



EFFECTO DE MICROPARTÍCULAS DE Mg CON Y SIN TRATAMIENTO CON KF EN CÉLULAS OSTEOBLÁSTICAS Y MACRÓFAGOS

**Florencia Alvarez¹♥, Rosa Lozano Puerto², Blanca Pérez Maceda², Claudia Grillo¹,
Patricia L. Schilardi¹ y Mónica Fernández Lorenzo^{1,3}**

¹*Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, CCT-CONICET La Plata), Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Universidad Nacional de La Plata, CC 16, Suc. 4 (1900) La Plata, Argentina.*

²*Lab. de Reconocimiento Célula-Biomaterial. Depto. Biología Físico-Química. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, (28040) Madrid, España.*

³*Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 1, (1900) La Plata, Argentina*

Recibido el 4 de Marzo de 2013. Aceptado el 4 de Junio de 2013.

♥ Corresponding author: E-mail: falvarez@inifta.unlp.edu.ar

Abstract

Mg-based materials are promising for medical applications due to their low density and mechanical properties close to those of human bone. Degradation products like Mg ions and debris particles may affect the surrounding cells. The aim of this work is to study the effect of pMg on cells in the vicinity of the biomaterial. For this purpose, studies on the cytotoxic effect on mammalian cell lines, simulating the *in vivo* situation close to the implant, were made. The results revealed a decrease in cell viability from 1000 µg/ml pMg, showing greater effect at higher concentrations. There was also a significant interaction of macrophages with pMg. Additionally, cells exposed for one hour to pMg treated with KF showed lower cytotoxic effects than those exposed to untreated particles.

Key words: magnesium, magnesium particles, implants, debris.

Resumen

Los materiales biodegradables a base de Mg tienen importantes aplicaciones en medicina debido a su baja densidad y a sus propiedades mecánicas similares al hueso [1]. Entre sus productos de biodegradación *in vivo* se encuentran las micropartículas (pMg) que se liberan al medio y podrían afectar a las células vecinas. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto de las pMg sobre las células próximas al biomaterial. Con ese propósito se realizaron estudios sobre el efecto citotóxico de las mismas sobre tres líneas celulares de mamífero, simulando la situación aledaña al implante. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular a partir de 1000 µg/ml de pMg, presentando mayor efecto a mayores concentraciones. También se observó una importante interacción de los macrófagos con las pMg. Además, las células expuestas durante una hora a pMg tratadas con KF mostraron efectos citotóxicos menores que las expuestas a pMg sin tratar.

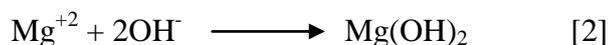
Palabras clave: magnesio, partículas de Mg, implantes, debris.

INTRODUCCIÓN

La disolución del magnesio procede, en presencia de agua, a través de una reacción electroquímica que produce hidróxido de magnesio y gas hidrógeno. La reacción global que la caracteriza es:



Y la formación de la capa de hidróxido está representada por:



Debido a la degradación y a la fricción se desprenden pMg de los implantes que se corroen de acuerdo a las reacciones previas [1,2].

Diversos estudios realizados a través de técnicas electroquímicas mostraron que los tratamientos con fluoruros contribuyen a la formación de una capa protectora de la corrosión tanto sobre Mg como sobre aleaciones [3,4]. Por ese motivo se aplicó un tratamiento superficial con fluoruro de potasio (KF) a las pMg a fin de estudiar el efecto de la disminución de la velocidad de disolución del material y la presencia de compuestos que contienen fluoruro sobre el metabolismo celular.

Con el objeto de evaluar el efecto de las micropartículas sobre las células próximas al biomaterial se realizaron estudios sobre el efecto citotóxico de las mismas sobre tres líneas celulares de mamífero, simulando la situación aledaña al implante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con pMg en un rango de concentraciones de 100-2000 $\mu\text{g/ml}$, con y sin tratamiento con una solución de KF 0.1M. Se emplearon células osteoblásticas de la línea UMR 106 para evaluar el efecto de dichas pMg y los iones liberados mediante el ensayo de Rojo Neutro. Se estudió también el cambio del número de células viables luego de la exposición a las pMg mediante la tinción con naranja de acridina a través de microscopía de epifluorescencia. Por otra parte se realizaron ensayos de citotoxicidad (WST-1 y LDH) en células osteoblásticas de la línea MT3C3-E1 y en macrófagos (J774.1). Por otra parte, se estudió el efecto de las pMg sobre la adhesión celular de los osteoblastos MC3T3-E1 a través de microscopía confocal mediante la utilización de 2 anticuerpos (anti-vimentina y anti-ICAM-1).

RESULTADOS

1. Efecto de las pMg sin tratar

Se analizó la citotoxicidad de pMg utilizando microscopía de epifluorescencia luego de teñir las células con naranja de acridina. Los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular a partir de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de micropartículas (Figura 1).

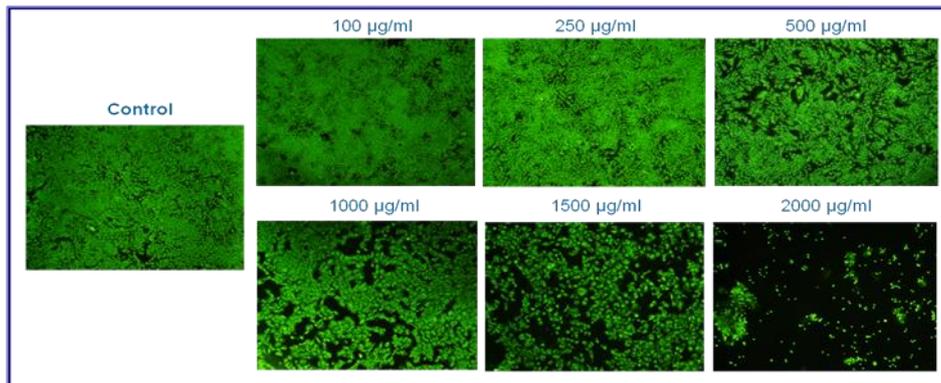


Figura 1. Microfotografías de células UMR-106 con tinción de Naranja de acridina (40X).

2. Estudio de la degradación de las partículas de magnesio en un cultivo celular

Mediante la utilización de microscopía multidimensional pudo seguirse la degradación de las pMg en tiempo real. Pudo constatarse la progresiva reacción de oxidación del Mg, dando lugar a $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (ecuación [2]) a través de la observación de la mayor transparencia de los bordes de las pMg con el tiempo. También se pudo distinguir la liberación de H_2 que ocurre en el medio de cultivo de acuerdo a la reacción [1] (Figura 2).

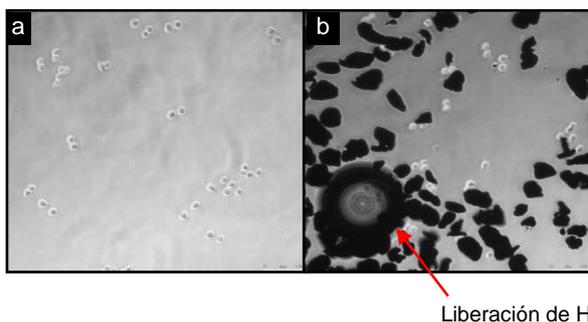


Figura 2. Fotografías de células J774 tomadas con microscopio multidimensional (160X) sin pMg (a) y con pMg (b)

Con esta técnica microscópica también se logró visualizar la interacción de los macrófagos con las pMg a través de acercamientos y contactos directos de los mismos con la superficie de las partículas (Figura 3).



Figura 3. Fotografías de células J774 con pMg tomadas con microscopio multidimensional (160X).

Los resultados de los tests de LDH en MC3T3-E1 y en J774.1 mostraron un aumento del daño de la membrana celular a medida que aumentaba la concentración de pMg. En concordancia con estos resultados, la respiración mitocondrial evaluada mediante WST-1 disminuyó bajo las mismas condiciones (datos no mostrados).

Por otra parte se estudió el efecto de las pMg sobre la adhesión celular de los osteoblastos MC3T3-E1 a través de microscopía confocal, utilizando dos anticuerpos. Pudo constatar un cambio en la distribución de las proteínas ICAM-1 y vimentina, implicadas en la adhesión celular. Las mismas modificaron su distribución en la célula en presencia de pMg.

3. Efecto de las pMg tratadas con KF

Las células expuestas durante una hora a pMg tratadas con KF mostraron efectos citotóxicos menores que las expuestas a pMg sin tratar (Figura 4). Sin embargo el efecto protector fue menos notable luego de 24 h de exposición evidenciándose una alta reducción del número de células para 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

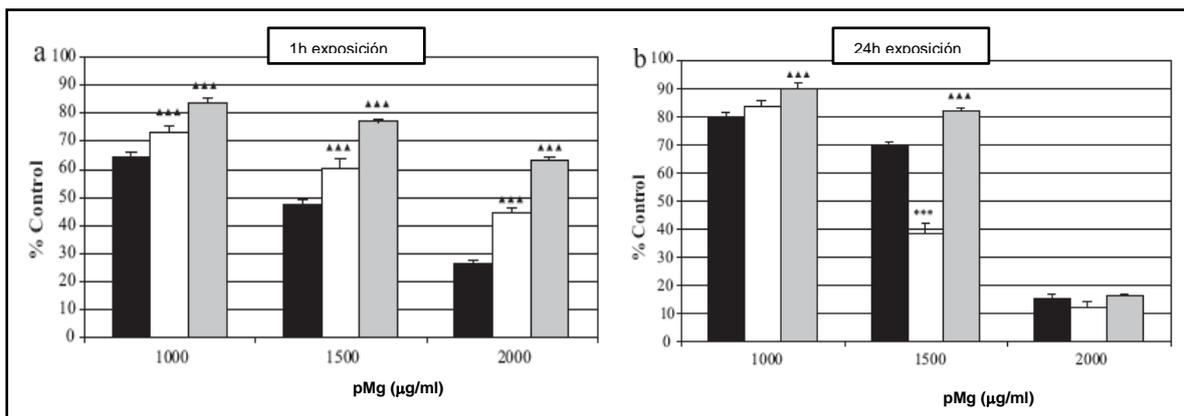


Figura 4. Efecto de las pMg sobre células UMR-106 luego de diferentes tiempos de exposición (a) 1h y (b) 24h, evaluado mediante RN; sin pretratamiento (negro) y pretratado con 0.1M KF (blanco) y 0.2M KF (gris).

4. Efecto del tratamiento con KF

Se evaluó el efecto de los iones de la sal de KF en un rango de concentración entre 10^{-3}M y 10^{-7}M sobre las células UMR-106 y no se observaron efectos citotóxicos sobre las células en el rango de concentración utilizado.

CONCLUSIONES

Los ensayos de citotoxicidad mostraron una disminución en la viabilidad celular a partir de $1000\ \mu\text{g/ml}$ de pMg. Este efecto podría asociarse a una alta concentración de iones Mg, al cambio local del pH, a la liberación de hidrógeno como así también a los efectos producidos directamente por la presencia física de partículas metálicas en la vecindad de las células. Se pudo constatar también una alta interacción de los macrófagos con las pMg. El daño sobre las membranas celulares (aumento de la actividad LDH) y la disminución de la respiración mitocondrial (WST1) fue mayor al aumentar la concentración de pMg en los cultivos celulares. Las proteínas ICAM-1 y vimentina, implicadas en adhesión celular, modificaron su distribución en la célula en presencia de pMg, siendo los cambios en la localización mayores en presencia de las pMg tratadas con KF.

Agradecimientos. Argentina: PRH 74- CONICET - ANPCyT- UNLP: Proyectos 11/X532 y 11/I163- PPL 2011 0003-PICT Bicentenario 2010-1779. España: MAT2011-29152-C02-02.

REFERENCIAS

- [1] M.P. Staiger, A.M. Pietak, J. Huadmai, G. Dias, *Biomaterials*, **2006**, 27, 1728-1734.
- [2] F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K. Ulrich Kainer, R. Willurmeit, F. Feyerabend, *Current Opinion in Solid State and Mat. Science*, **2008**, 12, 63-72.
- [3] F. El-Taib Heakal, A.M. Fekry, M.Z. Fatayerji, *Electrochim Acta*, **2009**, 54, 1545-1557.
- [4] M.D. Pereda, C. Alonso, L. Burgos-Asperilla, J.A. del Valle, O.A. Ruano, P. Pérez, M. Fernández Lorenzo de Mele, *Acta Biomaterialia*, **2010**, 6, 1772-1782.