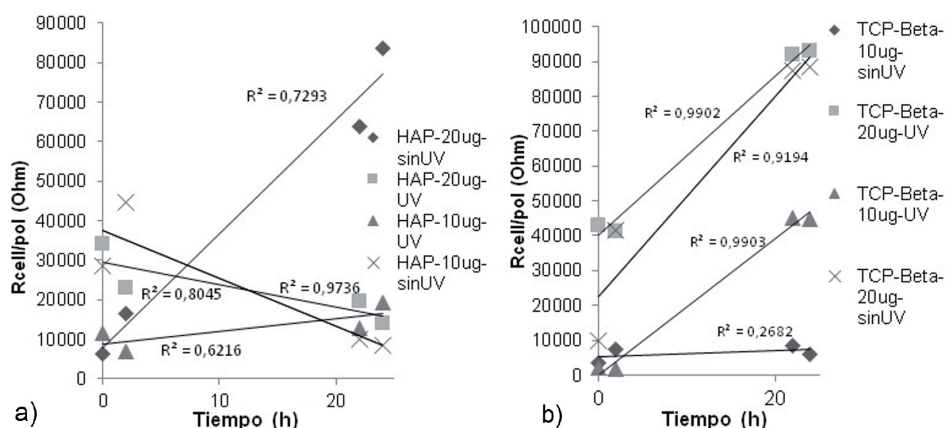


Figura 4. Resistencia a la transferencia de la carga entre las células osteoblásticas y los recubrimientos vs. Tiempo de evolución celular. a) Hidroxiapatita b) fosfato tricálcico β.

En estas gráficas, se muestra un comportamiento relativamente lineal con el tiempo de adhesión, lo cual podría estar relacionado con procesos de cobertura, degradación y proliferación, ocurriendo al mismo tiempo. Una disminución

con el tiempo en la resistencia electroquímica en esta interfase, de acuerdo a varios autores, indica, evolución celular, debido al incremento en el flujo e intercambio iónico a través de los conductos vascularizados celulares. Valores

mayores de esta resistencia, podría indicar, como ya se mencionó anteriormente, estresamiento celular o isquemia. Este comportamiento se observa de forma más relevante en el Fosfato Tricalcico-β, indicando que la Hidroxiapatita es más activa que el TCP-β y tiene mejores propiedades de reabsorción lo cual permite una interacción favorable entre el andamio modificado superficialmente y las células. Un fenómeno particular se observa en el comportamiento del TCP-β con 20μg de colágeno con UV, donde los niveles de isquemia son menores (menor incremento en la resistencia a la transferencia de carga). Un mejor ajuste presentado en el caso del andamio con 20μg de colágeno foto sensibilizado con UV, podría indicar un mejor comportamiento del andamio, al soportar eficientemente los procesos de evolución celular y reabsorción del mismo. Un alejamiento de la linealidad, podría representar que el andamio o película depositada, se afecta por procesos de degradación hidrolítica, los cuales pueden ser más relevantes que los procesos de evolución celular, tal es el caso del comportamiento mostrado por la muestra TCP-Beta-10μg-sin UV (R²= 0,2682) [11,12].

Análisis del proceso de adhesión por microbalanza de cristal de cuarzo.

La QCM es una potente técnica para el seguimiento de la cinética de adsorción de diferentes sistemas, desde moléculas hasta células vivas. Se considera el cristal y los electrodos depositados como un solo sistema, y como “capas simples” al material que se deposite sobre el electrodo. Esto implica suponer que las impedancias del electrodo y del otro material depositado sobre él son aditivas. Esta condición se cumple cuando el electrodo es muy rígido y de pequeño espesor [11,12]. En la ecuación de Sauerbrey (1), para películas delgadas, la frecuencia de resonancia es inversamente proporcional al espesor de la película [13].

$$\Delta F = \frac{-2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (1)$$

Donde ΔF es la medición de cambio de frecuencia [Hz], F_0 es la frecuencia de resonancia del modo fundamental microbalanza de cuarzo [Hz], A , es el área geométrica activa del cristal piezoeléctrico, ρ_q es la densidad del cuarzo $2,648 \text{ [g.cm}^{-3}\text{]}$, μ_q es el módulo de corte del cuarzo $[2,947 \times 10^{11} \text{ g.cm}^{-1} \text{ s}^{-2}\text{]}$, Δm es el cambio de masa [μg], por lo tanto agrupando todos los valores constantes, se tiene que:

$$\Delta F = -C_f \Delta m \quad (2)$$

El factor de sensibilidad para el cristal C_f tiene un valor $56,6 \text{ Hz}\mu\text{g}^{-1}\text{cm}^2$ para un cristal Au-Ti 5MHz. En la Figura 5 se observa la variación de la masa por unidad de área respecto al tiempo, obtenida de los ensayos de microbalanza de cristal de cuarzo para el fosfato tricálcico-β y la hidroxiapatita, respectivamente.

La disminución en la pendiente de las gráficas representa la pérdida de masa por área geométrica activa del recubrimiento, indicando una disminución de la adhesión celular. Este comportamiento constante en la variable masa por unidad de área podría estar relacionada con que la degradación del recubrimiento es simultánea al proceso de adhesión celular, lo cual es más notable en los casos donde la concentración de colágeno fue de 10μg/ml con un tratamiento con UV y mezcla con HAP y TCP-β. En la Figura 6 se muestra una imagen SEM de los osteoblastos adheridos al andamio de PLA-PLG-HAP-colágeno, resultante de este estudio. Estos resultados corroboran aproximadamente el comportamiento observado en las gráficas de resistencia a la transferencia de la carga entre las células osteoblásticas y los recubrimientos vs. Tiempo de evolución celular.

Un modelo de circuitos equivalentes que separe el comportamiento de degradación del andamio y la adhesión celular se propone para un próximo estudio. Otros autores, como Cheng y colaboradores han confirmado que la inclusión de hidroxiapatita y colágeno en andamios, favorece la fotosensibilidad e incrementa la regeneración celular [14].

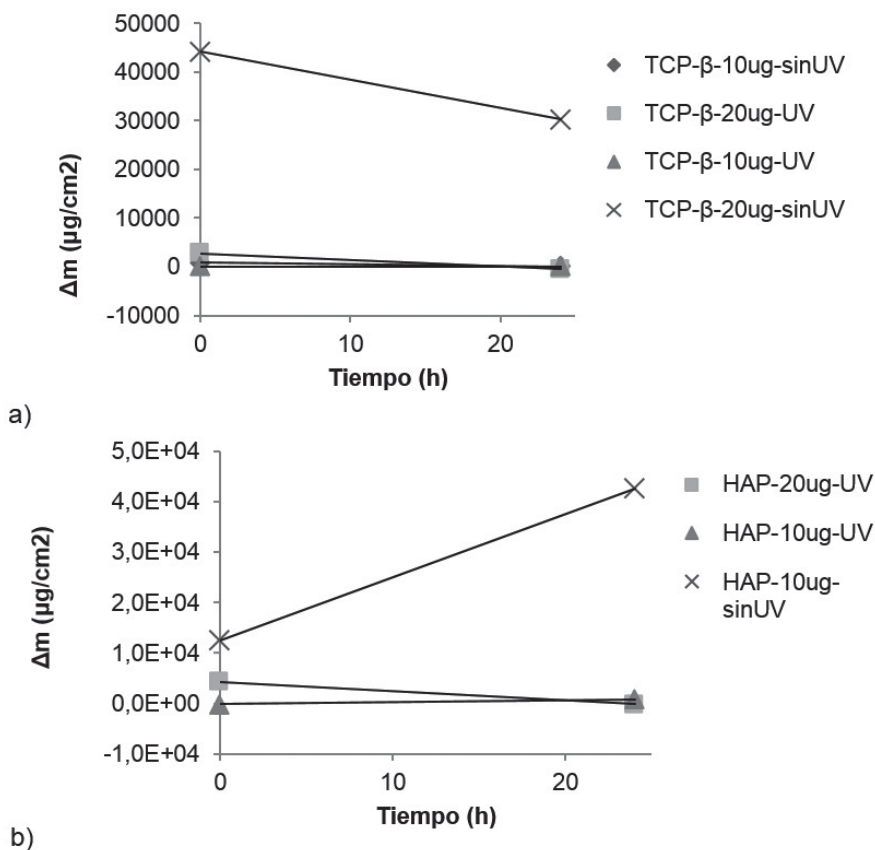


Figura 5. Relación de la variación de la masa por unidad de área respecto al tiempo. a) fosfato tricálcico β, b) Hidroxiapatita.

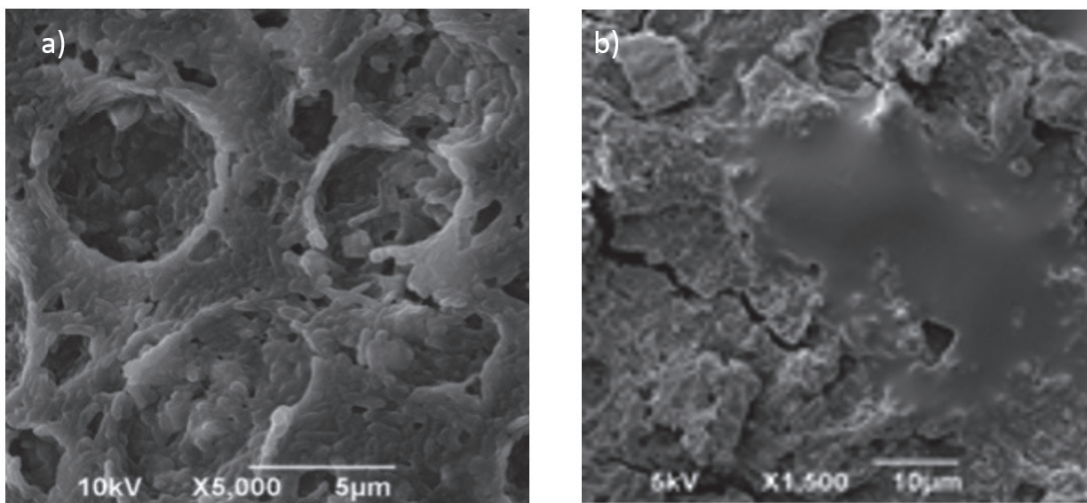


Figura 6. SEM de PLA-PLG-HAP-colágeno, a) sin y b) con células adheridas en su superficie.

En esta imagen, se observan los osteoblastos, adheridos a la superficie porosa del andamio foto-oxidado por UV, con una aparente adecuada distribución y cobertura de las células.

Conclusiones

Las mezclas de PLA-PLG y de fosfato tricálcico-β, a mayores concentraciones de colágeno,

mostraron un comportamiento resistivo en el proceso electroquímico medido entre las células y el fluido, lo cual indica un decrecimiento del proceso de adhesión; mientras, para las mezclas con Hidroxiapatita, se presentó un comportamiento capacitivo. A concentraciones menores de colágeno, se presentó una respuesta resistiva en este proceso.

El modelo de circuitos equivalentes propuesto, corresponde fielmente a la representación de las interacciones de las células con el material y el fluido o medio, cuya respuesta del proceso de intercambio iónico, fue representada mediante el balance de resistencias altas y bajas en paralelo de los procesos entre las células y el fluido y las células con el material, respectivamente.

El uso de irradiación ultravioleta para activar la superficie como una foto-oxidación, es un método adecuado para mejorar la adhesión celular de andamios poliméricos. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, esta foto-oxidación es más favorable cuando se emplea colágeno en el andamio e hidroxiapatita. En este orden de ideas, el colágeno permite incrementar la fotosensibilidad de la superficie del andamio, que preferiblemente, contenga hidroxiapatita.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias por la financiación de este trabajo.

Referencias bibliográficas

- [1] Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: hondrocytes and cartilage. *Arthritis Res.* 2002;4(3):63-8.
- [2] Rodil SE. Modificación superficial de biomateriales metálicos, *LatinAm. J. Met. Mat.* 2009;29(2):67-83.
- [3] Kokubo T, Kushitani H., Solutions Able to Reproduce Invivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3. *Jl of Biomed Mat Res.* 1990;24:721-34.
- [4] Ginebra MP. Desarrollo y caracterización de un cemento óseo basado en Fosfato Tricalcico- α para aplicaciones quirúrgicas (Tesis Doctoral) Barcelona, España: Universidad Politécnica de Catalunya; 1996.
- [5] Hoppe A, Nusret SG, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics, *Biomat.* 2011;32:2757-74.
- [6] Etchenique R. Aplicaciones analíticas de la balanza de cristal de cuarzo: Microgravimetría y Microrreología (Tesis Doctoral) Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires; 1998.
- [7] Ward ZL, Michael D. Determination of Contact Angles and Surface Tensions with the Quartz Crystal Microbalance. *Anal. Chem.* 1996;68:1285-91.
- [8] Joerg K, Achim M. Matrices and scaffolds for protein delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv Rev.* 2007;59:274-91.
- [9] Parada D, Estupiñán H, Peña D, Vásquez C, Laverde D. Synthesis, electrodeposition and characterization of a bioabsorbable polymer coating from l-lactic acid for biomedical applications. *Ingeniare, Rev. chil. ing,* 2009;17(3):365-74.
- [10] Kirchhof K, Groth T. Surface modification of biomaterials to control adhesion of cells, *Clin Hemorheol Micro.* 2001;39:247-51.
- [11] Jin-Soo P. An electrical impedance spectroscopic (EIS) study on transport characteristics of ion-exchange membrane systems. *J. Colloid Interface Sci.* 2006;300:655-62.
- [12] Pavel R, Ziqing D, Yicheng L. ZnO nanostructure-modified QCM for dynamic monitoring of cell adhesion and proliferation, *Biosens. Bioelectron.* 2013;41(15):845.
- [13] Chih-Chang Y, Cheng NC, Yun-Ting L. The effect of polymer molecular weight and UV radiation on physical properties and bioactivities of PCL films, *Cell. polym.* 2011;30(5):227-42.