

Capítulo 9

Desarrollo, degradación y respuesta celular de un andamio biodegradable (PLA/G5) para regeneración ósea

9.1. INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de los andamios desarrollados para aplicaciones en el campo de la Ingeniería de Tejidos está constituida por estructuras elaboradas a partir de materiales poliméricos.

Los polímeros sintéticos bioabsorbibles con capacidad de degradarse gracias a reacciones de hidrólisis en condiciones fisiológicas dentro del cuerpo, y eliminarse completamente por vías metabólicas son los materiales más atractivos para la elaboración de andamios en Ingeniería de Tejidos. Los andamios elaborados a partir de este tipo de polímeros ofrecen la posibilidad de crear tejidos completamente naturales dejando de lado los problemas de infección y formación de tejido fibroso, asociados a los implantes permanentes.

A pesar de que actualmente existen diferentes polímeros biodegradables para el desarrollo de estos andamios (ver Tabla 9.1), el PLA, el PGA y sus copolímeros, continúan siendo los más populares y de mayor uso (1-3).

Tabla 9.1**Polímeros sintéticos biodegradables, utilizados en Ingeniería de Tejidos (4)**

| Polímero | Aplicaciones |
|------------------|--|
| PLA-PGA | Hueso, Cartílago |
| Polianhídridos | Hueso, Liberación controlada de fármacos |
| Poliortoester | Liberación controlada de fármacos |
| Policaprolactona | Dispositivos biodegradables de fijación |
| Policarbonato | Hueso, dispositivos de fijación, liberación controlada de fármacos |
| Polifumarato | Hueso |

Las estructuras poliméricas porosas pueden ser obtenidas a través de numerosos métodos. Cada técnica de elaboración le confiere al andamio final características estructurales diferentes, por lo que es muy importante elegir la técnica correcta según la aplicación final del andamio. Algunas de las técnicas utilizadas hoy en día para la fabricación de andamios porosos se encuentran resumidas en la Tabla 9.2, a continuación se describen las más utilizadas.

Tabla 9.2**Técnicas de elaboración de andamos poliméricos para Ingeniería de Tejidos.**

| Técnica | Referencias |
|--|--------------------|
| Gel Casting | (5) |
| Disolución y colada con liberación de partículas | (6) |
| Laminación de membranas | (7) |
| Separación de fases | (8;9) |
| Saturación con gas | (10) |
| Espumado con alta presión y liberación de partículas | (11) |
| Liofilización | (12) |
| Unión de fibras | (13;14) |
| Impresión tridimensional | (15) |

Gel Casting Este método consiste en disolver el polímero en un solvente orgánico como la acetona. La solución polimérica es colocada en un molde hasta alcanzar consistencia de gel. Seguidamente el gel es procesado mediante diferentes concentraciones de acetona, etanol y agua para así obtener una estructura microporosa.

Disolución y colada con liberación de partículas En este método, se incorpora a la solución polimérica una proporción determinada de partículas minerales (cloruro de sodio) (16) u orgánicas (sacarosa). La mezcla es luego colada en un molde donde el solvente se evapora o puede ser procesada por “freeze-drying”. Una vez evaporado el solvente, las partículas son disueltas en agua dejando a su paso los diferentes poros.

Con esta técnica se pueden conseguir porcentajes de porosidad bastante elevados. El tamaño de los poros dependerá de las partículas utilizadas.

Laminación de membranas Es similar a la técnica conocida como “*laminated object manufacturing* (LOM)” usada en el *rapid prototyping*. Consiste en la utilización de diferentes films porosos generalmente obtenidos a partir de la técnica de disolución y colada con liberación de partículas, y colocados uno sobre otro unidos con la ayuda de la impregnación con cloroformo en la superficie, para obtener estructuras tridimensionales de forma compleja.

Separación de fases El polímero se disuelve en un solvente como el dioxano a una temperatura baja. La separación líquido-líquido y luego sólido-líquido es inducida al bajar la temperatura de la solución. Subsecuentemente se elimina el solvente solidificado por medio de la sublimación del mismo dejando así el andamio polimérico. La concentración del polímero y la estrategia de enfriamiento juegan un papel fundamental en la morfología final de los poros (8).

Saturación con gas Para esto se utilizan especímenes poliméricos sólidos previamente prensados, los cuales son expuestos a altas presiones (800 psi) de CO₂ permitiendo así la saturación del polímero con el gas. Se crea una inestabilidad termodinámica al reducir la presión del gas a niveles ambientales. Esto conlleva la nucleación y expansión del CO₂ disuelto, generando así macroporos. La mayor ventaja de este proceso es que no utiliza solventes orgánicos. La mayor desventaja es que el producto final es poco poroso en la superficie y además permanece un cierto porcentaje de porosidad cerrada en el interior del material. Para solucionar estos problemas se está utilizando esta técnica en combinación con partículas solubles en agua.

Liofilización Esta técnica es similar a la separación de fases, consiste en liofilizar soluciones congeladas del polímero con ácido acético glacial o benceno. La morfología de las esponjas depende notablemente del polímero y del solvente. Por ejemplo el benceno induce una estructura de tipo capilar, mientras que el ácido acético produce una estructura de tipo librillo.

Unión de fibras Consiste en la elaboración de redes interconectadas mediante la unión de fibras (13;14). Para esto se utilizan dos polímeros diferentes como el PLA y el PGA. Las fibras del PGA son alineadas con la forma final de la estructura deseada, y son embebidas en una solución de PLA/cloruro de metileno. Después de la evaporación del solvente, los polímeros son calentados por encima de su temperatura de fusión. Finalmente el PLA es disuelto en cloruro de metileno, dejando las fibras de PGA unidas de forma tal que forman una estructura porosa. Esto se puede conseguir ya que el PGA es insoluble en el cloruro de metileno. Dada la especificidad del solvente, del par de polímeros y de sus temperaturas de fusión, ésta técnica es de difícil aplicación con otros polímeros.

En general, casi todas estas técnicas pueden ser utilizadas no sólo para elaborar esponjas poliméricas, sino también para generar materiales compuestos porosos. Para esto, se añaden las partículas o fibras de la fase de refuerzo (fosfato de calcio) en la fase inicial de la elaboración de las estructuras. En la actualidad existen numerosos compuestos

para la regeneración ósea y reparación del tejido óseo que se encuentran en período de desarrollo. Estos materiales incluyen la utilización tanto de polímeros naturales como sintéticos, así como diferentes cerámicas y biovidrios.

Existen tres razones principalmente por las que la adición de una fase inorgánica en una matriz polimérica resulta interesante en un substrato para Ingeniería de Tejidos. En primer lugar, la incorporación de esta segunda fase modifica el comportamiento mecánico del material, así como la integridad estructural del andamio. En segundo lugar, la bioactividad del polímero aumenta debido a la incorporación de una fase bioactiva. En tercer lugar, la introducción de la fase inorgánica podría modificar de forma positiva el patrón de degradación del polímero. En la Tabla 9.3 se encuentran tabulados algunos de los compuestos para Ingeniería de Tejidos elaborados hasta este momento. Se puede observar que la mayoría de estos compuestos contienen TCP, HA o vidrio de silicio bioactivo como fase de refuerzo o bioactiva; sin embargo, en ninguno se utilizan vidrios de fosfato de calcio.

Tabla 9.3
Algunos de los materiales compuestos para Ingeniería de Tejidos, desarrollados hasta el momento.

| Matriz polimérica | Fase de refuerzo | Referencia |
|--------------------------|--|-------------------|
| PCL | HA | (17) |
| PLLA | HA | (18-20) |
| PLA | Bioglass | (21) |
| Quitosano | TCP, vidrio de fosfato de calcio | (22) |
| PGA | Apatita carbonatada | (23) |
| PLLA | TCP | (24) |
| PDLA | Bioglass | (25;26) |
| PLLA | Nano HA | (27) |
| Colágeno/PLLA | Nano HA | (28) |
| PLA/PGA | Nitrato de calcio tetrahidratado+amoniohidrógeno fosfato | (29) |

El estudio presentado en este capítulo es un primer acercamiento al desarrollo de este tipo de andamios porosos compuesto por PLA y una fase inorgánica formada por partículas de un vidrio de fosfato de calcio.

Objetivo

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de un nuevo andamio poroso formado por PLA y partículas del vidrio soluble G5, así como el estudio del efecto de la

incorporación de las partículas de vidrio en el comportamiento mecánico del andamio y en la degradación y la biocompatibilidad *in vitro* del mismo.

Dada la biodegradabilidad de los materiales estudiados, los ensayos de biocompatibilidad se llevaron a cabo tanto en contacto directo como con los extractos de los materiales, de forma similar a capítulos anteriores.

9.2 MATERIALES Y MÉTODOS

9.2.1. Materiales

En este capítulo se ha utilizado el ácido poliláctico (PLA) descrito en el capítulo 5 y partículas (< 80µm) del vidrio G5.

9.2.2. Métodos

9.2.2.1. Preparación de las esponjas de PLA y de compuesto

La preparación de los andamios de PLA y de PLA/G5 se hizo mediante la técnica de disolución y colada con liberación de partículas antes descrita. Se disolvió una cantidad determinada de PLA granulado en cloroformo (Panreac cod.141252.1714), de forma tal de obtener una solución al 5% peso / volumen. La solución fue agitada en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 2 días de forma similar a la preparación de la solución polimérica para la elaboración de los compuestos no porosos. Una vez disuelto el polímero en el solvente orgánico, se procedió a preparar dispersiones con 0% y 40% en peso de partículas de vidrio. En el caso del compuesto, las partículas fueron mezcladas en la solución hasta obtener una mezcla homogénea.

Para la fabricación de las esponjas, se incorporaron partículas de NaCl (250-500 µm) previamente tamizadas, en una proporción del 94% peso / peso. Una vez obtenida una mezcla homogénea con las partículas de sal y vidrio dispersas en la solución, la mezcla fue vertida sobre una bandeja recubierta con una lámina de teflón para evitar la adhesión del producto final a la bandeja. Las bandejas o moldes fueron colocadas bajo una campana de extracción durante al menos 48 horas para permitir la evaporación del solvente. Finalmente, se obtuvieron placas de compuesto con sal y de PLA con sal a partir de las cuales se cortaron discos o cilindros de 20 mm de diámetro y 13 ó 3 mm de espesor, según la aplicación (13 mm para ensayos mecánicos y de degradación y 3 mm para citocompatibilidad), con la ayuda de un sacabocados. Los cilindros de PLA-sal y PLA/G5-sal fueron colocados en un recipiente con agua destilada para eliminar la sal y dar paso a la estructura porosa. El recipiente con agua y las muestras se mantuvo bajo agitación para facilitar la liberación de la sal desde el interior de las muestras. Las esponjas se mantuvieron inmersas en agua durante dos días aproximadamente y el agua fue cambiada 4 veces al día para evitar la saturación de la misma.

Después del período de inmersión en agua, las muestras fueron sacadas del recipiente y colocadas primero en papel absorbente para drenar el exceso de líquido y luego se colocaron en una estufa a 37°C durante 24 horas para eliminar los restos de humedad. Una vez secas, las muestras fueron colocadas en un desecador hasta el momento de usarlas.

9.2.2.2 Caracterización de las esponjas

9.2.2.2.1. Porosidad

La porosidad de las esponjas de PLA y de PLA/G5 fue cuantificada utilizando picnometría de mercurio. Para esto, se sumergieron con la ayuda de un dispositivo metálico, una a una las esponjas de PLA y de PLA/G5 en un recipiente con mercurio colocado sobre una balanza. Conociendo la densidad del mercurio ($\rho_{\text{Hg}}=13.57 \text{ g/cm}^3$) y la masa indicada por la balanza, se calcula el volumen de mercurio (Vol_{Hg}). El volumen desplazado por el mercurio es equivalente al volumen de la muestra en cuestión. Por lo que, conociendo el Vol_{Hg} y la masa inicial de la misma (M_{muestra}), se puede calcular la densidad aparente (ρ_a) a partir de la siguiente ecuación:

$$r_a = \frac{M_{\text{muestra}}}{\text{Vol}_{\text{Hg}}} \quad [9.1]$$

Usando tanto la densidad aparente como las densidades del PLA y del compuesto no porosos (densidades medidas por picnometría, capítulo 5), se calculó el porcentaje de porosidad según la siguiente ecuación (30):

$$\%P = \left(1 - \frac{r_a}{r}\right) * 100 \quad [9.2]$$

donde P es el porcentaje de porosidad, ρ_a es la densidad aparente y ρ es la densidad de los materiales no porosos. Se realizaron cinco mediciones por cada tipo de material.

9.2.2.2.2. Propiedades Mecánicas

Las estructuras tridimensionales fueron ensayadas mecánicamente a través de ensayos de compresión. Para esto se utilizó una máquina universal de ensayos electromecánica (MTS-ADAMEL) equipada con una célula de carga de 100 N. Se utilizaron cilindros porosos de PLA y PLA/G5 de 20 mm de diámetro y 13 mm de altura. Los ensayos fueron realizados a una velocidad de 2 mm/min. La carga fue aplicada hasta que las esponjas estuvieron comprimidas en un 50% del espesor inicial. El módulo de compresión fue definido como el módulo lineal inicial calculado a partir de la zona elástica lineal (31). Se ensayaron 5 muestras de cada material.

9.2.2.3. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica se usó para verificar la eliminación de las partículas de sal y también para observar la morfología final de las muestras, así como la distribución e intercarra de las partículas de vidrio dispersas en la matriz polimérica. Para esto, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido durante 12 horas aproximadamente para así poder fracturarlas fácilmente y observar la superficie de fractura, la cual fue cubierta con oro previamente para su observación en el microscopio. Al igual que en los otros estudios, se utilizó un microscopio modelo *Jeol JSM-6400*.

9.2.2.3 Degradación *in vitro*

El ensayo de degradación se llevó a cabo por un período de 12 semanas y se realizó según el protocolo descrito en la sección 3.2.2.1 del capítulo 3, correspondiente a la degradación de los vidrios de fosfato. Una vez más se utilizó como medio de inmersión el fluido fisiológico simulado (SBF) a 37°C. Debido a la complejidad de la geometría de las muestras, la relación utilizada fue en términos de masa / volumen y no de superficie / volumen. La relación utilizada en este estudio fue de 1g/1000ml de fluido (32).

9.2.2.3.1. Estudio de la pérdida de peso durante la degradación

La pérdida de peso fue evaluada con mediciones semanales del peso de cada muestra utilizando la ecuación [2.6]. Se utilizaron 3 muestras de cada tipo de material (PLA y PLA/G5) de 20 mm de diámetro y 3 mm de espesor aproximadamente. Cada semana las muestras fueron sacadas del SBF, lavadas con agua destilada y colocadas sobre un papel absorbente para eliminar el exceso de humedad. Luego fueron colocadas en la estufa a 37°C hasta la estabilización de su peso.

Al igual que en el capítulo 6, se verificó la cantidad de agua presente en el material compuesto después del protocolo de secado mediante un ensayo de calcinación del compuesto PLA50, y se recalcularon los valores de pérdida de peso teniendo en cuenta los valores obtenidos a partir del ensayo de cenizas.

9.2.2.3.2. Determinación del porcentaje de fase inorgánica del material compuesto durante la degradación

Con la finalidad de analizar la evolución de la fase inorgánica del andamio poroso de PLA/G5 a lo largo del período de degradación, se llevó a cabo el ensayo de cenizas descrito en la sección 6.2.2.3. El estudio se hizo por triplicado para cada tiempo, es decir, tres muestras del material fueron ensayadas después de 0, 2, 4, 6 y 12 semanas.

9.2.2.3.3. Estudio de las transiciones térmicas y cristalinidad

Las propiedades térmicas de las esponjas de PLA y PLA/G5 fueron evaluadas tanto al inicio del estudio de degradación como después de 2, 4, 6, 8, 10 y 12 semanas de inmersión en el fluido a 37°C. El análisis se hizo por triplicado para cada tiempo y para cada material siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2.2.3.4 del capítulo 5. Las diferentes temperaturas de transición vítrea (T_g), de fusión (T_m) y de cristalización (T_c), además del porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$) de los dos materiales fueron determinadas durante la degradación del material. El porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$) fue calculado siguiendo el procedimiento descrito también en el capítulo 5.

9.2.2.3.4. Variaciones del peso molecular

La evolución del peso molecular del PLA conformado en forma de esponja, fue estudiado a lo largo del período de degradación. En este caso el estudio se hizo por duplicado para cada intervalo de tiempo de degradación estudiado. La medición del peso molecular a cada tiempo fue realizada siguiendo las condiciones descritas en el apartado 5.2.2.3.3

9.2.2.3.5. Microscopía electrónica de barrido

La evolución de los cambios en la morfología de las esponjas de PLA y PLA/G5 acontecidos durante el período de degradación *in vitro*, fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido, de forma similar a la descrita en el apartado c de la sección 9.2.2.2. Los andamios poliméricos fueron observados después de 4, 8 y 12 semanas.

9.2.2.4 Cultivos Celulares

Para realizar los diferentes ensayos se utilizaron células provenientes de la línea celular humana SAOS-2, al igual que en el capítulo anterior. Tanto para el cultivo como para el subcultivo de las células, se siguió el protocolo y las condiciones descritas en el capítulo 8, sección 8.2.5. Debido a que los materiales estudiados son degradables, se llevó a cabo el estudio tanto en contacto directo con los materiales como con sus extractos. Para la elaboración de los extractos de PLA y PLA/G5 porosos se siguió el procedimiento descrito en la sección 8.2.6 del capítulo 8.

9.2.2.5 Citotoxicidad y Proliferación

Tanto el ensayo de citotoxicidad como el de proliferación sobre los dos tipos de esponjas se llevó a cabo mediante el ensayo MTT (Sigma), el cual ya ha sido descrito en el capítulo 7, sección 7.2.2.4. Antes de realizar el cultivo celular, los andamios fueron esterilizados con óxido de etileno y sumergidos en medio de cultivo durante 12 horas

aproximadamente, a 37°C. En el caso del cultivo en contacto directo con los materiales, los diferentes discos (20 mm diámetro, 3 mm altura) de PLA y PLA/G5 porosos fueron colocados en placas de 24 pozos. En primer lugar, se depositaron 100µl de medio con 7.10^4 células en suspensión sobre cada uno de los discos a ensayar, se incubó por 30 min a 37°C, y posteriormente se añadieron 500µl de medio de cultivo en cada pocillo. Los pozos de la placa de cultivo de poliestireno fueron utilizados como control. En el caso de los cultivos hechos con los extractos de los materiales, se utilizó la misma concentración de células (7.10^4 células/pozo) y se añadieron 500µl de medio de cultivo en cada pozo. Después de 4 horas de incubación, se cambió el medio de cultivo por los extractos de los materiales (500µl/ pozo). En este caso, se utilizó como control el medio de cultivo.

Después de 24 horas, 3 y 6 días de cultivo, 1ml de solución de MTT (10% en medio de cultivo sin rojo fenol) fue añadido a cada pocillo con el fin de medir la actividad mitocondrial de las células. Después de 3 horas de contacto con el MTT, se añadieron 500 µl de solubilizante (0.1 N HCl en isopropanol) para disolver los cristales de formazán. Seguidamente, la absorbancia fue medida en un espectofotómetro modelo HP8453 a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados como el promedio de los valores de absorbancia de tres réplicas. La determinación de la significación estadística ($p < 0,05$) de las diferencias en los valores de absorbancia, se realizó mediante el método de Tukey, que es un método de comparación múltiple.

9.3. RESULTADOS

9.3.1. Porosidad

Según el método utilizado para la determinación de la porosidad de las diferentes estructuras poliméricas, el material formado por PLA presentó una porosidad de 92% mientras que el material compuesto (PLA/G5), alcanzó un 95.1% de porosidad.

9.3.2. Propiedades Mecánicas

El módulo de compresión fue medido para las estructuras de PLA y PLA/G5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.4. Se observa en dicha tabla, que el módulo sufrió un incremento significativo con la introducción de las partículas de vidrio en la matriz de PLA. De hecho, el módulo a compresión se incrementó en un 61% para el material compuesto poroso en relación con la esponja de PLA solo.

La Figura 9.1 muestra las curvas tensión-deformación para las esponjas de PLA y PLA/G5 al ser ensayadas a compresión.

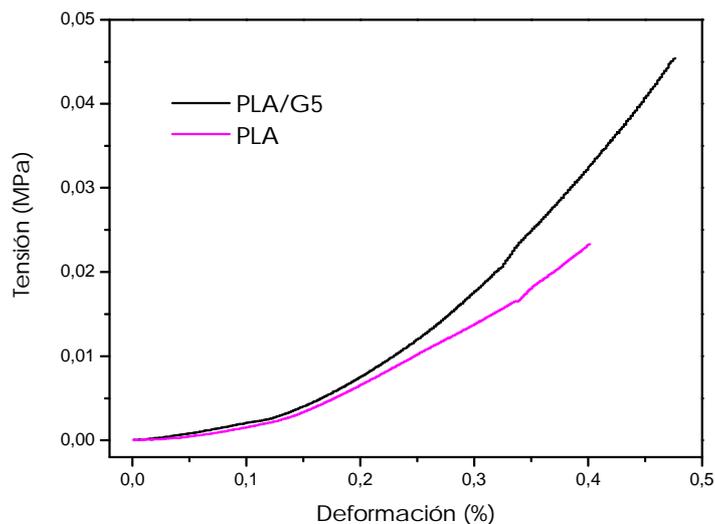


Figura 9.1. Curvas tensión-deformación para las esponjas de PLA y PLA/G5

La tabla 9.4 muestra los valores obtenidos para el módulo elástico y el límite elástico de los materiales estudiados.

Tabla 9.4.
Porcentaje de porosidad y módulo elástico (E) a compresión de los andamios estudiados. (Media \pm Desviación Estándar, n=5).

| Material | % Porosidad | E (KPa) |
|----------|-----------------|-----------------|
| PLA | 92 \pm 2.25 | 74.5 \pm 0.15 |
| PLA/G5 | 95.1 \pm 1.51 | 120 \pm 0.03 |

9.3.3. Microscopía electrónica

En las Figuras 9.2a,b se muestran las superficies de fractura de las estructuras tridimensionales con y sin vidrio, las cuales son muy similares. Se observan estructuras muy porosas e interconectadas en ambos casos. Las Figuras 9.3a y b, muestran la estructura polimérica con más detalle. Se observó en forma general, que las paredes de los poros son muy delgadas, y el vidrio en el caso del material compuesto está bien distribuido a lo largo de todo el andamio. Otro punto importante es la adhesión de las partículas a la matriz polimérica. En las Figuras 9.4a y b se observan algunas partículas envueltas por una fina película de polímero, por lo que parece existir una buena adhesión entre ambas fases. Por último podemos observar la formación de microporos en las paredes poliméricas debidos quizás al proceso de evaporación del solvente.

La observación con microscopía electrónica también permitió corroborar la correcta eliminación de las partículas de sal utilizadas para generar los poros.

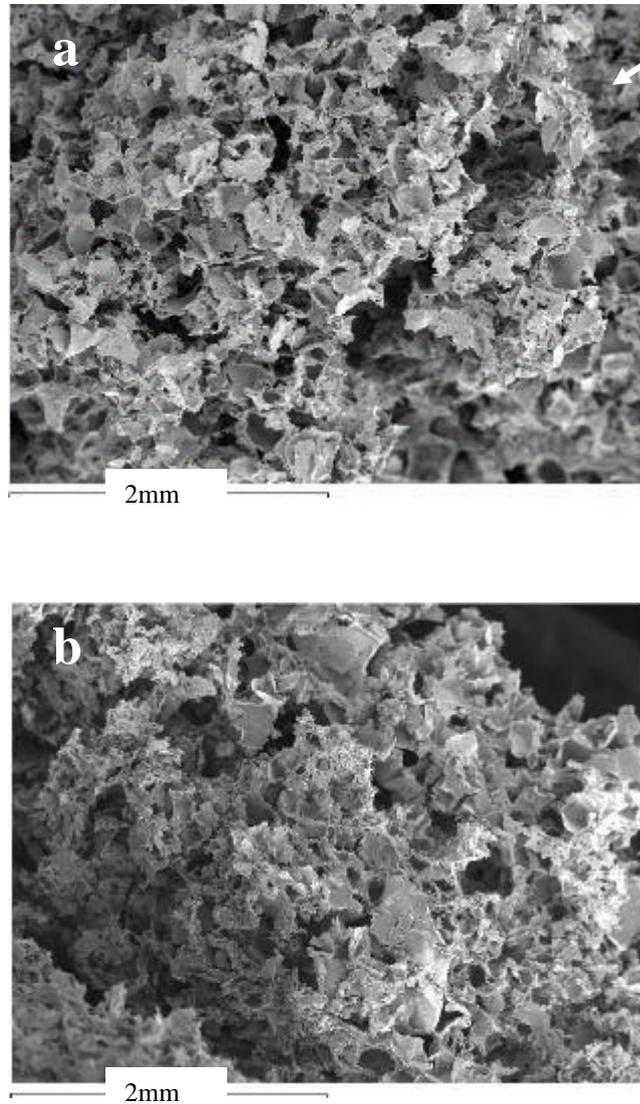


Figura 9. 2. Superficie de fractura de las estructuras poliméricas porosas, a) andamio de PLA y b) andamio de PLA/G5 (las flechas muestran algunas de las partículas de G5).

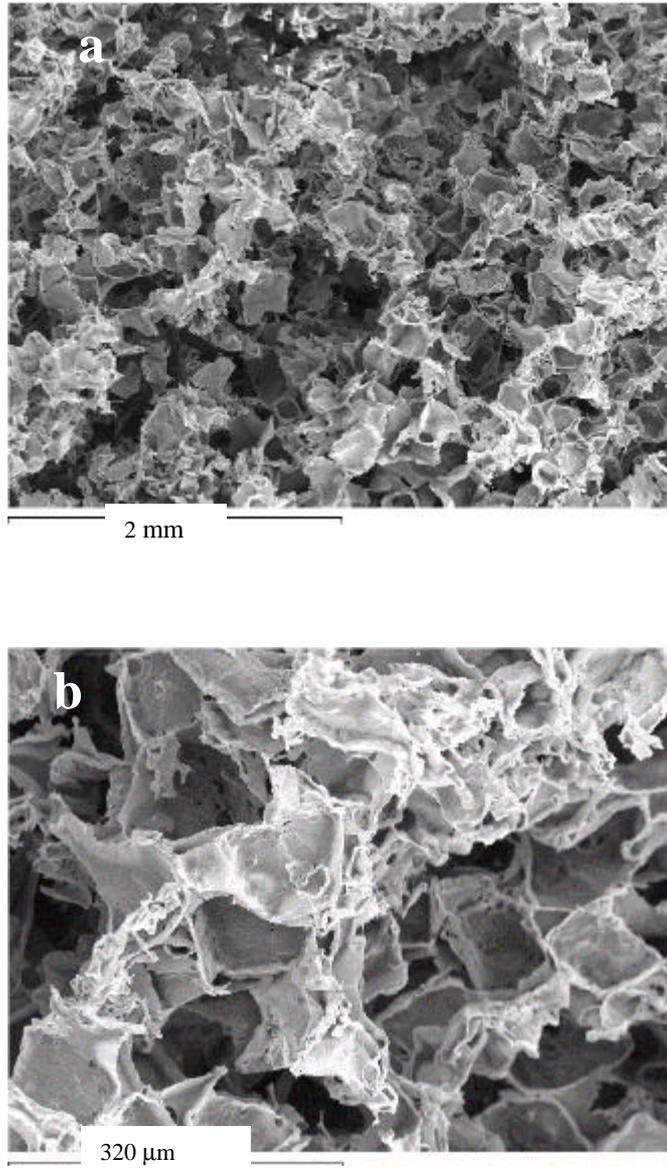


Figura 9. 3. Superficie de fractura de las esponjas poliméricas porosas de PLA

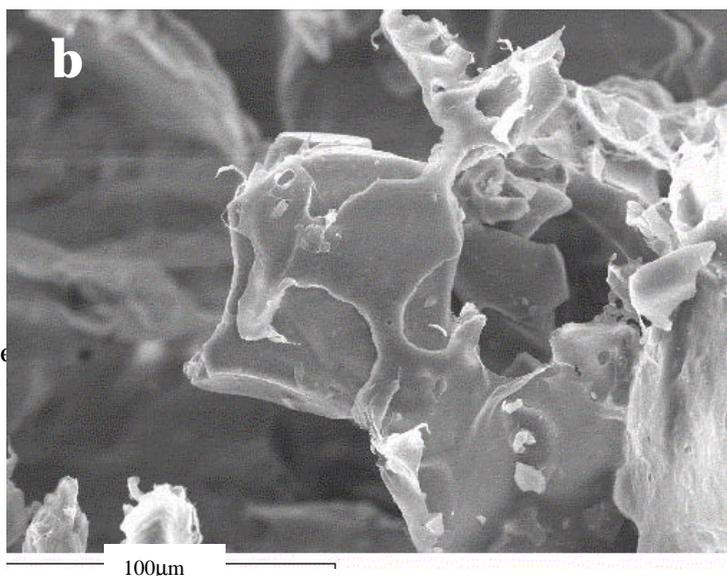
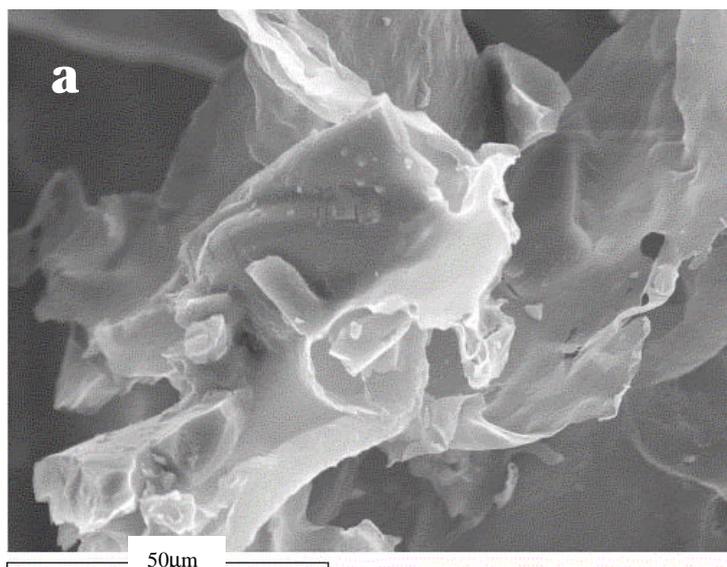


Figura 9. 4. Superficie de un andamio de PLA/G5 antes de ser utilizado, mostrando la estructura porosa y las fibras entrelazadas.

9.3.4. Evolución de la pérdida de peso durante la degradación

En la Figura 9.5 se encuentran las gráficas del porcentaje de pérdida de peso en función del tiempo para los andamios de PLA y de PLA/G5. En ambos casos se observa una tendencia creciente a lo largo de las 12 semanas estudiadas. No obstante, las esponjas de compuesto experimentaron una pérdida de peso más rápida que el polímero sólo.

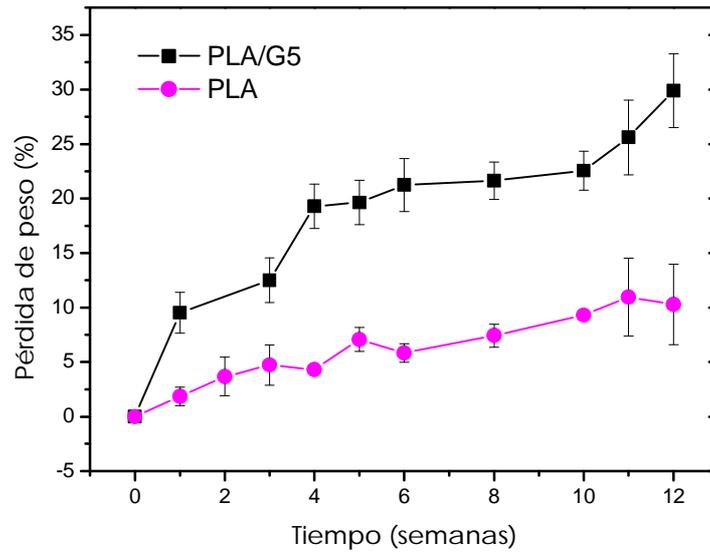


Figura 9. 5. Porcentaje de pérdida de peso en función del tiempo de degradación para los andamios de PLA y PLA/G5

9.3.5. Evolución del porcentaje de fase inorgánica

Los ensayos de cenizas realizados con el fin de evaluar los cambios en el porcentaje de vidrio revelaron una pérdida progresiva de la fase inorgánica a través del tiempo (ver Figura 9.6). Después de 12 semanas, el material compuesto sufrió una pérdida del 27% en peso con respecto al porcentaje inicial del vidrio.

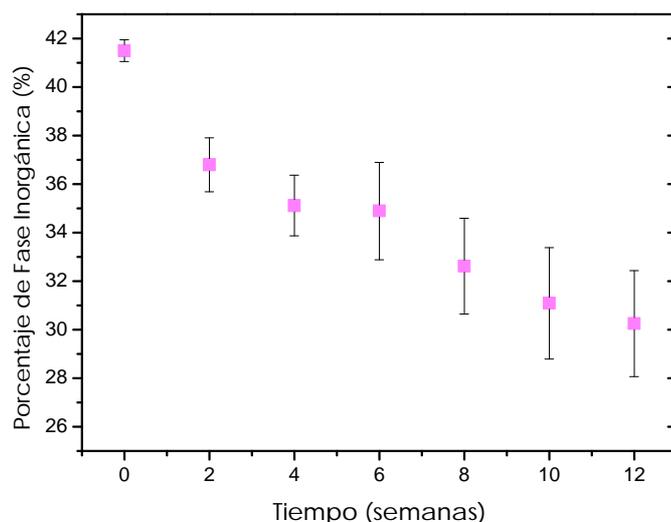


Figura 9. 6. Evolución del porcentaje de fase inorgánica presente en el compuesto PLA/G5 a lo largo del período de degradación.

9.3.6. Evolución del peso molecular (M_w)

Los valores del M_w correspondientes a los andamios de PLA de los mismos, se encuentran tabulados en la Tabla 9.5. Se observa un incremento continuo del porcentaje de pérdida de M_w con el tiempo, hasta llegar a perder un 80.75% después de 12 semanas de degradación.

Tabla 9.5

Peso molecular (M_w) y porcentaje de pérdida de M_w para el andamio de PLA después de diferentes semanas de degradación (Media \pm Desviación Estándar, $n=2$)

| Tiempo(semanas) | M_w ($\times 10^5$) | Porcentaje pérdida M_w (%) |
|-----------------|-------------------------|------------------------------|
| 0 | 3.12 ± 0.91 | |
| 4 | 2.23 ± 0.78 | 28.71 ± 2.49 |
| 6 | 1.94 ± 0.85 | 37.90 ± 5.84 |
| 16 | 0.6 ± 1.03 | 80.75 ± 0.89 |

9.3.7. Evolución de las propiedades térmicas

En la Tabla 9.6 se encuentran los valores obtenidos a partir de los ensayos de DSC para los dos materiales estudiados (PLA y PLA/G5) durante las 12 semanas de degradación. Los valores correspondientes a la temperatura de transición vítrea (T_g), disminuyeron gradualmente durante todo el período de degradación para los dos materiales. La temperatura de fusión (T_m) experimentó un aumento progresivo durante

el estudio *in vitro*. No se observaron diferencias significativas entre los valores de dichas temperaturas (T_g y T_m) para los dos materiales estudiados, es decir, que la incorporación de las partículas de vidrio no afectó en este aspecto. En ninguno de los casos se observó en la curva del primer calentamiento, el pico correspondiente a la cristalización. Los porcentajes de cristalinidad fueron calculados a partir de los valores corregidos de las entalpías de fusión (ΔH_{mcorr}) siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.3.4. El andamio de PLA no mostró variaciones significativas en la cristalinidad mientras que el PLA/G5 experimentó un aumento gradual aunque leve en el porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$) durante las 12 semanas de duración del estudio.

Tabla 9.6
Evolución de las propiedades térmicas de los andamios de PLA y PLA/G5 a después de diferentes semanas de degradación. (Media \pm Desviación Estándar, n=3)

| Material | T_g (°C) | T_m (°C) | DH_m (J/g) | DH_{mcorr} (J/g) | X_c (%) |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| PLA | | | | | |
| 0 semanas | 58.37 \pm 0.20 | 156.84 \pm 0.52 | -31.32 \pm 0.89 | -- | 33.64 \pm 0.96 |
| 2 semanas | 58.16 \pm 0.14 | 160.22 \pm 0.78 | -30.65 \pm 1.02 | -- | 32.92 \pm 1.11 |
| 4 semanas | 57.43 \pm 0.62 | 163.45 \pm 1.02 | -30.73 \pm 1.21 | -- | 33.01 \pm 1.28 |
| 6 semanas | 56.52 \pm 0.98 | 163.58 \pm 0.99 | -31.55 \pm 1,08 | -- | 33.89 \pm 1.15 |
| 8 semanas | 56.28 \pm 0.91 | 164.06 \pm 0.58 | -31.15 \pm 0.98 | -- | 33.46 \pm 1.08 |
| 10 semanas | 55.69 \pm 1.21 | 164.33 \pm 0.38 | -31.68 \pm 1.01 | -- | 34.03 \pm 1.09 |
| 12 semanas | 54.03 \pm 1.52 | 164.43 \pm 0.63 | -31.64 \pm 1.13 | -- | 33.99 \pm 1.19 |
| PLA/G5 | | | | | |
| 0 semanas | 57.26 \pm 0.31 | 159.51 \pm 0.45 | -18,11 \pm 0.67 | -30.93 \pm 1.42 | 33.22 \pm 1.33 |
| 2 semanas | 57.25 \pm 0.24 | 161.09 \pm 0.72 | -19,48 \pm 0.98 | -30.86 \pm 3.29 | 33.15 \pm 3.02 |
| 4 semanas | 56.16 \pm 1.82 | 161.95 \pm 0.84 | -20,61 \pm 1.02 | -31.74 \pm 3.75 | 34.09 \pm 2.88 |
| 6 semanas | 56.66 \pm 1.01 | 163.72 \pm 1.10 | -20,42 \pm 0.99 | -31.36 \pm 5.58 | 33.68 \pm 5.62 |
| 8 semanas | 56.48 \pm 0.88 | 163.89 \pm 0.99 | -20,93 \pm 1.08 | -31.02 \pm 6.11 | 33.32 \pm 6.11 |
| 10 semanas | 55.99 \pm 1.36 | 161.63 \pm 0.75 | -21,75 \pm 1.11 | -31.57 \pm 8.05 | 33.91 \pm 6.21 |
| 12 semanas | 55.12 \pm 1.62 | 164.70 \pm 1.04 | -22,17 \pm 1.23 | -31.85 \pm 8.43 | 34.21 \pm 7.56 |

9.3.8. Microscopia electrónica

Las Figuras 9.7-9.9 muestran la evolución de la morfología de la estructura polimérica porosa a través del período de degradación. Sólo se presentan imágenes del material compuesto, ya que las esponjas de PLA, presentaron un comportamiento muy similar. En las Figuras 9.7 a-d se muestra la superficie de fractura de las esponjas de material compuesto después de 4 semanas de degradación. Se observan pocos cambios con respecto al andamio inicial, y las partículas de vidrio presentan ya algunos signos de

erosión (ver Figura 9.7c). Algunas de las partículas de vidrio se encuentran bien envueltas por el polímero, mientras que otras parecieran estar tan solo apoyadas en el andamio. Después de 8 semanas de degradación (ver Figuras 9.8 a-d), se observó de forma general, una mayor degradación del PLA. Se conservó la estructura porosa inicial, pero las paredes de los poros presentaron algunos agujeros sobretodo en los bordes de las paredes. Al igual que antes, se observaron tanto partículas bien adheridas como desadheridas (Figuras 9.8 c-d). Después de 12 semanas de inmersión en SBF, se vio un mayor nivel de degradación de la matriz polimérica. Se observaron signos de degradación como la formación de numerosos agujeros, formados tanto en la parte interna como en los bordes de los poros, algunos de ellos de gran tamaño. Además las paredes de PLA parecieron volverse más delgadas con el tiempo de degradación.

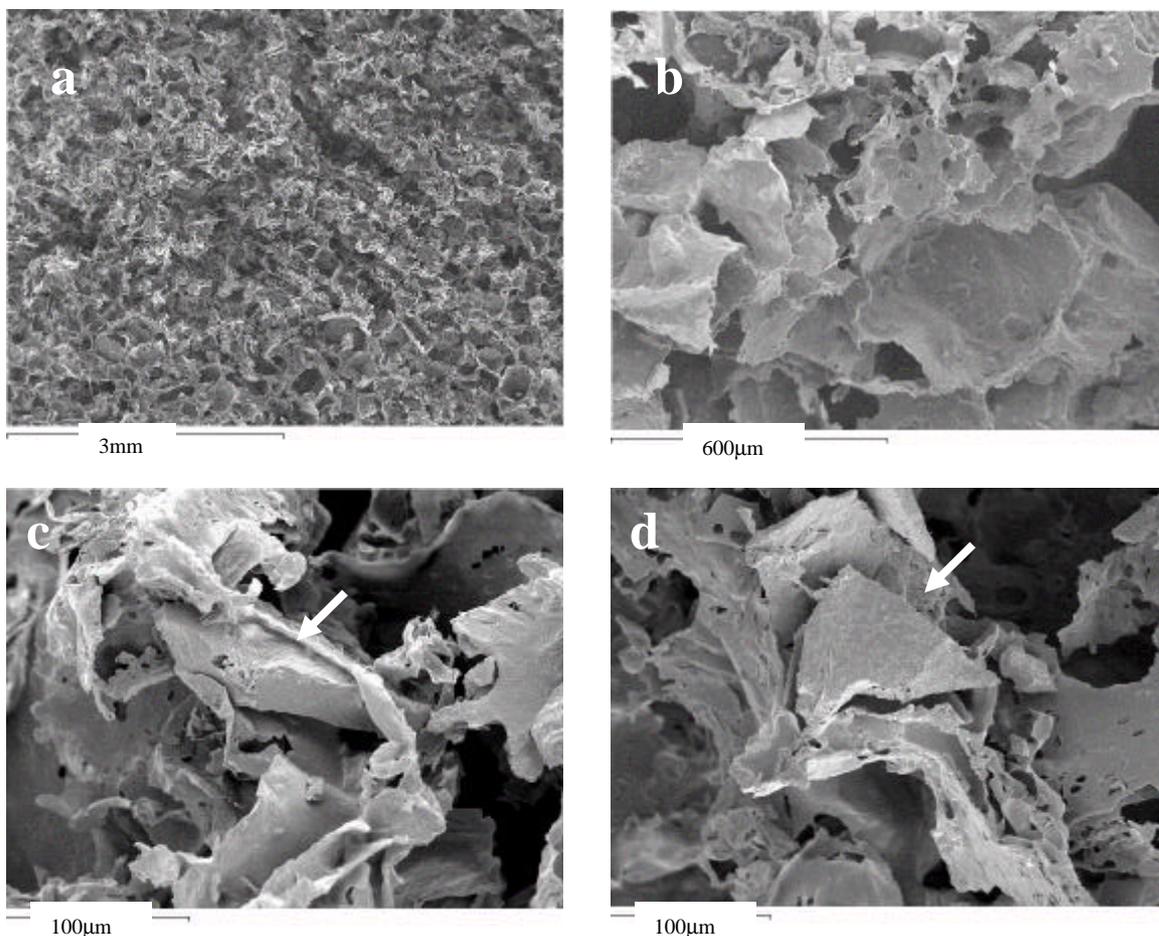


Figura 9.7. a) Superficie de fractura del material compuesto después de 4 semanas de degradación, b) detalle de la superficie, c) partícula envuelta en la matriz de PLA (ver flecha), d) partícula dentro de la estructura polimérica (ver flecha).

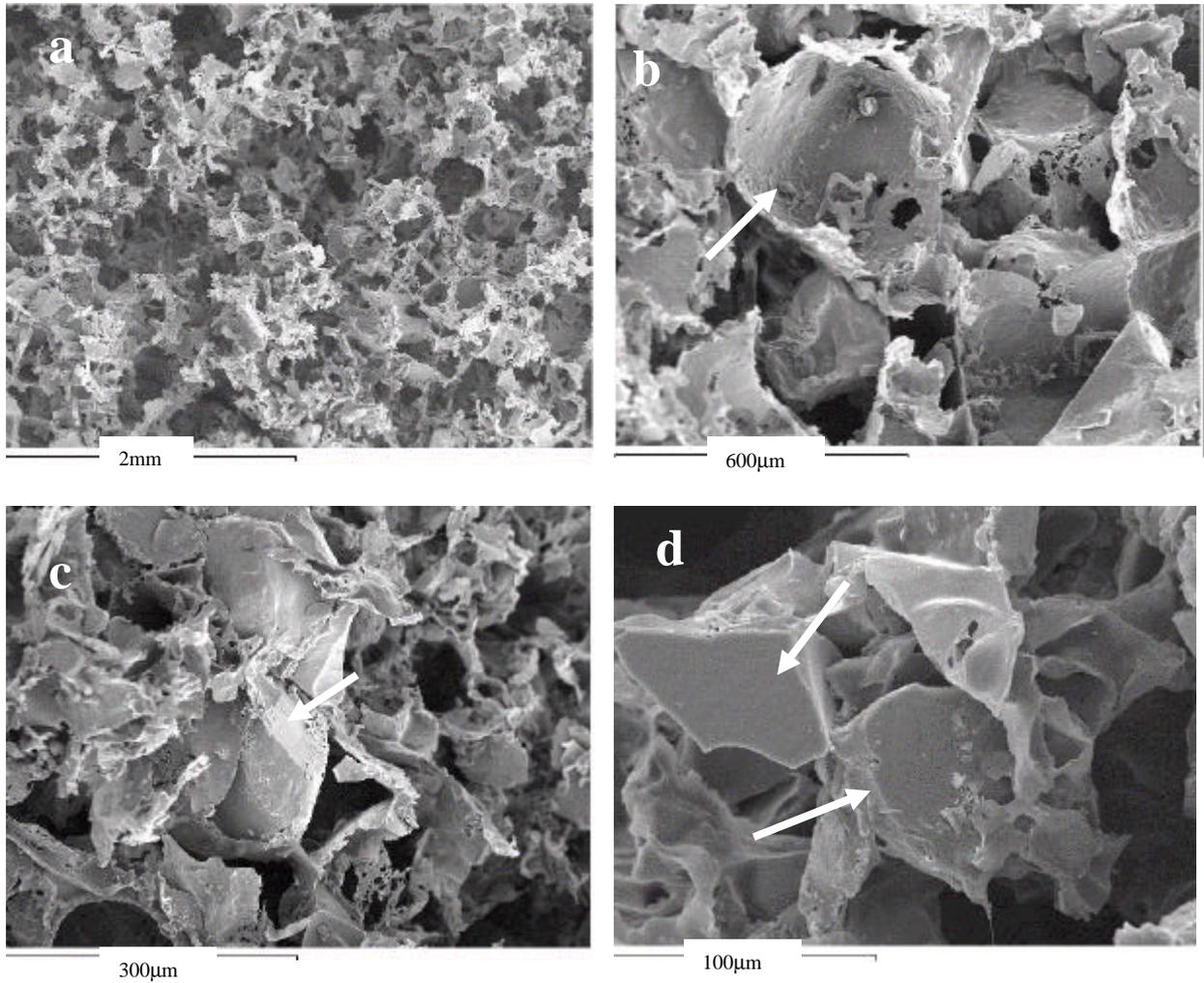


Figura 9.8. a) Superficie de fractura del material compuesto después de 8 semanas de degradación, b) detalle de la superficie, c) partículas envuelta en la matriz de PLA, d) partículas dentro de la estructura polimérica. Las flechas blancas indican los poros (b) y las partículas de vidrio (c, d).

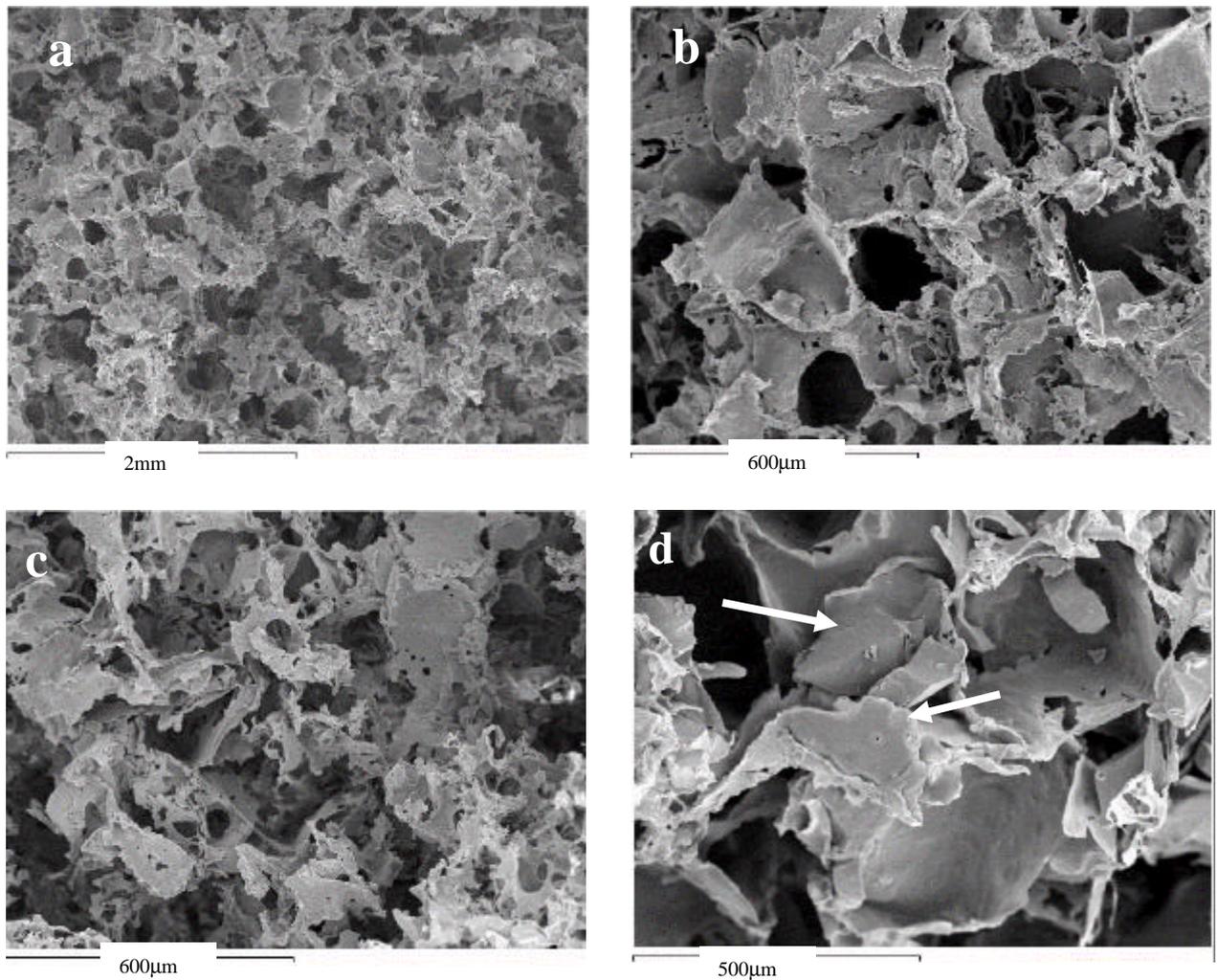


Figura 9.9. a) Superficie de fractura del material compuesto después de 12 semanas de degradación, b,c) detalle de la superficie, d) partículas dentro de la estructura polimérica (ver flechas).

9.3.9. Evaluación de la citotoxicidad y proliferación

a) Ensayos en contacto directo con los materiales

Los resultados obtenidos a partir del ensayo realizado con el MTT en contacto directo con los materiales se encuentran graficados en la Figura 9.10 Según los valores de absorbancia resultantes, tanto las esponjas de PLA como las esponjas de PLA/G5 presentaron una respuesta no-citotóxica.

A pesar de que después de 24 horas de cultivo la respuesta celular fue mejor para el control que para los materiales estudiados, se observó que después de 3 días los andamios de compuesto y después de 6 días los andamios de PLA y de compuesto

presentaron valores de absorbancia significativamente mayores que el control. Además el compuesto formado por la combinación de PLA y G5 presentó valores de absorbancia estadísticamente mayores ($p < 0.05$) que los valores obtenidos para las esponjas de PLA.

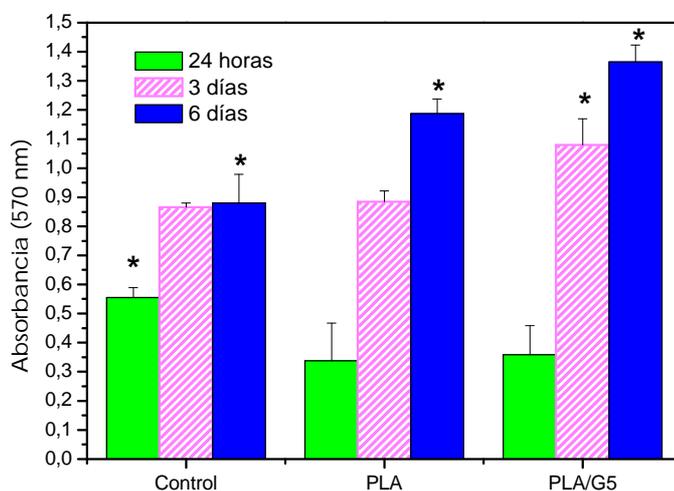


Figura 9.10. Resultados del análisis MTT realizado con las células MG63 en contacto directo con los andamios de PLA y PLA/G5 después de 24 h, 3 y 6 días de cultivo. Los asteriscos (*) indican los resultados con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para cada tiempo de cultivo ($n=3$).

b) Ensayos con los extractos de los materiales

En cuanto a los cultivos realizados con los extractos de los materiales estudiados, las Figuras 9.11 a y b muestran los resultados obtenidos después de 24 horas y 3 días de cultivo. Después de 24 horas de cultivo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el número de células viables cultivadas en los diferentes extractos o entre los extractos y el medio control. Sin embargo, después de 3 días de cultivo, sí hubo diferencias con respecto al medio control y entre los diferentes extractos. Se observó un descenso general en el número de células al utilizar los extractos de PLA y PLA/G5. No obstante, los extractos de PLA/G5 24 h y PLA 12 h no mostraron diferencias estadísticamente significativas en relación al medio control. Los valores de absorbancia de los extractos de PLA y PLA/G5 para cada período de tiempo no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí.

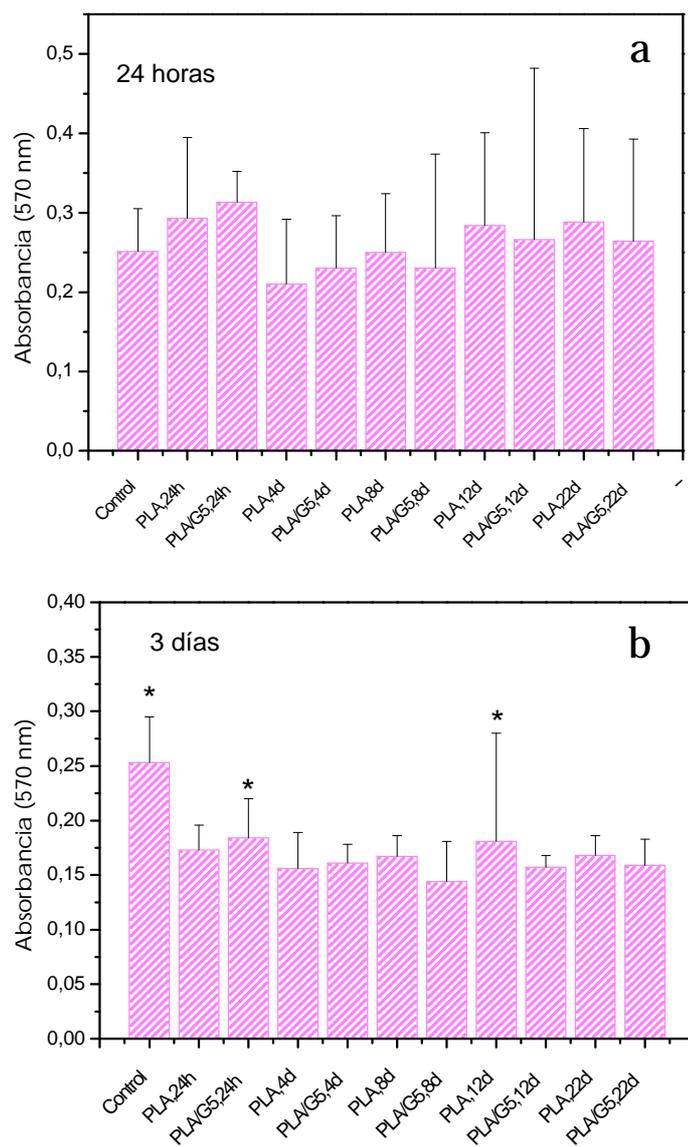


Figura 9.11. Resultados del análisis MTT realizado con los extractos de los materiales, a) después de 24 h de contacto y b) después de 3 días de contacto. Los asteriscos (*) indican los resultados estadísticamente iguales al control ($p < 0.05$), ($n = 3$).

9.4. DISCUSIÓN

De acuerdo a algunos autores, existen varios criterios que debe cumplir el andamio ideal para ser utilizado en la regeneración de tejidos óseos, entre los que destacan los siguientes (33;34):

- Debe ser biocompatible y sus productos de degradación deben ser no-citotóxicos.
- Debe ser biodegradable, y a su vez la velocidad de degradación debe adecuarse a la velocidad de formación del nuevo tejido.
- Debe poseer un grado elevado de porosidad interconectada, formada por una variedad de macro y microporos, de forma tal que permita el crecimiento celular en su interior, así como la vascularización del tejido y el transporte de nutrientes.
- Deben poseer propiedades mecánicas suficientes para regenerar el tejido óseo, en zonas donde deban soportarse cargas. Además, el material debe mantener su integridad estructural al menos durante el período de neoformación ósea.

En el presente capítulo se han desarrollado dos tipos de andamios tridimensionales, basados en PLA cono sin refuerzo de un vidrio soluble de fosfato de calcio. La incorporación del vidrio G5 dentro de la matriz polimérica tiene como finalidad mejorar tanto desde el punto de vista de la biocompatibilidad, como desde el punto de vista mecánico y de la velocidad de degradación, las propiedades del andamio de PLA, para acercarnos a los criterios del andamio ideal.

En este caso, al igual que en el caso del estudio de la degradación del compuesto no poroso PLA50, se utilizaron los andamios de PLA solo como material control para poder comparar y evaluar el efecto de la incorporación del vidrio en el sistema.

Según los resultados obtenidos, los andamios desarrollados en este estudio presentaron una porosidad de hasta del 95%, además de una buena interconectividad como pudo observarse en las imágenes de microscopía electrónica. El nivel de interconectividad es de gran importancia ya que tanto el crecimiento del tejido en su interior como el nivel de vascularización del mismo y la distribución de nutrientes a través del tejido neoformado, dependerá enormemente de este parámetro. Asimismo, el tamaño de los poros dentro del andamio juega un papel fundamental. Como hemos visto en el capítulo anterior, la mayoría de los autores coinciden en que poros con un diámetro mayor que 150 μm son los óptimos para facilitar la colonización del andamio por parte de las células. Sin embargo, el tamaño de poro ideal dependerá del material utilizado. En general se puede afirmar que los poros obtenidos a partir de las partículas de NaCl utilizadas como agente porogénico (250-500 μm), resultaron estar dentro del rango apropiado para asegurar el crecimiento del tejido óseo dentro del andamio biodegradable (35-39). Por otra parte, además de los poros atribuidos a la eliminación del agente porogénico, se observó la formación de microporos dentro de la estructura polimérica, específicamente en las paredes de los macroporos, debidos quizás, a la evaporación del cloroformo.

La incorporación de las partículas de vidrio de fosfato de calcio en las esponjas de PLA mejoró tanto las propiedades mecánicas del material como la respuesta biológica del mismo. Los valores obtenidos para el módulo a compresión aumentaron 61% en comparación con los andamios de PLA. Además, resultaron ser comparables a los valores obtenidos en otros estudios en los que se usaron materiales similares y dentro de un rango de porosidad similar (40). El aumento significativo de las propiedades mecánicas a compresión con la incorporación de la fase inorgánica sugiere que las partículas de vidrio cumplieron el papel de refuerzo mecánico esperado. Cuando las partículas de vidrio son introducidas en la estructura polimérica tridimensional, estas evitan que las paredes de los poros se doblen y colapsen tan fácilmente como en el caso del polímero solo.

En cuanto a la degradación, los resultados obtenidos sugirieron que la presencia de las partículas de vidrio, no ejercieron un efecto marcado sobre la degradación de la matriz polimérica.

Los resultados correspondientes a la pérdida de peso de las esponjas poliméricas y de material compuesto (Figura 9.5), revelaron que ambos experimentaron una pérdida progresiva de peso a lo largo del período de degradación y que a su vez, la pérdida de peso fue más marcada en el caso del material compuesto. Los resultados de pérdida de peso molecular (M_w) mostrados en la Tabla 9.4, reflejan la continua pérdida de masa mostrada por los andamios de PLA, los cuales perdieron un 80% del M_w después de las 12 semanas de degradación *in vitro*. Sin embargo, en el caso de los andamios de PLA/G5, la pérdida de masa puede atribuirse no sólo a la degradación y liberación de las cadenas poliméricas, sino también, a la pérdida de fase inorgánica o de vidrio. Esto se comprobó a través de los ensayos de cenizas, que revelaron una pérdida notable del porcentaje de fase inorgánica con el tiempo de degradación, llegando a perder hasta un 27% del porcentaje inicial de vidrio.

Esta elevada pérdida de vidrio a su vez, puede ser debida a dos razones principalmente. En primer lugar, puede deberse a la degradación de las partículas de vidrio como tal, que como ya hemos dicho en el capítulo 3, se degrada superficialmente y al estar presente en forma de partículas, aumenta el área de contacto con el fluido y por lo tanto es posible que aumente su velocidad de degradación. En segundo lugar, la pérdida de fase inorgánica puede deberse al desprendimiento de las partículas de vidrio de la matriz polimérica. Las imágenes obtenidas a través de la microscopía electrónica mostraron que, a pesar de que en muchos casos las partículas parecían estar bastante adheridas al polímero, en otros casos, las partículas se encontraban suspendidas dentro del andamio polimérico, por lo que es muy probable, que este tipo de partículas se haya desprendido fácilmente de la estructura porosa. También es posible que algunas de las partículas que inicialmente parecían bien adheridas al PLA, hayan sido desunidas por acción del medio acuoso.

Los termogramas correspondientes al análisis por DSC, mostraron las transiciones térmicas de cada uno de los materiales a lo largo del período de degradación (ver Tabla 9.5). Los valores de la temperatura de transición vítrea (T_g), resultaron ser similares en ambos casos, en las esponjas de PLA y en las de PLA/G5 y experimentaron una disminución gradual a lo largo del período de degradación. Este hecho concuerda con la pérdida progresiva de M_w , ya que la disminución en la T_g está relacionada con la rotura de las cadenas poliméricas. También existe concordancia con los resultados de pérdida de peso ya que el aumento progresivo del porcentaje de pérdida de peso en la matriz de PLA se debió a la liberación de las cadenas degradadas del polímero.

Con respecto al porcentaje de cristalinidad, ambos materiales mostraron valores iniciales muy cercanos (alrededor de 33%). La evolución del porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$) también fue muy parecido en ambos casos, lo cual indica que, a diferencia de los compuestos no porosos, la adición de partículas de vidrio, no afectó particularmente la degradación del polímero. El aumento en el $\%X_c$, está relacionado con el mecanismo de degradación del PLA, que ya ha sido comentado en el capítulo 6, donde se estudió la degradación del compuesto no poroso. Debido a que la hidrólisis de las cadenas se inicia de forma preferencial en las zonas amorfas del material, la cristalinidad del mismo se ve afectada de forma tal, que aumenta a medida que el material se degrada y pierde peso. Por lo tanto, los resultados de pérdida de masa, GPC y DSC, indicaron que la incorporación de vidrio dentro de la matriz polimérica porosa, no afectó directamente la degradación del PLA, ya que tanto la matriz del material compuesto, como el andamio de PLA, tuvieron comportamientos similares.

En las imágenes obtenidas de los diferentes andamios, se observa que las paredes poliméricas son muy delgadas y que las partículas de vidrio se encuentran en algunos casos envueltas en una película del polímero y en otras ocasiones, tan sólo se encuentran un poco ancladas dentro de la red porosa. Además, se observó la formación de numerosos agujeros y el adelgazamiento de las paredes con el tiempo de degradación. El hecho de que las paredes poliméricas sean tan delgadas, sugiere que no existen las condiciones para que se lleve a cabo el proceso de degradación autocatalítico, ya que al ser las paredes tan finas, los productos de degradación se liberan al exterior y no permanecen en el interior del material acidificándolo y acelerando su degradación interna. Esta liberación de cadenas se corrobora con la pérdida continua de masa (formación de agujeros y adelgazamiento de paredes) y de peso molecular experimentada por los andamios de PLA. Así como también concuerda con los resultados de DSC, específicamente con los valores de T_g y de $\%X_c$. El efecto autocatalítico en los poli(α -hidroxi ésteres), fue demostrado por primera vez usando especímenes sólidos de 2 mm de espesor (41), y más recientemente se ha visto este fenómeno en películas de 100 μm de espesor (42). Dado que las paredes de PLA de los andamios de este estudio presentaron un espesor que está muy por debajo de estas

dimensiones, es muy probable que el mecanismo de degradación experimentado por los materiales no haya sido el autocatalítico.

En el capítulo 6 se mencionó la posibilidad de que los productos de degradación liberados por el vidrio G5 ejercieran un efecto tampón sobre los productos de degradación del PLA. En el presente capítulo, no se observó la influencia del efecto tampón generado por las partículas de vidrio, así como tampoco se observó la formación de precipitados en la superficie del material como en el caso de la degradación de los compuestos no porosos. Esto puede deberse a 3 razones principalmente:

- a) En primer lugar, en el caso del PLA50, el grosor del material permitía que las partículas de vidrio quedaran atrapadas en su interior y que el material se degradara autocatalíticamente. Por lo que parecía que la reactividad de las partículas creaba un efecto tampón que estabilizaba el pH y consecuentemente la degradación del material. En el caso de la esponja de PLA/G5, las partículas quedan bastante expuestas a la superficie y las paredes poliméricas son muy delgadas, por lo que las cadenas poliméricas serían expulsadas hacia el fluido al igual que los productos de degradación del vidrio G5 y por lo tanto, el efecto tampón no tendría lugar.
- b) En segundo lugar, es posible que la relación peso volumen (1g/1000ml) haya sido muy baja y por lo tanto, el medio no se llegara a saturar dando paso a los precipitados de fosfato de calcio. Uno de los factores que afectan la formación de precipitados bajo condiciones *in vitro* en SBF a 37°C es la relación superficie/volumen o peso/volumen entre el biomaterial y el fluido. Mientras mayor sea la relación, mayor será la probabilidad de que el medio se sature y precipite. Si por el contrario, la relación es baja como en nuestro caso, los iones liberados por el vidrio serán difundidos al medio y tomará más tiempo para que el medio se sature. De hecho, en un estudio realizado con andamios de PLA y 40% en peso de partículas de vidrio G5, usando una relación peso/volumen de 1:500, se observó la presencia de precipitados de fosfato de Ca a partir de la cuarta semana de degradación (43). Por otra parte, en un estudio realizado por Zhang *et al.*(20), se reportó la formación de una capa de apatita carbonatada en la superficie de una esponja de PLA, al estar ésta sumergida en SBF a 37°C usando una relación superficie / volumen mucho mayor que la usada en el presente estudio, que conllevó la saturación del SBF y posteriormente a la precipitación y formación de la apatita carbonatada. Estos resultados indican, que la formación de fosfatos de calcio sobre los biomateriales, está relacionada con la relación superficie / volumen o peso / volumen utilizada.
- c) En tercer lugar, además de la relación superficie/volumen, existen otros factores que afectan la formación de precipitados de fosfato de calcio en la superficie de los biomateriales. Se ha visto que en el caso de los materiales compuestos, el porcentaje de fase inorgánica es un factor importante en la formación de estos precipitados (44). Es decir, que para obtener un material

compuesto bioactivo, la fase bioactiva debe exceder una cierta fracción en volumen. Por debajo de este volumen crítico, a pesar de la fase bioactiva esté presente, el compuesto no será bioactivo. Por ejemplo, se ha visto que para el compuesto de polietileno y hidroxiapatita conocido como HAPEX®, el porcentaje de volumen crítico es 20%, a partir de este porcentaje se estimula la unión del material con el tejido óseo (45). Es posible, que la pérdida de vidrio, así como el porcentaje de vidrio utilizado, hayan influenciado también en la ausencia de precipitados.

Es interesante mencionar que los procesos de degradación del PLA y del material compuesto (PLA50) no porosos y de las estructuras de PLA y PLA/G5 porosas son difícilmente comparables, ya que hay que tener en cuenta que las distintas condiciones de procesamiento dieron lugar a materiales con propiedades intrínsecamente distintas. Así, mientras los materiales densos eran poco cristalinos (aproximadamente 2-3% X_c) debido a la degradación térmica por el prensado en caliente, los materiales porosos tenían una cristalinidad muy superior, al ser obtenidos por disolución y colada (*solvent casting*). Por otra parte, hay que considerar también que ambos estudios fueron llevados a cabo bajo condiciones diferentes. A pesar de todo, puede ser relevante destacar algunos aspectos que se derivan de la comparación de los dos tipos de materiales.

- En cuanto a la pérdida de peso, se observó que los materiales no porosos siguieron un mecanismo diferente al de las estructuras porosas. En el caso del PLA, se observó tanto en el material poroso como en el no poroso un aumento gradual en la pérdida de peso con el tiempo de degradación. Sin embargo, la estructura porosa experimentó una mayor velocidad de pérdida de peso que el material no poroso. De hecho, el andamio poroso mostró un porcentaje de pérdida de peso alrededor del 5% después de 6 semanas de degradación, mientras que el compuesto no poroso mostró una pérdida del 0.4% para el mismo período de tiempo.

En el caso del material compuesto, el material no poroso (PLA50) mostró una drástica pérdida de peso durante las 3 primeras semanas de degradación, luego disminuyó la velocidad de pérdida de peso llegando a perder hasta un 21.6% de su peso inicial después de 6 semanas de inmersión en SBF. El andamio de compuesto por su parte mostró una pérdida de peso progresiva durante todo el período de degradación llegando a perder aproximadamente el mismo porcentaje de peso (21.5%) después de 6 semanas de degradación *in vitro*.

- En cuanto a la evolución del peso molecular del polímero, a pesar de no tener suficientes datos para comparar punto a punto, se observó en forma general, que para un mismo período de tiempo, el material no poroso experimentó una pérdida de M_w mayor que el material poroso. Así tenemos que, después de 3 semanas de degradación, el PLA no poroso perdió aproximadamente un 42% del M_w inicial, mientras que el material poroso perdió un 28,71%. Después de 6 semanas de estudio, el PLA no poroso perdió cerca de un 68% del peso molecular, mientras que el andamio poroso sufrió una pérdida del 37,9%. Es

decir, que el material no poroso, se degradó más rápidamente que el andamio poroso, debido principalmente al efecto de la degradación auto catalítica y debido a su carácter más amorfo, ya que es un hecho conocido que las regiones amorfas son más sensibles a la degradación.

- Otro punto importante, es la evolución de las transiciones térmicas y del porcentaje de cristalinidad. En el caso de los andamios porosos, el %X_c aumentó tan solo un 1.04% para las esponjas de PLA y 2.98% para las esponjas de PLA/G5 después de 12 semanas de degradación, y además, no hubo diferencias relevantes entre el comportamiento del PLA y el del PLA/G5, mientras que en el caso de los materiales no porosos, hubo un aumento más marcado del %X_c, sobretodo en el caso del material compuesto PLA50 el cual aumentó su cristalinidad en un 800% después de sólo 2 semanas de inmersión en SBF. Esto se deriva principalmente de que en el caso del material denso partimos de un compuesto amorfo que se degrada más rápido y por esto aumenta más el %X_c, mientras que en el caso de un material poroso con una cristalinidad cercana a la máxima que presentó el PLA recibido (40%), la degradación es más lenta ya que la fase amorfa es menor.

Con respecto a los estudios de biocompatibilidad, de acuerdo a los resultados obtenidos (ver Figura 9.10), el número de células viables aumentó con el tiempo de cultivo para los tres diferentes materiales, el poliestireno del control, las esponjas de PLA y las esponjas de PLA/G5, indicando que las células proliferaron de forma adecuada. No obstante, el incremento en los valores de absorbancia es más evidente en el caso de las esponjas. Más aún, las esponjas de PLA/G5 mostraron valores mayores que los presentados por las esponjas de PLA. Por lo tanto, estos resultados sugieren que las partículas de vidrio tuvieron una influencia positiva en la viabilidad y proliferación celular.

En el capítulo 7, donde se hizo el estudio de citocompatibilidad del material compuesto no poroso se observó que la incorporación de partículas de vidrio G5 en la matriz polimérica mejoró la respuesta biológica del PLA. Además se corroboró que la biocompatibilidad de los materiales estudiados depende de múltiples factores, entre las que tiene especial importancia sus características superficiales. Al igual que en el capítulo 7, los resultados obtenidos en este capítulo muestran que la presencia de partículas de vidrio G5 mejoró la interacción célula-material del PLA. Por otra parte, los capítulos 4, 7 y 8 donde se han realizado estudios de citocompatibilidad mostraron que en general el efecto de las características superficiales es más pronunciado que el de los productos de degradación en el caso de los materiales estudiados en la presente Tesis Doctoral. En el caso de los andamios también se observó que el efecto superficial es mayor que el efecto de los productos de degradación liberados en los extractos ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los estudios realizados con los diferentes extractos de PLA y de PLA/G5.

Como ya se ha mencionado en el capítulo 5 el vidrio G5 es un material con carácter hidrofílico. La incorporación del G5 en la matriz de PLA, le confiere un leve grado de hidrofiliidad al material compuesto, y estas diferencias en la mojabilidad de la superficie se reflejan en la respuesta celular, sobretodo en los ensayos de adhesión a 24 horas. En los ensayos de proliferación la química superficial juega un papel más importante, por lo que posiblemente la química del vidrio G5 haya sido el factor más importante en esta etapa. En el caso de los andamios fue imposible la observación de las células por microscopía electrónica así como la determinación de la rugosidad de los mismos. Es de esperar que los cambios topográficos sean mayores en el compuesto debido a la presencia de las partículas de vidrio. Sin embargo, no se pudo establecer ninguna relación entre la topografía del material y la morfología celular como en el capítulo 7.

En el caso de los ensayos de proliferación a 3 y 6 días en contacto directo con los andamios se observó un mejor comportamiento en los andamios 3D que en el control 2D. Estos resultados sugieren que la incorporación de porosidad tuvo un efecto positivo sobre la proliferación celular, quizás debido a la presencia de una mayor superficie disponible. Hay que mencionar que un control bidimensional no es el más adecuado para comparar la respuesta celular sobre los andamios poliméricos 3D. Sin embargo, debido a la carencia de materiales control 3D en el mercado, se optó por usar el control 2D estándar, es decir, la placa de cultivo.

En cuanto a los cultivos realizados con los extractos de los materiales, se observó un efecto similar al obtenido con los estudios de biocompatibilidad descritos en el capítulo 7. Después de 24 horas de contacto entre las células y los fluidos, no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, después de 3 días de cultivo, si se vio una disminución significativa de los valores de absorbancia, en las células cultivadas con los diferentes extractos. Dado que tanto los extractos del andamio de PLA como los del andamio de PLA/G5 presentaron resultados similares, es posible que el efecto principal de los extractos sobre las células haya sido ejercido principalmente por los productos de degradación del PLA, es decir, cadenas y grupos orgánicos formados por C y O principalmente, los cuales conllevan entre otras cosas cambios en el pH del medio de cultivo. El análisis de la liberación de estos grupos al medio no ha sido llevado a cabo, por lo que no se puede definir con precisión cuales son los grupos que intervienen y en qué concentración están presentes. Sin embargo, al igual que en capítulos anteriores (capítulos 7 y 8), debido a que los extractos utilizados se encontraban en su estado original, es decir, no fueron filtrados, diluidos o tamponados, los resultados obtenidos pueden ser considerados como positivos, ya que éste ha sido un ensayo *in vitro* de tipo estático y por lo tanto los efectos en el comportamiento celular son más intensos que en la situación dinámica o *in vivo*, donde los fluidos fisiológicos están en movimiento continuo y atenúan el efecto de los productos de degradación del material.

En este capítulo se ha realizado un estudio general de los andamios de PLA y PLA/G5 donde se ha analizado el efecto de la incorporación de partículas del vidrio G5 en el comportamiento mecánico a compresión, en el proceso de degradación y en la citocompatibilidad de las esponjas de PLA. El PLA fue utilizado como material de referencia. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la presencia de las partículas de vidrio en la matriz polimérica mejoró las propiedades mecánicas del andamio de PLA, así como también mejoró la respuesta celular del mismo. Sin embargo, a pesar de que el material compuesto sufrió una mayor pérdida de peso durante el período de degradación estudiado, la degradación de la matriz polimérica fue similar en ambos casos.

A pesar de que los cultivos celulares realizados en este estudio no permiten un análisis profundo de la interacción biológica entre las células y el material, si fue posible la evaluación de la respuesta celular inicial, cuando las células entran en contacto con los andamios, lo cual es de gran importancia para el estudio de la biocompatibilidad. No obstante, sería necesario realizar estudios complementarios para la detección de los diferentes grupos liberados al medio y para profundizar en el efecto de estos productos sobre el comportamiento celular. De esta forma, se tendría un mejor entendimiento de la influencia de los productos de degradación en las células.

Por otro lado, otro aspecto interesante sería estudiar el efecto de diferentes porcentajes de vidrio en los andamios de compuesto, sobre las propiedades mecánicas, la degradación y la respuesta celular. También sería interesante realizar estudios de degradación con diferentes relaciones superficie volumen para ver el efecto de este parámetro en la formación de precipitados.

En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo aunque son preliminares, pueden considerarse como positivos ya que mostraron una buena interacción célula-material a través de los ensayos de proliferación, por lo que el material compuesto desarrollado tiene potencial como andamio para Ingeniería de Tejidos.

Además, debido a la versatilidad del proceso de elaboración y a la combinación de los dos materiales (vidrio G5 y PLA), los andamios de material compuesto presentan múltiples posibilidades de modificar y ajustar diferentes parámetros como el grado y tamaño de la porosidad, las propiedades mecánicas, la velocidad de degradación y el grado de bioactividad, variando los porcentajes y tamaño de las partículas de vidrio y de sal. El porcentaje de porosidad y el tamaño de los poros dentro del andamio es de gran importancia y debe ser el adecuado para que permita tanto la adhesión y colonización celular como el transporte de nutrientes dentro de la estructura 3D. Por otro lado, es un hecho conocido que el control de las propiedades mecánicas de los andamios 3D para Ingeniería de Tejidos juega un papel de gran importancia ya que debe tenerse en cuenta el efecto de la estimulación mecánica sobre el comportamiento celular debido a los fenómenos de mecanotransducción. La incorporación de diferentes

porcentajes de partículas de vidrio dentro del compuesto, así como la variación del tamaño de los poros y el porcentaje de porosidad afectan en las propiedades mecánicas de las esponjas poliméricas.

El control de la velocidad de degradación del andamio también juega un papel importante ya que la finalidad de los mismos es funcionar como soportes temporales y desaparecer una vez que se ha regenerado el nuevo tejido. Este parámetro podría controlarse principalmente variando el porcentaje de fase cristalina del polímero mediante tratamientos térmicos. En cuanto a la bioactividad del andamio, la manipulación de la cantidad y del tamaño de las partículas de vidrio incorporadas en la matriz polimérica podría inducir cambios en la formación de precipitados de fosfato de calcio en la estructura 3D que favorezcan la interacción con el tejido óseo.

9.5. REFERENCIAS

- (1) Athanasiou KA, Niederauer GG, Agrawal CM. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996; 17(2):93-102.
- (2) Agrawal CM, Niederauer G, Athanasiou KA. Fabrication and Characterization of PLA-PGA orthopaedic implants. *Tissue Engineering* 1995; 1:241-252.
- (3) Agrawal CM, Niederauer G, Micallef D, Athanasiou KA. The use of PLA-PGA polymers in orthopaedics. In: Wise D, Trantolo D, Altobelh D, Yaszemski M, Greser J, Schwartz E, editors. *Encyclopaedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Part A. Materials. New York: Marcel Dekker, 1995: 1055-1089.
- (4) Agrawal CM, Ray RB. Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 55(2):141-150.
- (5) Coombes AGA, Heckman JD. Gel Casting of Resorbable Polymers .1. Processing and Applications. *Biomaterials* 1992; 13(4):217-224.
- (6) Wake MC, Gupta PK, Mikos AG. Fabrication of pliable biodegradable polymer foams to engineer soft tissues. *Cell Transplantation* 1996; 5(4):465-473.
- (7) Mikos AG, Sarakinos G, Leite SM, Vacanti JP, Langer R. Laminated 3-Dimensional Biodegradable Foams for Use in Tissue Engineering. *Biomaterials* 1993; 14(5):323-330.
- (8) Nam YS, Park TG. Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials* 1999; 20(19):1783-1790.
- (9) Nam YS, Park TG. Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 47(1):8-17.
- (10) Mooney DJ, Baldwin DF, Suh NP, Vacanti LP, Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 1996; 17(14):1417-1422.
- (11) Harris LD, Kim BS, Mooney DJ. Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 42(3):396-402.
- (12) Hsu YY, Gresser JD, Trantolo DJ, Lyons CM, Gangadharam PRJ, Wise DL. Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of in vitro controlled release of isoniazid from compressed foam matrices. *Journal of Biomedical Materials Research* 1997; 35(1):107-116.
- (13) Lu LC, Mikos AG. The importance of new processing techniques in tissue engineering. *Mrs Bulletin* 1996; 21(11):28-32.

- (14) Mikos AG, Bao Y, Cima LG, Ingber DE, Vacanti JP, Langer R. Preparation of Poly(Glycolic Acid) Bonded Fiber Structures for Cell Attachment and Transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research* 1993; 27(2):183-189.
- (15) Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 1996; 8(1):63-75.
- (16) Yang S, Leong K, Du Z, Chua.C. The Design of Scaffolds for use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering* 2001; 7(6):679-689.
- (17) Marra K, Szem J, Kumta P, DiMilla P, Weiss L. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 47:324-335.
- (18) Kasuga T, Ota Y, Nogami M, Abe Y. Preparation and mechanical properties of polilactic acid composites containing hydroxyapatite fibers. *Biomaterials* 2001; 22(1):19-23.
- (19) Ma PX, Zhang RY. Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 56(4):469-477.
- (20) Zhang RY, Ma PX. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 45(4):285-293.
- (21) Qiu QQ, Ducheyne P, Ayyaswamy PS. New bioactive, degradable composite microspheres as tissue engineering substrates. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 52(1):66-76.
- (22) Zhang Y, Zhang MQ. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 55(3):304-312.
- (23) Linhart W, Peters F, Lehmann W, Schwarz K, Schilling AF, Amling M et al. Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 2001; 54(2):162-171.
- (24) Xiong Z, Yan Y, Wang S, Zhang R, Zhang C. Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. *Scripta Materialia* 2002; 46:771-776.
- (25) Roether J, Boccaccini A, Hench LL, Maquet V, Gauthier S, Jerome R. Development and in vitro characterisation of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23:3871-3878.
- (26) Boccaccini A, Notingher I, Maquet V, Jerome R. Bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams filled with and coated by Bioglass particles for tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2003; 14:443-450.

- (27) Wei GB, Pettway GJ, McCauley LK, Ma PX. The release profiles and bioactivity of parathyroid hormone from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Biomaterials* 2004; 25(2):345-352.
- (28) Liao SS, Cui FZ. In vitro and in vivo degradation of mineralized collagen-based composite scaffold: Nanohydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Engineering* 2004; 10(1-2):73-80.
- (29) Khan YM, Katti DS, Laurencin CT. Novel polymer-synthesized ceramic composite-based system for bone repair: An in vitro evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2004; 69A(4):728-737.
- (30) Hou QP, Grijpma DW, Feijen J. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique. *Biomaterials* 2003; 24(11):1937-1947.
- (31) Gibson LJ, Ashby MF. *Cellular Solids, Structure and Properties*. second edn ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- (32) Holy C, Dang S, Davies JE, Shoichet M. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide)75/25 foam. *Biomaterials* 1999; 20:1177-1185.
- (33) Boccaccini A, Roether J, Hench LL, Maquet V, Jerome R. A composites approach to tissue engineering. *Ceramics Engineering Science Proceedings* 2002.
- (34) Spaans CJ, Belgraver VW, Rienstra O, de Groot JH, Veth RPH, Pennings AJ. Solvent-free fabrication of micro-porous polyurethane amide and polyurethane-urea scaffolds for repair and replacement of the knee-joint meniscus. *Biomaterials* 2000; 21(23):2453-2460.
- (35) Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Engineering* 1999; 5(1):35-51.
- (36) Holmes RE. Bone Regeneration Within A Coralline Hydroxyapatite Implant. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1979; 63(5):626-633.
- (37) Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998; 19(1-3):133-139.
- (38) Bobyn JD, Pilliar RM, Cameron HU, Weatherly GC. The Optimum Pore-Size for the Fixation of Porous-Surfaced Metal Implants by the Ingrowth of Bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1980;(150):263-270.
- (39) Klawitter JJ, Hulbert SF. Applications of porous ceramics for the attachment of load-bearing internal orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research(Symposium)* 1971; 2:161.

- (40) Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly(lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 50(1):50-58.
- (41) Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media Part 2: Degradation of lactide-glycolide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990; 1:131-139.
- (42) Lu L, Garcia CA, Mikos AG. In vitro degradation of thin poly(DL-lactic-co-glycolic acid) films. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 46(2):236-244.
- (43) Charles-Harris M, Beussart A, Hentges E, Planell JA. Characterisation and study of the degradation of scaffolds for tissue engineering. IV Jornades de recerca en Enginyeria Biomedica JEBC'04 2004;241-245.
- (44) Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* 2003; 24(13):2133-2151.
- (45) Bonfield W. Hydroxyapatite reinforced polyethylene as an analogous material for bone replacement. *Annals New York Academy of Sciences* 1988; 523:173-177.