

Andamios de PLGA/nHA para regeneración ósea, efectos de su composición sobre Citotoxicidad y degradación In Vitro

E. Díaz Tajada¹, I. Puerto Lecanda¹, I. Ibáñez Fernández¹

^{F1} Departamento de Ingeniería Minera, Metalúrgica y Ciencia de los Materiales, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Bilbao, Spain. esperanza.diaz@ehu.eus; igor.puerto@ehu.eus; itsaso.ibanez@ehu.eus

Resumen

Se estudia la influencia de la composición de andamios de poli(lactida-co-glicolida)/nanohidroxiapatita (PLGA/nHA), sobre la citotoxicidad y el ritmo de degradación, en el contexto de la regeneración de tejido óseo. Los andamios se fabrican por separación de fases inducida térmicamente (TIPS) y el estudio de degradación se realiza in vitro, con tampón fosfato salino (PBS) a 37°C y durante 8 semanas. Se analizan tanto la influencia de la concentración de partículas bioactivas como la composición de copolímero sobre el grado de degradación y la citotoxicidad de las muestras. Las medidas de peso molecular, pH, absorción de agua y morfología de los andamios indicaron que aquellos con ratio molar lactida/glicolida menor se degradaban más rápido, debido a su mayor hidrofiliidad. La evaluación de la citotoxicidad se llevó a cabo por el método estándar ISO10993-5 demostrando que ninguna de las muestras era citotóxica.

1. Introducción

La fabricación de andamios con propiedades, forma y tamaño adecuados constituye el principal reto para la ingeniería de tejidos. En general diremos que un andamio debe facilitar la adhesión, la diferenciación y la proliferación de las células. El andamio cumple también la función de guiar el crecimiento del tejido u órgano, facilitando su supervivencia y desapareciendo cuando ya no sea necesario para permitir la integración con el tejido nativo. Un andamio debe ser biocompatible, poroso, tridimensional, bioactivo, biodegradable, debiendo además presentar propiedades mecánicas similares a las del tejido a sustituir [1-3].

Uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de estos soportes, es el control de la degradación. Los andamios son estructuras diseñadas para ser usadas por un periodo de tiempo limitado, por lo que deben degradarse y reabsorberse sin producir productos que sean perjudiciales para el cuerpo y a un ritmo igual o ligeramente inferior al de crecimiento del nuevo tejido. [4]

Existe una gran cantidad de materiales que han sido propuestos y estudiados para este tipo de aplicaciones, entre los que destacan los polímeros biodegradables, que han demostrado ofrecer propiedades inigualables para la fabricación de andamios. La poli(DL-lactida-co-glicolida) es un copolímero de PDLA y PGA muy utilizado en ingeniería tisular. Cuenta con aprobación de la FDA para uso clínico y combina buenas propiedades mecánicas con una excelente procesabilidad y un periodo de degradación ajustable. Al igual que la mayoría de poliésteres alifáticos, se degrada mediante simple hidrólisis de sus enlaces éster, dando como resultado ácido láctico y ácido glicólico, que

son eliminados a través del ciclo de Krebs. Además, su cinética de degradación depende en gran medida de la ratio de los monómeros y del peso molecular relativo de éstos. [5]

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) es un mineral bioactivo y biodegradable que ha sido ampliamente usado durante los últimos 40 años en aplicaciones tales como recubrimiento de prótesis, implantes dentales, cirugía maxilofacial o andamios para el crecimiento de hueso. Se calcula que en torno al 50% del tejido óseo humano está formado por este mineral. La principal ventaja de la hidroxiapatita es que el hueso es capaz de unirse químicamente a ella sin crear una interface de colágeno, como pasa con otro tipo de biomateriales inertes. [6]

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

En este estudio se han utilizado dos copolímeros distintos de poli(DL-lactida-co-glicolida) (PLGA), con diferente ratio molar: Purasorb PDLG5004, con ratio 53/47 y Purasorb PDLG7502, con ratio 75/25, ambos suministrados por PURAC (Holanda). Como aditivo para la fabricación de andamios se utilizó nanohidroxiapatita (nHA), que fue suministrada por Aldrich Chemistry (EEUU), con un tamaño de partícula menor de 200 nm y un peso molecular de 502,31 g/mol. Como disolvente para la fabricación se usó 1,4 Dioxano fabricado por Panreac (Barcelona, España). Para el estudio de degradación *in vitro* se utilizó solución tampón salina (PBS) de Fluka Analytical (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), con un pH de 7,2.

2.2. Fabricación

Los andamios se fabricaron mediante separación de fases inducida térmicamente (TIPS). Para la fabricación se creó una disolución de polímero y 1,4 dioxano con una concentración 2,5 % (w/v) que era vertida en moldes de aluminio. La nHA fue dispersada por ultrasonidos en concentraciones de 0, 10 30 y 50% con respecto al peso total del polímero. La mezcla resultante fue enfriada para provocar la separación de fases y se extrajo el disolvente mediante liofilización. Por este método se obtuvieron soportes con una porosidad superior al 90%.

2.3. Ensayo de citotoxicidad

Se realizó una evaluación indirecta de la citotoxicidad de las muestras mediante una adaptación del método estándar ISO 10993-5. Para el ensayo *in vitro* se cortaron membranas de 0,1mg/ml y se esterizaron mediante

radiación UV. Antes de realizar el cultivo, las muestras fueron lavadas con solución tampón salina (PBS) para eliminar cualquier rastro residual de disolvente.

Las muestras se sumergieron en un medio de extracción DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), conteniendo 1 g/L de glucosa (Gibco) suplementada con un 10% de suero fetal bovino (FBS, Biochrom) y un 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Biochrom). A continuación, se incubaron durante 24 horas a 37°C en una atmósfera con un grado de humedad del 95% y un 5% de CO₂. Se utilizó un 20% de dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma Aldrich) como control positivo, y el medio de cultivo celular como control negativo.

Del mismo modo se utilizó una línea de células preostoblastos de ratón (MC3E3-E1, mus musculus calvaria). Las células se cultivaron sobre placas de poliestireno con una densidad de 3x10⁴ células/ml, se mantuvieron durante 24 horas para permitir su adhesión a la placa, transcurrido este tiempo se extrajo el medio de cultivo y se añadió el medio de extracción (100µl). Después las células se cultivaron durante 24 y 72 horas más. En cada punto de control se cuantificó la viabilidad de las células mediante un ensayo de MTT.

El ensayo MTT mide la actividad mitocondrial de las células, reflejando el número de células viables. Básicamente las células viables con metabolismo activo convierten el MTT produciendo una coloración púrpura, cuya densidad óptica puede ser medida. El porcentaje de células viables se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{\text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del control negativo}} \times 100$$

2.4. Degradación in vitro

Las muestras fueron cortadas en trozos rectangulares de unos 0,5 cm² y peso similar, en torno a los 20 mg. Tras ser pesadas se introdujeron en viales idénticos que contenían 10 ml de solución tampón salina (PBS), sumergiéndolas por completo. La degradación tuvo lugar en un horno termostatzado a 37 °C y en condiciones estáticas.

Transcurridos los periodos de degradación establecidos (1, 2, 3, 4, 6 u 8 semanas), las muestras eran extraídas, se les retiraba cuidadosamente la humedad superficial y eran pesadas para determinar la absorción de agua. Las variaciones en el pH de la solución tampón fueron determinadas utilizando un pH-metro PCE 228 (Instrumentos PCE, España) y corregidas por temperatura. Finalmente, las muestras se dejaron secar varias semanas durante las cuales fueron regularmente pesadas hasta que su peso se estabilizó. Así se pudo determinar el peso en seco tras la degradación.

2.5. Caracterización

Se realizó un estudio completo de caracterización de las muestras mediante las siguientes técnicas:

2.5.1. Absorción de agua y pérdida de peso

La absorción de agua y pérdida de peso se evaluaron pesando las muestras. Para el cálculo de la absorción se utilizó la siguiente ecuación:

$$W_a = \frac{W_w - W_r}{W_r} \times 100$$

Siendo W_w el peso de las muestras mojadas tras la degradación y W_r el peso residual de las muestras degradadas una vez secas. Para el cálculo de la pérdida de peso se utilizó la siguiente ecuación:

$$W_L = \frac{W_0 - W_r}{W_0} \times 100$$

Donde W₀ es la masa original de las muestras.

2.5.2. Análisis SEM

La morfología de los andamios y de las células cultivadas se evaluó mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM, HITACHI S-3400N, Tokio, Japón). Antes del análisis las muestras fueron metalizadas con una fina capa de oro en un metalizador JEL JFC-1100 (Jeol, Peabody, MA, USA) a 1200 V y 5 mA.s.

2.5.3. Cromatografía de Permeación de Gel (GPC)

Se determinó peso molecular promedio en peso (Mw), peso molecular promedio en número (Mn) e índice de polidispersidad (I=Mw/Mn), mediante el uso de un cromatógrafo de permeación de gel (GPC, Perkin Elmer 200). Para ello las muestras fueron disueltas en tetrahidrofurano (THF) al 2% y se utilizó un refractómetro diferencial Perkin Elmer 200 como detector. La calibración se realizó de acuerdo a los estándares del poliestireno con un caudal de 1 ml/min. Se utilizaron cuatro columnas Phenogel (Phenomenex) en serie con un tamaño de partícula de 5 µm.

2.5.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las características térmicas de los polímeros se determinaron mediante un calorímetro diferencial de barrido (DSC, Q200 de TA Instruments) equipado con un enfriador. Se utilizaron muestras de unos 6 mg que fueron encapsuladas en crisoles de aluminio del tipo Tzero. Como gas de purga se empleó nitrógeno con el fin de evitar la degradación termo-oxidativa de las muestras durante los experimentos. Los barridos comprendieron temperaturas de -50 a 200 °C con ratios de calentamiento de 10 °C/min y ratios de enfriamiento de 20 °C/min.

3. Resultados y conclusiones

3.1. Citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los diferentes soportes de PLGA y PLGA/nHA, fabricados con ambos copolímeros (PLGA 53/47 y PLGA 75/25), mediante el ensayo MTT. Los resultados quedan recogidos a continuación en la Figura 1.

Según los estándares ISO 10993-5 para que una muestra se considere citotóxica debe reducir la viabilidad en un 30% o más. Como se puede ver en la Figura 1 ninguna de las muestras resultó citotóxica transcurridas 72 horas. La incorporación de refuerzos bioactivos se considera un medio para mejorar las propiedades del polímero y su vez la nHA mejora la adhesión celular [7]. En nuestro caso, tras 72 horas, la viabilidad celular de las muestras logró valores superiores al 100%, lo que puede ser atribuible a los

materiales elegidos, y en especial al efecto que la nHA tiene sobre la proliferación de osteoblastos.[8,9]

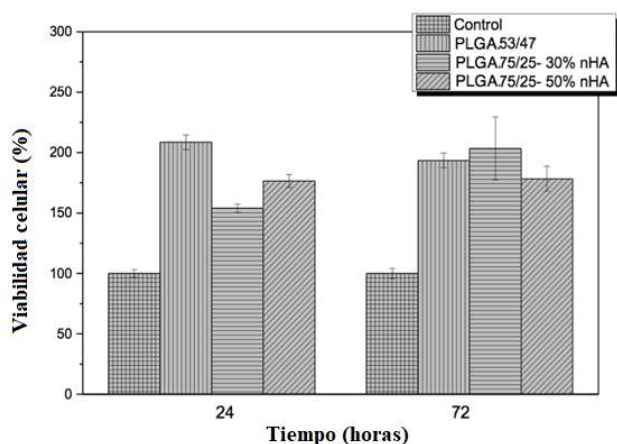


Figura 1. Viabilidad celular a 24 y 72 horas

Con el objetivo de determinar la idoneidad de los soportes se observó la morfología de las células cultivadas mediante microscopía SEM. Una de las micrografías resultantes puede verse en la Figura 2.

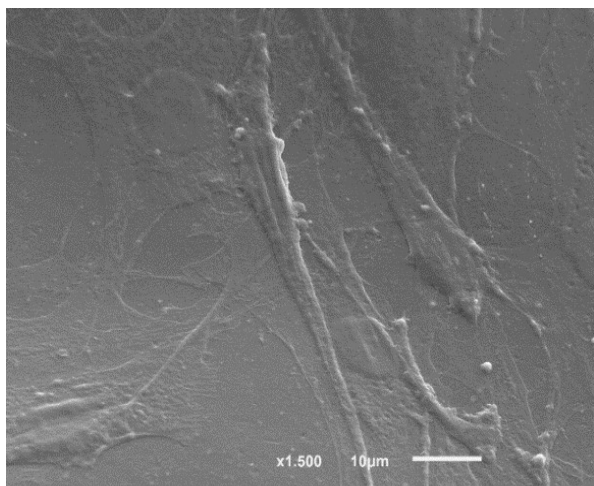


Figura 2. Morfología de un preostoblasto MC3T3-E1, cultivado sobre un andamio de PLGA 75/25 y 10% de nHA

La micrografía preostoblastos tras 3 días de cultivo sobre muestras de PLGA con nHA. Las células muestran una disposición al azar sobre las membranas. Estudios anteriores han demostrado que la introducción de nHA puede mejorar tanto la hidrofiliidad como las propiedades mecánicas a la vez que favorece la viabilidad de los osteoblastos y la regeneración ósea. [9]

3.2. Estudio de degradación

El control de la cinética de degradación es un factor vital en la fabricación de andamios, una degradación demasiado rápida podría comprometer la integridad mecánica del andamio, mientras que una degradación demasiado lenta puede interferir en la integración del tejido regenerado [4]

3.2.1. Pérdida de peso y peso molecular

La reducción de peso molecular y el aumento de la polidispersidad son los primeros indicadores de la degradación de un polímero. Durante el proceso de

degradación lo lógico es que las cadenas macromoleculares se vayan rompiendo como consecuencia del proceso de hidrólisis, con lo que su peso molecular se hará más pequeño y al tener más cadenas macromoleculares la diferencia entre sus pesos moleculares será mayor y la polidispersidad aumentará.

El análisis de las muestras con GPC permitió calcular estos parámetros. Se observó una reducción sistemática del peso molecular prácticamente desde el principio del estudio de degradación para todas las muestras. Sin embargo, las muestras de ambos copolímeros con nHA se degradaron más lentamente. Parece que el uso de nanopartículas tuvo un efecto amortiguador en la interfase entre la DLGA y la nHA, evitando la penetración de PBS en las paredes del scaffold y frenando la degradación al neutralizar el efecto catalítico de los grupos carbonilos formados al romperse las cadenas del polímero. Como consecuencia los valores de pérdida de peso molecular fueron más bajos.

Comparando los andamios de ambos copolímeros pudimos comprobar que el PLGA 53/47 sufrió una reducción del peso molecular mucho mayor que el PLGA 75/25, de tal modo que las muestras de andamio fabricadas con PLGA 53/47 puro sufrieron una degradación casi total en apenas 3 semanas. El peso molecular fue casi el doble al final de la degradación para muestras de PLGA 75/25. Esto se explica por el contenido más bajo de ácido glicólico en el sistema.

3.2.2. Absorción de agua

Las muestras con mayor contenido de nHA fueron capaces de estabilizar la absorción de agua a partir de la tercera o cuarta semana de degradación. El proceso de absorción es un equilibrio entre la disolución de oligómeros en la solución y la absorción de PBS. Un incremento en la absorción indica un aumento de la degradación. Un contenido mayor de unidades más hidrófilas (como el ácido glicólico) en el copolímero, facilita la absorción y difusión de agua y por lo tanto la hidrólisis. Por todo esto podemos afirmar que el comportamiento del andamio frente a la degradación depende tanto de la composición del copolímero como del material bioactivo que se haya utilizado. En general el PLGA 75/25, se mostró más hidrófobo, pero la inclusión de nHA aumento sus niveles de absorción en términos generales.

3.2.3. pH

Los cambios en el pH del medio acuoso de degradación a lo largo del tiempo, sirven para comprobar la liberación de residuos ácidos de las muestras. Cuanto mayor es la formación de ácidos mayor será la disminución del pH. Esta determinación también proporciona información sobre la producción total de ácido, y en última instancia sobre el grado de degradación.

La tendencia general para todas las muestras fue de una disminución moderada en el pH del medio de degradación. En los andamios compuestos de PLGA 53/47/nHA el pH también descendió de manera constante pero su pH se mantuvo por encima del de las muestras de DLGA puro.

En cuanto a los andamios de PLGA 75/25, al contrario de lo que ocurría con el DLGA 53/47, las muestras sin nHA fueron las que experimentaron una caída de pH menor, lo que indica que liberaron al medio menos cantidad de ácido que el resto. Teniendo en cuenta que los datos de GPC indican que éstas eran las muestras más degradadas, es muy posible que estuviesen sufriendo una degradación en bloque autocatalizada, en tal caso los productos ácidos se habrían mantenido en el interior del andamio, y no habrían sido liberados.

3.2.4. Análisis térmico (DSC)

La caracterización mediante DSC nos permitió observar los cambios en las propiedades térmicas (T_g , T_m y ΔH_m) acontecidos durante la degradación de los polímeros. El PLGA 75/25 mostró cierto grado de cristalinidad mientras que el PLGA 53/47 resultó ser amorfo. Sin embargo, todas las muestras de andamio mostraron un comportamiento amorfo, seguramente debido al tratamiento térmico utilizado durante su fabricación y a que el ensayo de degradación se llevó a cabo por debajo de la T_g del material, impidiendo un posible fenómeno de cristalización posterior. Algunos autores han postulado que el comportamiento en degradación de los polímeros amorfos es más favorable para la regeneración de tejido óseo. [5]

3.2.5. SEM

La morfología de los andamios se estudió mediante SEM. El PLGA 75/25 produjo andamios altamente porosos e interconectados, las paredes presentaban microporosidad. El PLGA 53/47 produjo poros más gruesos y sin microporosidad. La adición de nHA no afectó al porcentaje de porosidad, pero sí redujo el tamaño y la alteró la morfología de los poros al interferir en el proceso de cristalización del disolvente. También se observó menos microporosidad en los andamios compuestos de PLGA 75/25.

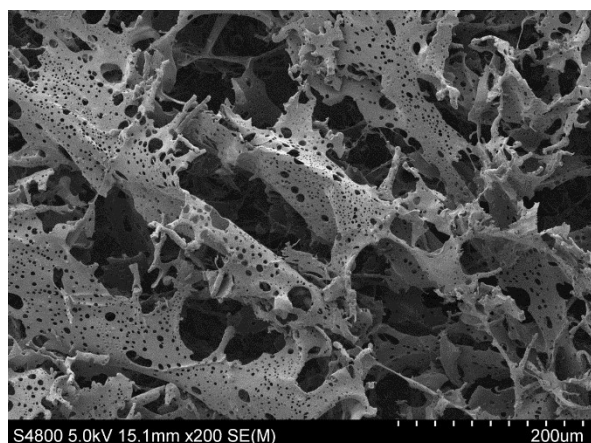


Figura 3. Micrografía SEM de andamios de DLGA 75/25 sin degradar.

En cuanto al proceso de degradación los andamios más porosos o con tamaño de poro más pequeño se degradan más lentamente que aquellos con poros más grandes, menos poros o paredes más anchas, ya que estos tres factores hacen más difícil la difusión de productos ácidos resultantes de la degradación por el interior del soporte poroso, dificultando las reacciones de hidrólisis. [10]

4. Conclusiones

El estudio de degradación in vitro de andamios de PLGA 53/47 y PLGA 75/25 y nHA nos ha permitido confirmar la influencia de la ratio de copolímero y la presencia de nHA como moderadores del ritmo de degradación. La nHA modifica la condición hidrofóbica del polímero, permitiendo la entrada de agua, pero a la vez forma una barrera física que dificulta la difusión de esta, retrasando la degradación. El PLGA con una ratio LA/GA menor se degradó más rápido al ser más hidrófilo. Ninguna muestra de PLGA ni su composite con nHA mostró citotoxicidad y a su vez esta nHA demostró ser un refuerzo con propiedades bioactivas. [11]

Referencias

- [1] Chen, G.; Ushida, T.; Tateishi, T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol. Biosci.* 2002, 2 (2), pp 67–77.
- [2] Vallet, M. Tendencias en Biomateriales. *Eidon* 2010, 33 (33), pp 8–12. http://www.fcs.es/docs/eidon/33/EIDON_33_biomateriales_008_012.pdf (Consultado: septiembre 2017).
- [3] Chen, Q.; Roether, J.A.; Boccaccini, A.R. Tissue engineering scaffolds from bioactive glass and composite materials. In *Topics in Tissue Engineering*; Reis, N.A.R., Chiellini, F. Eds., 2008; Vol. 4.
- [4] Naderi, H.; Matin, M.M.; Bahrami, A.R. Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *J. Biomater. Appl.* 2011, 26 (4), pp 383–417.
- [5] Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*. 2012, 2, pp 366–377. (doi:10.1098/rsfs.2011.0123)
- [6] Tajbakhsh, S.; Hajiali, F. A comprehensive study on the fabrication and properties of biocomposites of poly(lactic acid)/ceramics for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C-Mater for Biol Applic.* 2017, 70, pp 897–912, (DOI:10.1016/j.msec.2016.09.008).
- [7] Smith, I.O.; McCabe, L.R. and Baumann M.J., MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder. *Internat. Jour. Of Nanomed.*, 2006, 1(2): pp 189–194
- [8] Roohani-Esfahani, S.I. et al.; A bioceramic with enhanced osteogenic properties to regulate the function of osteoblastic and osteoclastic cells for bone tissue regeneration. *Biomed. Mater.* 2016. 11(3).
- [9] Messias, A.D.; Aragones, A.; Duek, E.A.D. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells, *Bioceramics* 21, M. Prado and C. Zavaglia, Editors. 2009, Trans Tech Publications Ltd: Durten-Zurich. pp 461–464
- [10] Linbo, W.; Jiandong, D. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomater.* 2004, 25 pp. 5821–5830, (DOI: 10.1016).
- [11] Diaz, E. et al. The Influence of Copolymer Composition on PLGA/nHA Scaffolds Cytotoxicity and In Vitro Degradation. *Nanomaterials*, 2017, 7, 173 (DOI:10.3390/nano7070173)