



Estudio de biocompatibilidad de membranas de poli- ϵ -caprolactona (PCL) y estroncio (Sr) con aplicación en ingeniería de tejido óseo

M. L. Torres

Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

torresmaluz@gmail.com

Director: J. M. Fernández

Laboratorio de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral (LIOMM), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Tópico: Polímeros

Resumen

Ingeniería de Tejido Óseo (ITO) nace para superar las dificultades asociadas a los tratamientos actuales utilizados para en distintos trastornos óseos. Esta ciencia interdisciplinaria se basa en la utilización de matrices que actúan como soportes para asistir la proliferación, diferenciación y biosíntesis celular; es decir, actuar de forma similar a la matriz extracelular biológica. En este trabajo desarrollamos matrices poliméricas de PCL con Sr que promoverán la regeneración ósea y además podrán actuar como sistema de liberación de drogas. Los resultados demostraron que no se obtuvo sistema de liberación de Sr y que la incorporación de 1%Sr favoreció tanto la proliferación de Células Progenitoras de Médula Ósea (CPMO) como la actividad de Fosfatasa Alcalina (ALP), al contrario del agregado de 5%Sr. Además, la producción de Óxido Nítrico (NO) demostró la toxicidad de las membranas de PCL+5%Sr, no así de las de PCL+1%Sr y PCL.

Palabras clave: estroncio, biocompatibilidad, células mesenquimales, ingeniería de tejido óseo.

Keywords: strontium, biocompatibility, stem cells, bone tissue engineering.

1. Introducción

Existen diversas situaciones de la práctica clínica en donde el tejido óseo dañado no puede autorepararse, como es el caso de tumores o fracturas. Las terapias convencionales para estos casos involucran métodos que poseen desventajas como ser la baja osteointegración, fatigas y desgastes de los implantes metálicos y la escasez y transmisión de enfermedades por parte de los de injertos. La Ingeniería de Tejido Óseo (ITO) nace para superar estas dificultades utilizando distintos materiales para guiar la regeneración del tejido [1]. Poli ϵ -caprolactona (PCL) es un poliéster biodegradable muy utilizado en ITO [2]. Estudios han demostrado que Estroncio (Sr) aumenta la actividad osteoblástica e inhibe la actividad osteoclástica [3]. El objetivo de este trabajo fue desarrollar matrices poliméricas utilizando PCL y Sr que permitieran la regeneración ósea y además pudiera actuar como un sistema de liberación de drogas.

2. Metodología

2.1. Desarrollo de Matrices

El polímero PCL fue obtenido comercialmente de Sigma-Aldrich y tiene un peso molecular promedio (MW) e índice de polidispersidad (IP) de 65 kg/mol y 1,53 respectivamente, según lo indicado por el fabricante.

El estroncio fue agregado a los soportes en forma de sales de $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Este fue obtenido

comercialmente de Sigma-Aldrich, posee un peso molecular de 266.62 kg/mol y una densidad de 3g/mL (25°C).

Las membranas (PCL sin Sr, PCL+1% p/p de Sr respecto de la cantidad de PCL total y PCL+5% p/p de Sr respecto de la cantidad de PCL total) fueron obtenidas por el método de Solvent Casting. Básicamente el polímero, junto con la sal de SrCl_2 , fue disuelto en cloroformo y vertidos en una placa de petri, permitiendo la evaporación del solvente hasta alcanzar peso constante. Cada membrana con Sr Para realizar ensayos con células, las matrices fueron esterilizadas por exposición a luz UV, previa inmersión en alcohol etílico 70%.

2.1.1 Observación microscópica de Matrices

La topografía de las membranas obtenidas fue estudiada con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) Phillips 505, con una aceleración de voltaje de 20 kV.

2.2. Liberación de Sr

Para evaluar si las membranas actúan como un sistema de liberación de estroncio, las mismas se incubaron en 1mL de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) a 37°C en atmósfera con 5% de CO_2 y humedad controlada. Se recolectó el medio a distintos tiempos durante 14 días y se midió la concentración de Sr liberado mediante un espectrofotómetro de llama.

2. 3 Cultivos Celulares

2. 3. 1 CPMO

Las células progenitoras de médula ósea (CPMO) se obtuvieron a partir de aspirados de médula ósea (tibia y/o fémur) de ratas Sprague Dowley. Estas fueron cultivadas en medio DMEM-10% SFB con penicilina y estreptomina a 37°C con 5% CO₂ hasta alcanzar confluencia. Luego de este periodo, las células se tripsinizaron para ser sembradas sobre las membranas.

2. 3. 2. RAW 264.7

Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados en medio DMEM sin rojo de fenol suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina y µg/mL de estreptomina a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Las células fueron sembradas en frascos de 75cm² y sub-cultivadas usando Buffer Fosfato Salido con ácido etilén diamín tetracético (PBS-EDTA) [4]. Este tipo celular es derivado de macrófagos de ratón (*Mus musculus*), establecida a partir de un tumor inducido por el virus de leucemia Abselon. Expresa distintos marcadores de actividad celular, como síntesis de interleuquinas, producción de óxido nítrico (NO), expresión de óxido nítrico sintasas (NOS) ante sustancias tóxicas [5]. Por estas características constituyen un excelente modelo para estudios de citotoxicidad de distintas sustancias sobre sistemas biológicos.

2. 4. Biocompatibilidad

2. 4. 1. Estudio de adhesión y proliferación

Las CPMO fueron sembradas sobre las membranas e incubadas durante distintos tiempos: 2hs para evaluar adhesión; 24, 48 y 96hs para estudiar proliferación. Para estos ensayos se utilizó el método de reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT). Las células con respiración activa convierten el MTT en un compuesto coloreado insoluble, azul formazán, que es detectado a 570nm luego de la lisis celular y disolución con dimetilsulfóxido (DMSO).

2. 4. 1. Diferenciación Osteogénica de CPMO

Con el objetivo de inducir la diferenciación osteoblástica, CPMO fueron cultivadas sobre las membranas en presencia de DMEM-10% SFB suplementado con ácido ascórbico y β-glicerolfosfato. Este medio fue cambiado cada 3 días durante 14 días. Al final del proceso, la diferenciación osteoblástica fue evaluada midiendo la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) y la producción de colágeno tipo 1 (COLT1).

2. 5. Estudios de Citotoxicidad

Para realizar la medición de NO en cultivos con macrófagos RAW 264.7 crecidos sobre las matrices, se utilizó el método de Griess. Se cultivaron dichas células en medio DMEM-SFB 10% sin rojo de fenol durante distintos tiempos de incubación. Al cabo de estos periodos, se recolectó el medio de cultivo y se midió la cantidad de nitrito liberado por las células

utilizando un espectrofotómetro a una longitud de 548nm.

Con el objetivo de observar la morfología celular de los macrófagos RAW 264.7 en las distintas membranas se procedió a tñirlas con Giemsa. Para ello procedimos a lavar los scaffolds con PBS 1X. En el segundo paso se utilizó metanol durante 5 minutos para fijar las células y luego se las tñió con el colorante durante otros 5 minutos. Después eliminar los restos de Giemsa con agua destilada se procedió a la observación de las células con un microscopio óptico.

2. 1. Estadística

Los datos se presentaron como promedio ± SEM. Las diferencias entre los grupos analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA con el método post hoc, Tukey. Se consideró una significancia estadística de 0,05(p<0,05).

3. Resultados y Discusión

Con el fin de conocer la topografía de las membranas obtenidas, estas fueron observadas utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB). En la figura 1 se observan fotografías de la superficie de las tres membranas. El soporte de PCL posee una superficie homogénea con la presencia de estructuras cristalinas con forma de esferulitas (observadas a menor aumento).

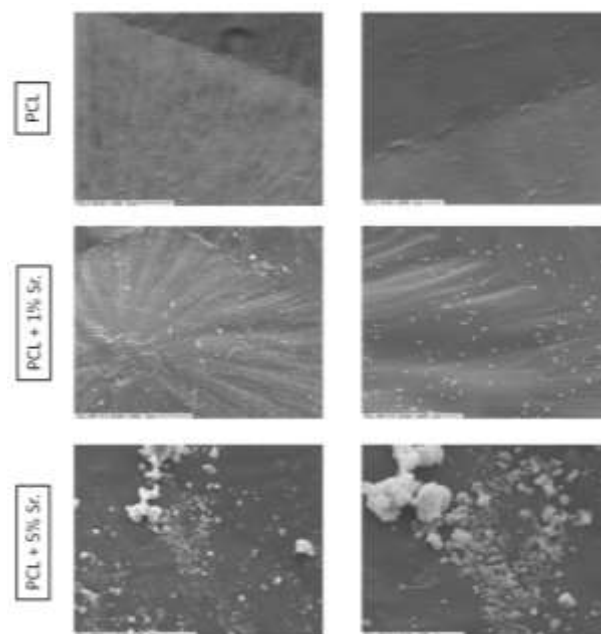


Figura 1. MEB de PCL, PCL + 1% Sr y PCL + 5% Sr a 1000X (columna Izq) y 2500X (columna Der.)

Las películas de PCL + 1% Sr muestran una superficie muy similar a PCL pero, además, se observa una gran dispersión de partículas de estroncio a lo largo de toda la membrana. Por el contrario, scaffolds de PCL + 5% Sr mostraron conglomerados de estroncio en sectores particulares sin la correcta distribución a lo largo de toda la superficie. La concentración de estroncio en la matriz que contiene 5% es 5 veces mayor que la de

1%, sin embargo, en las figuras tomadas en el MEB, esta relación parece ser mucho mayor. Es probable que esto se deba a que el volumen de la membrana puede estar saturado de estroncio a bajas concentraciones, dejando expuesto en la superficie de las mismas el resto.

Al analizar la liberación de estroncio observamos que existe un pico de concentración luego del segundo día de cultivo para la membrana con 5% de Sr (figura 2). Es posible que este se deba Sr pobremente incorporado sobre la membrana, como se observa en la figura 1. Con respecto a la concentración del elemento liberado al medio, observamos que este es liberado pobremente. En otros trabajos [6], demostramos que la concentración óptima de Sr²⁺ en las células es de 0,1mM; sin embargo, la concentración más alta de Sr detectada en el medio de cultivo en este trabajo fue de 0,003 mM (PCL + 5% Sr en el segundo día de incubación), siendo esta concentración solo el 3% de la concentración óptima (0,1 mM), aunque la concentración en el microentorno celular podría ser considerablemente mayor.

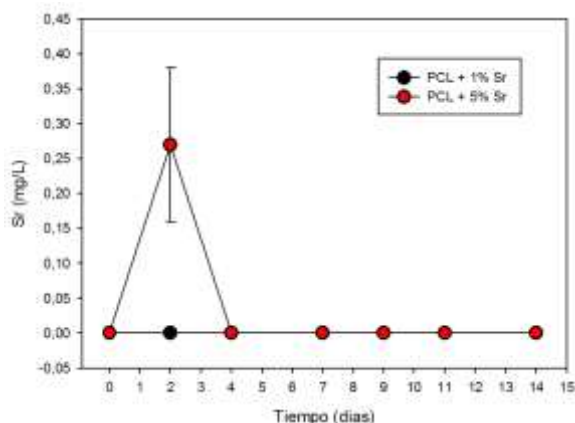


Figura 2. Liberación de estroncio desde las membranas al medio de cultivo.

Al estudiar la proliferación de las CPMO luego de 4 días, no se detectaron diferencias significativas en la proliferación de las células en ninguna de las membranas en los primeros 3 días, sin embargo, luego de 96hs de incubación, puede observarse de forma clara que los scaffolds de PCL y PCL + 5% Sr proliferaron un 67% y 77% menos ($p < 0.001$) que el soporte de PCL + 1% Sr, respectivamente. Además, en este mismo tiempo, la proliferación de las células sobre PCL fue significativamente mayor ($p < 0.05$) respecto a PCL + 5% Sr.

Con el fin de evaluar cómo afectan las membranas desarrolladas en este trabajo sobre la diferenciación osteogénica, analizamos la expresión de dos marcadores de diferenciación osteoblástica de las células en las distintas matrices: la síntesis de colágeno tipo 1 (COLt1) y la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (APL). Los resultados demostraron que, después de 14 días de cultivo en presencia de β -glicerol fosfato y ácido ascórbico, la actividad de APL en las células crecidas sobre membranas de PCL + 1% Sr ha aumentado en aquellas células crecidas sobre PCL ($\$: p < 0.05$ vs. PCL + 1% Sr) sin embargo,

esta actividad ha disminuido en aquellas células crecidas sobre PCL + 5% Sr ($\#: p < 0.01$ vs. PCL) respecto a PCL y PCL + 1% Sr ($\&: p < 0.001$ vs. PCL + 5% Sr) (figura 4). Si bien, no se produjo liberación de Sr al medio de cultivo, la concentración de Sr en el microentorno celular en las membranas con 1% Sr, induce un aumento de la actividad enzimática mientras que en las membranas con 5% de Sr disminuye la actividad. Esto puede deberse al efecto directo del Sr sobre la ALP tal como hemos demostrado en otro trabajo [7], obteniéndose así, una concentración de Sr en el microentorno celular que favorezca en forma directa la actividad de la enzima cuando se agrega 1% Sr a la membrana, pero inhibitorio con el agregado de 5% Sr.

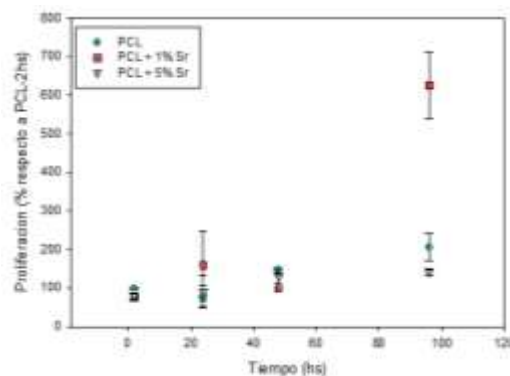


Figura 3. Proliferación de CPMO en las membranas.

En cuanto a la producción de colágeno tipo 1 por las células, no hubo diferencia significativa en este parámetro sobre PCL y PCL + 1% Sr, pero si entre PCL + 1% Sr y PCL + 5% Sr ($\$: p < 0,05$ vs. PCL + 1% Sr). La disminución de este marcador osteogénico puede deberse a un efecto tóxico del Sr sobre la célula.

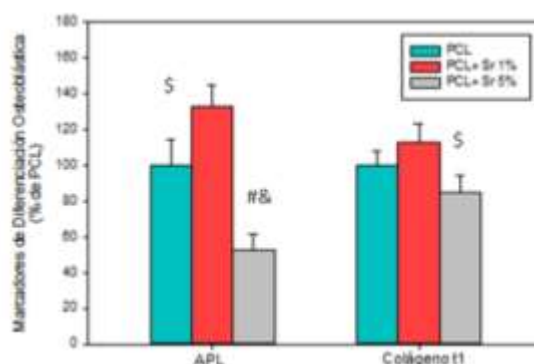


Figura 4. Actividad de Fosfatasa Alcalina y depósito de Colágeno tipo 1 en células cultivadas en medio osteogénico durante 14 días sobre las membranas.

Para evaluar la toxicidad de estas membranas (figura 5), analizamos la presencia de óxido nítrico (NO), uno de los marcadores de toxicidad liberados por las células macrofágicas. Tanto a 24 como a 48 y 72 hs de cultivo, la producción de NO por las células RAW 264.7 crecidas sobre las membranas de PCL + 5% Sr fue mayor ($\&: p < 0.001$) respecto a PCL y PCL + 1%

Sr. Por otro lado, no hubo diferencia significativa en la producción de NO de las células crecidas sobre las membranas de PCL + 1% Sr respecto a PCL luego de 24 y 48 hs de cultivo. No así, luego de 72 hs de cultivo, donde la liberación de NO fue significativamente menor (@: $p < 0.05$) en las células crecidas sobre PCL + 1% Sr respecto a PCL.

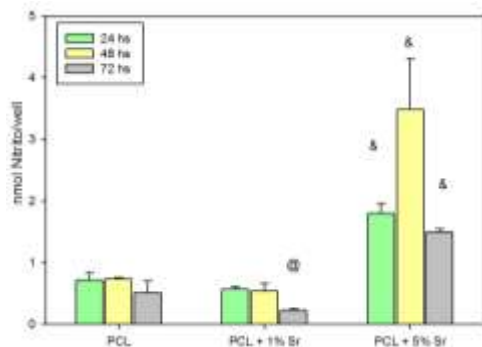


Figura 5. Liberación de NO al medio de cultivo por macrófagos RAW 264.7 crecidas sobre las membranas de PCL, PCL + 1% Sr y PCL + 5% Sr.

Las células RAW 264.7 no solo producen y liberan al NO al estar en contacto con sustancias tóxicas, sino también cambian de morfología. En trabajos previos [8] hemos demostrado que estas células pueden cambiar de morfología cuando se exponen a sustancias tóxicas como por ejemplo lipopolisacáridos. En la figura 6, se observa la morfología de las células RAW 264.7 crecidas durante 48 hs sobre las membranas teñidas con Giemsa. En las fotos, se puede ver como las células conservan su morfología redondeada típica con pocas extensiones cuando son crecidas sobre las membranas de PCL y PCL + 1% Sr. Sin embargo, esta morfología cambia a una forma expandida y con citoplasma vacuolado cuando se las cultiva sobre PCL + 5% Sr, sugiriendo la activación de las células.

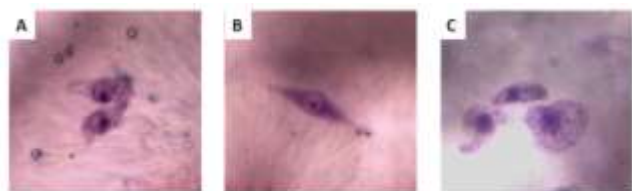


Figura 6. Morfología de los macrófagos RAW 264.7 crecidos sobre las membranas de PCL (A), PCL + 1% Sr (B) y PCL + 5% Sr (C) a 400X.

4. Conclusiones

Debido a los resultados obtenidos, observamos que no se obtuvo un sistema de liberación de Sr, siendo este retenido en la matriz polimérica al menos en el tiempo que duraron los ensayos. Sin embargo, la incorporación de 1% de Sr ha favorecido tanto la proliferación de las CPMO como la actividad de ALP, probablemente al estar en contacto las células con un microentorno favorable. Sin embargo, el agregado de 5% Sr demostró poseer un efecto inhibitorio tanto en la

proliferación como en la diferenciación de las células CPMO crecidas sobre ellas.

Por otro lado, la producción de NO por parte de las células RAW 264.7 y su morfología demostraron que la toxicidad de la membrana PCL + 5% Sr, no así las membranas de PCL y PCL + 1% Sr.

Nuestros resultados indican que la membrana de PCL + 1% Sr podría ser utilizada como implante óseo, aunque otros estudios deberían llevarse a cabo como ser producción de nódulos de mineral, expresión de RUNX-2 de las CPMO, determinación de citoquinas de las RAW 264.7 y ensayos in-vivo.

Referencias

- [1] R. Langer, J. Vacanti. *Science* **260** (1993), 920-926.
- [2] P.X Ma. *Materials Today*. **7(5)** (2004), 30-40.
- [3] E. Boanini, P. Torricelli, M. Fini. *J Mater Sci: Mater Med*. **22** (2011), 2079-2088.
- [4] M.S. Molinuevo, L. Schurman, A.D. McCarthy, A.M. Cortizo, M.J. Tolosa, M.V. Gangoiti, V. Arnol, C. Sedlinsky. *Journal of Bone and Mineral Research* **25** (2010), 211-221.
- [5] L.C. Denlinger, P.L. Fiset, K.A. Garis, G. Kwon, A. Vazquez-Torres, A.D. Simon, B. Nguyen, R.A. Proctor, P.J. Bertics, J.A. Corbett. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (1996), 337.
- [6] J.M. Fernández, M.S. Molinuevo, C. Sedlinsky, L. Schurman, A.M. Cortizo, A.D. McCarthy. *Eur J Pharmacol*. **706** (2013), 41-47.
- [7] J.M. Fernández, M.S. Molinuevo, A.D. McCarthy, A.M. Cortizo. *Biometals* **27** (2014), 601-607.
- [8] J.M. Fernández, M.S. Cortizo, A.M. Cortizo. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* **4** (2014), 227-234.