

# PROCESAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y ENSAYOS BIOLÓGICOS DE SCAFFOLDS POLIMÉRICOS NATURALES Y SINTÉTICOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO Y CARTILAGINOSO

Juan José Pavón Palacio, Ph.D.<sup>1</sup>, Alice Pesquet, Ing.<sup>2</sup>, Mónica Echeverry Rendón, MSc.<sup>3</sup>, Sara María Robledo Restrepo, Ph.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Biomateriales Avanzados y Medicina Regenerativa, Programa de Bioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Escuela de Ingeniería Biomédica, ISIFC, Besançon, Francia

<sup>3</sup>Grupo de Investigación PECET, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Universidad de Antioquia, calle 67, No. 53-108. E-mail: juan.pavon@udea.edu.co

## RESUMEN

La ingeniería de tejidos (IT) requiere estructuras de soporte (*scaffolds*) que son fabricadas con materiales que favorecen la migración, adhesión, proliferación e incluso la diferenciación celular y además poseen ciertas propiedades mecánicas, morfológicas y de biodegradabilidad. Se describe la fabricación de *scaffolds* basados en polímeros biodegradables sintéticos y naturales, ácido poli L-láctico (PLLA) y quitosano, optimizando las condiciones de secado por congelación (liofilización). Después de la evaluación de varias rutas de procesamiento, los resultados obtenidos muestran que la técnica es adecuada para la obtención de materiales con características apropiadas para su aplicación en IT, debido a su gran similitud morfológica con la matriz sólida del cartílago y el hueso trabecular. La evaluación de citotoxicidad e interacción células/*scaffolds*, mostró una alta biocompatibilidad y aceptable biofuncionalidad de los *scaffolds* fabricados. Los *scaffolds* de PLLA presentan mayor resistencia mecánica, mientras los de quitosano son más flexibles con una mayor biocompatibilidad.

**Palabras clave:** Acido poli L- láctico, Quitosano, Andamio Polimérico.

Recibido: 19 de abril de 2014.

Aceptado: 16 de noviembre de 2014.

Received: April 19<sup>th</sup>, 2014.

Accepted: November 16<sup>th</sup>, 2014.

## PROCESSING, BIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND TESTS TO NATURAL AND SYNTHETIC POLYMER SCAFFOLDS FOR BONE AND CARTILAGINOUS TISSUE ENGINEERING

### ABSTRACT

*Tissue engineering (TE) practice requires supporting structures (scaffolds), which are made of materials that must help cells to improve their migration, adhesion, proliferation and even differentiation, besides having very specific mechanical, morphological and biodegradable properties. It is described how the scaffolds were fabricated using synthetic and natural biodegradable polymers, poly L-lactic acid (PLLA) and chitosan, as well as hybrids of these components, through optimization of freeze-drying (lyophilization) technique. After evaluation of several processing routes, the results have shown that freeze-drying technique is suitable for obtaining materials with appropriate chemical and morphological characteristics for TE applications. This technique allowed obtaining scaffolds for cartilage and bone TE thanks to their similitude to tissues solid matrix. Citotoxicity assays and cells/scaffolds interactions indicated that obtained scaffolds are highly biocompatible with a suitable biofunctionality. PLLA scaffolds exhibited a higher mechanical strength, whilst chitosan ones were more compliant with a higher biocompatibility.*

**Keywords:** Poly L-lactic acid, Chitosan, Polymeric Scaffolds.

## 1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de las propiedades de los tejidos asociadas a traumas y enfermedades, relacionadas o no con el envejecimiento, hace necesario el uso de materiales biomédicos para reparar o reemplazar dichos tejidos. La ingeniería de tejidos (IT) se ha convertido en los últimos años en una importante alternativa para superar las dificultades con las que se enfrentan los ortopedistas para tratar satisfactoriamente las enfermedades que afectan el hueso y el cartílago articular.

Estas enfermedades, degenerativas o traumáticas, son causa de discapacidad severa y afectan la calidad de vida de los pacientes, generando altos costos económicos y sociales. La alternativa de solución a través de IT surge en la década de los 70's como un área científica interdisciplinaria; su fundamento es el uso de células, manipulación del entorno extracelular y creación de sustitutos biológicos como matrices de estimulación y soporte (*scaffolds*), para su posterior implantación en el cuerpo reemplazando un tejido. En este orden de ideas, la IT se considera una solución potencial para reparar, reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido [1,2]. La IT y la medicina regenerativa (MR) son dos conceptos que están actualmente claramente relacionados. Mientras la IT está más relacionada con la implementación de métodos de ingeniería para la producción de nuevos tejidos, *In vitro* e *In Vivo*, a partir de diferentes fuentes celulares, la MR se aproxima un poco más al desarrollo de materiales destinados a estar en contacto con tejidos y órganos, con el propósito de producir su crecimiento y regeneración [3].

Los Institutos Nacionales Americanos de Salud, *The American National Institutes of Health (NIH)*, definen MR como un campo multidisciplinario de rápido crecimiento que involucra ciencias de la vida, físicas y de ingeniería, para desarrollar estructuras celulares funcionales, tejidos y órganos sustitutos, para reparar, reemplazar o mejorar la función biológica que se ha perdido debido a problemas congénitos, heridas, enfermedades o envejecimiento [4]. Simultáneamente, conceptos como diseños biomiméticos y bioinspirados han emergido recientemente basados en la construcción de materiales parcial o totalmente artificiales que imitan en una máxima extensión los tejidos que están reemplazando, interactuando activa y positivamente con sus células [5].

El éxito de un tejido obtenido a partir de la IT depende, en gran parte, de las propiedades de los materiales utilizados para la fabricación del scaffold y de sus características morfológicas. Además de las características físico-químicas del material, el comportamiento mecánico de la estructura y el área superficial al que tendrán acceso las células, también son factores importantes. Idealmente, un scaffold debe tener las características siguientes [1-3]: a) Tridimensional, altamente poroso y con una red de poros interconectados para favorecer el comportamiento y colonización de las células, al igual que el transporte de nutrientes; b) Biocompatible y biodegradable con una velocidad de degradación controlable para sincronizar el crecimiento del tejido con la resistencia mecánica; c) Tener una superficie químicamente apta para el acceso, migración, la adhesión, proliferación e incluso diferenciación de las células; y d) Poseer propiedades mecánicas similares a las del tejido huésped en el sitio de la implantación.

Una gran variedad de materiales han sido utilizados para la fabricación de scaffolds: cerámicos, polímeros (naturales y sintéticos) y sus combinaciones, e incluso espumas metálicas. En lo referente a la ingeniería de tejido cartilaginosa, los materiales más utilizados han sido de tipo polimérico, debido a su balance entre degradabilidad, resistencia mecánica y biocompatibilidad. Es así como el colágeno, ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLLA, PDLA), policaprolactonas (PCL), son materiales que cumplen con los requisitos necesarios para ser empleados en la reparación de tejido cartilaginosa [6-9]. En lo referente a la IT ósea, la utilización de biocerámicos biodegradables, bioactivos y biodegradables/bioactivos, se considera una alternativa importante para la fabricación de scaffolds [10]. Para esta aplicación, los materiales tradicionalmente más utilizados para el desarrollo de estructuras porosas tridimensionales han sido la hidroxiapatita, los vidrios bioactivos tipo Bioglass® [11] y los biodegradables [12], los poli (hidróxi-ácidos) y algunos polímeros de origen natural como el colágeno I y el quitosano. En muchos casos, las superficies de los materiales son modificadas con diferentes proteínas y factores de crecimiento óseo, biofuncionalización, que estimulan la respuesta celular y activan los genes responsables de la diferenciación celular y mineralización del tejido [13-15]. En cuanto a los polímeros que han sido empleados como scaffolds para reemplazo de hueso, dos de los más estudiados han sido el ácido

poliglicólico (PGA) y el ácido poliláctico (PLA). Las técnicas de fabricación para scaffolds dependen casi exclusivamente de las propiedades másicas y de superficie del material buscado, al igual que de la función propuesta para dicha aplicación. Sin embargo, el costo y el tiempo de fabricación deberán ser considerados para la viabilidad del tratamiento para el paciente. Algunas de las técnicas más utilizadas son: liofilización (secado por congelación), separación de fases inducida térmicamente, laminación por membranas, disolución y colada con lixiviación de partículas, tecnología de fluido supercrítico, moldeo por fusión, entre otras [16]. La técnica de secado por congelación (*Freeze-Drying*, liofilización) ha sido ampliamente utilizada tanto para eliminación del solvente, obteniendo una porosidad deseada para su aplicación en IT, como para la retención de dicha estructura. Esto a pesar de las limitaciones que presenta esta técnica, tales como el consumo de tiempo y energía, y el fenómeno de "piel superficial" consecuencia de la falta de control a temperaturas suficientemente bajas para evitar que la estructura porosa colapse por efecto de la tensión interfacial, debido a su baja rigidez, presentándose el fenómeno antes mencionado [16].

El objetivo fundamental de este trabajo es el procesamiento y la caracterización de scaffolds candidatos a ser aplicados en IT para cartílago y hueso articular, mediante diferentes rutas de fabricación, implementando la técnica de liofilización (*freeze-drying*) a partir del polímero sintético ácido poli L-láctico (PLLA) y de polímero natural de quitosano. Esta comunicación se presenta con la siguiente estructura: inicialmente se hace la descripción del material polimérico utilizado, de las técnicas de fabricación y de caracterización fisicoquímica, microestructural, mecánica y biológica con células óseas. Los resultados más relevantes relacionados con el procesamiento y las caracterizaciones de los scaffolds se presentan seguidamente y, finalmente, se exponen las conclusiones más destacables del trabajo.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales.

Uno de los polímeros utilizado para la fabricación de los scaffolds fue el ácido poli L-láctico (PLLA, polysciences, Warrington, PA, USA) de alto peso molecular (~80,000-100,000 Da), cuya presentación

es en forma de polvo blanco granulado. Para la disolución previa del polímero se utilizó un solvente orgánico no polar, cloruro de metileno (Panreac, USA). El otro polímero utilizado fue el quitosano (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI, USA) el cual se obtiene a partir de la caparazón de crustáceos y tiene una presentación en polvo de color blancuzco. Para su disolución, se utilizó ácido acético glacial (Panreac, USA) y como emulsificantes se utilizaron agua desionizada y una solución de ácido acético glacial 2%. Los scaffolds, PLLA, quitosano e híbridos entre los dos, se fabricaron mediante la técnica de liofilización (*freeze-drying*) [17]. Las condiciones de procesamiento se describen brevemente a continuación.

### 2.2. Fabricación de los scaffolds.

#### Liofilización 1

La Tabla 1 resume las condiciones de las diferentes rutas de liofilización. En la *Liofilización 1*, para llevar a cabo el secado por congelación de las diluciones de PLLA (5 % p/v en cloruro de metileno, diclorometano, DCM), la temperatura de la solución debe estar por encima de la correspondiente al nitrógeno líquido, para poder utilizarlo como medio efectivo de congelación. Teniendo en cuenta la baja temperatura de congelación del solvente utilizado, fue necesario fabricar una emulsión con agua, homogenizar lo mejor posible y congelar en el menor tiempo posible, para evitar la separación de fases.

Tabla 1. Resumen de las condiciones de liofilización para las diferentes rutas de obtención de los scaffolds de PLLA y de Quitosano.

Liofilizaciones	L1; LABCONCO-Lyph-Jack 6L modelo 77535	L2; LABCONCO-Freeze4.5	L3: PLLA y Quitosano; LABCONCO-Freeze4.5
Disolución (agitación magnética)	5% PLLA en DCM	5% PLLA en DCM	5% PLLA en DCM; 1% Quitosano en 2% CH <sub>3</sub> COOH, 24 h a 5°C.
Emulsificación (sonicador ultrasónico)	PLLA-DCM en H <sub>2</sub> O; 40%, 10 min.	PLLA-DCM en H <sub>2</sub> O; 40%, 10 min.	PLLA y Quitosano en H <sub>2</sub> O; 40%, 10 min;
Congelación instantánea	Inmersión en N <sub>2</sub> líquido, 2 min.	Inmersión en N <sub>2</sub> líquido, 2 min.	Inmersión en N <sub>2</sub> líquido, 2 min.
Congelación	-80°C; 24 h.	-80°C; 24 h.	-80°C; 24 h.
Secado por congelación	-40°C a -12°C; 48 h.	-40°C; 24 h.	-40°C; 24 h.
Secado final en estufa	60°C; 72 h.	60°C; 72 h.	60°C; 72 h.

En este orden de ideas, se prepararon varias emulsiones de 25 ml, agregando agua y homogenizando con la ayuda de un ultrasonido con 40 kHz, durante 10 minutos (Fisher Scientific Sonicator, FSH30H); posteriormente, se utilizó el nitrógeno líquido por 2 minutos, manteniendo las muestras a -40°C, para garantizar la estabilidad de la congelación.

Finalmente, se llevó a cabo el proceso de liofilización utilizando el equipo LABCONCO- Lyph-lock 6L modelo 77535, durante 2 días, tiempo en el cual las muestras permanecieron totalmente congeladas, a temperaturas variables desde -40°C a -12°C.

#### *Liofilización 2*

Con el propósito de tener parámetros de comparación con otro equipo de liofilización, se decidió llevar a cabo el secado de las muestras de PLLA (misma concentración del proceso anterior) utilizando un equipo en el cual las condiciones eran más flexibles. Para ello, se practicó la misma secuencia de preparación de muestras como se indicó en el proceso anterior, para luego realizar el proceso de liofilización utilizando esta vez el equipo LABCONCO-FreeZone 4.5, durante 1 día, tiempo en el cual las muestras permanecieron totalmente congeladas, a una temperatura de -40°C.

#### *Liofilización 3*

Se desarrollaron 5 etapas, similares a las anteriores pero optimizadas, para fabricar de manera aislada scaffolds de PLLA y de quitosano: disolución del polímero, emulsificación, congelación, liofilización y secado. El PLLA se disolvió en cloruro de metileno (diclorometano, DCM) en una concentración 10 % (p/v). Esta disolución se lleva a cabo con un agitador magnético, la cual luego se conserva refrigerada durante 24 h. Es importante que el recipiente permanezca bien cerrado para evitar la volatilización del DCM. Para lograr la emulsificación, la disolución del PLLA en DCM se mezcla con agua (40% de solución de PLLA y 60% de agua destilada) y dicha mezcla se somete a sonicación 40% amplitud, 10 min, para lograr la emulsión (Ultrasonic Processor, Cole Parmer). La congelación de las muestras se realizó inicialmente en nitrógeno líquido a -120°C, durante 2 min, para luego llevarlas en un congelador a -80°C, 24 h. La liofilización de las muestras se realizó en un equipo LABCONCO-FreeZone con 4 frascos individuales, durante 24 h a una temperatura de -40°C.

Finalmente, las muestras liofilizadas fueron secadas en estufa a 60°C durante 72 h. Posteriormente, utilizando las mismas etapas de esta ruta de fabricación, se implementaron algunas modificaciones para obtener nuevas muestras de scaffolds de PLLA: se disminuyó la amplitud y tiempo de sonicación (20%, 5 min); estos cambios se deben a las tendencias en los resultados observado. Luego, se pasó directamente de nitrógeno líquido a liofilización. En una siguiente fase, teniendo en cuenta los resultados previos de esta ruta de *Liofilización 3*, se llevaron a cabo algunas adaptaciones del protocolo: minimizar la evaporación del solvente disolviendo directamente en tubo Falcon, emulsificación directa en los recipientes pequeños con sonicación inmediata en baño de maría (10% amplitud, 10 min); algunas muestras sometidas a nitrógeno líquido, congelación, liofilización, mientras otras pasaron del nitrógeno directamente al liofilizador.

Para la fabricación de los scaffolds de quitosano, éste se disolvió al 1% (p/v) en una solución de ácido acético (2%), utilizando agitador magnético durante 2 h, en ambiente de laboratorio; las disoluciones fueron conservadas en tubos Falcón, durante 24 h a 5°C. Para la homogenización de las disoluciones, éstas fueron sonicadas con 40% amplitud, 10 min. La congelación de las muestras se llevó a cabo de la misma manera antes descrita para el PLLA: nitrógeno líquido a -120°C, durante 2 min, para luego llevarlas en un congelador a -80°C, 24 h. La liofilización de las muestras de quitosano fue la misma descrita para el PLLA: equipo LABCONCO-FreeZone con 4 frascos individuales, durante 24 h a una temperatura de -40°C. Finalmente, las muestras liofilizadas fueron secadas en estufa a 60°C durante 72 h.

La fabricación de los scaffold de quitosano también fue sometida a ciertas variaciones sobre la base de la misma ruta antes descrita: para una primera variante se cambió la concentración inicial de quitosano (1 % p/v a 2 % p/v) en una solución de ácido acético (1% de concentración); en la segunda variante se mantuvo el 2 % (p/v) de quitosano, se omitió la sonicación y la congelación en nitrógeno líquido, manteniendo el resto de condiciones de liofilización y secado.

### **2.3. Caracterización microestructural de los scaffolds.**

Antes del análisis, tanto por microscopía electrónica de barrido (SEM), como por espectrometría de

energía dispersa (EDS), las muestras de los diferentes scaffolds fueron cortadas a las dimensiones adecuadas para el equipo y posteriormente metalizadas con una capa delgada de oro depositada al vacío en un metalizador DESK II. El equipo para el análisis SEM-EDS utilizado fue un JEOL JSM 5910 LV con un voltaje de 15 kV. En ambos análisis, SEM y EDS, se realizaron evaluaciones, tanto en la zona superficial, como en un corte transversal, para observar la composición química y estructura de las muestras obtenidas. Las mediciones de porosidad de los scaffold se realizaron a través de un protocolo de análisis de imágenes usando el software Image J 1.47 Version (National Institutes of Health, USA). Posteriormente, la herramienta binaria del software se utilizó para procesar las imágenes a una escala de colores negro y blanco. Finalmente, la medición de porosidad se obtuvo a través de la opción "Analizar Partículas", con la cual los espacios en blanco fueron cuantificados.

#### 2.4. Ensayos mecánicos de compresión.

Las propiedades elasto-plásticas de los scaffolds fabricados fueron evaluadas mediante ensayos uniaxiales de compresión sobre las muestras cilíndricas. Para ello, se empleó una máquina electro-mecánica universal de ensayos (DIGIMESS, USA), con una velocidad de la deformación de 5mm/min, límite en el desplazamiento de 50% y carga máxima de 500 N.

#### 2.3. Ensayos biológicos *in vitro*.

Para los ensayos de citotoxicidad y morfología celular, se emplearon diferentes líneas celulares, debido a la potencial de los materiales utilizados para diferentes aplicaciones de I.T. Dichas líneas se utilizaron con el protocolo conocido como MTT para la citocompatibilidad, descrito por Denizot y col. [18] y adaptado por Echeverry y col. [19]. En una primera sesión de ensayos, las muestras de scaffolds obtenidos fueron cortadas y esterilizadas en autoclave a 120°C. Para los ensayos de citotoxicidad, en los pozos de cultivo se sembraron células U2OS en monocapa, línea celular de osteoblastos proveniente de sarcoma de hueso y que crecen en medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB. También se sembraron Macrófagos Peritoneales de Hámster que crecen en medio RPMI suplementado con 10 % de SFB. Después se adicionaron 20 µl del medio de cultivo a cada pozo y se incubaron los cultivos a 37°C. Pasadas las 72 horas de cultivo, se le

adicionó MTT a cada pozo de cultivo, 20 µl a los pozos con células U2OS y 40µl a los pozos cultivados con los macrófagos; se incubó por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán. Se adicionó luego, una solución de parada, 10 % de dodecil sulfato de sodio (Fisher) y 50% de isopropanol, y se dejaron en reposo los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán se disolvieron por aproximadamente 30 min. Posteriormente se realizó la lectura de densidad óptica (DO) con un espectrofotómetro (Benchmark, Biorad) a una longitud de onda de 570 nm. En una segunda sesión de ensayos, se empleó la línea celular osteoblástica humana SAOS-2 (ATCC, EE.UU) y una línea de macrófagos humanos U937 (ATCC, EE.UU). Las células de la línea SAOS-2 fueron cultivadas en botellas de cultivo y puestas a crecer 72 h antes del ensayo, en incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo fue preparado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 90% de medio McCoy (Sigma-Aldrich).

Las células de la línea celular U937 fueron cultivadas en medio RPMI en una botella de cultivo, centrifugadas a 1.300 rpm durante 10min; luego se recuperó el precipitado y se contaron las células, adicionando una suspensión celular de 50.000 cel/ml, e incubando a 37°C por 72 h. Las pruebas de citotoxicidad y de morfología celular, se basaron en el mismo protocolo antes descrito. Cada muestra volumétrica de los scaffolds se sembró en una suspensión celular de 500.000 células/ml, que se incubaron 37°C por 72 h. La viabilidad celular se determinó mediante el método MTT, siguiendo el mismo procedimiento antes expuesto. Las muestras sembradas se llevaron a la incubadora a 37°C por 72 h. Cumplido este tiempo, los osteoblastos se fijaron sobre el material usando glutaraldehído al 2 % y dejándolo actuar durante 12 h a una temperatura de 4°C. Se prepararon concentraciones de etanol en *Buffer Phosphate Saline*, BPS, del 30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%, para la deshidratación celular. Finalmente, se llevó al secado a punto crítico, se metalizaron con oro y fueron observadas por medio de un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM-6490LV).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Procesamiento de las muestras.

##### *Scaffolds de PLLA, liofilización 1*

Inicialmente, se buscaba determinar la viabilidad técnica y estructural de la ruta liofilización 1. Los residuos sólidos obtenidos después del proceso de liofilización 1 presentaron una división en dos estructuras diferentes (Fig. 1): en la parte superior se aprecia un residuo tipo lámina, mientras en el fondo se observa una especie de espuma delgada, por falta de emulsificación. Estos resultados son consistentes con las dificultades reportadas en trabajos previos [2].

##### *Scaffolds de PLLA, liofilización 2*

Nuevamente, con esta sesión se buscaba determinar la viabilidad técnica y estructural de la ruta liofilización 2. En la Fig. 1 se presenta el aspecto macroscópico de las muestras obtenidas a partir del proceso de liofilización 2: el aspecto de los residuos secos obtenidos es muy similar a los observados a partir de la evaporación del solvente en placas Petri. Estos resultados parecen indicar que el secado se aproxima parcialmente al proceso de evaporación del solvente.

##### *Scaffolds de PLLA, liofilización 3*

Una vez observadas las limitaciones de las rutas 1 y 2, se buscaba implementar y validar nuevas variantes. Los scaffolds de PLLA obtenidos a partir de la sesión 1, por esta ruta de liofilización 3, presentaron problemas de homogeneidad debido a una mala sonicación reflejada en una evaporación parcial del DCM, y en la estratificación de las fases. Estos inconvenientes permitieron que las muestras poco homogéneas se tradujeran en residuos secos poco densos e irregulares, mientras que las muestras más densas permitieron obtener residuos secos cilíndricos y homogéneos similares a los reportados en la literatura [17]. Para la sesión 2, liofilización 3, se apreciaron resultados similares a los de la sesión 1, con algunas mejoras poco relevantes. De esta manera sólo los residuos secos de mayor concentración presentan una tendencia a liofilizar con una geometría cilíndrica y con cierta homogeneidad; este es un hallazgo inicial importante, no reportado hasta ahora en la literatura. En la sesión 3, liofilización 3, la variación en la sonicación consistió en llevarla a cabo directamente al interior de los recipientes pequeños que posteriormente serían congelados y liofilizados.

##### *Scaffolds de Quitosano, liofilización 3*

Las variantes implementadas a esta ruta de liofilización para quitosano arrojaron importantes mejoras en el aspecto de los residuos secos. La variación de concentración de quitosano (1% a 2%), pasando directamente del nitrógeno líquido al liofilizador, permitieron eliminar casi totalmente los problemas de división bifásica observada inicialmente (Fig. 2a). Esto se convierte en otro aporte metodológico importante, el cual no aparece en los trabajos anteriores sobre scaffolds de quitosano obtenidos por liofilización [20].

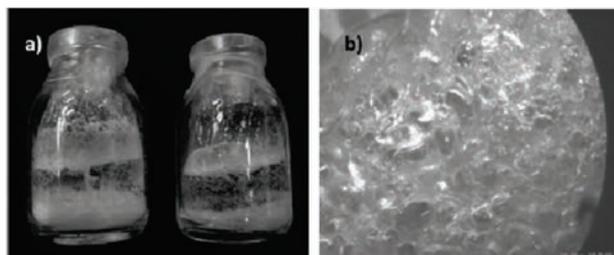


Fig.1. Muestras de 5% p/v de PLLA sometidas al proceso de liofilización 1 (b) y liofilización 2 (a).

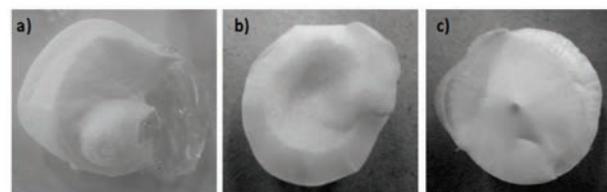


Fig.2. Muestras de quitosano obtenidas del proceso de liofilización 3: a) Concentración de 1%, congelación previa a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; b) Concentración de 1%, sin congelación previa a  $-80^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno a liofilizador, directamente); c) Concentración de 2% (nitrógeno a liofilizador, directamente).

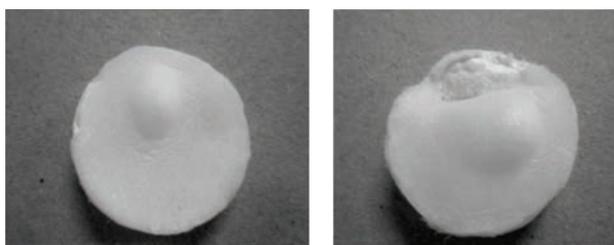


Fig.3. Muestras de quitosano obtenidas del proceso de liofilización 3: Concentración de 1%, sin congelación previa a  $-80^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno a liofilizador, directamente).

La última variante implementada para la fabricación de estos scaffolds de quitosano por liofilización, consistió en mantener la mínima concentración,

pero esta vez con una sola muestra por recipiente del liofilizador. Con esto último se buscaba hacer más eficiente la eliminación del solvente durante la liofilización, sin la existencia de obstáculos asociados a la presencia de un excesivo número de muestras por recipiente del liofilizador.

### 3.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de los scaffolds.

#### *Scaffolds de PLLA*

El residuo seco obtenido en el fondo del recipiente sometido a liofilización 1 (Figs. 1 y 4) ha presentado interesantes características como candidato a scaffold para IT de cartílago articular, ya que posee una estructura flexible con una elevada porosidad altamente interconectada. Sin embargo, es evidente la necesidad de mejorar propiedades mecánicas como rigidez y resistencia, sólo a partir de la inspección visual. Para ello, se requiere la optimización del proceso de liofilización y evaluación del efecto de otros polímeros, sintéticos y naturales, que permitan mejorar las propiedades mecánicas antes mencionadas. También se deben considerar otros emulsificantes más eficientes a través de los cuales se logre un residuo seco homogéneo. Cabe destacar la gran similitud que presenta la Fig. 4 con scaffolds poliméricos para cartílago obtenidos en trabajos anteriores, con excelentes resultados de comportamiento celular [21-24]. La estructura del scaffold obtenido a partir de las condiciones de liofilización 2 está asociada a un sólido poroso de alta rigidez con poros muy grandes de poca interconectividad, como ya se ha reportado en la literatura [21-24].

En la Fig. 4 se puede apreciar la morfología interna de los scaffolds obtenidos por esta vía, ruta de liofilización 3. En ella se ve que la estructura porosa 3D e interconectada es muy similar a la obtenida en el proceso de liofilización 1, con una diferencia fundamental en la estabilidad estructural como se evidenció a partir del análisis macroscópico. El mejoramiento en las características de los scaffolds obtenidos por esta ruta es una consecuencia directa de la mejor homogenización debida a una mejor emulsificación; a pesar de esto, la persistente separación de fases y baja estabilidad estructural sugieren la necesidad de implementar mejoramientos en la técnica. Los resultados obtenidos con el protocolo de liofilización 3, adaptado para los scaffolds de quitosano y analizados por SEM, confirmaron las ventajas

observadas a partir del análisis macroscópico. En la Fig. 5 se confirma como estos scaffolds de quitosano, que corresponden a las variables en la Tabla 1, presentan una porosidad de diámetro medio adecuado (93.8% de porosidad; diámetro de poros:  $254 \pm 4.1 \mu\text{m}$ ), uniformemente distribuida, altamente interconectada y con la tridimensionalidad requerida, según lo que se acepta de trabajos anteriores [21-24].

### 3.3. Ensayos mecánicos de compresión uniaxial.

#### *Scaffolds de PLLA vs. Scaffolds de quitosano*

A pesar de la baja estabilidad estructural de los scaffolds de PLLA a escala macro, en la Fig. 6 se aprecia como los de mayor concentración (10% p/v) presentan claramente una mayor rigidez y resistencia mecánica. En el mismo sentido, dicha tendencia se ve penalizada por su elevada fragilidad. Este comportamiento mecánico permite esperar que, en principio, el PLLA obtenido por liofilización en este trabajo sea mejor candidato para scaffolds de IT óseo, aunque su baja ductilidad lo compromete para dicha aplicación.

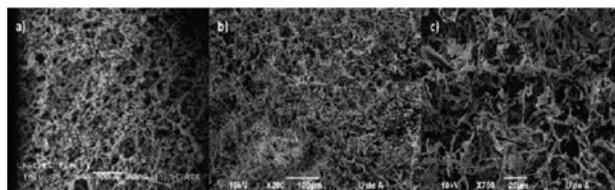


Fig. 4. Micrografía SEM del residuo seco obtenido a partir del proceso de liofilización 1 de la muestra con 5% p/v de PLLA (a, escala de  $200 \mu\text{m}$ ) y a partir del proceso de liofilización 3 (b y c) de la muestra con alto contenido de PLLA (mayor a 10 % p/v).

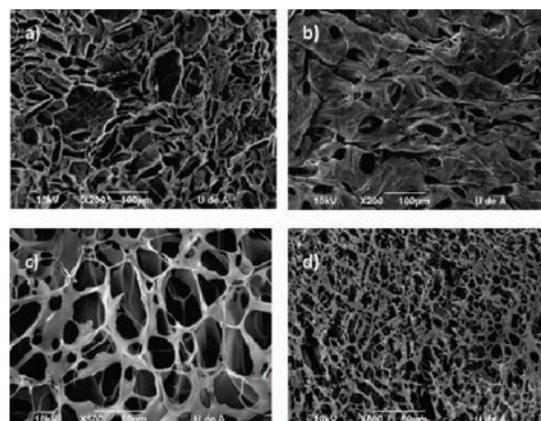


Fig.5. Micrografía SEM de scaffolds de quitosano obtenidos mediante la liofilización 3 (Tabla 1): concentración de 2 % p/v, en diferentes zonas del scaffold (a y b vistas superiores; c y d vistas internas).

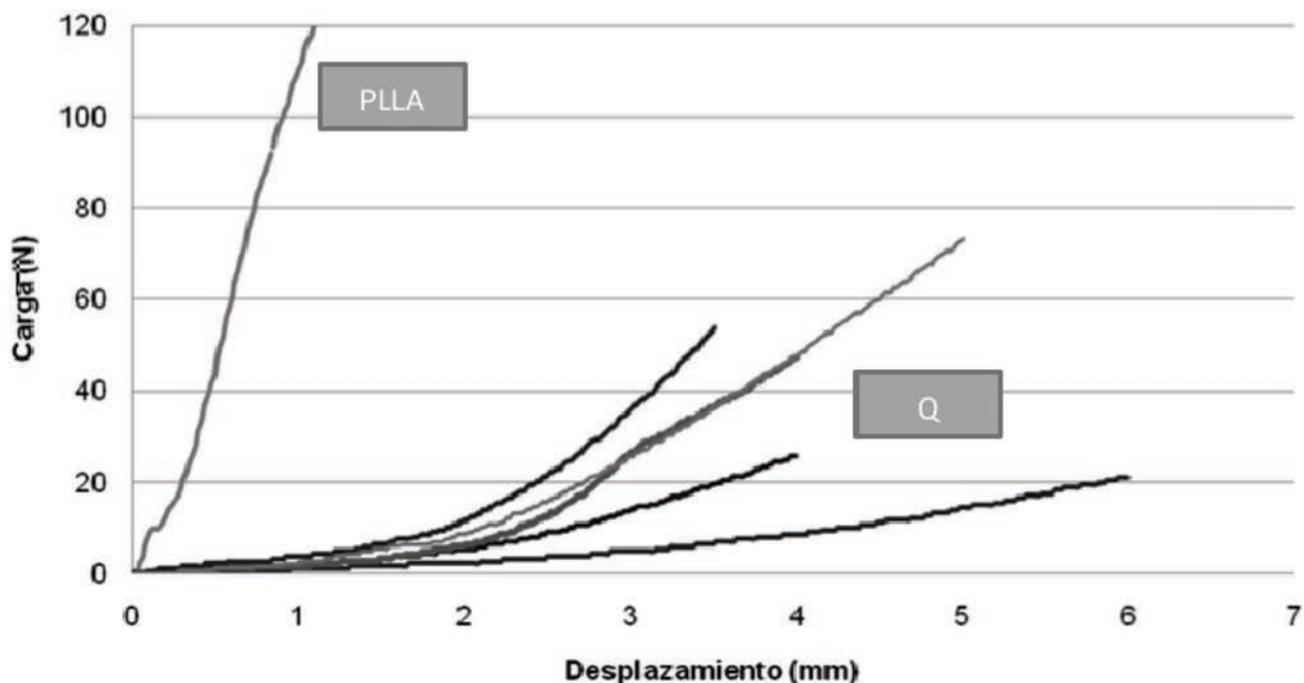


Fig.6. Ensayos de compresión sobre los scaffolds de PLLA y de quitosano. Las curvas designadas con la letra Q, denotan la realización de 5 ensayos de compresión al mismo tipo de muestras de quitosano.

Por otro lado, la respuesta mecánica de las muestras de scaffolds de quitosano presentan regímenes de deformación bastante cercanos a la idealidad para la IT de cartilago [20]: gran flexibilidad y ductilidad; inicialmente elástico no lineal y luego elástico lineal. Al comparar estos scaffolds con la respuesta mecánica de un cartilago nativo [6], es evidente la coherencia de este con la respuesta a compresión de las muestras de quitosano. Por tanto, desde el punto de vista de la teoría de compuestos, estos resultados de compresión sugieren la fabricación de scaffolds híbridos, PLLA + quitosano, para equilibrar propiedades de cara a la IT óseo como ya lo han demostrado diversos autores [25], y que hace parte de otra publicación de los autores [26].

### 3.4. Ensayos biológicos *in vitro*.

#### Citotoxicidad de los scaffolds

El porcentaje de citotoxicidad de las distintas muestras fue calculado de acuerdo a la expresión matemática:

$$\%CV = \left( \frac{AC - AM}{AC} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde % CV es el porcentaje de células vivas, AC es la absorbancia de control y AM es la absorbancia de la muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de células muertas en el ensayo (Tabla 2) para las muestras de PLLA obtenidas con los procesos de liofilización 1 y 2. El promedio de las longitudes de onda emitidas por lo pozos, sólo con presencia de células y del medio es 1,06 nm; el promedio de las longitudes de onda emitidas por lo pozos, sólo con el medio es 0,69 nm (longitud de onda del medio).

Tabla 2. Resultados de la viabilidad y mortalidad de las células U2OS\* y las células macrófagos peritoneales de Hámster en los scaffolds de PLLA\*\*.

Muestras	Longitud de onda de las muestras (a)	Longitud de onda de las muestras (b)	Promedio	% Células vivas	% Células muertas
PLLA (1)*	0.71 nm	2.34 nm	0.1 nm	5.05	94.95
PLLA (2)*	0.61 nm	1.01 nm	0.81 nm	32.58	67.42
PLLA (1)**	0.99 nm	0.29 nm	0.29 nm	74.78	25.22
PLLA (2)**	0.29 nm	0.3 nm	0.30 nm	83.37	16.63

Tabla 3. Resultados de citotoxicidad presentando el porcentaje de células vivas de Saos-2 y U937. El control corresponde a las células cultivadas en pozo de cultivo. El blanco corresponde al medio citotóxico, preparado según lo descrito en la metodología.

Línea Celular	U937		Saos-2	
	Ensayo	Replica	Ensayo	Replica
<b>Control</b>	100%	100%	100%	100%
<b>Blanco</b>	0%	0%	0%	0%
<b>Scaffolds de PLLA</b>	9%	82%	22%	58%
<b>Scaffolds de Q</b>	126%	228%	710%	241%

Para calcular el % de viabilidad de cada pozo de la placa de cultivo, se aplica la ecuación (1). Los datos de las longitudes de onda que se alejan mucho del valor 1,06 nm no se tienen en cuenta, ya que demuestran que en ese pozo hay un mayor crecimiento celular.

Analizando los resultados de los porcentajes de viabilidad (ver Tabla 2) se infiere que entre el 70% y el 80 % de los macrófagos sobreviven en los materiales analizados. La diferente viabilidad observada entre las células de osteosarcoma y los macrófagos puede estar asociada a que cada una de estas líneas puede responder de manera diferente a un sólido poroso biocompatible y polimérico [19]. Esto debe ser verificado en un estudio futuro. Adicionalmente, se debe tener presente que estos materiales son para uso en IT y que la citotoxicidad que deben presentar debe ser nula, correspondiente a un porcentaje de viabilidad cercano al 95 % ó mayor. Para explicar estos resultados de aparente citotoxicidad se debe tener en cuenta que estos polímeros (PLLA) son materiales de biocompatibilidad garantizada por las casas proveedoras.

Otro factor importante es la elevada interconectividad de los poros la cual permite que las células sedimenten en el fondo del recipiente.. En lo que respecta a la citotoxicidad de los scaffolds de PLLA procedentes de la liofilización 3, en la Tabla 3 se resumen los resultados en porcentaje de células vivas. Como puede apreciarse, hay una dificultad de interpretación evidente por las diferencias entre ensayo y replica. Los valores correspondientes a los scaffolds de

quitosano, superiores a 100%, pueden ser la consecuencia de una degradación parcial del material.

*Interacción células/scaffolds*

En la Fig. 7 se observan osteoblastos de la línea SaOS-2 con diferentes niveles de actividad y adhesión. Se evidencia el diferente comportamiento celular con respecto a los scaffolds fabricados con cada biopolímero: sobre el PLLA se aprecia que las células no forman una monocapa compacta y poseen morfologías aplanadas, con escasos filipodios (prolongaciones citoplasmáticas de pequeño diámetro) y poca actividad dorsal. Aunque estas muestras son biocompatibles, su estímulo al comportamiento biológico es suficiente para una buena adhesión de los osteoblastos sobre el PLLA [21-24]. La poca adhesión celular sobre el PLLA observada en la Fig. 7 es una primera validación de la importancia del material en el comportamiento celular en contacto con los scaffolds.

En la Fig. 7 se aprecian las morfologías celulares de osteoblastos cultivados sobre los scaffolds de quitosano. Las imágenes evidencian la diferencia en la formación de una compacta monocapa de células, contrario a lo observado sobre los scaffolds de PLLA. Aunque en algunas zonas se distingue una morfología similar a los osteoblastos sobre el PLLA, las células exhiben un íntimo contacto con el material, a pesar de presentar poca actividad dorsal.

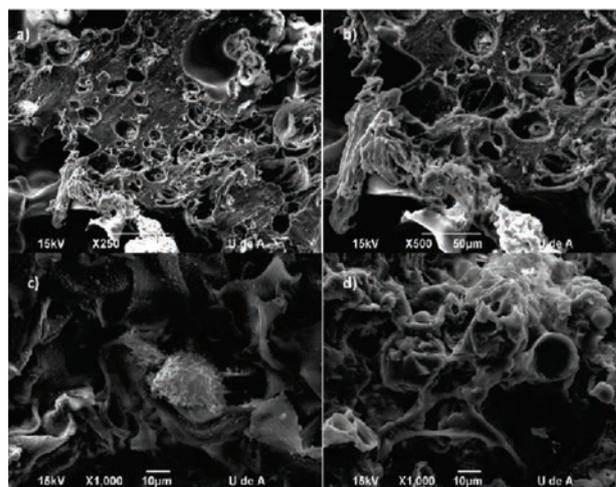


Fig. 7. Comportamiento de los osteoblastos (SaOS-2) en contacto con scaffolds de PLLA (a y b) y en contacto con scaffolds de quitosano (c y d).

Para la muestra con mayor concentración de quitosano, es posible observar morfologías más compactas, algunas de ellas con pocos filipodios y una actividad dorsal limitada, en íntimo contacto con el scaffold; otras presentan algunas extensiones citoplasmáticas (filipodios y lamelipodios), en contacto con células vecinas.

#### 4. CONCLUSIONES

1. La evaluación morfológica, mecánica y biológica de los scaffolds de PLLA y de quitosano, ha permitido destacar los siguientes aspectos relevantes:

Las iteraciones del proceso de liofilización para la fabricación de scaffolds de PLLA y quitosano para IT de cartílago y hueso nos permitieron optimizar las condiciones de procesamiento para garantizar la reproducibilidad de sólidos cilíndricos tridimensionales, con buena distribución de porosidad, interconectada, de diámetros adecuados para IT, con la estabilidad estructural requerida. Una vez optimizadas las condiciones de procesamiento asociadas a la liofilización, el quitosano ha mostrado las mejores características para la aplicación en IT.

2. El estudio de las propiedades mecánicas elasto-plásticas a compresión uniaxial de ambos tipos de scaffolds poliméricos ha mostrado dos tendencias claramente opuestas, pero que pueden ser complementarias de cara a la fabricación de scaffolds híbridos; los productos cilíndricos obtenidos de PLLA muestran mayor rigidez y resistencia mecánica, con mayor fragilidad asociada, siendo más adecuado para reemplazo de hueso. Por otro lado, las muestras de quitosano presentaron una respuesta más de tipo elástico-no lineal, con baja resistencia mecánica e hiper-elasticidad.

3. El comportamiento biológico de ambos scaffolds poliméricos, en cuanto a citocompatibilidad e interacción célula/material, muestran el potencial que ambos tienen para ser utilizados en IT, como se ha reportado ampliamente en la literatura. Sin embargo, es destacable el mayor estímulo que produce el scaffold de quitosano, expresado en el mayor contacto íntimo células/scaffolds, adhesión, e interacción global a través de un mayor número de filipodios y lamelipodios, con los diferentes tipos de líneas celulares humanas estudiadas.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren expresar sus agradecimientos al CODI de la Universidad de Antioquia por la financiación de este trabajo según código MC-07-01.

#### 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Park, J. B., *Biomaterials: principles and applications*, Bronzino, J. (Ed.), CRC Press, Estados Unidos, 2003.

[2] Dietmar, W. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues — state of the art and future perspectives, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12,107–124, 2001.

[3] Planell, J.A., Navarro, M., Altankov, G., Aparicio, C., Engel, E., Gil, J. En: *Advances in Regenerative Medicine: Role of Nanotechnology and Engineering Principles* (Eds. Ginebra, M.P., Lacroix, D., Lacroix, Shastri V.P., et al.), Chapter 12, *Materials Surface Effects on Biological Interactions*, pp. 233, Springer, The Netherlands, 2007.

[4] Biggs, J.P., Geoff R., R., Dalby, M.J., *Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6, 619–633, 2010.

[5] Deligianni, D. D., Katsala, N. D., Koutsoukos, P. G. & Missirlis, Y. F., *Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength*. *Biomaterials*, 22, 1, (Jan 2001) 87-96, ISSN0142-9612.

[6] Dai, W., Kawazoe, N., Dong, J., Chen, G., *The influence of structural design of PLGA/collagen hybrid scaffolds in cartilage tissue engineering*, *Biomaterials*, 31, 2141–2152, 2010

[7] Sato, T., Chen, G., Ushida, T., Ishii, T., Ochiai, N., Tateishi, T., Tanaka, J. *Evaluation of PLLA-collagen hybrid sponge as a scaffold for cartilage tissue engineering*, *Materials Science and Engineering: C*, 24, 365 – 372, 2004.

[8] Cui, L., Wu, Y., Cen, L., Zhou, H., Yin, S., Liu, G., Liu, W., Cao, Y. *Repair of articular cartilage defect in non-weight bearing areas using adipose derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh*.

Biomaterials, 30, 2683–2693, 2009.

[9] Chen, G., Ushida, T., Tateishi, T. A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 51, 273-279, 2000.

[10] Hutmacher, D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-2543, 2000.

[11] Maquet, V., Boccaccini, A.R., Pravata, L., Notingher, I., Jerome, R. J. *Biomed. Mater. Res.*, 66A, 335-346, 2003.

[12] Navarro, M. Desarrollo y Caracterización de Materiales Biodegradables para Regeneración Ósea [PhD Thesis], Barcelona: Universitat Politècnica de Catalunya, 2005.

[13] López, A. Estudio del quitosano como biomaterial portador de rhBMP-2: desarrollo, caracterización y aplicabilidad en regeneración de tejido óseo [PhD Thesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2008.

[14] Fisher, J., Dickhut, A., Rickert, M., Richter, W., Human Articular Chondrocytes Secrete Parathyroid Hormone-Related Protein and Inhibit Hypertrophy of Mesenchymal Stem Cells in Coculture During Chondrogenesis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, 62, 2696–2706, 2010.

[15] Worster A., Nixon A., Brower-Toland B., Williams J. Effect of transforming growth factor beta1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells, *AM J VET RE*, 61,1003-1010, 2000.

[16] Törmälä P, Rokkanen P, Laiho J, Tammimäki M, Vainionpää S. Material for osteosynthesis devices. US Patent 4: 743 257 1988.

[17] Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J. Principles of tissue engineering. Elsevier Academic Press. 2007.

[18] Denizot, F., Lang, R. *J Immunol Methods* 89, 271, 1986.

[19] Echeverry, M. Evaluación de la oseointegración mediante ensayos biológicos de Ti c.p. y Ti6Al4V anodizados [MSc Thesis]. Medellín: Universidad de Antioquia, 2012.

[20] Tan, H., R. Chu, C., Payne, K. A., Marra, K.G., Injectable in situ forming biodegradable chitosan–hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 2499–2506, 2009.

[21] Hutmacher D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 21, 2529-2543, 2000.

[22] Langer, R., Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science*. 260, 920-6, 1993.

[23] Cao, Y., Vancanti, J.P., Paige, K.T., Upton, J., Vacanti, C.A. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineering cartilage in the shape of a human ear, *Plast Reconstr Surg*. 100, 297-302, 1997.

[24] Freed, L.E., Marquis, J.C., Nohria A., Emmanuel, J., Mikos, A.C., Langer, R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers, *J Biomed Mater Res*, 27, 11-23, 1993.

[25] Madihally, S., Matthew, H. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials* 20,1133-1142, 1999.

[26] Pavón, J., Pesquet, A., Echeverry, M., Robledo, S. Development of new chitosan scaffolds reinforced with PLLA micro and nanoparticles by directional freeze-drying for bone tissue engineering, *To be submitted*.