

1. Andamios porosos de origen marino basados en alginato y biocerámica para la regeneración del tejido óseo.

E. López-Senra¹, M. López-Álvarez¹, G.S. Diogo^{2,3}, T.H. Silva^{2,3}, R.L. Reis^{2,3,4}, P. González¹, J. Serra¹.

¹Grupo Novos Materiais – Departamento de Física Aplicada, MTI, Universidade de Vigo.

²3B's Research Group, I3Bs – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Guimarães, Portugal.

³ICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

⁴The Discoveries Centre for Regenerative and Precision Medicine, Headquarters at University of Minho, Guimarães, Portugal.

eslopez@uvigo.es

En el presente estudio se han desarrollado andamios porosos de origen marino basados en la combinación de alginato y biocerámica. La evaluación de los mismos se realizó en base a su estabilidad, bioactividad, porosidad, propiedades mecánicas y respuesta biológica in vitro. Se demostró la viabilidad para fabricar andamios con una estructura polimérica de alginato de sodio en la cual se encuentra distribuida de forma homogénea

la biocerámica. En este capítulo se detallan las formulaciones óptimas para obtener estructuras con buen comportamiento mecánico y adecuada bioactividad. Los ensayos biológicos confirmaron la ausencia de citotoxicidad y un aumento óptimo de la densidad celular.

1. Introducción

Hoy en día la ingeniería biomédica se encuentra inmersa en una intensa actividad investigadora para contribuir, entre otros objetivos, al cambio de paradigma en el que se encuentra la medicina actual: pasar de la reparación o sustitución de un tejido u órgano dañado a su regeneración. En este contexto es donde se ubica la reciente disciplina denominada ingeniería de tejidos, la cual pretende promover la regeneración de tejidos mediante la utilización de tres elementos básicos: andamiajes porosos que repliquen la matriz extracelular, cultivo de células sobre estas estructuras e incorporar biomoléculas o factores de crecimiento que promuevan la diferenciación de esas células hacia el tejido que se pretende regenerar (Kasper, 2016).

En el caso particular del hueso, uno de los retos para la ingeniería de tejidos está en desarrollar andamios que, además de tener propiedades osteoinductoras y mecánicas adecuadas, resuelvan el gran problema de promover la vascularización (Amini et al., 2013, Roseti et al., 2017). Para el diseño y fabricación de los andamios porosos se utilizan diferentes biomateriales como polímeros, cerámicas, vidrios o incluso metales. En el caso particular de los polímeros destacan los de origen sintético como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico; aunque cada vez más se van incorporando los de origen biológico como el colágeno de origen bovino, el quitosano y el ácido hialurónico, entre otros. Si hablamos de cerámicas las más ampliamente utilizadas son los fosfatos de calcio, destacando la hidroxiapatita (HA) o el beta-tricalcio fosfato (β -TCP), ya sean de origen biológico o sintético, con un grado mayor o menor de cristalinidad según la resorción deseada.

En cuanto a los biomateriales de origen biológico es importante destacar el gran potencial de la biodiversidad marina. En el caso particular de los subproductos pesqueros su aprovechamiento se encuentra centrado en tres líneas fundamentales: (1) valorización de subproductos para uso alimentario, (2) valorización biotecnológica de subproductos marinos y (3) obtención de compuestos de interés para la industria farmacológica y biomédica (Balboa, 2013). Fruto de estas investigaciones se han desarrollado productos entre los que destacan, harinas y aceites de pescado, colágeno, ácidos grasos, ácido hialurónico, fosfatos cálcicos, carbonato cálcico y quitosano, entre otros (Balboa, 2013).

Así, el objetivo de este trabajo de investigación se centra en el desarrollo de nuevos andamios que permitan replicar la matriz extracelular de los tejidos que componen el sistema osteoarticular y utilizando para ello biomateriales de origen marino. En particular se propone la fabricación, caracterización y evaluación biológica *in vitro* de andamios porosos basados en la combinación de un polímero y una cerámica: alginato de sodio y fosfato de calcio, ambos de origen marino, en determinadas proporciones y empleando un reticulante que refuerce la estructura del polímero sin afectar a la viabilidad celular.

2. Obtención de andamios

La fabricación de los andamios porosos de origen marino se basó en la combinación de alginato comercial obtenido de algas pardas (Sigma-Aldrich SL) y una biocerámica obtenida a partir de dientes de tiburón de la especie *Prionace glauca* (López-Álvarez et al., 2016, López-Álvarez et al., 2017). El agente reticulante utilizado fue cloruro de calcio (CaCl_2). La proporción de alginato:biocerámica (Alg:CaP) utilizada correspondió a 70:30 y se fabricaron 6 formulaciones distintas variando la razón peso/volumen de alginato + CaP respecto al agua empleada (3%, 6% y 9%) y el porcentaje de reticulación de la mezcla (1.6 % y 12.5%) (López, 2019).

3. Caracterización fisicoquímica

3.1. Estabilidad

La estabilidad de los andamios se evaluó mediante inmersión en medio de cultivo celular en condiciones estáticas a 37°C durante 28 días. Los resultados demostraron que todas las formulaciones permanecen estables, independientemente del porcentaje de reticulación alcanzado. También es interesante destacar que la presencia de la biocerámica incrementa la estabilidad de los andamios, siendo especialmente crítico en los andamios fabricados para el menor porcentaje de p/v (López, 2019).

3.2. Bioactividad

Para el estudio de la respuesta bioactiva de los andamios se utilizó el tampón fosfato DPBS (Dubelcco's phosphate buffer saline, Sigma Aldrich) enriquecido con calcio y magnesio. El procedimiento seguido corresponde al propuesto por Kokubo y colaboradores (Kokubo y Takadama, 2006). Tal y como se aprecia en la Fig. 1.1, tras 14 días de inmersión se observó la formación de estructuras típicas del crecimiento de cristales de CaP, un comportamiento que se reproduce en todas las condiciones estudiadas y que, además, se incrementa con el porcentaje

p/v empleado en la fabricación. Un aumento en la proporción p/v conlleva un aumento en la cantidad de alginato y también en la cantidad de CaP (manteniéndose la proporción entre ellos de 70:30) resultando en una mayor cantidad de puntos de nucleación que incrementan el proceso de biomineralización (López, 2019).

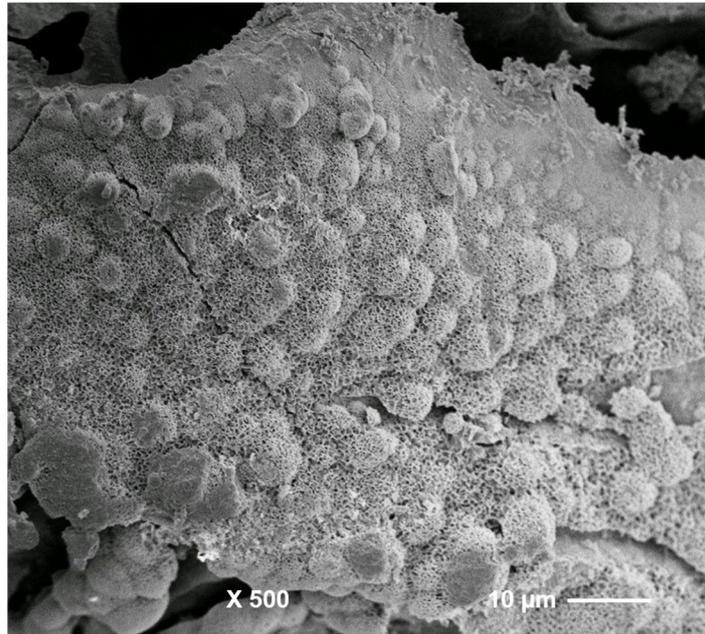


FIGURA. 1.1. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para el andamio Alg/CaP 70:30 9% p/v reticulado con CaCl_2 12.5%, tras 28 días de incubación en DPBS.

3.3. Parámetros estructurales

Los parámetros estructurales como porcentaje de porosidad, tamaño de poro, interconectividad y espesor trabecular fueron estudiados mediante microtomografía computarizada (μCT). De manera cualitativa y como se observa en la Fig. 1.2, se ha observado una distribución homogénea de los granos biocerámicos en la matriz polimérica de alginato y la porosidad del andamio disminuye a medida que aumenta la proporción p/v, mostrándose cada vez más apelmazados. No se apreciaron cambios a nivel morfológico al incrementar la reticulación del 1.6 al 12.5%. Por otro lado, se detectó una cierta tendencia al alineamiento de los poros en todas las formulaciones. Este comportamiento se encuentra descrito en la literatura, siendo una propiedad que presenta el alginato en función de los parámetros de fabricación utilizados: temperatura/tiempo de congelación y tiempo de liofilización (Zhang et al., 2017).

A partir de estas imágenes μCT se obtuvieron los valores cuantitativos de los parámetros microestructurales. En cuanto al tamaño de poro se observó una cierta tendencia a que éste disminuya a medida que aumenta la proporción p/v, situándose en torno a 100 μm para

prácticamente todas las formulaciones estudiadas, que es el establecido en la literatura como el tamaño mínimo requerido para asegurar el crecimiento celular (Karageorgiou y Kaplan, 2005). En cuanto al porcentaje total de porosidad e interconectividad, según la formulación empleada podemos encontrar valores muy variables, en el caso de la porosidad entre 70%-30% y para la interconectividad entre 90%-20%. De forma general ambos parámetros disminuyen a medida que se aumenta el porcentaje p/v y el porcentaje de reticulación. En cuanto al espesor trabecular, éste aumenta a medida que se incrementa el % p/v. Todas estas tendencias sólo se ven interrumpidas para aquellos andamios fabricados con una proporción del 9% p/v y reticulados al 12.5% CaCl₂ (López, 2019).

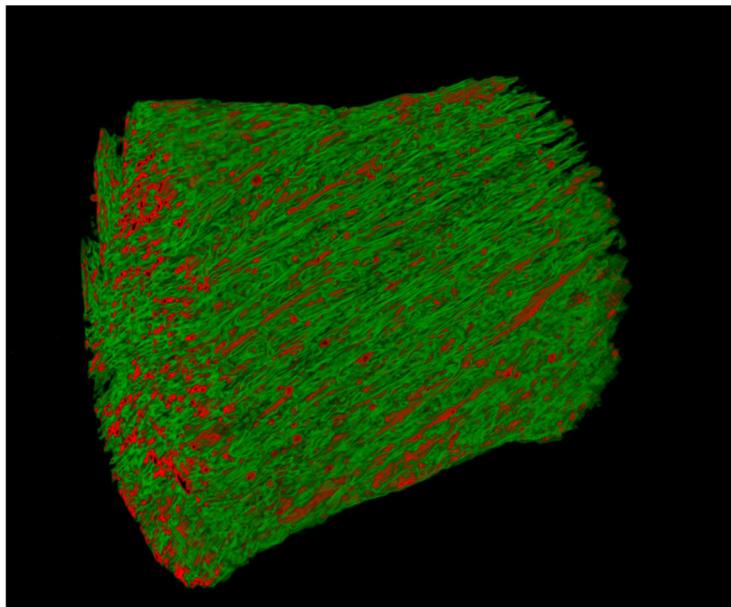


FIGURA 1.2. Imagen obtenida mediante reconstrucción 3D realizada por microtomografía computarizada del andamio Alg/CaP 6% p/v reticulado al 12.5% con CaCl₂. En verde la matriz polimérica de alginato y en rojo los granos biocerámicos.

3.4. Comportamiento mecánico

El estudio del comportamiento mecánico de los andamios se realizó en modo compresión para todas las formulaciones anteriormente comentadas y también se incluyeron como andamios de referencia los fabricados con un 100% de alginato. Tal y como se puede observar en la Fig.1.3, en general las propiedades mecánicas se ven influidas por los parámetros estudiados. Respecto al porcentaje p/v empleado, se observa que el módulo de compresión aumenta a medida que este porcentaje es mayor; siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para los andamios fabricados a un 6% y 9% p/v respecto a los del 3% p/v, independientemente del porcentaje de reticulación empleado. Estos resultados indican que al disponer de mayor cantidad de material

(alginato y CaP) damos origen a andamios con parámetros estructurales que le aportan mayor rigidez, donde un aumento del % p/v origina que el tamaño de poro y porosidad disminuyan mientras el espesor trabecular aumenta (López, 2019).

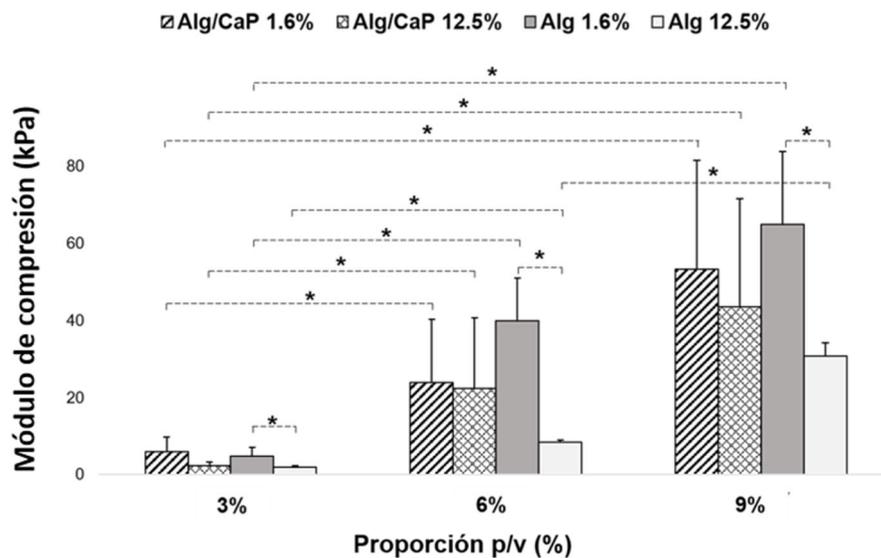


FIGURA 1.3. Ensayos mecánicos para los andamios Alg/CaP en las diferentes proporciones peso/volumen y reticulados en diferentes porcentajes con CaCl_2 . Se han incluido los resultados para andamios con un 100% de alginato. Se muestran las diferencias estadísticas para $p < 0.05$ (Test no paramétrico de Mann-Whitney).

Atendiendo a la presencia de CaP, los valores encontrados arrojan unos márgenes de error muy elevados y estadísticamente no significativos. Sólo señalar que como cabría esperar para los andamios fabricados al 6 y 9 % p/v con 12.5% CaCl_2 e incorporando CaP en la mezcla, presentan un módulo de compresión mayor que los fabricados en las mismas condiciones, pero sólo con alginato. Estos resultados están en buen acuerdo con los de otros autores (Lin et al., 2004) demostrando que el empleo de una biocerámica mejora el comportamiento mecánico de los andamios fabricados en base a alginato. Cabe destacar que este comportamiento también ha sido observado en andamios fabricados utilizando colágeno y CaP, con la diferencia que la utilización de alginato incrementa el módulo de compresión en comparación con el colágeno (Diogo et al., 2018). En cuanto a la influencia del porcentaje de reticulación empleado, los andamios fabricados a 12.5 % CaCl_2 presentan un módulo de compresión menor que los 1.6 % CaCl_2 . Aunque este comportamiento sólo es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a los andamios fabricados exclusivamente con alginato, llama la atención que la tendencia es la misma para todos los casos. Los resultados obtenidos mediante microtomografía computarizada no nos permiten aclarar este comportamiento (López, 2019).

De todas las formulaciones estudiadas destacan por su estabilidad, estructura y respuesta mecánica los andamios fabricados al 6% p/v (1.6% reticulación CaCl₂) y al 9% p/v (12.5% reticulación CaCl₂). Por esta razón son los seleccionados para realizar los ensayos *in vitro*.

3.5. Caracterización biológica

La caracterización biológica de los andamios se realizó siguiendo la norma ISO 10993 que regula la evaluación biológica de productos sanitarios, con la línea celular MG-63 evaluando, en primer lugar, la viabilidad de la monocapa de células al situar los distintos andamios sobre la misma y, posteriormente, la proliferación celular tras la siembra directa de células sobre ellos. Además de los andamios con propiedades fisicoquímicas óptimas también se han incluido en el ensayo andamios fabricados 6% p/v – 12.5% reticulación CaCl₂ y andamios puros de alginato como material de referencia.

Como se puede observar en la Fig. 1.4, los resultados obtenidos confirmaron la viabilidad celular, aumento de la densidad celular tras 7 días de incubación y con ello la ausencia de citotoxicidad producida por potencial liberación al medio de partículas/moléculas nocivas o por contacto directo con los andamios. Además se confirma que la presencia de CaP en los andamios poliméricos, sea cual sea la formulación empleada para fabricar el andamio, no afecta a la viabilidad celular (López, 2019).

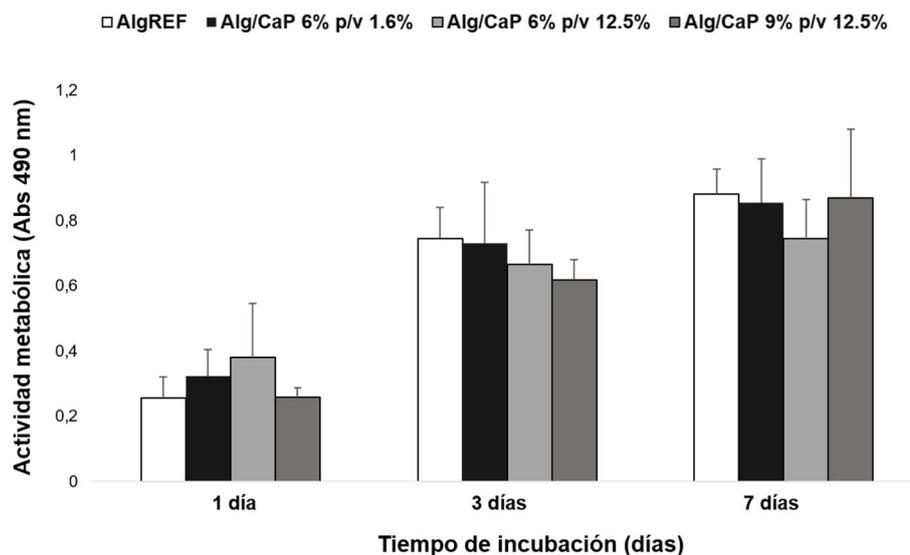


FIGURA 1.4. Viabilidad celular (ensayo MTS) de la línea MG-63 tras 1, 3 y 7 días de incubación al contacto directo en fondo de pocillo con los andamios Alg/CaP 6% p/v reticulados al 1.6% y 12.5% y 9% p/v al 12.5%. Se incorpora un andamio sin CaP (AlgREF) como control.

4. Conclusiones

Se demuestra la viabilidad para fabricar andamios porosos de origen marino basados en la combinación de alginato de sodio y biocerámica de fosfato cálcico, siendo el agente reticulante el cloruro de calcio. Estos andamios presentan una distribución homogénea del granulado biocerámico en la matriz polimérica, siendo estables tras 28 días de incubación y con propiedades bioactivas en condiciones fisiológicas. En cuanto a las propiedades estructurales y mecánicas, las formulaciones óptimas corresponden a los andamios fabricados al 6% p/v (1.6% reticulación CaCl₂) y 9% p/v (12.5% reticulación CaCl₂). Los ensayos biológicos confirmaron la ausencia de citotoxicidad de todos los andamios ensayados y la presencia de CaP parece favorecer la adhesión celular respecto a andamios fabricados únicamente con alginato.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido parcialmente financiada por los proyectos: 0245_IBEROS_1_E, “Instituto de Bioingeniería en Red para el Envejecimiento Saludable”; 0302_CVMAR_I_1_P 2017-2019- Industrial innovation through specific collaborations between companies and research centres in the field of marine biotechnology valorization; BLUEHUMAN_Interreg_Atlantic Area; “BLUE biotechnology as a road for innovation on HUMAN’s health aiming Smart growth in Atlantic Area” y REDE GALEGA DE BIOMATERIAIS (ED 431D 2017/13).

Referencias bibliográficas

Amini A.R. Laurencin C.T. Nukavarapu S.P. (2013) Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(5): 363–408.

Balboa Franco M. E. (2013) Valorización de recursos naturales en la producción de materiales cerámicos con aplicaciones biomédicas. Trabajo Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Minas de Vigo.

Diogo G.S. Senra E.L. Pirraco R.P. Canadas R.F. Fernandes E.M. Serra J. Pérez-Martín R.I. Sotelo C.G. Marques A.P. González P. Moreira-Silva J. Silva T.H. Reis R.L. (2018) Marine Collagen/Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications. *Mar Drug*, 16(8): 269.

Estrada C. (2006) Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Revista EIA*, 5: 93-100.

Karageorgiou V. Kaplan D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26: 5474–5491.

Kasper D, Fauci A, Hauser S, Dan Longo, Jameson JL, Loscalzo J. (2016) Ingeniería de tejidos. En: *Harrison Principios de Medicina interna 19e*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA.

Kokubo T. Takadama H. (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27: 2907–2915.

Life iSEAS (IIM-CSIC). Soluciones innovadoras basadas en el conocimiento para mejorar los mecanismos de valor añadido con vistas a una pesca sana y sostenible en la UE.

Lin H.R. (2004) Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*, 71 (1): 52–65.

López-Álvarez M. Pérez-Davila S. Rodríguez-Valencia C. González P. Serra J. (2016) The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts. *Biomed. Mater*, 11 (3): 1-13.

López-Álvarez M. Vigo E. Rodríguez-Valencia C. Outeiriño-Iglesias V. González P. Serra J. (2017) In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. *Clin Oral Implants Res*, 28 (9): e91–100.

López E. (2019) Andamios y biomoléculas de origen marino para regeneración tisular del sistema osteoarticular. Tesis Doctoral Universidad de Vigo, Galicia, España.

Roseti L. Parisi V. Petretta M. Cavallo C. Desando G. Bartolotti I. Grigolo B. (2017) Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C*, 78: 1246–1262.

Zhang Y. (2017) Influence of Stage Cooling Method on Pore Architecture of Biomimetic Alginate Scaffolds. *Scientific Reports*, 7 (1): 1–8.