

Liberación de Cefalexina en Prótesis Óseas: Andamio Cerámica-Hidrogel con Nanopartículas de Sílice Mesoporosa

Cephalexin Release in Bone Prosthetics: Ceramic-Hydrogel Scaffold with Mesoporous Silica Nanoparticles

Nuria Lafuente Gómez

Tutores:

Juan Luis París Fernández de la Puente y M. Victoria Cabañas Criado

Universidad Complutense de Madrid

Resumen

El objetivo del trabajo es desarrollar un andamio cerámica-hidrogel que se integre en el hueso, contribuya en la regeneración ósea y libere antibiótico para combatir infecciones. Las nanopartículas de sílice mesoporosa (NPs), que permiten incorporar fármacos en sus poros, se sintetizan por una reacción de hidrólisis y condensación de tetraetilortosilicato en medio básico en presencia de un surfactante. Se obtienen NPs con grupos silanoles (NPneg) o grupos amino (NPpos). Ambos tipos de NPs se cargan con cefalexina y se estudia la liberación en función del tiempo. Las NPneg liberan más cantidad de antibiótico y son las seleccionadas para incorporarlas al andamio. Los andamios apatita-agarosa son fabricados con una porosidad diseñada para facilitar el crecimiento óseo. La cefalexina se incorpora al andamio bien en disolución y/o encapsulada en las NPs. En el primer caso, la cefalexina se libera rápidamente mientras que encapsulada la liberación es sostenida. Finalmente, el estudio de la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* indica que los andamios fabricados constituyen una buena opción para el tratamiento de infecciones óseas.

Palabras clave: biomateriales, liberación de fármacos, infección ósea, nanopartículas.

Abstract

The aim of this work is to develop a ceramic-hydrogel scaffold, which integrates with the bone, contributes to bone regeneration and releases antibiotic to treat infections. Mesoporous silica nanoparticles (NPs), whose pores can be loaded with drugs, are synthesized by a hydrolysis and condensation reaction in a basic medium of tetraethyl orthosilicate in the presence of a surfactant. NPs with silanol groups (NPneg) or amino groups (NPpos) are obtained. Both kinds of NPs are loaded with cephalexin and the time-dependent release is studied. NPneg, which release a larger amount of antibiotic, are the ones selected to be included in the scaffold. Apatite-hydrogel scaffolds are fabricated with a porosity designed to facilitate bone growth. Cephalexin is incorporated into the solution and/or encapsulated in nanoparticles inside the scaffold. In the first case, cephalexin is quickly released whereas if it is encapsulated, the release is sustained. The inhibition of *Staphylococcus aureus* growth study shows that these scaffolds are a good option for bone infections treatment, being able to combine a loading dose during the first hours with maintenance dose the following days.

Keywords: biomaterials, drugs release, bone infection, nanoparticles.

Introducción

El envejecimiento de la población y los accidentes de tráfico han producido un aumento de patologías óseas como la osteoporosis, tumoraciones y daños por traumatismos (Vallet-Regí, Román Zaragoza, Peña López y Cabañas Criado, 2014). La implantación de prótesis es cada vez más necesaria y uno de los principales problemas son las infecciones. Entre las bacterias implicadas en las infecciones osteoarticulares destacan los cocos Gram-positivos y más especialmente los estafilococos por ser responsables del 42-66% de las infecciones (Zimmerli, Trampuz y Ochsner, 2004).

En este trabajo se recoge la fabricación de un sistema que se pueda emplear como prótesis ósea y contribuya en la regeneración. Para ello se necesita un andamio biodegradable que actúe como una matriz extracelular temporal donde las células puedan crecer y migrar mientras el tejido se regenera. Atendiendo a la composición de los huesos, el material ideal estaría formado por la hidroxiapatita (cerámica análoga a la presente en la fase mineral del hueso) y otro componente polimérico natural como la agarosa (polisacárido que presenta semejanzas con las macromoléculas de la matriz extracelular). Además, es imprescindible que el sistema tenga poros interconectados que faciliten el crecimiento óseo, la angiogénesis y el transporte de nutrientes. (Martínez-Vázquez, Cabañas, París, Lozano y Vallet-Regí, 2015). Para combatir las infecciones asociadas a las prótesis óseas se incorpora cefalexina libre o encapsulada en nanopartículas de sílice mesoporosa. Este fármaco es un antibiótico β -lactámico del grupo de las cefalosporinas muy eficaz contra las bacterias Gram-positivas.

Material y métodos

Obtención de las nanopartículas de sílice mesoporosa (NPs): se sintetizan por una reacción de condensación en medio básico de tetraetilortosilicato o una mezcla de tetraetilortosilicato/3-aminopropiltriétoxilano, en presencia de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, surfactante catiónico que forma micelas que originan los poros (París, Cabañas, Manzano y Vallet-Regí, 2015). En el primer caso, las NPs tienen grupos silanoles (NPneg) y en el segundo, grupos amino (NPpos). Para la síntesis de NPs cargadas con antibiótico, las NPs se dispersan en una disolución acuosa de cefalexina, CEF (8 mg/mL), durante 24 h para conseguir la incorporación del fármaco en los poros de las NPs.

Obtención del andamio cerámica-hidrogel: se utilizó el método GELPOR3D (Figura 1). Se añade al agua un agente gelificante que asegure la formación de un soporte consistente, en nuestro caso agarosa, y una cerámica que refuerce la consistencia del agente gelificante y contribuya en la regeneración ósea, la nano-carbonatohidroxiapatita, nCHA (Peña, Román, Cabañas y Vallet-Regí, 2010). Por último, se añade cefalexina en disolución (andamio ARcef), encapsulada en NPs (ARNPcef) o bien una combinación de ambas (ARcefNPcef). La mezcla se vierte en un soporte tridimensional para obtener el andamio poroso cerámica-hidrogel.

Los materiales se caracterizan por dispersión de luz dinámica (DLS), porosimetría de adsorción de N₂, difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB), espectroscopia infrarroja (FTIR) y análisis elemental.

Estudio de liberación de cefalexina en función del tiempo in vitro: se hace en medio tampón fosfato salino a

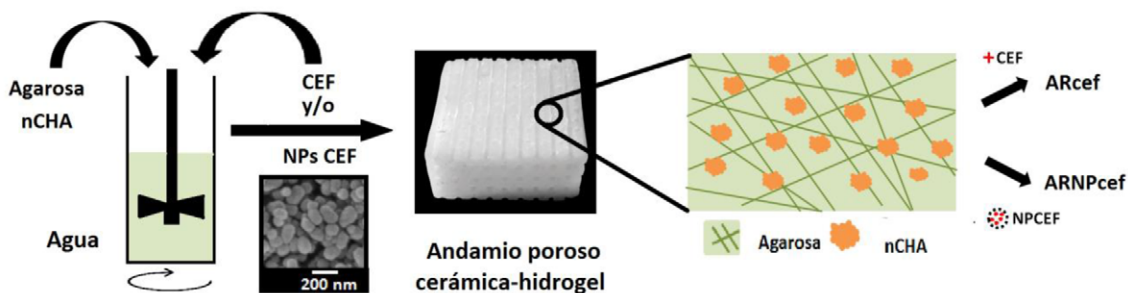


Figura 1. Método de preparación de los andamios.

Tabla 1. Caracterización de NPneg y NPpos sin y con cefalexina.

| | Tamaño DLS (nm) | Potencial zeta (mV) | Parámetro de red, DRX (nm) | Diámetro de poro (nm) | Área BET (m ² /g) | | %S | |
|-------|-----------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|------------------------------|-----|-------|------|
| | | | | | + cef | | + cef | |
| NPneg | 140 | - 30,4 | 4,95 | 2,9 | 1026 | 701 | 0,06 | 0,68 |
| NPpos | 195 | + 27,7 | 4,58 | 2,3 | 1177 | 640 | 0,05 | 0,73 |

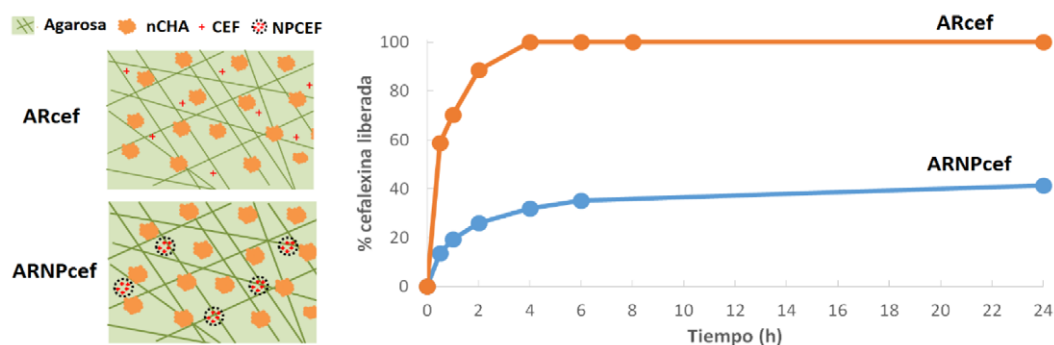


Figura 2. Esquema de ARcef y ARNPcef; % cefalexina liberada en función del tiempo.

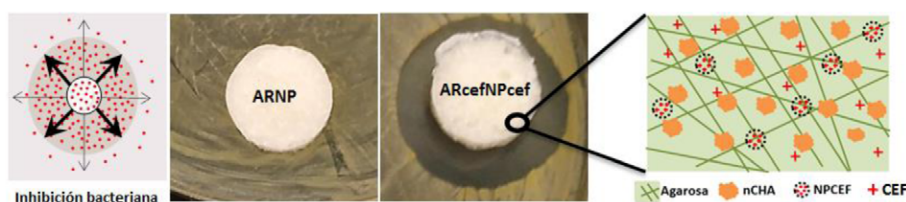


Figura 3. Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

37°C con agitación. El fármaco liberado se cuantifica en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 260 nm.

Estudio de inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus: la bacteria se siembra en agar y se incuban los andamios 24 h a 37°C, tiempo tras el cual se mide el halo de inhibición.

Resultados

En la tabla 1 se recogen los resultados obtenidos en la caracterización de los dos tipos de NPs, con grupos silanoles y grupos amino, con y sin cefalexina. El estudio por FTIR permite identificar la sílice y los grupos amino de las NPs y la presencia de cefalexina de las NPs cargadas. El diagrama de DRX muestra que las NPneg tienen máximos de DRX más definidos que las NPpos. El estudio de liberación del fármaco en medio tamponado muestra que las NPneg liberan mayor cantidad de cefalexina, tras 24 horas de ensayo, que las NPpos (17 mg/mgNP vs 9 µg/mgNP).

Los diagramas DRX de los andamios fabricados muestra máximos de difracción correspondientes a la nCHA poco cristalina y un fondo amorfo de la agarosa. El FTIR permite identificar los grupos funcionales de la nCHA y de la agarosa, no siendo posible visualizar con claridad las NPs y la cefalexina. El porcentaje de cefalexina liberada de los andamios fabricados en función del tiempo se recoge en la figura 2.

Los resultados de la inhibición del crecimiento de *S. aureus* en presencia de los andamios, sin y con cefalexina, se muestran en la figura 3.

Discusión

La caracterización de las NPs presentada en la tabla 1 confirma tanto su correcta síntesis y funcionalización como la carga del fármaco cefalexina. Las imágenes de MEB (figura 1) indican que la morfología de las NPs no se modifica por su funcionalización. El estudio cinético de liberación del fármaco, que sigue un modelo de orden 1, muestra que las NPs con grupos silanoles liberan más cantidad de fármaco que las aminadas.

Los estudios de liberación de los andamios muestran la total liberación del fármaco a las 4 horas desde el material ARcef, mientras que desde ARNPcef se observa una liberación sostenida (sólo un 41% en 24 horas). En base a estos resultados, una combinación de ambas estrategias (material ARcefNPcef) permitiría conseguir una “dosis de choque” en las primeras horas y una liberación sostenida posteriormente. Esta hipótesis es confirmada por la aparición de un halo de inhibición del crecimiento de *S. aureus* en presencia de dicho material, destacando su capacidad antibacteriana.

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que los andamios apatita-agarosa-NPs constituyen una buena opción para el tratamiento de infecciones óseas relacionadas con las prótesis. La posibilidad de incorporar cefalexina en disolución permite una liberación rápida (“dosis de choque”) con la que se combatiría el foco infeccioso en las primeras horas. La incorporación de las NPs permite conseguir una

liberación sostenida del antibiótico en los siguientes días, evitando así la propagación de la infección.

Referencias

- Martínez-Vázquez F. J., Cabañas, M. V., París, J. L., Lozano, D., & Vallet-Regí, M. (2015). Fabrication of novel Si-doped hydroxiapatite/gelatine scaffolds by rapid prototyping for drug delivery and bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, *15*, 200-209. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.021>
- París, J. L., Cabañas, M. V., Manzano, M., & Vallet-Regí, M. (2015). Polymer-grafted mesoporous silica nanoparticles as ultrasound-responsive drug carriers. *ACSNano*, *9*(11), 11023-11033. <http://doi.org/10.1021/acsnano.5b04378>
- Peña, J., Román J., Cabañas, M. V., & Vallet-Regí M. (2010). An alternative technique to shape scaffolds with hierarchical porosity at physiological temperature. *Acta Biomaterialia*, *6*, 1288-1296. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.049>
- Vallet-Regí, M., Román Zaragoza, J., Peña López, J., & Cabañas Criado, M.V. (2014). Soportes porosos de cerámica-hidrogel para la utilización en implantología oral. *Gaceta Dental*, *263*, 130-137.