

MICROSCOPIA MULTIDIMENSIONAL Y DE EPIFLUORESCENCIA APLICADAS AL ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE CÉLULAS Y MATERIALES DEGRADABLES A BASE DE Fe.

Natalia Fagali (1), Claudia Grillo (2), Blanca Pérez Maceda (2), Rosa Lozano Puerto (2), Mónica Fernández Lorenzo (1,3)

(1) Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT La Plata, CONICET - Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. La Plata, Argentina. (2) Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC. Madrid, España. (3) Facultad de Ingeniería, UNLP. La Plata, Argentina.

Email: nfagali@gmail.com

Desde hace relativamente pocos años se ha propuesto la utilización de *stents* temporales biodegradables a base de Fe puro, y algunas de sus aleaciones, debido a los efectos indeseables provocados por los *stents* permanentes. Se espera que el *stent* se degrade y desaparezca del organismo una vez cumplida su función de sostén para la regeneración y recuperación funcional del tejido vascular [1]. La mayoría de las publicaciones que apoyan esta propuesta destacan la compatibilidad de este tipo de materiales a nivel sistémico. Sin embargo, la liberación de iones, la formación de partículas o *debris* por rotura o desgaste, la generación de productos insolubles de corrosión y los cambios de pH podrían producir efectos colaterales tales como estrés oxidativo e inflamación en los tejidos adyacentes al implante [2]. Dada la complejidad que representa la evaluación de la biocompatibilidad *in situ* (en la zona del implante), el empleo de cultivos celulares constituye un modelo útil para este fin. Con el objetivo de estudiar las interacciones entre estos materiales y sus productos de degradación con las células se incubaron fibroblastos (*3T3 Balbc*) y macrófagos murinos (*J774-A1*) con anillos de Fe⁰ puro (99,9% *SpecPure*) o diferentes cantidades (0.25, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mg/ml) de micropartículas de Fe⁰ (*Riedel de Haen*). Mediante el empleo de microscopía multidimensional se evaluaron las interacciones de las células con actividad fagocítica (macrófagos) y los mencionados materiales a base de Fe. Por otro lado, los fibroblastos se incubaron en presencia de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA), un reactivo ampliamente utilizado para la determinación de la generación de ROS. El reactivo no fluorescente DCFH₂-DA atraviesa la membrana celular y los ROS intracelulares lo oxidan a su forma fluorescente (DCF). Así, mediante microscopía de epifluorescencia y análisis de imágenes es posible estimar el estado oxidativo de las células en cultivo. Como técnicas complementarias a la microscopía, se realizaron ensayos de determinación de daño a membrana (LDH), cuantificación de Fe soluble en medio de cultivo (Batofenantrolina) y de proteínas totales (Bradford). Mediante microscopía de epifluorescencia con DCFH₂-DA, a las 24 hs de incubación, se observa un aumento significativo de fluorescencia con respecto a los controles respectivos en la zona más cercana al anillo, mientras que en las zonas más alejadas no existen diferencias significativas con las células control (Fig 1A). Esto permite inferir que el estrés oxidativo producido por la corrosión del anillo depende estrechamente de la cercanía de las células al mismo y, por lo tanto, del contacto directo entre las células y los productos de degradación del Fe. Con respecto a las partículas, a la mayor concentración (2.00 mg/ml) se observa un aumento significativo en la producción de ROS, particularmente en las células en estrecho contacto con las micropartículas (Fig 1B). Experimentos realizados con microscopía multidimensional, permitieron evaluar la respuesta de las células a la degradación del anillo de Fe⁰ puro (Fig 2) a diferentes tiempos. El registro se realizó mediante fotografías cada 15 minutos a lo largo de 24 hs, lo que posibilita la recopilación de las mismas a modo de video. Las fotografías presentadas en la Fig. 2 corresponden a 24, 32, 40 y 48 hs de incubación. Se puede observar claramente que al degradarse el material, los macrófagos captan los productos de degradación y mueren dejando en su lugar un depósito oscuro de material insoluble. Los resultados obtenidos en este trabajo, y antecedentes publicados previamente por nuestro grupo [3], nos permiten concluir que la corrosión de Fe puro genera un estado oxidativo exacerbado en las células que pueden derivar en la muerte celular. Técnicas complementarias permitieron inferir que la corrosión de las partículas de Fe⁰ genera además, un mecanismo de daño a la membrana celular. Así, los efectos colaterales del uso de Fe como material implantable degradable que comúnmente son despreciables a nivel sistémico, cobran notoria importancia en los tejidos adyacentes al implante.

REFERENCIAS

- [1] Hermawan H., Dubé D., Mantovani D., (2010) "Developments in metallic biodegradable stents" *Acta Biomater.* 6:1693–7.
- [2] Pierson D., Edick J., Tauscher A., Pokorney E., Bowen P., Gelbaugh J., Stinson J., Getty H., Lee C., Drelich J., Goldman J., (2012) "A simplified in vivo approach for evaluating the bioabsorbable behavior of candidate stent materials" *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 100:58–67.
- [3] Fagali N., Grillo C., Puntarulo S., Fernández Lorenzo M., (2015) "Cytotoxicity of corrosion products of degradable Fe-based stents: Relevance of pH and insoluble products" *Colloids Surfaces B Biointerfaces*;128:480–8.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la financiación de ANPCyT (PICT 2012-1795), CONICET, SECyT UNLP, Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MAT2008-06719- C03-01-02), Ministerio de Economía y Competitividad de España (MAT2011-29152-C02-02); al grupo de la Dra. M. Magdalena Gherardi (Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA. INBIRS, Facultad de Medicina, UBA por la donación de fibroblastos *3T3 Balbc*; al Dr Angel Catalá y a la Dra Patricia Battistoni por su valiosa colaboración.

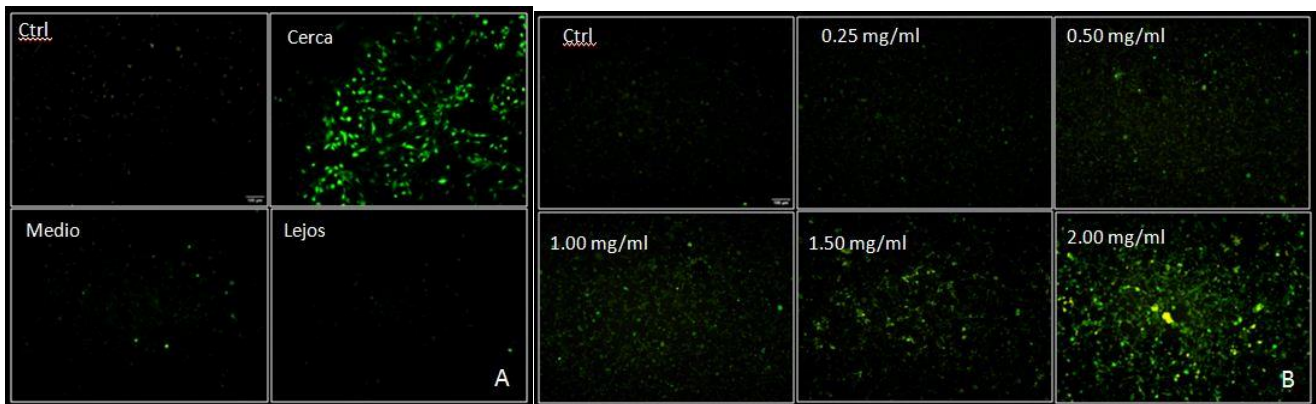
FIGURAS

Figura 1. Estado oxidativo de fibroblastos *3T3 Balbc* tras 24 h de incubación con A) anillo de Fe puro o B) micropartículas de Fe. Tras el tratamiento, las células fueron incubadas con DCFH2-DA, lavadas y examinadas por microscopía de epifluorescencia. Se observa claramente que las células con mayor daño oxidativo (verdes) son las que crecen en contacto con el anillo (A cerca) mientras que las más alejadas no presentan diferencia con las células control (A medio y lejos). En el caso de las micropartículas (B) el daño oxidativo se torna significativo en presencia de 2 mg/ml de partículas.

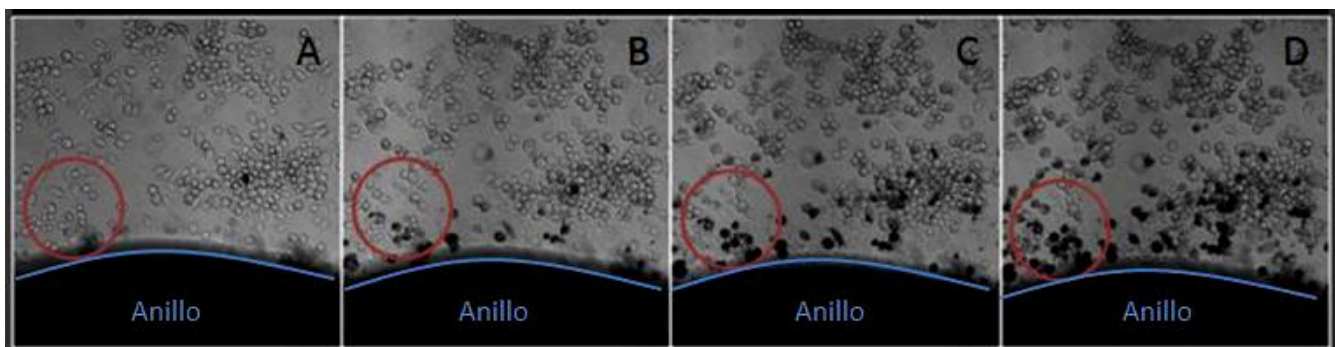


Figura 2. Microfotografías obtenidas por microscopía multidimensional de macrófagos *J774* a A) 24 hs, B) 32 hs, C) 40 hs y D) 48 hs de incubación con anillo de Fe puro. En el círculo rojo se observa la muerte de las células, quedando en su lugar depósitos de productos insolubles oscuros cuya cantidad aumenta con el transcurso del tiempo.