

FABRICACIÓN DE APÓSITO TISULAR CUTÁNEO: MEMBRANAS
ULTRAFINAS Y BIOCAMPATIBLES DE QUITOSANO

CUTANEOUS TISSUE DRESSING MANUFACTURE: ULTRATHIN
MEMBRANES AND BIOCAMPATIBLE OF CHITOSAN

Rojas-Infantas, L.¹, Bello A.1, González, G.² y Noris-Suárez, K.¹

¹ Laboratorio Bioingeniería de Tejidos-USB, Departamento de Biología Celular,
Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.

² Laboratorio de Ciencia e Ingeniería de Materiales, Departamento de Ingeniería,
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)

^{PhD} Lola Del Carmen Rojas Infantas. Universidad Simón Bolívar. Sartenejas, Estado
Miranda. Caracas. Venezuela

lrojas@uct.edu.pe

+51 969602247

Fuente de apoyo financiero: Proyecto en Red – FONACIT No. G-2007001522 y el
proyecto LOCTI-USB No. 50-2066.5172-07

5 figuras, 3184 palabras

RESUMEN

El Quitosano es un polisacárido natural biodegradable y que no es tóxico. Se obtiene de la desacetilación del polisacárido, quitina. El Quitosano ha sido ampliamente reportado como un material biocompatible, hemostático, mucoadhesivo, impulsa la absorción de numerosos compuestos biológicos y presenta actividad antimicrobiana, entre otras propiedades. Todas estas cualidades hacen que sea un material interesante para utilizarlo en la regeneración de tejidos como dermis, epidermis, cornea, etc. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de matrices porosas poliméricas fabricadas a partir de materiales compuestos de quitosano, entrecruzada con polietilenglicol (PEG) de diferente espesor (de 2, 3 y 5 mm y ultrafinas) y la evaluación de su biocompatibilidad mediante el empleo de diferentes modelos *in vitro*, fibroblastos obtenidos de una lipectomia abdominal y células madre mesenquimales (CMM) derivadas de gelatina de Wharton. Los resultados confirman la biocompatibilidad (adhesión y proliferación celular) con ambos modelos celulares. En conclusión, las membranas desarrolladas pueden ser empleadas como andamios biocompatibles en la fabricación de sustitutos dermo-epidérmicos y otras potenciales aplicaciones.

Palabras clave: Membranas de quitosano; Ingeniería de tejidos; Modelos *in vitro* y Biocompatibilidad.

ABSTRACT

Chitosan is a natural polysaccharide that is biodegradable and is not toxic. Is obtained from the deacetylation of the polysaccharide, chitin. Chitosan has been widely reported as a biocompatible, haemostatic, mucoadhesive material, promotes the absorption of numerous biological compounds and presents antimicrobial activity, among other properties. All these qualities make it an interesting material to be used in the regeneration of tissues such as dermis, epidermis, cornea, etc. The objective of the present work was the development of polymeric porous matrices, manufactured from chitosan composites, crosslinked with polyethylene glycol (PEG) of different thickness (2, 3 and 5 mm and ultrafine) and the evaluation of its biocompatibility by using of different *in vitro* models like fibroblasts obtained from an abdominal lipectomy and mesenchymal stem cells (CMM) derived from Wharton's gelatin. The results confirm the biocompatibility

(adhesion and cell proliferation) with both cellular models. In conclusion, the developed membranes can be used as biocompatible scaffolds in the manufacture of dermo-epidermal substitutes and other potential applications.

Keywords: Chitosan membranes; Tissue engineering; In vitro models and Biocompatibility.

INTRODUCCIÓN

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinario que aplica los principios de la biología y de la ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan y mejoren la función tisular basándose en el uso combinado de tres elementos: biomateriales, células y andamios para reparar tejidos lesionados o enfermos [1]. En los últimos años, el quitosano ha surgido como un material de gran interés para diferentes desarrollos en el área de ingeniería de tejidos [2][3]. Este es un polímero natural que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, que es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza y forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos [2]. El Quitosano es un polisacárido lineal compuesto de cadenas aleatoriamente distribuidas de β -(1-4) D- glucosalina (unidades deacetiladas) y N-acetil-d-glucosamina (unidad acetilada) [4].

El grado o porcentaje de deacetilación (DA) del quitosano está en el rango de 60-100 % y se puede determinar por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR). El grupo amino del Quitosano tiene un valor pKa cercano a los 6,5 y por esta razón, el quitosano posee una ligera carga positiva, por lo que es soluble en medios ácidos o en soluciones neutras con dependencia de carga del pH y del valor %DA; es decir, el quitosano es un material bioadhesivo que puede unirse negativamente a las superficies de cargas negativas tales como las membranas mucosas. Es por ello que debido a esta propiedad, el quitosano permite el transporte de compuestos químicos, comportándose como un dosificador de los mismos, a través de las superficies epiteliales y que además de ser biocompatible, es biodegradable ya que puede ser hidrolizado por lisozimas presentes en los fluidos corporales [4] [5] [6].

Los hidrogeles a base de quitosano, pueden presentar poros que permiten a las células distribuirse adecuadamente y puedan proliferar, más aún, cuando se combina con hidrogeles de fibrina cuyos microporos permite la comunicación de factores de nutrición y de crecimiento entre las dos capas [7]. Adicionalmente los hidrogeles de quitosano son biomateriales que por sus propiedades mecánicas y elásticas se amoldan a cualquier tipo de superficie y ello los convierte en un material con amplias aplicaciones potenciales.

El objetivo del presente trabajo es la estandarización de las condiciones en la fabricación de hidrogeles de quitosano, de espesor variable y demostrar su

biocompatibilidad usando como modelo *in vitro*, cultivos de fibroblastos y de CMM aisladas a partir de gelatina de Wharton.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de hidrogeles de quitosano/PEG de 2, 3 y 5 mm de espesor

Para la fabricación de los hidrogeles, se disolvió el quitosano en una solución de ácido acético grado analítico al 2% y a 90°C. Una vez disuelto se agregó polietilenglicol (PEG) como agente entrecruzante. Las láminas se prepararon colocando las mezclas entre dos vidrios planos colocados con separadores de diversos grosores (2, 3 y 5mm). Una vez solidificadas, se realizaron 2 lavados con 1M NaOH, y esta solución se lavó con tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS, por sus siglas en inglés). Los hidrogeles obtenidos se secaron empleando dos condiciones diferentes: 1) en estufa convencional a 40°C por 6 horas y, 2) liofilizados (secado en frío) por 24h.

Obtención de láminas ultrafinas de hidrogeles de quitosano/PEG

En un matraz de vidrio se colocó 1,5% (w/v) de quitosano $\geq 75\%$ desacetilado (Sigma Aldrich® C3646), 0,5% (w/v) de agarosa y 15,6 mM de polietilenglicol 400 (PEG-400) y ácido acético grado analítico al 2% (v/v). La mezcla se mantuvo en agitación constante (200 rpm) a temperatura ambiente, por 24 h. Para la obtención de las láminas ultrafinas, la solución se vertió en placas Petri de 100 x 15 mm de diámetro (aproximadamente 8 ml en cada una) y posteriormente, se dejaron secar en una estufa convencional a 50°C por 24 h. Una vez secas se neutralizaron con 5% NaOH, incubando por 2h a temperatura ambiente, y a continuación se realizaron lavados extensos con agua destilada y se retiró la lámina de la placa. Las membranas ultrafinas obtenidas se conservaron en etanol al 70% hasta su uso.

Aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos

Las muestras de piel humana, procedente de lipectomías abdominales en cirugía plástica, fueron cedidas a la investigación, con consentimiento informado de los pacientes del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo en Caracas, Venezuela. Las muestras, en el

hospital, fueron cuidadosamente colocadas en los medios especiales para su transporte al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Universidad Simón Bolívar de Venezuela. En el laboratorio, dentro de la campana de flujo laminar, se le realizaron varios lavados a la muestra con PBS estéril y se diseccionaron, separando y retirando la hipodermis de la dermis. Las muestras de la dermis se cortaron en fragmentos de 3–4 mm² y se colocaron sobre la placa de cultivo. Los fragmentos se mantuvieron en cultivo con medio DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB). Luego de obtener los cultivos primarios se realizaron subcultivos (no más de 3-5 pasajes). Los cultivos obtenidos se emplearon para la evaluación de biocompatibilidad de las membranas de quitosano.

Células madre mesenquimales (CMM) a partir de gelatina de Wharton: Aislamiento y cultivo

Las muestras de cordón umbilical de un recién nacido fueron donadas por las madres previa autorización (consentimiento informado). Una vez transportadas las muestras al Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la Universidad Simón Bolívar de Venezuela, se diseccionó el cordón umbilical, retirándose la vena y las arterias de la estructura, a fin de evitar contaminación de los cultivos por células de tipo endotelial. El resto del material se cortó en fragmentos de 3 a 4 mm², los cuales se cultivaron con medio α MEM suplementado con 10% SFB. Las células se empezaron a observar al cabo del 6to-7mo día de cultivo y una vez alcanzada el 70% de confluencia, se realizaron subcultivos. Los cultivos obtenidos se emplearon para la evaluación de biocompatibilidad de las membranas de quitosano.

Diferenciación de las CMM a linaje osteogénico.

Cuando los cultivos de las CMM alcanzaron el 70% de confluencia se realizaron los procesos para la diferenciación de las CMM en osteoblastos; para lo cual, los cultivos se trataron con medio osteogénico (medio DMEM, 10% de SFB, 0,1 μ M dexametasona, 0,2 mM ácido ascórbico y 10 mM β -glicerolfosfato). El medio se cambió cada 3-4 días por 21 días de cultivo. Se evaluó la diferenciación de los cultivos midiendo la actividad de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo a diferentes periodos de tiempo y la formación

de nódulos de mineralización al culminar el tratamiento siguiendo los protocolos descritos por Noris-Suarez [7].

Prueba de absorción de agua de los hidrogeles ultra finos de quitosano/PEG

Para esta prueba se utilizaron 20 discos de 1,4 cm de diámetro, los cuales fueron previamente secados en una estufa a 50°C por 24h; luego se sumergieron en agua desionizada por 24 h. Para evaluar el porcentaje de absorción de agua (AA) por cada uno de los discos de quitosano/PEG, se determinó la masa seca inicial (M_i) y la masa húmeda final (M_f) por 24h, mediante la siguiente fórmula (1):

$$\% AA = [M_f - M_i] \div [M_i \times 100] \quad (1)$$

Determinación de la Curva de hinchamiento del hidrogel Quitosano/PEG de 2, 3 y 5 mm de espesor

Las propiedades de absorción de agua de los hidrogeles de Quitosano de 2, 3 y 5 mm se evaluaron a temperatura ambiente (22°C) y en tres medios de hidratación: a) Agua Destilada, b) PBS y c) Medio de cultivo DMEM. Se cortaron por triplicado discos de 5mm de diámetro del hidrogel seco (xerogeles) y se colocaron en el medio de hidratación, pesándolos antes de la hidratación y durante la misma en una balanza analítica de precisión $\pm 0,0001$ gr, cada 10 minutos durante las primeras 2 horas, y luego periódicamente hasta alcanzar el equilibrio en el que la variación de peso era $\leq 1\%$ entre un periodo de tiempo y el siguiente.

El porcentaje de hinchamiento fue calculado con la siguiente fórmula (2), en base a la media correspondiente a la determinación por triplicado en cada caso [8]:

$$\% H = \frac{Ph - Ps}{Ps} \times 100 \quad (2)$$

Donde: **% H**: porcentaje de hinchamiento; **Ps**: peso inicial del hidrogel y **Ph**: peso del hidrogel hidratado en los diferentes tiempos.

Evaluación de biocompatibilidad

La biocompatibilidad de los hidrogeles de quitosano fue evaluada determinando la viabilidad celular en cultivos expuestos por 48h a un medio de cultivo previamente condicionado con las membranas fabricadas de quitosano. En estos cultivos se cuantificó el número de células metabólicamente activas mediante el kit comercial *CellTiter 96R (MTS)* (Promega®), siguiendo las instrucciones del comerciante.

La morfología de las células adheridas sobre las matrices se evaluó mediante microscopia óptica convencional, y empleando marcaje de actina, proteína del citoesqueleto, mediante el uso de faloidina-FITC y también se utilizó el marcador nuclear fluorescente, DAPI, que se une a regiones enriquecidas en adenina y timina en las secuencias de ADN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método de aislamiento de células y establecimiento de los cultivos primarios, tanto de fibroblastos como de las CMM, a partir de muestras humanas fue exitoso, pudiendo lograrse luego la amplificación del número de células mediante el subcultivo. Ambos tipos celulares muestran morfología fibroblastoide (figura 1)

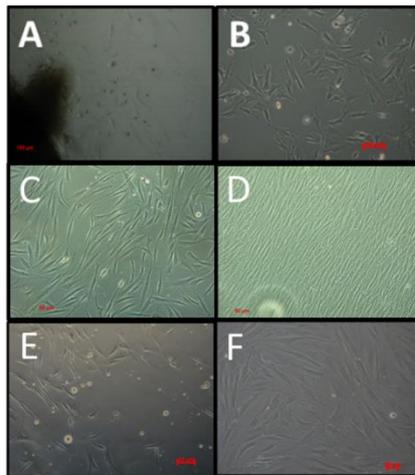


Figura 1. Micrografía del Cultivo de CMM y Fibroblastos a partir de explantes de gelatina de Wharton y de tejido mamario, respectivamente, obtenidas por microscopia óptica convencional (10X, 20X, 40X). A-D: CMM.- Obtención por migración: A) 5 días de cultivo, B) 30% de confluencia (13 días de cultivo), C) 70% de confluencia (16 días de cultivo), D) 100% de confluencia (24 días de cultivo). E-F: Fibroblastos.- Obtención por migración: E) 6 días de cultivo y F) 70% de confluencia (20 días de cultivo).

Para demostrar el potencial de diferenciación de las CMM, fueron tratadas con medio osteogénico y a los 21 días de tratamiento se evidencia, en los cultivos, la formación de nódulos de mineralización, revelados mediante la tinción de rojo de alizarina (figura 2).

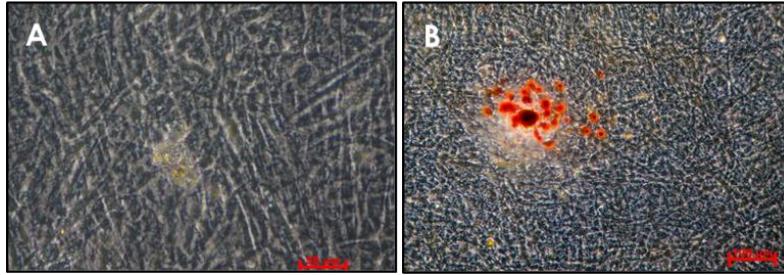


Figura 2. Tratamiento de diferenciación de las CMM con medio osteogénico (micrografía del cultivo obtenida por microscopía óptica convencional). A) Cultivo a los 8 días; B) a los 21 días de cultivo. Se observa el nódulo de mineralización teñido con rojo de alizarina,

Algunos materiales convencionales como las gasas utilizadas en los vendajes de heridas generalmente obstaculizan el proceso de cicatrización de la herida cuando absorben los exudados de la misma [9]; por lo que en este trabajo se pudo obtener un biomaterial que puede absorber líquidos, mantener la humedad lo cual protegería a las heridas de la desecación, de la invasión microbiana.

Los resultados de las pruebas de hinchamiento de los hidrogeles de espesor 2 y 3 mm se muestran en la figura 3. Tanto en las muestras secadas en estufa como en aquellas liofilizadas, en contacto con el agua, el hidrogel de 2 mm alcanza un 900 % de hinchamiento para luego descender gradualmente, estabilizándose alrededor del 700%. Cuando los hidrogeles se sometieron al proceso de hinchamiento en medios con un alto contenido de sales (PBS y DMEM) se pudo observar que el grado de hinchamiento llega a valores menores de 450 % en los primeros 40 minutos, para luego descender hasta 300% al alcanzar la estabilidad del peso en un tiempo cercano a los 80 minutos. Lo cual es indicativo de que los geles alcanzan su equivalencia física y química, aumentando considerablemente su peso. En ambas condiciones de secado y/o de espesor, el comportamiento de hinchamiento es relativamente similar.

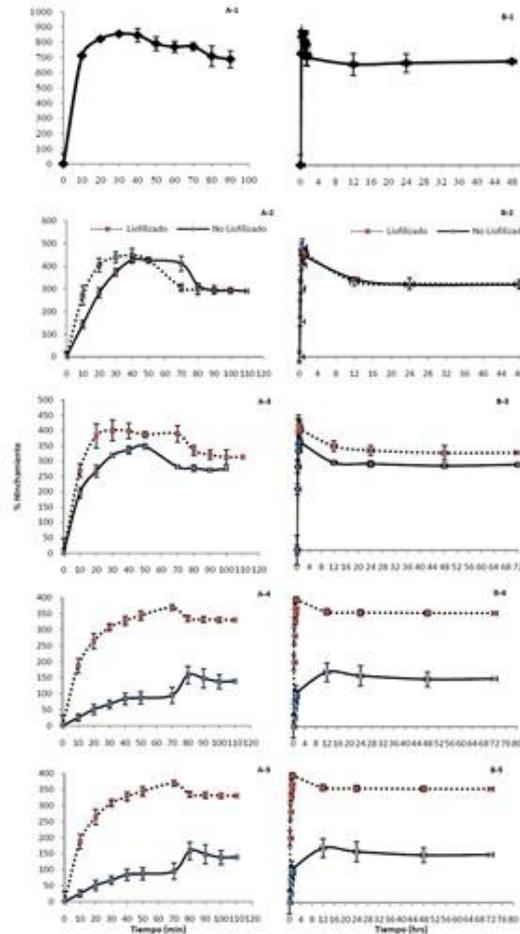


Figura 3. Determinación de la Curva de hinchamiento de hidrogeles de diverso espesor. A.1-2) 2 mm de espesor, en agua destilada, B.1-2) 2 mm en PBS. C.1-2) 2 mm en medio DMEM, Panel D.1-2) 3 mm en PBS. E.1-2) 3mm en DMEM.

Por otra parte, la prueba de hinchamiento de las membranas ultrafinas fue cercana al 60 % en agua (resultados no mostrados). Por lo tanto, estos resultados nos confirman, lo que indican otros autores, que el entrecruzamiento con PEG, intensifica este comportamiento, donde el agua es absorbida osmóticamente por la membrana [10].

Finalmente, logramos obtener una lámina de hidrogel flexible, en el que pueden adherirse y proliferar células (en nuestro ensayo, fibroblastos y células madre mesenquimales de la gelatina de Wharton), lo que indica que también puede mantener la actividad de los factores de crecimiento; por lo que las posibles aplicaciones de nuestro material serían biomateriales para el vendaje de heridas. En la figura 4 se muestra una fotografía de las

membranas ultrafinas obtenidas con el procedimiento descrito en la sección de metodologías.

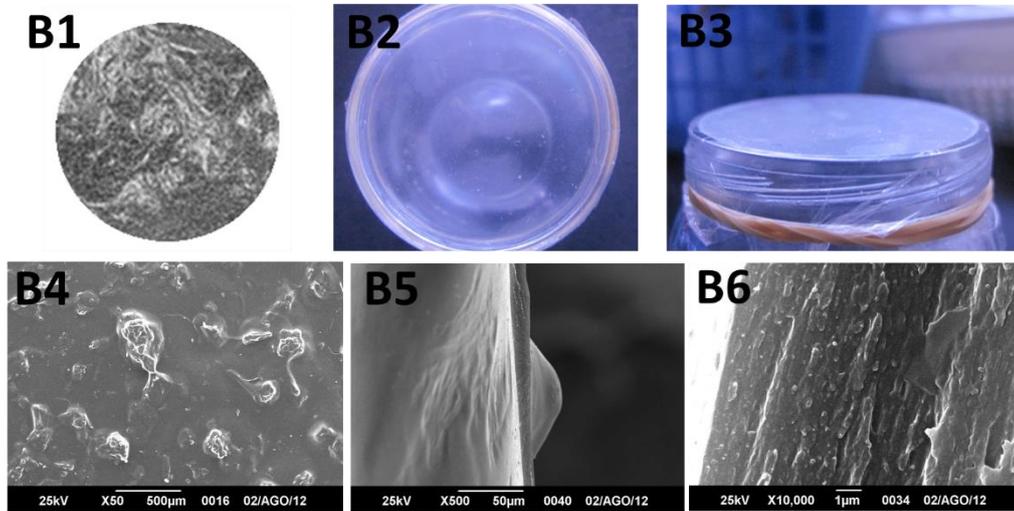


Figura 4. Xerogeles de quitosano/PEG ultrafinas. - B4-B6 Imágenes tomadas por el microscópio electrónico de barrido: B5, vista lateral, B6, corte transversal.

Los ensayos de biocompatibilidad empleando medio condicionado tanto de los hidrogeles de 2, 3 y 5 mm, como de los ultrafinos demostraron que las células presentaron diferencias en cuanto a proliferación, respecto a los controles (resultados no mostrados). Por ello, como se muestra en la figura 5, se decidió cultivar las células sobre las membranas ultrafinas empleando dos condiciones: cultivos sobre geles de fibrina usando los hidrogeles como andamios y directamente sobre las membranas ultrafinas. En las dos condiciones fue posible demostrar que las células se encuentran adheridas sobre superficies del material y muestran su apariencia fibroblastoide característica indicativo de su biocompatibilidad con las matrices desarrolladas.

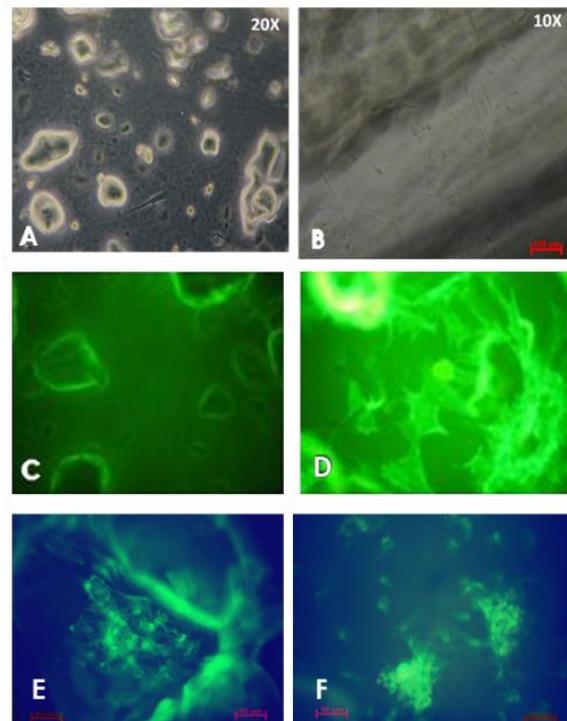


Figura 5. Biocompatibilidad de las membranas ultrafinas de quitosano empleando fibroblastos y CMM. A) y B) micrografías de fluorescencia de células mesenquimales sobre geles de fibrina usando hidrogeles ultrafinos de quitosano como andamio, a las 48 horas y 14 días de cultivo, respectivamente. C) y D) membranas ultrafinas sin y con fibroblastos tratados con faloidina-FITC, respectivamente; los fibroblastos fueron cultivados sobre las membranas ultrafinas de quitosano por 15 días. E) y F) membranas ultrafinas con CMM tratados con faloidina-FITC y DAPI, donde se destaca la distribución de las células en un bolsillo del material.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que se estandarizaron los protocolos para el aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos a partir de explantes de piel y de CMM, a partir de la gelatina de Wharton, empleando el método de migración en ambos casos. Demostrándose además que las CMM presentan potencial osteogénico. Igualmente se logró la fabricación de membranas de quitosano, de espesor entre 2 y 5 mm, y ultrafinas, las cuales son biocompatibles y permiten el cultivo de las células promoviendo su proliferación. Estos biomateriales, así fabricados pueden emplearse, entre otras aplicaciones para el desarrollo de sustitutos dermo-epidérmico.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue posible gracias a los fondos recibidos del proyecto en Red – FONACIT No. G-2007001522 y el proyecto LOCTI-USB No. 50-2066.5172-07

REFERENCIAS

- [1] Ficke, J.R., Pollak, A.N. Extremity War Injuries: Development of Clinical Treatment Principles. *J Am Acad of Orthop Surg* 2007 Oct, **15**: 509-595. Available from, PMID: 17916782
- [2] Okuyama K, Noguchi K, Kanenari M, Egawa T, Osawa K, Ogawa K. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers* 2000 March, **41**: 237-247. Available from, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00142-3](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00142-3)
- [3] Han CM, Zhang LP, Sun JZ, Shi HF, Zhou J, Gao CY. Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 2010 Jul 03, **11**: 524-530. Available from, DOI: <https://doi.org/10.1631/jzus.B0900400>
- [4] Shahidi F, Synowiecki J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab and shrimp processing discards. *J. Agric. Food Chem* 1991 Aug, **39**: 1527-1532. Available from, DOI: 10.1021/jf00008a032
- [5] Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park JB, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International*

- Journal of Pharmaceutics. 2002 Dec 5; **249**(1-2):165-174. Available from, DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00487-8
- [6] Rampino A, Borgogna M, Blasi P, Bellich B, Cesáro A. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. International Journal of Pharmaceutics. 2013 Oct 15; **455**(1-2): 219-228. Available from, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.034>
- [7] Noris-Suarez K, Barrios de Arenas I, Vasquez M, Baron Y, Atias I, Bermudez J, Morillo C, Olivares Y & Lira, J. Caracterización biológica empleando células osteoblásticas de vidrios del sistema SiO₂. Na₂O. CaO. K₂O. MgO. P₂O₅. Modificados con Al₂O₃ y B₂O₃. Revista latinoamericana de metalurgia y materiales. 2003; **23**(1): 82-88.
- [8] Bajpai S K, Bajpai M, & Sharma L. Investigation of water uptake behavior and mechanical properties of superporous hydrogels. Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry. 2006 Aug 23; **43**(3): 507-524. Available from, <https://doi.org/10.1080/10601320600575249>
- [9] Yoshida C, Uchida Y, Ito T, Takami T & Murakami Y. Chitosan Gel Sheet Containing Polymeric Micelles: Synthesis and Gelation Properties of PEG-Grafted Chitosan. Materials. 2017 Sept 13; **10**(9): 1075. Available from, <https://doi.org/10.3390/ma10091075>
- [10] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. Advanced drug delivery reviews. 2012 Jan 25; **64**: 18-23. Available from, <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03823.x>