

Adherencia y viabilidad de osteoblastos humanos sobre un polímero de Ácido Poliláctico y Quitosano

G.M. Ortega-Díaz¹, Y.G. Torres^{2,3}, A. Torres³, L. Tellez-Jurado², H. Balmori², B.E. García-Pérez¹

¹Departamento de Microbiología, ENCB, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

²Departamento de Metalurgia y Materiales, ESQIE, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

³Departamento de Materiales, Universidad Autónoma de México, Ciudad de México.

Resumen—Un andamio celular también llamado biomaterial, es un soporte inicial que permite la proliferación, adhesión, diferenciación celular, así como la síntesis de matriz extracelular. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de un polímero compuesto de ácido poliláctico adicionado de quitosano sobre la adherencia y viabilidad de osteoblastos humanos MG-63, para conocer si éste es funcional como un andamio celular en tejido óseo. La adherencia y las características morfológicas de los osteoblastos desarrollados sobre los polímeros constituidos por ácido poliláctico y diferentes concentraciones de quitosano (1, 3 y 5%) fueron evaluadas mediante una tinción de falodina-rodamina y observada en microscopía confocal en los días 1, 7, 14 y 21, la viabilidad de las células adheridas al biomaterial se evaluó con la técnica de MTT. En los biomateriales compuestos con quitosano se observó la adherencia de los osteoblastos, los cuales presentaron morfología blástica característica, el aumento en la confluencia de las células sobre los biomateriales dependió de la concentración de quitosano. Los biomateriales sin quitosano también mostraron células adheridas, pero en menor confluencia que con quitosano. La mayor actividad metabólica se evidenció a los 21 días. Los osteoblastos se adhieren y proliferan en los biomateriales de ácido poliláctico y quitosano.

Palabras clave— Ácido poliláctico, andamio celular, ingeniería de tejidos, osteoblastos MG-63, quitosano, tejido óseo.

I. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejido óseo es una ciencia altamente interdisciplinaria que pretende abordar las cuestiones clínicas relacionadas con los huesos [1]. Esta ciencia conjunta la tecnología del cultivo celular, la ingeniería de materiales y factores bioquímicos para restaurar y mantener los tejidos, ya sea para crearlos o para regenerar tejidos dañados [2]. Actualmente existen diversas enfermedades asociadas a la pérdida de tejido óseo, por lo que la ingeniería de tejidos busca continuamente tratar la pérdida de hueso por medio del uso de productos biomédicos obtenidos a partir de biomateriales, con aplicaciones en reparación de tejidos dañados [3]. El campo en desarrollo de la ingeniería de tejidos apunta a regenerar los tejidos dañados mediante la combinación de las células del cuerpo con biomateriales, que actúan como soportes para la regeneración de tejidos, guiando el crecimiento de nuevo tejido [4]. Un andamio, también llamado biomaterial, es una estructura o soporte

inicial que permite la proliferación, adhesión y diferenciación celular, así como la síntesis de matriz extracelular que provee de integridad estructural al tejido en formación [5].

El quitosano ha jugado un papel importante en la ingeniería de tejido óseo en las últimas dos décadas, este es un polímero natural que se obtiene de la quitina, que forma un componente principal del exoesqueleto de crustáceos. En los últimos años, se ha prestado considerable atención a los materiales compuestos de quitosano y sus aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejido óseo, debido a sus reacciones mínimas de cuerpo, a que tiene una naturaleza intrínseca antibacteriano y tiene la capacidad de ser moldeado en diversas geometrías y formas, adecuados para el crecimiento interno celular y la osteoconducción [6]. Algunas de las aplicaciones del quitosano en el área biomédica es su uso como membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras y sistemas liberadores de fármacos [6]; es importante decir que hay numerosas investigaciones que hacen referencia a su afinidad sobre diversos tejidos y su grado de biodegradabilidad y biocompatibilidad [7]. La naturaleza intrínseca del ácido poliláctico la hace deseable para la fijación de hueso, debido a que pueden eliminar la osteopenia; estudios sugieren que la biocompatibilidad y toxicidad del ácido poliláctico con tejido óseo [8].

II. METODOLOGÍA

1) *Elaboración de Biomateriales*: Los materiales se sintetizaron a base de ácido poliláctico en forma de resina y quitosano obtenido de exoesqueleto de camarones (Los detalles de la síntesis y caracterización de los materiales se reservan con fines de patente). Los materiales se obtuvieron en forma de cilindros largos, los cuales se cortaron para obtener cubos de 0.5 cm³, con los que se realizaron las pruebas biológicas en placas de 96 pozos.

2) *Cultivo de células*: La línea celular de osteoblastos humanos MG-63 (ATCC CRL-1427) se cultivó en α -Medio Mínimo Esencial (α -MEM Thermo Scientific, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB, Gibco) en una atmósfera humidificada con 95% de aire y 5% de CO₂, a 37° C, el medio se renovó cada tres días y cuando las células alcanzaron la confluencia se utilizó una solución de tripsina para separar las células confluentes de

los frascos, posteriormente se contabilizaron las células con cámara de Neubauer teñidas previamente con azul de tripano para tener una densidad final de 50,000 células en 200 μ l α -MEM.

3) *Esterilización de biomateriales*: Los materiales se lavaron dos veces con etanol absoluto durante 1 hora en tubos de 15 ml y posteriormente se dejaron 15 min expuestos a luz UV.

4) *Cultivo de células en los materiales*: Los materiales contenidos en placas de 96 pozos se incubaron con α -MEM durante la noche, posteriormente se adicionaron 50,000 células en cada material con medio α -MEM, se incubaron durante 24 h en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. El medio se cambió todos los días y la actividad osteogénica se evaluó al día 1, 7, 14 y 21.

5) *Evaluación de la actividad metabólica de los osteoblastos MG-63 desarrollados sobre los biomateriales*: Para determinar la actividad metabólica y la viabilidad de los osteoblastos sobre los biomateriales se realizó un ensayo colorimétrico usando Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5 difeniltetrazólico (MTT). Este método permite medir la viabilidad celular basado en la reducción del MTT (de color amarillo) a una sal de formazan de color azul, por la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células [10]. Al término de cada uno de los tiempos a evaluar, el medio de cultivo de cada pozo se retiró y se adicionó 50 μ L de una solución de MTT (25 mg/mL) y 50 μ L de α -MEM suplementado con 10% de SFB. La placa se incubó durante 3 h, a 37 °C y 5% de CO₂. Después de este tiempo se retiró el material del pozo y las sales de formazan se solubilizaron con 100 μ L por pozo de una solución de dimetil sulfóxido, agitando durante 15 min. Finalmente, la densidad óptica se determinó a 545 nm en un espectrofotómetro para microplacas.

6) *Evaluación de la morfología de los osteoblastos desarrollados sobre los biomateriales*: Los osteoblastos se sembraron en los biomateriales esterilizados a una densidad de 50000 células y se incubaron durante 1, 7, 14 y 21 días, después de cada tiempo, las células crecidas en cada material se fijaron con paraformaldehído al 4%. Los filamentos de actina se tiñeron con rodamina-faloídina (Sigma Aldrich) durante 20 minutos a temperatura ambiente y el exceso de rodamina se eliminó lavando 5 veces con PBS. Las preparaciones se observaron en un sistema de microscopía confocal de barrido láser (LSM5 Pascal, Zeiss).

III. RESULTADOS

A. Actividad metabólica y viabilidad de los osteoblastos sobre los biomateriales

Los resultados de MTT demostraron que la actividad metabólica de los osteoblastos se incrementó a los 21 días cuando se crecieron en el biomaterial adicionado de quitosano en comparación con las células crecidas en el PLA, en donde no hubo un incremento importante de la

actividad metabólica. Estos resultados también indican que los osteoblastos permanecen viables sobre los biomateriales hasta el día 21 (Figura 1).

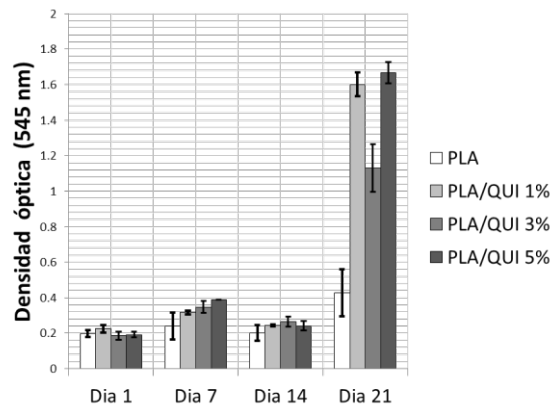


Fig. 1. Actividad metabólica de los osteoblastos desarrollados sobre los biomateriales. Se siguió una cinética de 1, 7, 14 y 21 días de incubación. PLA (Ácido Poliláctico), QUI 1% (Quitosano 1%), QUI 3% (Quitosano 3%) y 5% (Quitosano 5%).

En la figura 2 se puede apreciar la reducción del MTT y la formación de las sales de formazan sobre los biomateriales. Es notorio el incremento de la sal de formazan en el transcurso de los días.

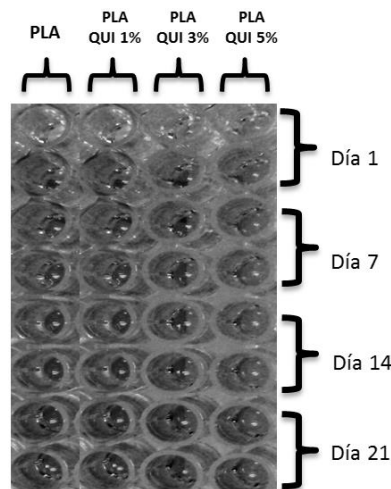


Fig. 2. Reducción de MTT y formación de la sal de formazan en los pozos que contenían previamente los biomateriales.

B. Morfología de los osteoblastos desarrollados sobre los biomateriales

En la Fig. 3 se presentan imágenes representativas de la superficie de los materiales obtenidas por microscopía confocal. En el biomaterial de PLA se observa una superficie más lisa y homogénea por el contrario los biomateriales adicionados de quitosano presentan una

superficie heterogénea, rugosa y con líneas que semejan fracturas.

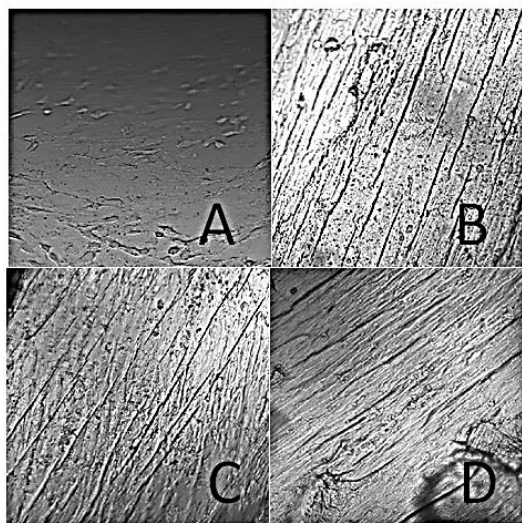


Fig. 3. Superficie de los materiales por microscopia confocal. (A) PLA, (B) PLA/QUI 1%, (C) PLA/QUI 3% y (D) PLA/QUI 5%

En todos los biomateriales compuestos con quitosano, se encontró adherencia de los osteoblastos, los cuales presentaron morfología característica, con una distribución longitudinal del citoesqueleto de actina. Se observó un incremento en la confluencia de las células crecidas sobre los materiales al incrementarse la concentración del quitosano. El biomaterial únicamente con ácido poliláctico también mostró células adheridas aunque en menor confluencia que los adicionados de quitosano (Figura 4).

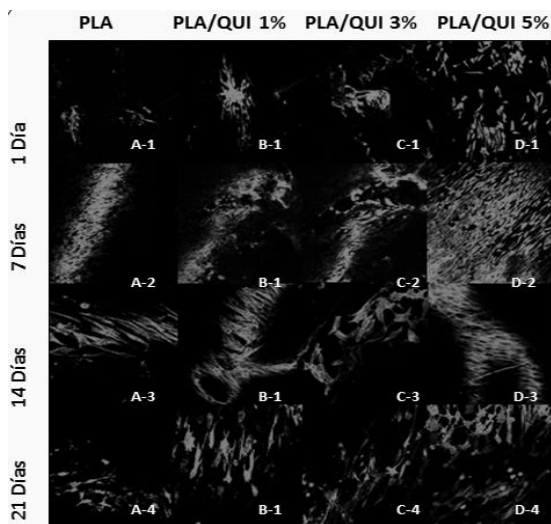


Fig. 4. Citoesqueleto de osteoblastos desarrollados sobre los biomateriales. Se siguió una cinética de 1, 7, 14 y 21 días de incubación. A (PLA), B (PLA-QUI 1%), C (PLA-QUI 3%) y D (PLA-QUI 5%).

3%) y D (PLA-QUI 5%). PLA (Ácido Poliláctico), QUI 1% (Quitosano 1%), QUI 3% (Quitosano 3%) y 5% (Quitosano 5%).

IV. DISCUSIÓN

Uno de los retos en el área de síntesis de materiales es demostrar su funcionalidad y su potencial aplicación. En este trabajo se evaluó el potencial biológico de nuevos materiales cuya composición está basada en una combinación de ácido poliláctico y quitosano. Aquí se presentan resultados de la actividad metabólica y la morfología de osteoblastos desarrollados sobre dichos materiales. El material que contiene solo PLA no mostró un incremento evidente en la actividad biológica de los osteoblastos a los 21 días, sin embargo los materiales con PLA/QUI 1%, PLA/QUI 3% y PLA/QUI 5% si mostraron un alto incremento en los niveles de absorbancia, lo que indica un incremento de la actividad biológica de las células desarrolladas en estos materiales. Esto se relaciona a la presencia del quitosano en la composición de los materiales (Fig. 2). Los pequeños cambios observados en los niveles de absorbancia del día 7 al 14 podrían estar relacionados al proceso de adaptación celular y no por un efecto citotóxico del material, ya que si hubiese un efecto toxico habría un decremento en la actividad metabólica a los 21 días. La reducción de MTT es un método que no solo determina la actividad metabólica, sino también determina la citotoxicidad del material sobre los osteoblastos MG-63, por lo que el incremento en la actividad metabólica indica también que los biomateriales no son tóxicos para estas células [10].

La reducción de MTT evidenció de forma cualitativa la proliferación celular, mismo que tuvo un pico máximo a los 21 días (Fig. 1), por lo anterior mencionado no solo el PLA favorece la proliferación, sino también el quitosano, es decir los dos compuestos inducen una acción en conjunto.

Es importante mencionar que hay numerosas investigaciones que hacen referencia a su afinidad del quitosano sobre algunos tejidos [6], esto se puso en evidencia cuando los osteoblastos tuvieron mayor actividad metabólica a los 21 días en materiales que contenían PLA/QUI a sus diversas concentraciones; el quitosano crea una superficie de mayor contacto, formando ranuras, relieves y poros sobre la superficie del material que inducen que los osteoblastos tengan una mayor afinidad por este tipo de superficies que solo cuando esta el PLA, ya que éste es liso y la superficie de contacto es menor, sin embargo el quitosano incrementa la superficie de contacto. Además de aumentar la afinidad de las células por el material, se conoce que el quitosano puede incrementar las propiedades biológicas ya que tiene la capacidad de ser un acelerador de la formación de osteoblastos responsables de la formación ósea, esto es debido a que su estructura es similar a la glucosamina de la matriz extracelular ósea [9].

En todos los biomateriales compuestos con quitosano se encontró adherencia de los osteoblastos y éstos presentaron morfología blástica característica, con una distribución longitudinal del citoesqueleto de actina (Fig. 4). Se observó un incremento en la confluencia de las células desarrolladas sobre los materiales al incrementarse la concentración del quitosano. Los materiales compuestos únicamente con ácido poliláctico también mostraron células adheridas, aunque en menor confluencia que los adicionados de quitosano. Estos resultados aportan datos interesantes, ya que la composición del material con el quitosano no solo favorece que las células se mantengan viables, sino que permite que las células se adhieran y adopten su morfología característica, lo cual indica que la superficie del material es un nicho con las condiciones idóneas para que las estructuras citoplasmáticas de la célula relacionadas con la adherencia hacia los sustratos se desarrollen adecuadamente [9].

La reducción de MTT y la tinción con faloidina rodamina evidencia la viabilidad de las células, además de indicarnos que las células se ven favorecidas en presencia de quitosano, el cual posiblemente podría inducir un proceso completo de neoformación ósea. La línea celular MG-63 no se encuentra 100% diferenciada, los resultados aquí observados sugieren que los biomateriales favorecen el proceso de diferenciación ya que fue posible observar la morfología de las células sobre los materiales, es decir todas las células tenían la formación de prolongaciones citoplasmáticas, que se forman en el proceso de ontogénesis. Sin embargo la osteoconducción y la osteointegración, son eventos que requieren de un análisis más profundo y una evaluación de marcadores celulares que participan en esos procesos.

V. CONCLUSIÓN

En las últimas dos décadas, la ingeniería de tejidos ha tomado una gran relevancia debido al uso de andamios celulares que permiten la regeneración de tejidos y no solo sustituirlo. En la presente investigación se evidenció que los biomateriales compuestos con ácido poliláctico y quitosano tienen propiedades biológicas que permiten que los osteoblastos se adhieran y desarrollen su morfología blástica característica, además de evidenciar que metabólicamente estas células están activas.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con apoyos financieros del Conacyt a través del proyecto 222001 y del Proyecto SIP clave 20160248. La autora de este trabajo agradece el apoyo financiero otorgado a través del Proyecto SIP clave 20160248.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Vacanti and R. Langer, "Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation", *The Lancet*, vol. 354, pp. S32-S34, 1999.
- [2] E. Rabkin and F. Schoen, "Cardiovascular tissue engineering", *Cardiovascular Pathology*, vol. 11, no. 6, pp. 305-317, 2002.
- [3] A. Amini, C. Laurencin and S. Nukavarapu, "Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges", *Crit Rev Biomed Eng*, vol. 40, no. 5, pp. 363-408, 2012.
- [4] C. Agrawal and R. Ray, "Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering", *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 55, no. 2, pp. 141-150, 2001.
- [5] J. Holzwarth and P. Ma, "Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, vol. 32, no. 36, pp. 9622-9629, 2011.
- [6] E. Rabea, M. Badawy, C. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut, "Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action", *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1457-1465, 2003.
- [7] J. Venkatesan and S. Kim, "Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview", *Marine Drugs*, vol. 8, no. 8, pp. 2252-2266, 2010.
- [8] K. Athanasiou, "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers", *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 93-102, 1996.
- [9] S. Arce, C. Valencia and D. Garzón-Alvarado, "Obtención de un biocompuesto constituido por fosfato tricálcico y quitosana para ser usado como sustituto óseo en un modelo animal", *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica*, vol.31, no.3, pp. 268-277, 2012.
- [10] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays", *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, 1983.