

INFORME PERIODO 2016-2017

1. APELLIDO Parisi

Nombre(s) Julieta Marcia

Título(s) Lic en Biología or. Zoología Dirección Electrónica

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría Profesional Asistente

Mes Diciembre Año 2011

ACTUAL: Categoría Profesional Adjunto

Mes Agosto Año 2017

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Study of intracellular localization and interaction of photosensitizers and singlet oxygen quenchers in cancer cells using Fourier transform infrared microspectroscopy. INIFTA. Dra Bossio Gabriela

b) Desarrollo de biomateriales metálicos y resinas flexibles para implantes y prótesis quirúrgicas y odontológicas. Director Ricardo Walter Gregorutti. LEMIT

c) Fortalecimiento Integral del Instituto Biológico de La Plata Dr Tomas Perón. FONARSEC 2013. Produccion general de vacunas en cultivos celulares.

d) Estudio in-vitro de la Potencialidad de Membranas Ordenadas de Colágeno como Patrón de Crecimiento de Tejido Epitelial. IMBICE, IFLYSIB, INIFTA y CINDEFI.

e) Obesidad Infanto - Juvenil: Búsqueda de nuevos marcadores genéticos y neuroendocrinológicos y su aplicación al diagnóstico y tratamiento. IMBICE.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s): Ermácora, Mario R.

Cargo Institución: Director

Dirección: Ciudad La Plata Tel. Dirección Electrónica

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución: Institución Instituto Multidisciplinario de Biología Celular y Molecular (IMBICE)

Dependencia: CIC - CONICET- UNLP

Dirección: Calle 526 entr 10 y 11 N °.....S/N

Ciudad: La Plata C. P....1900...Prov.....Bs As.....Tel....421-0112

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre.....

Dependencia.....

Dirección: Calle.....N°.....

Ciudad.....C. P.....Prov.....Tel.....

Cargo que ocupa.....

7. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA:

Realizo en el Sector las siguientes actividades: Mantenimiento y criopreservación de líneas celulares, Suministro de cultivos celulares a los diferentes laboratorios e investigadores. Preparación de: Agua ultra pura, Medios de cultivos (D-MEM, MEM, RPMI, etc), Soluciones salinas: PBS, HANK Colorantes (tripan blue, rojo nuegro) Participación en el desarrollo de técnicas específicas utilizadas en diferentes bioensayos y a su vez colaboro con distintos laboratorios e investigadores para llevar a cabo técnicas y realizar protocolos. Participo en los siguientes STAN "Venta de Líneas Celulares", resol. 2715/07, Ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad en biomateriales usados en medicina reparadora resol. 486/2012 y como colaboradora y docente en el curso de posgrado Cultivos Celulares y sus Aplicaciones.

INDICE

8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.....	4
9. OTRAS ACTIVIDADES.....	5
10. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.....	6
11. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.	6
ANEXO DESCRIPCION DE TECNICAS EMPLEADAS:.....	7
ANEXO CERTIFICACIONES:.....	10

8. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

Las tareas desarrolladas durante el presente periodo en el sector de cultivos celulares fueron:

A-Mantenimiento y criopreservación de líneas celulares:

Mantenimiento de líneas celulares:

- Preparación de: Agua ultra pura, Medios de cultivos (D-MEM, MEM, RPMI, etc), Soluciones salinas: PBS, HANK y Colorantes (tripan blue, rojo neutro)

- Las células son propagadas en monocapa o en suspensión, en frascos Falcon T-25 con el medio apropiado para cada tipo celular (MEM, D-MEM, RPMI etc.), suplementado con suero bovino fetal, cuyo porcentaje también varía y con el agregado de 50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina; a 37°C de temperatura para las células de mamífero, a 28° C las células de mosquito y a 20° C las células de peces, líneas con las contamos en nuestro Banco Celular.

-Subcultivo: para levantar las células adherentes primero volcar el medio, lavar con solución salina, agregar tripsina 0,25%(enzima que actúa produciendo la digestión de las proteínas de adherencia), dejar actuar en estufa durante 5 minutos, luego hacer una dilución 1/10 con medio de cultivo para inactivar a la tripsina, hacer un conteo celular y tomar el medio con células exacto para el subcultivo (según el comportamiento de cada línea celular varía la cantidad de las mismas a sembrar), agregar medio nuevo y colocar en estufa a la temperatura adecuada.

Para subcultivar células en suspensión se hace una dilución 2/10 con medio nuevo, siempre teniendo en cuenta el número inicial de células sembradas.

-Recuento celular: con cámara de Neubauer o Hemocitometro, este es un portaobjetos de vidrio grueso con una zona central aislada del resto del porta por dos canales profundos. Esta zona aislada contiene dos cámaras de recuento separadas por un reservorio central, se utiliza el colorante tripan blue para estimar al mismo tiempo la viabilidad celular, ya que este colorante no penetra en el citoplasma de las células vivas. La observación se realiza al microscopio con objetivo de 20X.

-Controles de PH observando el cambio de coloración del medio lo que puede indicar un aumento del CO₂ y si además el medio está turbio hay probabilidad de contaminación.

-Observación celular en microscopio invertido y con un objetivo 10 x, para observar morfología y el normal crecimiento del cultivo.

2-Cultivos Primarios:

Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano que se mantiene en periodo de tiempo limitado pero con reproducción de las células en cultivo. Las células pueden aislarse a partir de sangre entera, órganos (hígado, riñón, etc) u organismos completos (embriones de pollo). Para cada procedencia debe diseñarse un método de aislamiento ya que cada tejido, órgano u organismo presenta sus propios problemas particulares.

3-Criopreservación:

Las células se suspenden en una solución de glicerol o dimetilsulfóxido (DMSO), el criopreservante, con una elevada concentración de suero, se enfrían a un ritmo determinado

1C°/min en un dispositivo de congelación colocado durante al menos tres horas en un congelador de -70 C° y luego se colocan en nitrógeno líquido. La función del criopreservante es reducir el contenido de agua en las células, de esta manera se evita la formación de cristales de hielo, que de otro modo romperían las membranas celulares y producirían la lisis celular.

Las células se cuentan y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos.

Se elimina el sobrenadante y se resuspende en medio con 10% de DMSO.

Se colocan en cada criotubo 1,8 ml de suspensión celular. La concentración celular final por vial será de 1×10^6 en células adherentes y de 5×10^6 en células en suspensión.

4-Control de contaminación:

Tinción fluorescente con DAPI para Micoplasma. Técnica que detecta el DNA de los micoplasmas ya que el colorante se une específicamente al DNA.

Tinción con Giemsa para gram + y gram-

Cultivo con agar sabouraud para control de medios y células que puedan estar contaminadas con Hongos

Cultivo con tioglicolato para control de medios y células que puedan estar contaminadas con Bacterias.

B- Técnicas de cito-genotoxicidad:

- Citotoxicidad:

- Estudio de la funcionalidad lisosomal. Ensayo del Rojo neutro.

- Estudio de la funcionalidad mitocondrial. Formación de sales de formazán con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

- Determinación de Colágeno Tipo I.

- Proliferación celular:

- Técnica de difusión en agar noble

- Estudio de Biocompatibilidad - Ensayo de Contacto directo

-Genotoxicidad:

- Estudios de fragmentación de ADN. Ensayo cometa: electroforesis en gel de una única célula.

- Ensayo de micronúcleos (Mn)

9. OTRAS ACTIVIDADES

9.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC.

-Propiedades de las aleaciones usadas en implantes quirúrgicos

R. W. Gregorutti¹, J. E. Grau¹, F. Sives², J. Parisi³, D. Castrogiovanni³, C. I. Elsner⁴. Enviado: Cuarto Congreso Internacional Científico y Tecnológico de La provincia de Buenos Aires. 1 de septiembre 2017.

- Estudio Multidisciplinario de enfermedades crónicas relacionadas con desarreglos en el peso corporal de origen multifactorial y de relevancia regional y nacional. Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) y Servicio de Nutrición y Dietoterapia. Unidad de Trastornos Alimentarios. HOSPITAL DE NIÑOS "Sor María Ludovico". Enviado: Cuarto Congreso Internacional Científico y Tecnológico de La provincia de Buenos Aires. 1 de septiembre 2017.

9.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS O EVENTOS SIMILARES.

- Asistencia al Tercer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. 1 de Septiembre de 2016. Como parte integrante del Stand del IMBICE, Sector Cultivos Celulares.

10. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

- Participación en la XIV Semana Nacional de la Ciencia, la Tecnología y el Arte Científico, edición 2016. Realizado en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE). Organizado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Presidencia de la Nación.

- XVI Curso de Cultivos Celulares y sus Aplicaciones Teórico-Práctico 2016. Coordinadora y docente del 19 al 29 de septiembre.

- Formación de recursos humanos en Técnicas de Cultivos Celulares
Becaria: Biotecnóloga Belén Rivas Aiello
Instituto: INIFTA
Duración: 2016

11. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES

-Coordinadora del Laboratorio General Planta Baja en el IMBICE, hasta agosto de 2017.
- Integrante de la Comisión de Bioseguridad en el IMBICE, desde agosto de 2017.

ANEXO DESCRIPCION DE TECNICAS EMPLEADAS:

- Citotoxicidad:

- Estudio de la funcionalidad lisosomal. Ensayo del Rojo neutro.

Se siembra en placas de 96 pocillos una determinada cantidad de células (según el tipo) con 100 µl de medio de cultivo, a 37°C en atmosfera con 5% de CO₂, a las 24hs se cambia el medio por el acondicionado (con la sustancia a testear). Después de 24 hs de tratamiento se reemplaza el medio acondicionado por medio conteniendo 0,1 mg / ml de colorante rojo neutro y las placas son incubadas por 3 horas más a 37 °C. Luego, se lavan las células con PBS y el colorante captado por los lisosomas se extrae con solución de extracción (ácido acético glacial: etanol: agua (1:50:49)) por 10 min con agitación suave. Se lee la absorbancia a 540 nm. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de los lisosomas.

- Estudio de la funcionalidad mitocondrial. Formación de sales de formazán con 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Se siembra en placas de 96 pocillos una determinada cantidad de células (según el tipo) con 100 µl de medio de cultivo, a 37°C en atmosfera con 5% de CO₂, a las 24hs se cambia el medio por el acondicionado (con la sustancia a testear). Luego de 24 hs, a los pocillos con células tratadas y controles se les reemplaza el medio acondicionado por medio conteniendo 1,0 mg / ml de MTT. Las placas son incubadas por 3 horas más a 37 °C. Luego, se lavan las células con PBS y el colorante captado por las mitocondrias se extrae con DMSO (dimetilsulfóxido) por 10 min con agitación suave. Se lee la absorbancia a 540 nm. Una disminución de la absorbancia indica la pérdida de funcionalidad de las mitocondrias.

- Determinación de Colágeno Tipo I.

Se siembran en placas multiwell de 96 pocillos, 8000 células (ej. UMR-106) por pozo con medio D-MEM 10 % SBF con bicarbonato y se incuba en estufa a 37°C con intercambio gaseoso durante 24 horas.

Luego se adiciona a cada well 100 ul del medio acondicionado o del medio de cultivo con la droga a ensayar y se incuba durante un periodo de 7 días.

Cumplido el tiempo de cultivo se lava 2 veces con 100 ul de PBS no estéril en cada well.

Posteriormente se agregan 100 ul por well de fijador (15 ml. de solución de ac. pícrico saturada + 5 ml. de formaldehído al 37% + 1 ml. de ácido acético glacial.) y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora, etapa de FIJACION.

Luego se lava con 100 ul de agua destilada 2 veces dejando reposar en el segundo lavado el agua durante 15 min. (se agita ligeramente).

Se agregan 100 ul de solución de colorante Sirius Red (100 mg de Sirius Red en 100 ml de una solución saturada en ácido pícrico). Se agita suavemente, se incuba durante 1 hora.

Seguidamente se lava con 100 ul de HCl 0.01 N 2 veces o hasta eliminar por completo el resto de colorante Sirius Red.

El colágeno producido por las células ahora puede observarse en microscopio óptico y si es necesario sacarle fotos.

Posteriormente se hace la cuantificación, extrayendo el colorante fijado en las células, agregando a cada well 100 ul de solución de NaOH 0.1 N, agitando suavemente durante unos 30 minutos.

Lectura: se hace en el contador de Elisa para placas multiwell de 96, a una longitud de onda de 550 nm. La cuantificación puede realizarse largando conjuntamente una curva de calibración de colágeno, a partir de una solución de colágeno tipo I de concentración conocida (optativo). Esto ultimo si quiero saber cual es la concentración de colágeno tipo I.

- Proliferación celular:

Este ensayo permite determinar cuales compuestos son promotores de la proliferación celular y los que actúan inhibiendo este proceso. Se determina la proliferación por el bioensayo del cristal violeta de uso corriente en nuestro laboratorio. El colorante vital es incorporado por ciertas estructuras subcelulares, en particular por las mitocondrias de las células metabólicamente activas, pero no por células inactivas. Las células se subcultivan en platos de 48 pocillos y se someten a diferentes concentraciones y tiempos de incubación. Los cultivos se fijan con glutaraldehído al 5 % en PBS y se colorean con cristal violeta al 0,5 %. El colorante incorporado por las células se extrae con buffer glicina / HCl pH= 3,0 que contiene 30 % de metanol. El extracto se diluye adecuadamente con agua destilada y se mide la absorbancia a 540 nm. Previamente se determina que los valores de absorbancia obtenidos con este ensayo correlacionan en forma directa con el recuento de células vivas en cámara de Neubauer. Para el caso de compuestos que inhiban la proliferación celular, se calcula la concentración que inhibe el 50 % (DI₅₀), mediante metodología estadística adecuada (Probit).

- Técnica de difusión en agar noble

Se siembran en diferentes cajas de petri una suspensión celular de células según protocolo en una concentración de 50000 células por ml. Las mismas se incuban durante 48 hs. a 37°C en estufa con 5% de CO₂. Posteriormente se reemplaza el medio de cultivo por medio fresco formado por una mezcla de agar (4%) y medio de cultivo (2X) con doble concentración de suero. Se añade 10 ml. de solución de rojo neutro para cubrir toda la superficie sembrada y se mantiene a 37°C en oscuridad durante 30 minutos para luego retirar el exceso del mismo. Finalmente, se coloca en cada placa una muestra a estudiar. En paralelo se utiliza una placa para control positivo y una para control negativo. Las mismas se incuban durante 24 hs. a 37 °C y 5 % de CO₂.

Se valora la zona de decoloración alrededor de la muestra colocada y de los controles para determinar el índice de zona (IZ) y el índice de lisis (IL) para cada muestra ensayada. Con estos datos se calcula el índice de respuesta (IR).

$$IR = \frac{IZ}{IL}$$

- Estudio de Biocompatibilidad - Ensayo de Contacto directo

Este ensayo permite evaluar la citocompatibilidad del material analizado. Las distintas muestras son colocadas en cajas de petri en forma estéril. Posteriormente se siembra una suspensión celular sobre la superficie de cada una de las muestras, la cual contiene aproximadamente 3x10⁵ células, luego se le adiciona medio de cultivo completo hasta cubrirlas totalmente. Las cajas se incuban en atmósfera saturada de humedad, con el 5% de dióxido de carbono, a 37°C, durante 120 hs.

Como control negativo se cultivan células en las mismas condiciones, sin agregado de muestra.

- Genotoxicidad:

- Estudios de fragmentación de ADN. Ensayo cometa: electroforesis en gel de una única célula.

El método fue descrito por Singh y colaboradores para evaluar el daño en el ADN de células individuales causado por agentes genotóxicos. La técnica consiste en levantar las células tratadas

y los controles con tripsina, las células suspendidas en PBS se mezclan con agar de bajo punto de fusión al 0.5 % a 37 °C y son esparcidas sobre un portaobjeto previamente tratado con una capa de agar común que actúa como base. Luego de la gelificación del agar, las células se lisan con buffer de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente, se prepara la electroforesis a pH: 13,0 (300mM NaOH, 1 mM EDTA). Se deja 20 min para que se produzca el desenrollamiento del ADN y se corre 30 min a 25 Volt / 300 mA. Una vez realizada la corrida se neutraliza con 0,4 M Tris-HCl pH 7,5 y se colorea con plata o bromuro de etidio para visualizar el ADN, se toman fotografías y se evalúa la presencia, tamaño y cantidad de cometas. Es necesario evaluar al menos 50 células por condición experimental.

- Ensayo de micronúcleos (Mn)

El ensayo de Mn permite evaluar inequívocamente el daño producido por agentes aneunogénicos y/o clastogénicos. Esta técnica es empleada como prueba complementaria de otros ensayos de genotoxicidad de corto plazo que caracteriza el mismo u otros aspectos del agente en estudio. La técnica desarrollada por Fenech consiste en la siembra de células durante 24 hs a 37°, luego se le incorpora el compuesto problema y 3 µg/ml de citocalasina B. Después de 24 hs se cosechan, se fijan las células y se analizan los Mn en todas aquellas células binucleadas.

ANEXO CERTIFICACIONES:

Sesión 4

ESTUDIO MULTIDISCIPLINARIO DE ENFERMEDADES CRÓNICAS RELACIONADAS A DESARREGLOS EN EL PESO CORPORAL DE ORIGEN MULTIFACTORIAL Y DE RELEVANCIA REGIONAL Y NACIONAL.

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)

Servicio de Nutrición y Dietoterapia. Unidad de Trastornos Alimentarios. HOSPITAL DE NIÑOS "Sor María Ludovica

"La obesidad es un trastorno multifactorial que incluye predisposición genética y la exposición a un ambiente obesogénico. La obesidad infantil ha aumentado drásticamente en los últimos años, representando un problema para la salud pública. El desconocimiento de factores genéticos predictivos sobre la susceptibilidad individual y la falta de biomarcadores para objetivar el estado nutricional de los pacientes dificultan el abordaje médico de esta problemática. A través del proyecto de Fortalecimiento de Centros CIC, se propone hallar biomarcadores hormonales y genéticos que puedan brindar utilidad clínica en pacientes infanto-juveniles con desordenes del peso corporal. Aún no hemos estudiado muestras de los pacientes ya que aguardamos la aprobación del Comité Institucional de Revisión de Protocolos de Investigación del Hospital de Niños. Entretanto, hemos usado la técnica de High Resolution Melting para analizar en muestras de la Argentina algunas variantes de marcadores genéticos conocidos que han sido previamente asociados a la obesidad en otras poblaciones. Gracias a este estudio ya contamos con las muestras controles a través de las cuales se podrán identificar los genotipos de los pacientes participantes del proyecto. Por otro lado, actualmente estamos trabajando en el desarrollo de métodos de la valoración hormonal y la caracterización de nuevos marcadores circulantes

Mario Perello* marioperello@imbice.gov.ar, Camila Sala, Silvia S Rodríguez, Gisela L Vigo, Cecilia I Catanesi, Josefina Lacunza, Beatriz Tosti, María R. Santos, Mariela V Cuello, Lucas R Aguilar, Guadalupe García Romero, Jesica Raingo, Claudio M Bravi, Lidia B. Arbeletche, Sabrina E. Gambaro, Maia Uriarte Denati, Andrea Portales, Gimena Fernández, Franco Barrile, María P Cornejo, Emilio R. Mustafá, Sebastian A. Trejo, Diana M Hohl, Gabriela Di Santo Meztler, Daniel C Castrogiovanni, Ana Alzamendi, Mario R. Ermácora, Agustina Cabral, Clara I Mc Carthy, Clara Inés; Paula Paz, Melina Anello, Maria A Rey, Graciela Bailliet, María J. Tolosa, María G. Zubiría, Florencia Di Rocco, Valentina Martínez Damonte, Marina Muzzio, Andrés Giovambattista, Verónica Baliño, Sebastián Noó Bermudez, Pablo N. De Francesco, María S. Daverio, Ignacio Miguel, Eugenio Cálcena, Santiago Cordisco Gonzales, Daniela Lufano, Mirta Reynaldo, Daniela C. Rodríguez Golpe, Alejandro E Arnichar, Ramiro Llovera, Miriam B. Silbestro, Joel B. Martínez, Julieta M. Parisi. Calle: 526 entre 10 y 11. La Plata. Buenos Aires. Argentina. Tel: 001-0221-421-0112.

Dra. Adriana Fernández julietaher04@gmail.com, Verónica Garrido, Julieta Hernández, Mónica Dalieri. Calle 14 N° alle 14 Nro. 1631 (entre 65 y 66) - La Plata, Buenos Aires. Argentina

XVI Curso de Cultivos Celulares y sus Aplicaciones

Teórico-Práctico 2016

(Auspiciado por el Departamento de posgrado de la facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP)

Directores

Dr. Miguel A. Reigosa - Dr. Alejandro Bolzán

Coordinadores

Lic. Julieta Parisi - Qco. Daniel Castrogiovanni

Temario Teórico

Historia de los cultivos celulares. Equipamiento esencial del laboratorio: Presentación y utilización de sistemas de cultivos. Laboratorios experimentales, clínicos e industriales.

La célula en cultivo: Mantenimiento y establecimiento de líneas celulares. Cultivo de células linfoblásticas, producción de líneas transformadas. Medios y suplementos específicos para el cultivo. Factores de crecimiento. Criopreservación.

Controles diarios de las líneas celulares. Contaminaciones adventicias en cultivos. Observación microscópica. Viabilidad. Desdiferenciación, transformación y envejecimiento celular.

Ensayos de citotoxicidad y citocompatibilidad. Estudio de la adhesión y migración celular *in vitro*.

Los cultivos celulares como herramienta en Genética Toxicológica. Estudios de genotoxicidad.

Cultivo de células adiposas y preadiposas (diferenciación celular).

Producción de hibridomas (anticuerpos monoclonales).

Transfección de líneas celulares. Métodos actuales.

Obtención y cultivo de células madres. Diferenciación celular.

Cultivos en gran escala y aplicaciones industriales. Obtención de productos, elaboración de vacunas.

Temario de Trabajos Prácticos

Presentación de los diferentes sectores y equipos del área de cultivos celulares. Preparación, desinfección, esterilización de material y equipos para el laboratorio. Reactivos generales de uso común en cultivos celulares. Preparación y esterilización de diferentes medios de cultivos. Controles biológicos: bacterias, hongos y micoplasma. Manipulación de líneas celulares, métodos de propagación y amplificación de los cultivos, recuento celular. Criopreservación de las líneas celulares (congelación y descongelación).

Cultivos primarios de embrión total de ratón y de linfocitos de sangre periférica. Ensayos de citotoxicidad y biocompatibilidad (normas ISO 10993-5). Ensayos citogenéticos en cultivos celulares.

Dirigido a

Graduados Universitarios en Ciencias Biológicas, Médicas, Bioquímicas, o carreras afines.

Cupo limitado: 16 personas

Actividades

Las clases teóricas se desarrollarán en el Aula de seminario "Fernando Estivariz" del IMBICE en el horario de 8:30 a 12:30 horas.

Los trabajos prácticos se desarrollarán en el sector de cultivos celulares del IMBICE en el horario de 14-17 hs.

Duración del curso:

Del 19 de septiembre al 29 de septiembre de 2016.

Horario de clases teóricas: del 19/09/2016 al 23/09/2016 de 8:30 – 12:30 hs.

Horario de trabajos prácticos: del 19/09/2016 al 29/09/2016 de 13:00 – 17:00 hs.

El curso teórico-práctico tendrá una duración de 60 horas.

Evaluación

Al finalizar el curso, se realizará una evaluación final. Su aprobación permitirá acceder al certificado correspondiente.

Contacto

Consultas e inscripción:

TEL: (221) 421-0112 int.103

email: cultivos@imbice.gov.ar

IMBICE calle 526 e/ 10 y 11 Tolosa – La Plata

PROPIEDADES DE LAS ALEACIONES USADAS EN IMPLANTES QUIRÚRGICOS

R. W. Gregorutti¹, J. E. Grau¹, F. Sives², J. Parisi³, D. Castrogiovanni³, C. I. Elsner⁴

¹ Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica (LEMIT-CICPBA), Av. 52 s/n e/121 y 122, B1900AYB, La Plata, Argentina.

Telefono: 0221 4831141, e-mail: metalurgia@lemit.gov.ar

² Instituto de Física La Plata, CONICET, Dto. de Física, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, 49 y 115, B1900AYB, La Plata, Argentina

e-mail: sives@fisica.unlp.edu.ar

³ Instituto Multidisciplinario de Biología Celular – IMBICE (CICPBA-CONICET-CCT La Plata), Calle 526 y Camino General Belgrano, B1906APO, La Plata, Argentina.

Teléfono: 0221-4210112, e-mail: cultivos@imbice.gov.ar

⁴ Centro de Investigación y Desarrollo en Tecnología de Pinturas (CIDEPINT-CICPBA-CONICET), Av. 52 s/n e/121 y 122, B1900AYB, La Plata, Argentina and Facultad de Ingeniería – UNLP, Av. 1 esq. 47, B1900AYB, La Plata, Argentina

Telefono: 0221 4831141, e-mail: anelpire@cidepint.gov.ar

Resumen

Las aleaciones habitualmente usadas para elaborar dispositivos implantables son los aceros inoxidables ASTM F138 y ASTM F745, la aleación de cobalto ASTM F75, la aleación Ti-6Al-4V y el Ti Grado 4. Las propiedades mecánicas varían desde 480 MPa de resistencia a la tracción del ASTM F745 hasta 890 MPa del Ti-Al-V, con módulos de elasticidad de 200 GPa y 120 GPa, respectivamente. La resistencia a la corrosión es una de las exigencias más importantes, ya que además de la degradación química, genera fenómenos adversos como la liberación de iones metálicos, que pueden depositarse en distintos órganos y producir reacciones sistémico – tóxicas. Los ensayos de polarización cíclica indicaron que el Ti Grado 4 y el Ti-Al-V presentan la menor susceptibilidad a la corrosión localizada en medios que simulan fluidos del cuerpo humano. Otra característica, es que estos materiales no deben ser magnéticos. Las curvas de histéresis magnética mostraron que las aleaciones de Ti experimentan una menor magnetización ante campos magnéticos externos.

En cuanto a la biocompatibilidad, se han iniciado estudios de citotoxicidad en el acero inoxidable ASTM F745. Los resultados de los ensayos Rojo neutro y MTT mostraron una aceptable viabilidad celular, sin evidencia de liberación de compuestos citotóxicos al medio.

1. Introducción

Las prótesis biomédicas son dispositivos usados con el fin de sustituir tejidos óseos y restaurar funciones en el cuerpo humano. Si bien existen evidencias de su uso desde hace varios siglos¹, el factor que impulsó su desarrollo en nuestros tiempos fue la necesidad de rehabilitar a millones de inválidos de guerra. Por este motivo, a partir de la década del 50 se ha impulsado el desarrollo de nuevas disciplinas en Ciencia e Ingeniería de materiales, las que a partir de procedimientos empíricos pretenden adaptar materiales convencionales a aplicaciones biomédicas.

El requisito primordial de un material a ser implantado en el cuerpo humano es que sea biocompatible, de modo tal que no cause ninguna reacción adversa en el organismo. Se puede definir a la biocompatibilidad, como la capacidad de un material para no interferir ni degradar el medio biológico en el cual se encuentra. Los biomateriales existentes hoy en día, que muestran una performance clínica aceptable, son el resultado de la aplicación del método de prueba y error clínico, y no del diseño para el logro de una interacción preestablecida con el medio biológico. Esto se debe a que los mismos no fueron diseñados originalmente para el uso médico.

Los materiales más empleados en esta disciplina son las aleaciones metálicas, polímeros y cerámicos. Las aleaciones metálicas son las que han sido usadas históricamente para elaborar piezas tales como, prótesis de cadera y de rodilla, placas de fijación óseas e implantes dentales. Entre ellas se destacan los aceros inoxidable austeníticos ASTM F138 y ASTM F745, las aleaciones base cobalto tipo ASTM F75, la aleación de titanio Ti-6Al-4V y el Ti Grado 4. Estos materiales deben satisfacer propiedades intrínsecamente relacionadas, como biocompatibilidad, resistencia mecánica y principalmente, resistencia a la corrosión. El posible deterioro de una prótesis implantada puede ser originado por mecanismos electroquímicos, mecánicos o por combinación de ambos. Desde el punto de vista electroquímico, las prótesis están sometidas al entorno biológico consistente en fluidos oxigenados con presencia de iones cloruros, proteínas, enzimas, bacterias y suero, los que eventualmente pueden causar la corrosión del material. Al mismo tiempo, los movimientos propios del cuerpo generan cargas dinámicas que pueden ocasionar el fallo de la pieza por fatiga mecánica. Estas cargas dinámicas varían en distintos puntos del cuerpo, ya que una prótesis de cadera durante una caminata puede llegar a sufrir picos equivalentes a 4 veces el peso del cuerpo, mientras que una de rodilla hasta 3 veces². La conjunción de los efectos electroquímicos y mecánicos generan a su vez, fallas por el mecanismo conocido como corrosión-fatiga³.

Por otro lado, la biocompatibilidad está relacionada con los efectos citotóxicos de los componentes de la aleación (Cr y Ni en el caso del acero inoxidable) y el daño que pueden causar a las células durante el tiempo prolongado en el que la prótesis se implanta en el cuerpo. En la respuesta biológica del organismo a la presencia de cualquier implante, también es importante considerar la capacidad de proliferación de osteoblastos y fibroblastos sobre la superficie metálica para asegurar la oseointegración al hueso^{4,5}.

El presente trabajo presenta valores de propiedades mecánicas, electroquímicas, magnéticas de las aleaciones usadas como biomateriales, obtenidos en experiencias propias y recopiladas de la bibliografía. Al mismo tiempo, también se exponen los resultados de ensayos de citotoxicidad realizados con el acero inoxidable ASTM F745.

2. Materiales y técnicas experimentales

El acero inoxidable ASTM F745 y la aleación de cobalto ASTM F75 fueron obtenidos por colada mediante horno de inducción. Posteriormente a la colada, el acero ASTM F745 fue sometido a un tratamiento térmico de solubilizado a 1050°C, con enfriamiento en agua, para disolver los carburos y la ferrita delta formada durante la solidificación. Las muestras de Titanio Grado 4 y Ti-6Al-4V y las de acero inoxidable ASTM F138 fueron obtenidas de barras laminadas. En el presente trabajo se evaluaron las propiedades mecánicas del acero inoxidable ASTM F745 mediante ensayos de tracción, determinándose la resistencia y el alargamiento porcentual. Los

datos correspondientes al resto de los materiales se obtuvieron de la bibliografía. La susceptibilidad a la corrosión localizada fue evaluada mediante ensayos de polarización cíclica. Los mismos se realizaron con barridos entre un potencial inicial de -0.1V respecto al potencial de circuito abierto en sentido anódico y un potencial de inversión del barrido acotado por una densidad de corriente máxima permitida, en función de las áreas expuestas de las muestras analizadas, que estuvieron en el rango de 3,5 a 4 cm². La velocidad de barrido fue de 0,167 mV/s. La celda se conformó con el material a estudiar como electrodo de trabajo, el electrodo de calomel saturado como referencia y contraelectrodo de platino. Para simular las condiciones del entorno humano, se trabajó con una solución acuosa 0,9 % de NaCl a 37°C y pH entre 7,1 y 7,4. Las propiedades magnéticas fueron evaluadas mediante curvas de histéresis magnéticas obtenidas mediante un magnetómetro Lake Shore 7404, con campos entre -10.000 y 10.000 Gauss.

Las composiciones químicas de los biomateriales se detallan en la Tabla 1⁶.

Tabla 1. Composición química de los materiales usados en implantes quirúrgicos

	C	Cr	Ni	Mo	Fe	Co	Ti	Otros
ASTM F745	<0,06	17,0-19,0	11,0-14,0	2,0-3,0	resto	-	-	Si<1,0, Mn<2,0
ASTM F138	<0,03	17,0-19,0	13,0-15,0	2,25-3,0	resto	-	-	Si<0,75, Mn<2,0
ASTM F75	<0,35	27,0-30,0	<1	5,0-7,0	<0,75	resto	-	Si<1,0, Mn<1
Ti Grado 4	0,003	-	-	-	0,05	-	resto	0,34O, 0,0015H, 0,006N
Ti-Al-V	0,08	-	-	-	0,25	-	resto	6,0 Al, 4,0V, 0,13O, 0,0125H

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron empleando la línea celular osteoblástica de rata UMR-106 (ATCC, CRL-1661), la que fue cultivada en medio DMEM 10% SBF a 37°C y 5% de anhídrido carbónico. El material a ensayar se puso en contacto con el vehículo de extracción (VE), consistente en el medio de cultivo, durante 72 horas a 37°C, siguiendo la relación superficie/volumen de 2 cm²/mL, de acuerdo a lo especificado por la NORMA ISO 10995-5. Los bioensayos desarrollados para evaluar la citotoxicidad fueron los de rojo neutro, ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico y ensayo de colágeno Tipo I. Se realizaron tres experimentos por cada bioensayo, haciéndose ocho mediciones en cada caso. Los valores medios de las 24 determinaciones se compararon con las realizadas con un medio de cultivo sin exposición al material, usado como control CTR. Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba t de Student.

3. Propiedades mecánicas

Los valores de resistencia a la tracción, tensión de fluencia y módulo de elasticidad de los materiales habitualmente usados para confeccionar implantes quirúrgicos se ilustran en la Tabla 2, así como también las propiedades del hueso cortical⁶.

Tabla 2. Propiedades mecánicas de los materiales usados en implantes quirúrgicos

	σ_f	σ_{tracc}	E	σ_{max}
--	------------	------------------	---	----------------

	(MPa)	(MPa)	(GPa)	
ASTM F745 (*)	221	483	200	12
ASTM F138	190	490	200	40
ASTM F75	450	655	248	8
Ti Grado 4	485	550	110	15
Ti-Al-V recocido	830	895	124	10
Hueso cortical	-	50-150	7-30	-

La aleación Ti-Al-V es la que presenta la mayor resistencia mecánica y menor módulo elástico, respecto de los aceros inoxidable y la aleación de cobalto. En la actualidad se considera que el valor del módulo elástico debe ser lo más próximo posible al del hueso, de modo reducir la carga fisiológica que ejerce el implante sobre el mismo. Una alta carga fisiológica puede conducir a un proceso de osteopenia, esto es, la pérdida de masa ósea, también llamada reabsorción ósea. La consecuencia final es la pérdida de la interfase hueso-implante. Por este motivo, se están desarrollando materiales porosos con el objetivo de disminuir el módulo elástico, al tiempo que mejoraría la osteointegración del implante, a través de la penetración de tejido óseo a través de los poros de la pieza implantada⁷⁻⁹.

4. Susceptibilidad a la corrosión localizada

Los materiales implantables deben su pasividad a una capa superficial, que en el caso de los aceros inoxidable y de la aleación ASTM F75 es de Cr_2O_3 , mientras que en el Ti Grado 4 y la aleación Ti-Al-V dicha capa es de TiO_2 .

La susceptibilidad a la corrosión localizada fue evaluada a través de un ensayo de polarización cíclica, mediante el cual se determina el potencial de corrosión (E_{Corr}), el potencial de ruptura de la película pasiva (E_{Rupt}) y el potencial de protección o repasivación (E_{Repas}). El E_{Corr} revela la tendencia a la corrosión del material y queda determinado por el punto al cual la densidad de corriente tiende a cero. El E_{Rupt} es el potencial a partir del cual, el proceso de picado se desarrolla progresivamente y se pone de manifiesto cuando la densidad de corriente anódica se incrementa considerablemente, indicando que el material deja de estar pasivo. Por otro lado, el E_{Repas} es el potencial al que se completa el lazo de histéresis, denotando la repasivación del material. La Figura 1 ilustra una curva obtenida en el ensayo de polarización cíclica, donde se muestran los potenciales mencionados.

Cuanto mayor sea la diferencia ($E_{\text{Corr}} - E_{\text{Rupt}}$) menor será la tendencia del material a desarrollar un proceso de picado, a la vez que cuanto menor sea la diferencia ($E_{\text{Rupt}} - E_{\text{Repas}}$) mayor será su capacidad de repasivación.

Las curvas obtenidas para cada uno de los biomateriales analizados se muestran en la Figura 2, donde se observa que si bien el Ti Grado 4 y la aleación Ti-Al-V presentan menores E_{Corr} , lo que indica una mayor tendencia a la corrosión, sus respectivos potenciales E_{Rupt} son significativamente mayores, denotando una menor tendencia al picado respecto de la aleación de cobalto y de los aceros inoxidable. Al mismo tiempo, se ha notado en ambos materiales que la densidad de corriente vuelve a estabilizarse hacia potenciales mayores, lo que indicaría una tendencia a una segunda pasivación.

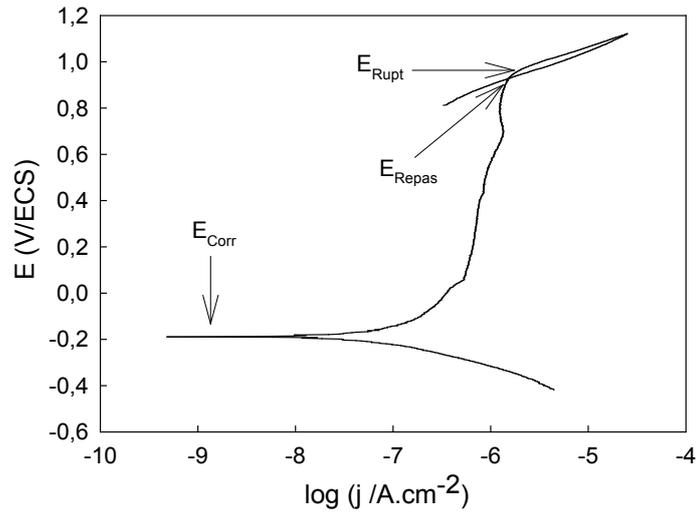


Figura 1. Ilustración de los potenciales E_{Corr} , E_{Rupt} y E_{Repas}

En el caso de la aleación de cobalto ASTM F75, se han observado valores intermedios de E_{Rupt} , siendo la característica más significativa de este material, el estrecho lazo de histéresis que presenta, lo que revela su alta capacidad de repasivación.

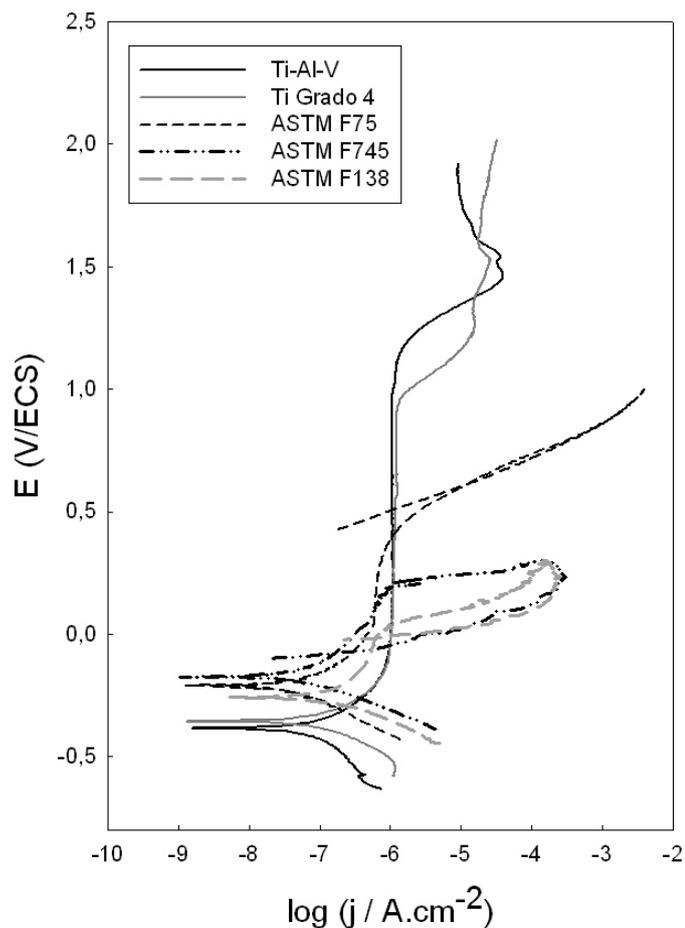


Figura 2. Curvas potenciodinámicas de los biomateriales analizados.

En cuanto a los aceros inoxidable, sus potenciales E_{Rupt} y E_{Repas} son más bajos respecto de los biomateriales previamente analizados y también es más amplio su lazo de histéresis, lo que indica que presentan una mayor tendencia a sufrir un evento de corrosión localizada y una menor capacidad de repasivación.

Las normas internacionales que tratan los aspectos relativos a la resistencia a la corrosión de los biomateriales, sólo establecen los ensayos que se deben realizar y no especifican valores de potenciales que se deben alcanzar. De modo que, estos resultados son comparativos y establecen una escala relativa sobre el posible desempeño de estos materiales en el cuerpo humano.

5. Propiedades magnéticas

Además de las propiedades mecánicas y de la resistencia a la corrosión, los biomateriales deben satisfacer la condición de no ser magnéticos, ya que de lo contrario podrían ocasionar efectos nocivos en el cuerpo ante la exposición de campos magnéticos importantes como en el caso de los estudios por Resonancia Magnética Nuclear^{10,11}. El análisis de las propiedades magnéticas se realizó mediante las curvas de histéresis ilustradas en la Figura 3, las que permiten evaluar la respuesta de un material cuando es expuesto a un campo magnético externo. Los estudios se centraron en el acero inoxidable ASTM F745, la aleación de cobalto y el Ti Grado 4.

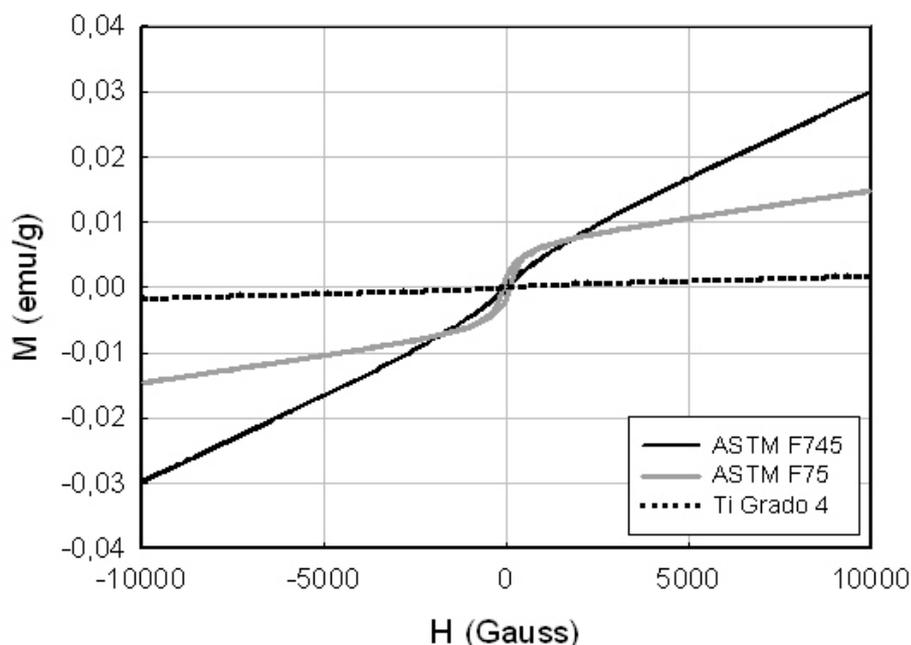


Figura 3. Curvas de histéresis magnética

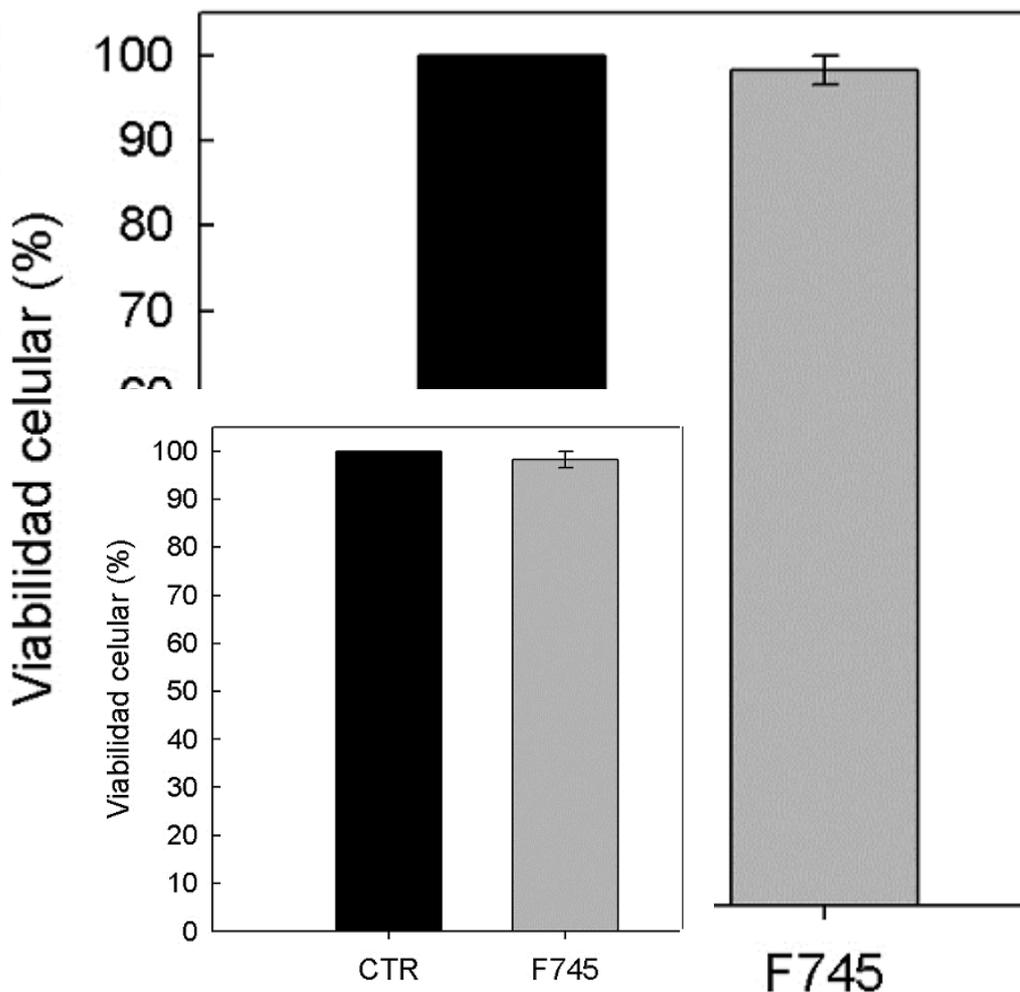
En todos los casos, se observó que el área encerrada en el ciclo de histéresis fue mínima, con muy bajos valores de remanencia y coercitividad. El acero inoxidable es el biomaterial que experimenta la mayor magnetización de saturación ante los campos magnéticos aplicados. Este comportamiento puede ser atribuido a que al ser obtenido por colada, este material puede contener pequeñas cantidades de ferrita delta precipitada, fase que le otorga cierto carácter magnético. La aleación ASTM F75 presenta una magnetización intermedia, aunque ha registrado mayor coercitividad, por lo que es más proclive al calentamiento cuando se la expone a un campo magnético. Por otro lado, el Ti Grado 4 es el material de mejor comportamiento, ya que mostró la menor magnetización.

6. Ensayos de biocompatibilidad

Como se mencionara anteriormente, el Cr y Ni pueden promover efectos citotóxicos en el cuerpo humano. Por esta razón, previamente a los ensayos, el VE fue analizado por ICP para determinar la cantidad de Cr y Ni que pudo haber liberado el acero inoxidable. La concentración de Cr fue menor que 0,05 mg/L, mientras que la de Ni fue de 13 mg/L.

Los ensayos de biocompatibilidad se realizaron para evaluar la citotoxicidad del acero inoxidable ASTM F745. Se entiende por citotoxicidad a la disminución de la proliferación celular inducida por un agente físico, químico o biológico. Los bioensayos realizados fueron los siguientes: Ensayo de Rojo Neutro (RN), ensayo de reducción del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT) y en

6.1 Ensayo
elemento o
daños que
endosomas
cultivado e:
Las células
se muestra
ya que el v
efectos adv



eterminado
e no sufren
osomas y
i el medio

CTR, como
estadístico,
i, no habría
ar.

Figura 4. Ensayo de Rojo neutro

6.2 Ensayo MTT: Este ensayo se basa en la reducción de MTT a formazan insoluble 41-43. La reacción depende de la actividad metabólica mitocondrial de la enzima succinato deshidrogenasa. En consecuencia, las células con metabolismo bajo reducen muy poco MTT, mientras que las células que se dividen rápidamente exhiben altas tasas de reducción del MTT. La Figura 5 muestra que la viabilidad celular alcanza valores similares a CTR. No se observaron diferencias significativas en el análisis estadístico. Este resultado indicaría la ausencia de compuestos tóxicos que puedan afectar el metabolismo mitocondrial de las células.

El efecto no tóxico de F745-SS mostrado en este ensayo es coincidente con un trabajo realizado en placas de reconstrucción maxilofacial hechas de 316L¹⁴. En él se informó la buena biocompatibilidad in vitro de esta aleación con fibroblastos. Al mismo tiempo, Wang et. Al, también se refieren a los efectos no adversos de 316L sobre la viabilidad celular de las células L929 y NIH3T3¹⁵.

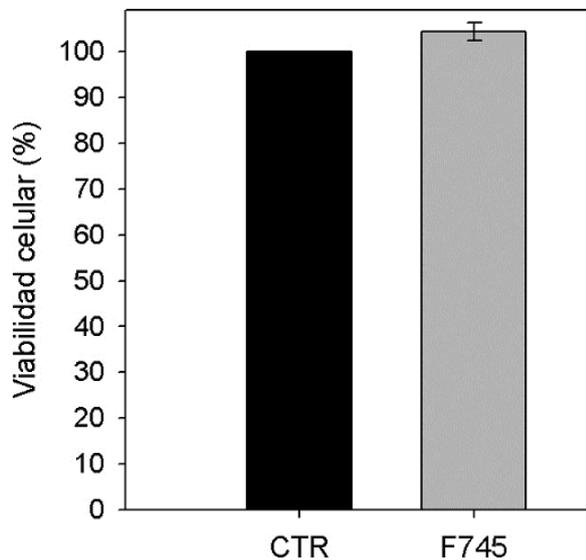


Figura 5. Ensayo MTT

6.3 Ensayo de determinación de colágeno Tipo I: El colágeno tipo I constituye el 85% de la matriz extracelular de hueso, lo cual tiene un papel importante en la diferenciación y función de los osteoblastos que participan en la integración del implante^{5,14,16}.

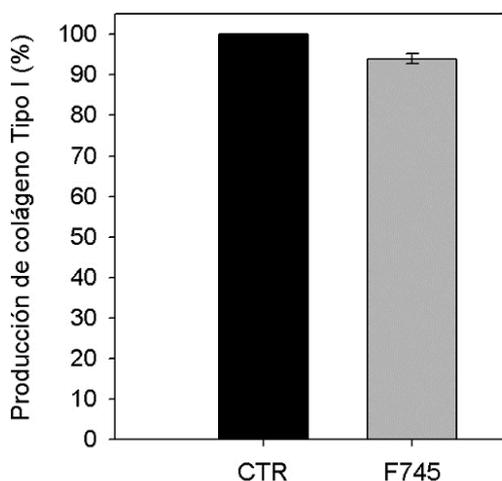


Figura 6. Ensayo de colágeno Tipo I

Las células expuestas al VE experimentaron una ligera reducción en la producción de colágeno respecto a las expuestas al CTR, como se muestra en la Figura 6. En este caso, el análisis estadístico mediante la prueba t de Student mostró un valor p menor que 0,05, indicando que el acero inoxidable podría generar algún efecto tóxico en la producción de colágeno. De acuerdo con la caracterización del VE utilizado, se podría conjeturar que la disminución en la producción de

colágeno es una consecuencia de la concentración de Ni. Aunque para confirmar esta presunción, deben realizarse nuevos ensayos.

7. Conclusiones

De los estudios realizados, se deduce que el Ti Grado 4 y la aleación Ti-Al-V presentan el mejor comportamiento como biomaterial, teniendo en cuenta sus altas resistencias mecánicas, bajos módulos elásticos y a la menor susceptibilidad a la corrosión localizada. Al mismo tiempo, estos materiales experimentan menor magnetización, ante la presencia de campos magnéticos.

La aleación de cobalto ASTM F75 presenta una buena resistencia mecánica y un comportamiento satisfactorio ante la corrosión localizada, con una alta capacidad de repasivación. En cuanto a los aceros inoxidable, si bien poseen una aceptable resistencia mecánica, su respuesta ante eventos de corrosión localizada es inferior a la de los otros materiales analizados. Respecto de los bioensayos realizados con el acero inoxidable ASTM F745, se ha observado que la viabilidad celular ha sido satisfactoria, evidenciando que el Cr y Ni en las concentraciones medidas, no provocarían efectos citotóxicos, en las condiciones de ensayo establecidas. Sin embargo, se observó una ligera disminución en la producción de colágeno Tipo I.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Entrenamiento Multidisciplinario para la Investigación Tecnológica (LEMIT), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICIPBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico brindado para su desarrollo.

Referencias

1. ASM Metals Handbook, Vol 13, Corrosion, (1987), 3313-3339.
2. V. Sudhakar, Engineering Failure Analysis, 12, (2005), 249–256.
3. R. Altobelli Antunes, M. C. Lopes de Oliveira, Acta Materialia, 8, (2012), 937-962.
4. L. C. Baxter, V. Frauchiger, M. Textor, I. Gwynn, R. G. Richards: 'Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces', *Eur. Cells and Mater.*, 2002, **4**, 1-17, DOI: 10.22203/eCM.
5. A. F. Mavrogenis, R. Dimitriou, J. Parvizi and G. C. Babis: 'Biology of implant osseointegration', *J. Musculoskelet Neuronal Interact.*, 2009, **9**, (2), 61-71.
6. Handbook of Materials for Medical Devices, Ed. J. R. Davis, ASM International, (2003).
7. A. S. Unger, R. J. Lewis, T. Gruen, The Journal of Arthroplasty, Vol. 20, 8 (2005), 1002-1009.
8. X. Flecher, S. Sporer and W. Paprosky, The Journal of Arthroplasty, Vol. 23, 7, (2008), 949-955.
9. Y. J. Chen, B. Feng, Y. P. Zhu, J. Weng, J. X. Wang, X. Lu, Materials Letters, 63, (2009), 2659-2661.
10. H. Mansura, T. Inoue, H. Konno, N. Sasaki., K. Ogasawara, A. Ogawa., *J. Neurosurg.*, 97, (2002), 1472–1475.
11. M. Sawyer-Glover, F. G. Shellock, J. Magn. Reson. Imaging, 12, (2000), 92–106.
12. J. Weyermann, D. Lochmann and A. Zimmer: 'A practical note on the use of cytotoxicity assays', *Inter. J. of Pharm.*, 2005, **288**, 369-376.
13. G. Fotakis and J. A. Timbrell: 'In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride', *Toxicol. Lett.*, 2006, **160**, (2), 171-177.
14. N. P. M. Sumarta, C. P. Danudiningrat, E. A. Rachmat and P. Soesilowati: 'Cytotoxicity difference of 316L stainless steel and titanium reconstruction plate', *Dent. J.*, 2011, **44**, (1), 7-11.

15. Y. B. Wang, H. F. Li, Y. F. Zheng and M. Li: 'Corrosion performances in simulated body fluids and cytotoxicity evaluation of Fe-based bulk metallic glasses', *Mater. Sci. and Eng. C*, 2012, **32**, 599-606.
16. C. Roehlecke, M. Witt, M. Kasper, E. Schulze, C. Wolf, A. Hofer and R. H. W. Funk: 'Synergistic Effect of Titanium Alloy and Collagen Type I on Cell Adhesion, Proliferation and Differentiation of Osteoblast-Like Cells', *Cells Tissues Organs*, 2001, 168, 178-187.