

UTILIZACIÓN DE SOPORTES DE HIDROGEL DE QUITOSANO OBTENIDOS A PARTIR DE DESECHOS DEL CAMARÓN LANGOSTINO (*Pleuroncodes planipes*) PARA EL CRECIMIENTO “in vitro” DE FIBROBLASTOS HUMANOS

Andrés Sánchez B¹, María Sibaja B², José Vega-Baudrit³, Miguel Rojas¹

1. Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica
2. Laboratorio de Polímeros-POLIUNA, Escuela de Química, Universidad Nacional, Apartado 86-3000 Heredia. Heredia, Costa Rica. Correo electrónico: maria.sibaja@gmail.com
3. Laboratorio de Nanotecnología-LANOTEC-CENAT, San José, Costa Rica

Recibido: 8 Enero 2007; Aceptado: Agosto de 2007

RESUMEN

Actualmente el uso de biomateriales para el tratamiento de heridas es un área de interés para los investigadores y personal médico, a tal punto que la ingeniería de tejidos busca soluciones mediante la utilización de estos productos en interesantes aplicaciones en cirugía y reparación de tejidos dañados.

El objetivo de esta investigación es la utilización de los desechos marinos provenientes del camarón langostino *Pleuroncodes planipes* con el fin de obtener un biomaterial que permita el crecimiento de fibroblastos humanos para agilizar la producción *in vitro* de piel humana. Este biomaterial está constituido de hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal.

De los resultados obtenidos se concluyó que los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glicoxal al 20% no son loas adecuados para el crecimiento de fibroblastos humanos, pues se disminuye la viabilidad celular. Asimismo, se concluyó que la proliferación celular en diferentes sustratos va a depender de la capacidad de adhesión de las células para lograr mantenerse viables.

Palabras clave: *desechos marinos, hidrogel, soportes, quitosano, biomaterial, biomedicina, fibroblastos.*

1. INTRODUCCIÓN

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha encontrado muchas aplicaciones, dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de drogas, gracias a sus excelentes propiedades mecánicas como a su baja tasa de biodegradación. Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular. Como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar

directamente el crecimiento celular. En muchas aplicaciones que involucran cultivo celular, se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento (*Roh y Kwon, 2002*).

Los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* que utilizan diferentes tipos de células sobre quitosano (o conjugados) han demostrado su excelente citocompatibilidad, las células se adhieren fuertemente y proliferan adecuadamente, por lo que se ha demostrado su capacidad para ser ósteo y neocondrogénico, además de soportar y modular el crecimiento y proliferación de células vasculares, neuronales, fibroblastos, células epiteliales o queratinocitos, además de osteoblastos y condriocitos (*Wang y Hon, 2003*).

Las unidades estructurales del quitosano (Figura 1), la glucosamina y la N-acetilglucosamina, están presentes en diferentes glicosaminoglicanos (GAG), los cuales son heteropolisacáridos lineales y aniónicos presentes en las matrices extracelulares de los tejidos humanos; normalmente los GAG se encuentran unidos covalentemente a proteínas centrales y forman los proteoglicanos, los cuales tienen la función de organizar y dar funcionamiento adecuado a la matriz extracelular (*Abram, 2004*). Debido a que el quitosano presenta un carácter catiónico puede mantener una carga positiva a pH ácido, confiriéndole la capacidad de interaccionar con las superficies celulares y proteínas plasmáticas, combinando interacciones específicas tipo GAG con otras inespecíficas asociadas a su carga.

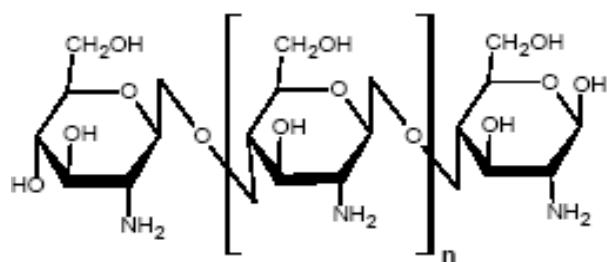


Figura 1. Estructura molecular del quitosano.

Investigaciones llevadas a cabo por *Saintigny et al. (1993)* los cuales utilizaron sustituyentes dérmicos obtenidos a partir de copolímeros de quitosano-colágeno, determinaron que la adición de quitosano aumenta la adhesión celular, favoreciendo la proliferación de fibroblastos y queratinocitos; sin causar respuesta inmune y permitiendo una vascularización y colonización adecuada de fibroblastos, obteniéndose así una matriz organizada con poca formación de granulación y tejido cicatrizado.

Estudios clínicos realizados por *Damour et al.* (1994) utilizando sustratos dérmicos de quitosano-colágeno-glicosaminoglicanos (GAG) mostraron resultados prometedores en tejidos quemados, sin presentar rechazo alguno en ratas y humanos. Este sustrato estimuló la vascularización y la colonización del tejido quemado por parte de los fibroblastos, los resultados in vitro como in vivo indicaron la formación de una epidermis continua y diferenciada la cual presentó adherencia con el área de la herida a los 15 días. Estos estudios se encuentran entre las aplicaciones más avanzadas utilizando quitosano como base estructural para la reparación de heridas y tejidos.

Para comprobar la afinidad de los fibroblastos con el quitosano *Chuang et al.* (1999) determinaron la interacción de la línea de fibroblastos L-929 con hidrogeles de quitosano-polivinil alcohol (PVA), los cuales favorecieron la adhesión y crecimiento celular in vitro, con una proliferación considerable y estimulación de la respuesta celular. Este estudio en conjunto con los mencionados anteriormente, ilustran que mediante la incorporación de aditivos químicos, las buenas propiedades de los hidrogeles de quitosano en presencia de fibroblastos pueden ser suprimidas o favorecidas dependiendo del aditivo utilizado.

Los hidrogeles presentan numerosas aplicaciones biológicas, médicas y tecnológicas. Dentro de las aplicaciones más importantes se encuentran liberación controlada de drogas y la ingeniería de tejidos, esta última mantiene una tendencia a la utilización de soportes a partir de hidrogeles poliméricos para la reparación y regeneración de una gran variedad de tejidos y órganos (*Rojas et al.* 2004, *Sánchez et al.*, 2007). Son estructuras tridimensionales hinchadas en presencia de agua o de fluidos biológicos (*Berger et al.* 2004; *Swami*, 2004). Algunos materiales cuando se colocan en medios líquidos, tienen la capacidad de hincharse y retener cierto volumen del medio acuoso absorbido en su red tridimensional. Actualmente se utilizan materiales tanto de origen natural (de plantas y animales) así como materiales sintéticos.

Los hidrogeles presentan una desventaja por su baja resistencia mecánica, comparada con otra clase de soportes obtenidos mediante técnicas diferentes para ser utilizados en ingeniería de tejidos. Es por eso que se tienden a entrecruzar las cadenas poliméricas de su estructura con agentes tales como formaldehído, compuestos epóxicos, dialdehídos (glutaraldehido y gioxal) y almidón (*Rohindra et al.*, 2005); de los cuales el más utilizado e investigado corresponde al glutaraldehido (*Gonçalves et al.*, 2005; *Ma et al.*, 2003; *Silva et al.*, 2004)

En los hidrogeles entrecruzados las cadenas poliméricas se encuentran unidas entre sí por medio del agente entrecruzante, lo que conlleva a la formación de una red tridimensional. Las propiedades de los hidrogeles dependen principalmente de la densidad o grado de entrecruzamiento, denominado como la relación de moles del agente con los moles de las unidades repetitivas del polímero. Entre más pequeño sea el tamaño del entrecruzante, más rápido se da la reacción de entrecruzamiento (*Rohindra et al.*, 2005).

Los hidrogeles como soportes para ingeniería de tejidos, actúan como guía para el desarrollo de tejidos *in vitro* e *in vivo*, los polímeros utilizados para la fabricación de los soportes deben asemejar las matrices extracelulares presentes en los tejidos; es por esta razón que los hidrogeles han sido sumamente investigados para este tipo de aplicación, específicamente para reemplazo de tejido blando ya que los hidrogeles presentan la capacidad de retener agua en su estructura polimérica al igual que retienen proteínas bioactivas.

Los hidrogeles usados en ingeniería de tejidos presentan poros, los cuales tienen la funcionalidad de permitir que las células vivas se acomoden adecuadamente o se diseñan para que se disuelvan o degraden, liberando factores de crecimiento y por ende creando poros en los cuales las células puedan penetrar y proliferar.

Las ventajas que presentan los hidrogeles es su capacidad de brindar un ambiente favorable para las proteínas, la capacidad de moldearse en diferentes formas y su alta biocompatibilidad; sin embargo presentan limitaciones como baja resistencia mecánica y dificultad para esterilizar.

Los hidrogeles al igual que otro tipo de soporte deben de cumplir ciertos criterios para ser utilizados en ingeniería de tejidos, los cuales se mencionan a continuación:

- Habilidad para restaurar la regeneración normal de tejido
- Facilidad en diseño, modificación y manipulación
- No tóxico y que interaccione específicamente con las células
- Fácil de esterilizar
- Que tenga una mínima respuesta inmune e inflamatoria
- Fácil de escalar el proceso de obtención del soporte
- Propiedades físico-químicas deseables
- Adecuada difusión de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento

- Permeabilidad macromolecular
- Variación espacial en la morfología porosa
- Modo de degradación del hidrogel

Específicamente, los hidrogeles obtenidos a partir de quitosano presentan una buena biocompatibilidad, baja degradación y un procesamiento sumamente fácil; la capacidad de estos hidrogeles de hincharse y deshidratarse depende de la composición y medio en el cual se obtuvo el gel (*Abram*, 2004).

El objetivo general de este trabajo es comprobar la efectividad del hidrogel de quitosano, con una porosidad determinada, en el crecimiento de fibroblastos humanos. Las condiciones del preparación de los soportes de hidrogel de quitosano fueron establecidas anteriormente (*Sánchez et al.* 2007).

Los fibroblastos son el principal tipo de célula presente en la dermis y es el encargado de producir fibras colágenas, reticulares y elásticas, y de la síntesis de los glicosaminoglicanos, glucoproteínas y ácido hialurónico de la sustancia intercelular amorfía.

Las proteínas de adhesión (presentes en la matriz) son las que cumplen una de las funciones principales de la dermis, de unirse a las células epidermales y servir para la migración y replicación de las mismas. Además de producir colágeno (tipo I) y elastina; tiene a cargo producir fibronectina, la cual sirve como señal para la preparación del tejido en el proceso de recuperación de una herida (*Demling et al.*, 1999).

Debido a que los fibroblastos tienen una función crítica en el proceso de reparación de tejido, han sido utilizados como modelos celulares por muchas razones. Contribuyen en la reparación del tejido debido a que producen la mayoría de las proteínas estructurales de las cuales carece el tejido dañado; además de que favorecen la contracción de la herida y la reorganización de la matriz extracelular. Adicionalmente los fibroblastos son las células de mamíferos más fáciles de cultivar (*Katalinich*, 1997).

Actualmente los fibroblastos son utilizados para la evaluación de biomateriales en ingeniería de tejidos, gracias a la utilización de líneas celulares aisladas de cualquier parte del cuerpo humano, las cuales tienen la capacidad de permanecer cultivadas por largos períodos de tiempo. Otra característica que presentan estas células es que son dependientes de soporte para su crecimiento; estudios indican que este tipo de células tienen preferencia por superficies catiónicas como la del quitosano; y por los iones Ca^{+2} presentes en el suero bovino fetal (SBF) y

en el medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) entre otros, permitiendo la adhesión a estas películas u otras con características químicas diferentes.

La importancia de esta investigación se basa en la utilización de un soporte de hidrogel de quitosano, obtenido a partir de materiales considerados como desechos marinos, para lograr una mayor eficiencia en la producción de células epidérmicas. Asimismo, brindar información acerca de las características del crecimiento de los fibroblastos en condiciones diferentes a las tradicionalmente mantenidas en el laboratorio, lo cual se podría evidenciar en mejores resultados de viabilidad y crecimiento celular.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materias primas. La quitina técnica se obtuvo según la metodología descrita por *Madrigal* (2003). Se llevó a cabo un proceso de descarnado mecánico del camarón langostino, seguido por una desmineralización con HCl 10% m/v por una hora, a temperatura ambiente, el producto se lavó con agua hasta neutralidad y se secó en una estufa de aire circulante a 60-70 °C por 24 horas.

El quitosano, obtenido a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes*, fue proporcionado por el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) de Costa Rica. En un reactor de vidrio, se colocó una relación 1:10 de quitina técnica e hidróxido de sodio 50% m/v. Se calentó a 120°C por una hora, con agitación constante (*Blair* et al., 1987). Posteriormente el producto se lavó con agua hasta pH neutro y se secó en una estufa de aire circulante VWR 1300 FD a 75°C por 24 horas. Finalmente, se disminuyó el tamaño de partículas del quitosano obtenido en un molino *Hammer Mill* con una rejilla de 1 mm de diámetro.

Para purificar el quitosano, se siguió la metodología propuesta por *Esquivel* (2005), para lo cual se colocó en un reactor de vidrio una relación 1:20 de quitosano grado técnico y ácido acético al 2% v/v. La solución se agitó mecánicamente a velocidad constante de 25 rpm. Posteriormente se filtró al vacío con una bomba KNF *Laboport*. La solución filtrada se colocó en un erlenmeyer y se agregaron 300 mL de hidróxido de sodio al 25% m/m; se agitó mecánicamente por una hora con agitación constante. Se filtró y se le hicieron lavados con agua hasta pH neutro. Al sólido se le agregaron 250 mL de etanol al 95% y se dejó en reposo por tres horas. Finalmente, se filtró y se secó a temperatura ambiente por 24 horas.

2.2. Caracterización del quitosano. El quitosano obtenido fue caracterizado mediante la determinación del porcentaje de material soluble en ácido acético, la determinación del grado de acetilación mediante análisis termogravimétrico (TGA), la determinación de la masa molecular viscosimétrica (M_v). Los resultados obtenidos se muestran en publicaciones previas (Sánchez et al. 2007).

2.3. Obtención de los hidrogeles de quitosano. El procedimiento de entrecruzamiento de hidrogeles de quitosano se realizó por inmersión de la película en soluciones comerciales de agentes entrecruzantes según lo propuesto por Chen et al. (2005). Se utilizó gioxal al 20% (CHO-CHO). Se dejó reaccionar por 24 horas en un sistema de vidrios prensados que contenían la solución respectiva. Posteriormente, se eliminó el agente entrecruzante del sistema y se agregó etanol por 10 minutos para eliminar el exceso del reactivo del hidrogel. Se eliminó el etanol y se sustituyó por glicina 0,1 mol/L por 5 minutos para neutralizar los grupos aldehídos que no reaccionaron. Por último se hicieron tres lavados con agua destilada. Finalmente, se procedió a secar los hidrogeles en una estufa de aire circulante a 55 °C por 24 horas, hasta peso constante.

2.4. Caracterización de hidrogeles de quitosano. Se realizaron pruebas de absorción de agua, la determinación de material soluble, microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis termogravimétricos (TGA). Los resultados obtenidos se muestran en publicaciones previas (Sánchez et al. 2007).

2.5. Crecimiento de fibroblastos humanos.

2.5.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos: Los fibroblastos humanos se obtuvieron a partir de un tejido de descarte de biopsia cutánea proporcionado por el Servicio de Dermatología del Hospital Nacional de Niños de Costa Rica, y se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Sigma) suplementado con HAM's F12 en relación 3:1, con glutamina (200 mM Invitrogen Corporation) y antibiótico (1.000 U/mL penicilina y 10.000 µg/mL estreptomicina, Invitrogen Corporation) al 1% y suero fetal bovino al 10%, se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5 % en una humedad relativa del 94%.

2.5.2. Subcultivos de los fibroblastos: Para tal fin se agregó 4 mL de tripsina/EDTA (Sigma Cell Culture) a los frascos de cultivo de 25 cm² y se agitó suavemente para desprender los fibroblastos. A continuación se agregó 6 mL de medio DMEM/HAM's F12 para neutralizar la tripsina, para posteriormente tomar 5 mL y traspasarlos a otro frasco de cultivo. Cuando el

medio de cultivo DMEM/HAM's F12 se tornó de color amarillo por la actividad metabólica de los fibroblastos, se cambió por medio de cultivo nuevo precalentado a 37°C cada 7 días.

2.5.3. Soportes de quitosano: Se obtuvieron siguiendo la metodología propuesta en el apartado 2.3, las dimensiones del hidrogel corresponden a 15 mm de diámetro con un grosor de 0,02 mm. Se esterilizaron en cápsulas *Petri* con etanol al 70% por una hora en la cámara de flujo laminar (Hsu et al., 2004) para luego llevar a cabo el crecimiento celular.

2.5.4. Crecimiento en hidrogeles de quitosano: Se compararon los resultados de la viabilidad celular de fibroblastos crecidos en una placa de 24 pozos con hidrogel de quitosano y sin él (control positivo). Se determinó la confluencia celular visualmente, por medio de un microscopio invertido. Antes de cultivar los fibroblastos, se incubaron los soportes en suero fetal bovino (SFB) por 24 horas para cubrir el soporte con proteínas celulares esenciales y facilitar la adhesión celular.

2.5.4.1. Proliferación celular y prueba de viabilidad celular: Los fibroblastos se incubaron por 3 y 7 días, se inocularon a una densidad de $5,5 \times 10^4$ células/pozo. Las pruebas se llevaron a cabo en seis pozos para cada tiempo de incubación a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5%; se controló que el medio de cultivo cubriera por completo al hidrogel de quitosano.

Después del tiempo de incubación, a cada uno de los pozos se le realizó el conteo celular siguiendo el procedimiento propuesto por *Worthington Biochemical Corporation* (2005). Se eliminó el medio de cultivo DMEM/HAM's F12 y se agregó 0,2 mL de tripsina/EDTA para desprender los fibroblastos. Se agregó 0,4 mL de medio para neutralizar la tripsina. Posteriormente, se traspasó el medio a un tubo *Eppendorf*, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y se resuspendieron las células en 200 µL de medio DMEM/HAM's F12.

De los tubos *Eppendorf* se tomó 10 µL de la suspensión celular y se realizó un conteo total de células en un hematocitometro. Se contaron las células presentes en cuatro cuadrantes para obtener un promedio. Se llevó a cabo por duplicado para determinar la proliferación celular a los 3 y 7 días de incubación. Para los pozos incubados por 7 días, después de realizar el conteo, se le agregó 10 µL de eosina azul para teñir los fibroblastos y se dejó por 5 minutos en reposo, para proceder a contar las células viables y no viables (*Worthington Biochemical Corporation*, 2005), con el fin de determinar el efecto del soporte de quitosano en el crecimiento celular.

Se procedió a realizar una prueba de hipótesis para promedios por tratamiento (con y sin hidrogel) y por tiempo de incubación para los conteos de fibroblastos, con un grado de confianza del 95%.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Crecimiento de fibroblastos humanos.

3.1.1. Mantenimiento de fibroblastos humanos: Se utilizó un medio de cultivo que cumpliera con las exigencias nutritivas de los fibroblastos. El medio DMEM/HAM's F12 ha sido utilizado para crecimiento de células embriogénicas, adipositos y queratinocitos entre otros (Davis, 2002), indicando que es un medio de cultivo que satisface las demandas nutritivas de diferentes tipos celulares. El medio de cultivo provee un pH y un ambiente esencial para la supervivencia celular y multiplicación, además de proveer sustancias químicas complejas requeridas por las células las cuales no pueden ser sintetizadas (Davis, 2002). Aparte de la composición nutritiva del medio basal (DMEM/HAM's F12), por lo general se le agregan otros suplementos que satisfacen requerimientos celulares más complejos y permiten el crecimiento en el medio tales como glutamina, suero bovino, entre otros.

Así, se observó que todos los 6 frascos de cultivo de 25 cm², presentaron una confluencia celular del 100%. Los fibroblastos se mostraron alargados, entrelazados y muy aglutinados cubriendo toda la superficie del frasco (Figura 2).

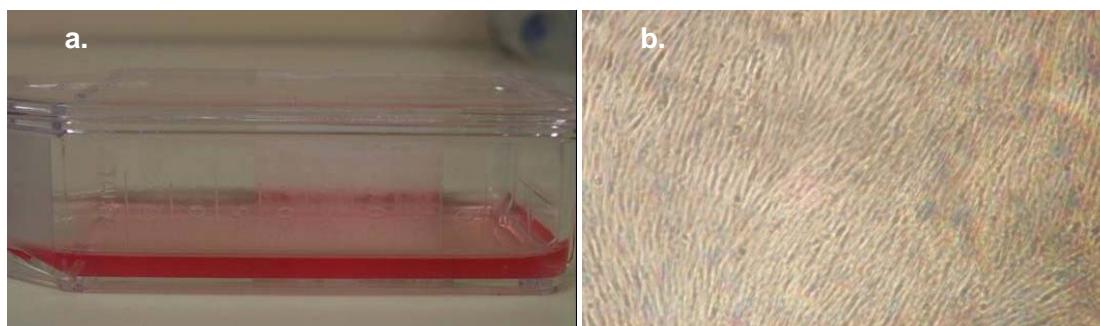


Figura 2. Crecimiento de fibroblastos humanos en medio de cultivo DMEM/HAM's F12 suplementado con glutamina, antibiótico y 10% de suero fetal bovino: a) frasco de cultivo 25 cm², b) confluencia celular de fibroblastos humanos (aumento 10x).

3.1.2. Crecimiento en hidrogeles de quitosano: Debido a que la placa de cultivo celular cuenta con 24 pozos, a 12 de los pozos se les colocó el hidrogel de quitosano entrecruzado con glioal al 20%, y los otros 12 pozos restantes se utilizaron como controles positivos (sin

hidrogel). Cuando se agregó el medio de cultivo conteniendo los fibroblastos a cada uno de los pozos, el color del medio se mantuvo rojo (Figura 3.a), después de tres días de incubación el color pasó a ser rosado para ambos tratamientos analizados (Figura 3.b).

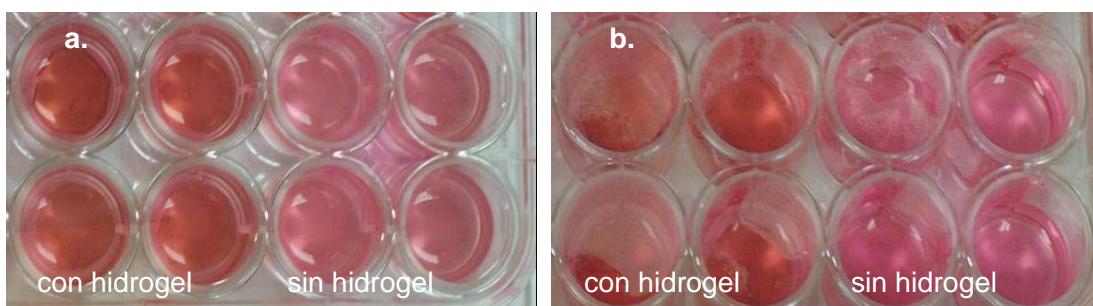


Figura 3. Crecimiento en placa de cultivo celular de 24 pozos: a) inicio del crecimiento en placa con hidrogel y sin hidrogel, b) tiempo de incubación de 3 días.

Mediante la observación de los pozos de la placa de cultivo celular con el microscopio invertido, se determinó que los fibroblastos se adhirieron al fondo después de un día de incubación a 37°C (Figura 4). Esto se debe a que los fibroblastos producen y liberan colágeno tipo I, el cual es característico del tejido conectivo; esto les permite empezar con el proceso de división celular para incrementar el número de células colocadas inicialmente en cada pozo, hasta lograr un crecimiento máximo que se refleja en un 100% de confluencia. Una vez que las células han establecido su matriz extracelular, la proliferación celular toma lugar para empezar el crecimiento exponencial en los sustratos utilizados, estos resultados concuerdan con estudios previos llevados a cabo por Gutshe et al. (1994) que indican que después de 24 horas de cultivo, los fibroblastos han producido suficientes proteínas de la matriz extracelular para continuar el crecimiento.

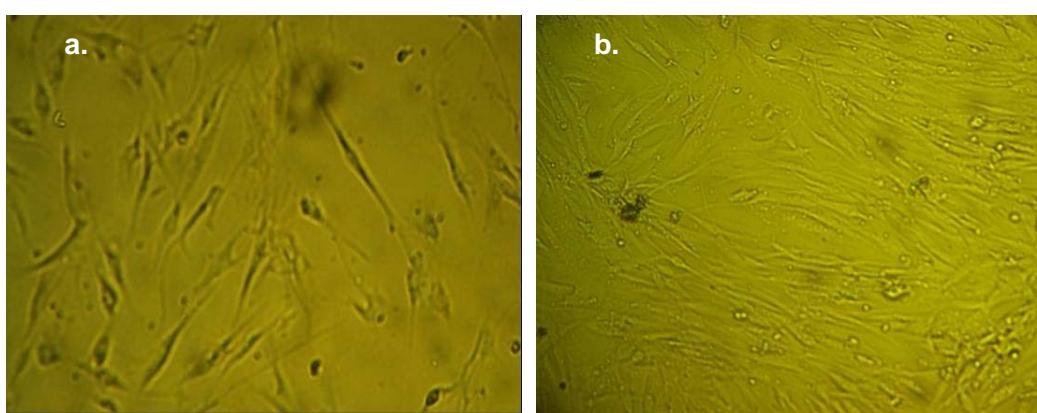


Figura 4. Fibroblastos en placa de cultivo celular de 24 pozos sin hidrogel de quitosano: a) tiempo de incubación de un día, b) tiempo de incubación de 3 días (aumento 10x).

La confluencia celular se determinó únicamente para los pozos utilizados como controles, puesto que para los pozos que presentaban el soporte no fue posible observar los fibroblastos, debido a que el color del hidrogel resultó ser café claro lo que impidió el paso del rayo de luz en el microscopio invertido (Tabla 1).

Tabla 1. Confluencia celular de los pozos utilizados como control positivo.

Pozo	Tiempo de incubación (días)	
	3	7
1, 2, 3, 4	60% de confluencia, los fibroblastos presentaron forma normal y alargada con una sola dirección	
5, 6	75% de confluencia, se observó fibroblastos largos	
7, 8	80% de confluencia, con superposición de fibroblastos los cuales se tienden a aglutinar	
9, 10, 11	85% de confluencia, con crecimiento desordenado y presencia de agregados celulares de la suspensión celular	Todos los pozos presentaban un 100% de confluencia, con fibroblastos que abarcaron toda la superficie del pozo, se presentó aglutinación y entrelazamiento o superposición de fibroblastos
12	90% de confluencia, se observa una conformación de red y aglutinación de fibroblastos, con posible presencia de agregados celulares	

En la Figura 5 se observan los resultados de la prueba proliferación celular de fibroblastos sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% y sin hidrogel (controles positivos). Se obtuvo una reducción en el número de células colocadas inicialmente para los pozos que presentaban hidrogel, con valores de $1,9 \cdot 10^4$ y $1,6 \cdot 10^4$ células/pozo para los tiempos de incubación a los 3 y 7 días respectivamente. Mientras que en los controles se observó un incremento en el número de células colocadas, con valores de $2,3 \cdot 10^5$ y $2,8 \cdot 10^5$ células/pozo respectivamente, en comparación con los hidrogeles de quitosano. En los pozos con hidrogel de quitosano y sin hidrogel existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos, con un valor de t_c de 3,85 y 4,58 para los tiempos de incubación a los 3 y 7 días respectivamente (con un probabilidad del 0,05 y con 10 grados de libertad).

Si se comparan los datos obtenidos de proliferación celular sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20%, resultaron ser bajos comparados con los obtenidos por Katalinich (1997), en el cual se fabricó un soporte de quitosano en dos dimensiones por medio

de la técnica de evaporación del disolvente, utilizando tres concentraciones de quitosano diferentes y las cuales favorecieron el crecimiento de la línea de fibroblastos NIH-3T3, a pesar de que los valores obtenidos resultaron menores que el crecimiento en los controles (sin soporte). Si se comparan los resultados de proliferación obtenidos por *Katalinich*, se observa que para las concentraciones de quitosano de 0,5, 1,5 y 3%, a los cuatro días de incubación el número de células aumentó con respecto del inoculado inicialmente, evidenciando que el soporte de quitosano no resultó tóxico, contrario a lo obtenido en esta investigación en la que a los 7 días de incubación la cantidad de células disminuyó notablemente con respecto de la cantidad de células inoculadas inicialmente.

La disminución obtenida en la cantidad de fibroblastos colocados inicialmente, se puede deber en parte a la posible toxicidad del hidrogel; sin embargo no se puede hacer mucha referencia a esta toxicidad puesto que no se tiene certeza del efecto del hidrogel sobre los fibroblastos, con lo que se mencionaran ciertos criterios que pudieron afectar el aumento en el número de células colocadas inicialmente.

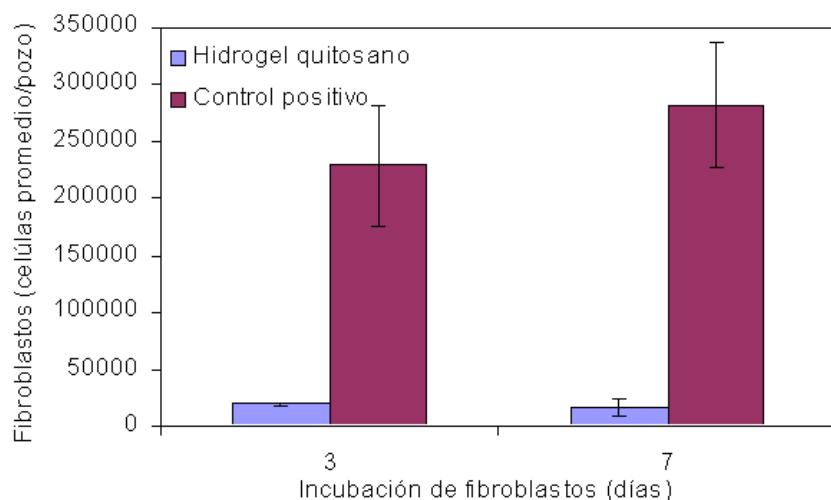


Figura 5. Proliferación celular de fibroblastos humanos sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioal al 20% y sin hidrogel (control).

En el caso del hidrogel de quitosano este cumple con ciertos criterios para la utilización en ingeniería de tejidos, pero hay ciertos aspectos que no satisface con base en los resultados obtenidos. Un criterio que debe cumplir el hidrogel es que la superficie sea heterogénea y porosa (*Roh y Kwon, 2002*), aspecto necesario para la adecuada proliferación de células debido a que los poros permiten que las células vivas se acomoden o adhieran adecuadamente para la

consiguiente proliferación. Sin embargo como menciona *Tan et al.* (2001) los soportes utilizados en ingeniería de tejidos deben presentar poros con dimensiones mayores a las 10 μm para permitir la adecuada migración e interacción celular; sin que exista interferencia con la difusión de nutrientes, hormonas o metabolitos dentro de la matriz para proveer nutrimento y así iniciar la respuesta celular.

Con respecto de la prueba de viabilidad celular, se obtuvo un mayor porcentaje para las células crecidas sin hidrogel con un valor del 78,9% en comparación con las células crecidas sobre el quitosano con un 63,05% de viabilidad (Figura 6), sin embargo, no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos.

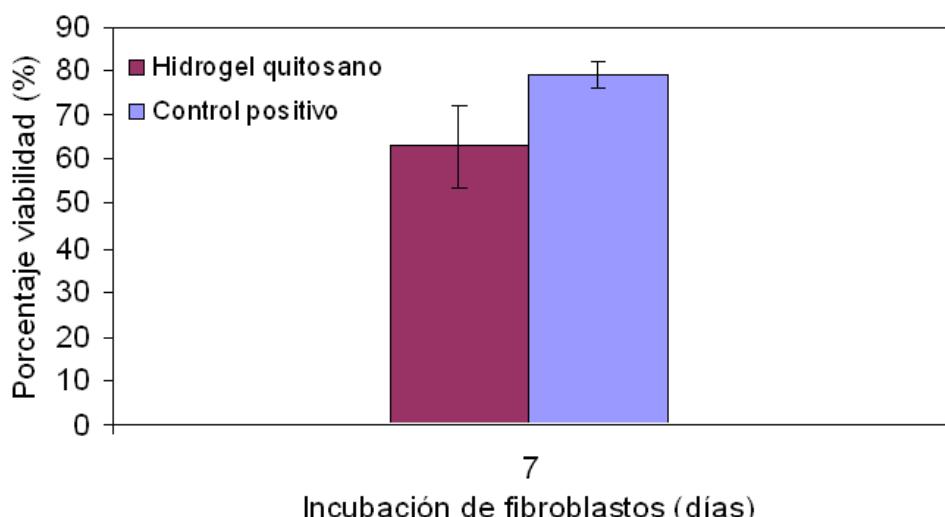


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular de fibroblastos humanos a los 7 días de incubación sobre hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% y sin hidrogel (control).

Debido a los resultados negativos obtenidos del crecimiento de los fibroblastos en los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal, se logró determinar una reducción en la viabilidad celular comparado con los controles utilizados; es evidente que después de 7 días de incubación aún existen células viables, o sea que no absorbieron la eosina azul debido a que presentan su membrana intacta, sin embargo la cantidad es baja si se compara con los controles utilizados. Estas células viables pueden ser aquellas que lograron adherirse al hidrogel y por consiguiente proliferar, o incluso aquellas en las que el hidrogel no presentó un efecto adverso. Se debe tomar en cuenta que la técnica de conteo celular puede influir en los resultados presentados anteriormente, puesto que para el crecimiento en hidrogeles de quitosano se obtuvo

una baja proliferación y una baja viabilidad, lo que supone una mala disociación de las células del soporte así como daño celular por la utilización de la tripsina en exceso o muy concentrada.

La mayoría de los criterios analizados se relacionan con la capacidad de los fibroblastos de adherirse al hidrogel de quitosano, ya que según varias teorías entre más rápido se adhieren las células en cultivo, es más probable que estas permanezcan viables y puedan proliferar (Katalinich, 1997). Debido a que la adhesión no se pudo determinar mediante la observación al microscopio invertido esto podría explicar el hecho del porque se obtuvo tan baja proliferación celular. Por ende es necesario optimizar los soportes para que las células se puedan adherir con el fin de obtener comportamientos de proliferación adecuados, conforme las células se preparan para esta fase.

4. CONCLUSIONES

El quitosano obtenido a partir del camarón langostino *Pleuroncodes planipes*, permitió obtener hidrogeles de quitosano entrecruzados con agentes difuncionales que presentan características físicas y químicas acorde a lo expuesto por diferentes investigadores, sin embargo ciertos criterios requeridos para el crecimiento de células en soportes de quitosano no se cumplieron, con lo que se obtuvo una disminución en la cantidad de células colocadas inicialmente. Así, se concluyó que los hidrogeles de quitosano entrecruzados con glioxal al 20% son tóxicos para el crecimiento de fibroblastos humanos, disminuyendo la viabilidad celular. Asimismo, se concluyó que la proliferación celular en diferentes sustratos va a depender de la capacidad de adhesión de las células para lograr mantenerse viables.

Se recomienda realizar un estudio acerca de la influencia del grado de desacetilación del quitosano de langostino en la proliferación y adhesión celular optimizar el método de determinación de viabilidad celular por medio de la prueba con MTT, así como pruebas de adhesión y proliferación celular. Asimismo, utilizar agentes entrecruzantes que no sean químicos y tóxicos o aplicar otra técnica convencional en la obtención de soportes para ingeniería de tejidos. Finalmente, se recomienda emplear otros biomateriales y técnicas de ingeniería de tejidos para lograr el máximo crecimiento celular de fibroblastos sobre soportes poliméricos.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abram, AP “*Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*”, Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, (2004).

2. Berger, J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R, *Eur. J. Pharmac. & Biopharmac.*, **57**, 29 (2004)
3. Blair H, Guthrie J, Law TK, Turkington P, *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 641 (1987)
4. Chen K, Ku Y, Lee CL, Lin HR, Lin FH, Chen TM, *Materials Science & Engineering*, **25(4)**, 472 (2005)
- Chuang W, Young TH, Yao CH, Chiu WY, *Biomaterials*, **20**, 1479 (1999)
- Davis JM “*Basic Cell Culture, Practical Approach*”, Oxford University Press, 2^a edición, (2002)
- Davis MH, Dunkley P, Harden RM, Harding K, Laidlaw J, Morris A, Wood R “*The Wound Program*”, traducido por Neus Falguera Aleu y Jardo Junca Piera, Centre for Medical Education, University of Dundee, Scotland, (1994)
- Demling RH, Desanti L, Orgill DP “*The use of skin substitutes*”.
<http://www.burnsurgery.org/Betaweb/Modules/skinsubstitutes/sec13.htm> (2005)
- Damour O, Gueugniaud PY, Berthin-Maghit P, Rouselle P, Berthod F, Sahuc F, Collumbel C, *Clinical Materials*, **15**, 273 (1994)
- Esquivel M “*Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del camarón Pleuroncodes planipes*”. Tesis Lic. Química Industrial. Universidad Nacional, Costa Rica (2005)
- Gonçalves VL, Laranjiera MC, Fávere VT, *Polímeros: Ciéncia e Tecnologia*, **15(1)**, 6 (2005)
- Gutshe AT, Parsons-Wingerter P, Chand D, Saltzman WM, Leong KW, *Biotechnology & Bioengineering*, **43**, 801 (1994)
- Hsu S, Whu SW, Tsai CL, Wu YH, Chen HC, Hsieh KH, *J. Polym. Research*, **11**, 141 (2004)
- Katalinich M “*Characterization of chitosan films for cell culture applications*”, Thesis MSc in Chemical Engineering, University of Colorado, 1997
- Liu H, Mao J, Yao K, Yang G, Cui L, Cao YJ, *Biomater. Sci. Polymer*, **15(1)**, 25 (2004)
- Ma L, Gao C, Mao Z, Shen J, Hu X, Han C, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **(14)8**, 861 (2003)
- Madrigal S “*Obtención de quitosano a partir del camarón langostino Pleuroncodes planipes y valoración de sus propiedades farmacéuticas*”. Tesis Licenciatura de Química Industrial. Universidad Nacional, Costa Rica, 2004
- Roh IR, Kwon IC, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **13(7)**, 769 (2002)
- Rohindra D, Nand AV, Khurma JR “*Swelling properties of chitosan hydrogels*”, 2005
- Rojas O, Moya M, Sibaja M, Ruepert C, Vega-Baudrit JR, *Rev. Iberoam. Polím.*, **5(3)**, 133 (2004)

- Saintigny G, Bomard M, Darnour O, Collombell C, *Acta Derm. Venereol.*, **73**, 175 (1993)
- Sánchez A, Sibaja M, Vega-Baudrit J, Rojas Miguel, *Rev. Iberoam. Polím.*, en revisión (2007)
- Silva RM, Silva GA, Coutinho OP, Mano JF, Reis RL, *J. Materials Science: Materials in Medicine*, **15**, 1105 (2004).
- Swami SN “*Radiation Synthesis of polymeric hydrogels for swelling controlled drug release studies*”, Thesis Ph.D., University of Western Sydney, 2004
- Wang JW, Hon MH, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **14**(2), 119 (2003)
- WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION, Cell Isolation Techniques.
<http://www.tissuedissociation.com/techniques.html>. Lakewood. NJ (2005)