

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Vicerrectoría de Investigación y Extensión

Informe final de Proyecto

*Elaboración de apósitos biológicos del colágeno de la dermis de tilapia y del quitosano del exoesqueleto de camarón y evaluación preliminar de su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas.*

## **DOCUMENTO I**

Elaborado por:

Silvana Alvarenga, M.Sc. y Miguel Rojas, Ph.D.

Marzo, 2011

## Tabla de contenidos

Nombre del proyecto: .....	4
Autores.....	4
Participantes en el proyecto:.....	4
Investigador(a) responsable:.....	4
Otros investigadores: .....	4
Resumen .....	4
La piel como órgano fundamental.....	5
Definición de Ingeniería de Tejidos .....	5
Importancia e implicaciones.....	6
Biomateriales empleados en las matrices .....	7
Problemática en Costa Rica .....	7
Empleo de las matrices .....	8
Propiedades ideales de los sustitutos de piel.....	9
Empleo de Colágeno y Quitosano como biomateriales.....	11
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
Mantenimiento de la línea celular de fibroblastos 3T3 .....	12
Amplificación de fibroblastos .....	12
Cambio de medio de cultivo.....	13
Criopreservación .....	13
Descongelamiento.....	13
Esterilización de las matrices.....	14
Esterilización con rayos X. ....	14
Esterilización con acetona de las matrices seleccionadas para el crecimiento de fibroblastos	16
Diseño y elaboración de aros de sujeción para las membranas biopoliméricas. ....	17
Preparación y esterilización de las matrices biopoliméricas seleccionadas. ....	19
Esterilización Anillos de sujeción.....	19
Preparación de matrices con anillos de sujeción.....	20
Verificación de la adhesión celular a las membranas y determinación de la viabilidad .....	20

Verificación de la adhesión celular a las membranas .....	20
Tinciones con MTT, Azul Tripán y Diacetato de Fluoresceína .....	20
Incremento de la adhesión celular .....	20
Mantenimiento de la línea celular de fibroblastos 3T3 .....	21
Esterilización mediante rayos X.....	21
Preparación y esterilización de las matrices biopoliméricas seleccionadas. ....	23
Verificación de la adhesión celular a las membranas y determinación de la viabilidad .....	23
Aspectos en que el proyecto colaboró para el aumento de la cooperación entre las universidades y la conformación del Sistema Interuniversitario de Investigación .....	29
Impacto que el proyecto alcanzó en los ámbitos científico, social, cultural, ambiental y económico.....	30
Comentarios adicionales o recomendaciones a los investigadores del proyecto.....	30
Anexo 1. Póster presentado en el Congreso Mundial de la Sociedad Internacional de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos en el 2009. ....	33
Anexo 2. Folleto informativo del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, en sus versiones en Inglés y Español. ....	34
Anexo 3. Diapositivas de la ponencia “Experiencia costarricense en el establecimiento de cultivos primarios de piel para fines terapéuticos” en el Simposio Internacional “Traducción Clínica en Tecnologías de Ingeniería de Tejidos” efectuado los días jueves 13 y sábado 14 de Mayo en Buenos Aires, Argentina, organizado por la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral. ....	36
Anexo 4. Resultados de trabajo de graduación de la Ing. en Biotecnología, Silvia Castro: “Modelos experimentales para el manejo in vitro de queratinocitos y fibroblastos humanos para su utilización con una matriz con potencial en ingeniería de tejidos” realizado en el Hospital Austral, en Buenos Aires, Argentina. ....	41
Anexo 5. Protocolo de esterilización de las membranas biopoliméricas con alcohol 70% y acetona. ....	42
Anexo 6. Evaluación del cultivo de fibroblastos con membranas biopoliméricas. ....	43

## INFORME FINAL

### DOCUMENTO I

#### **Nombre del proyecto:**

*Elaboración de apósitos biológicos del colágeno de la dermis de tilapia y del quitosano del exoesqueleto de camarón y evaluación preliminar de su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas.*

#### **Autores:**

*Elaborado por* M. Sc. Silvana Alvarenga ([salvarenga@itcr.ac.cr](mailto:salvarenga@itcr.ac.cr)). y Dr. Miguel Rojas ([mirojas@itcr.ac.cr](mailto:mirojas@itcr.ac.cr)) ITCR. Marzo de 2011

#### **Participantes en el proyecto:**

##### ***Investigador(a) responsable:***

M. Sc. María del Rosario Sibaja B. Laboratorio de Polímeros de la Escuela de Química POLIUNA UNA

Dr. Miguel Rojas Ch., Laboratorio de Ingeniería Tejidos. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. ITCR

##### ***Otros investigadores:***

M.Sc. Silvana Alvarenga, ITCR

Lic. Vanesa Zamora M., UNA

M.Sc. Sergio Madrigal C., UNA

Dr. José Vega B., UNA

Ing. Laura Calvo C.

M.Sc. Carolina Centeno C.

#### **Resumen**

La Ingeniería de Tejidos comprende los métodos utilizados para obtener y crecer tejidos humanos o animales para restaurar, mejorar o sustituir órganos humanos dañados. Este proyecto constituyó un esfuerzo pionero de las universidades públicas en ingeniería de tejidos en el país. Se diseñaron y ensayaron biomateriales tridimensionales compuestos a partir de colágeno de la dermis de tilapia y de quitosano del exoesqueleto de camarón, para la realización de pruebas preliminares con la finalidad de demostrar su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas.

Las matrices extracelulares porosas fueron producidas por POLIUNA, a partir de colágeno y quitosano con la finalidad de estimular la proliferación y diferenciación celular, sirvieron de base estructural para el crecimiento de la línea celular de fibroblastos 3T3. Las membranas con proporciones de 2-8 y 6:4 C-Q, (Colágeno-Quitosano), mostraron el mayor crecimiento de fibroblastos.

Se probaron varios protocolos de esterilización (antibióticos, acetona, luz ultravioleta e irradiación de las membranas con rayos x). La irradiación fue el método más eficiente, este protocolo debe adaptarse según el grosor y composición del biomaterial. El diseño y confección de un soporte de anillos y la colocación de las membranas en anillos de sujeción, resultó favorable para el crecimiento celular, debido a que mantienen la membrana tensa. Se logró optimizar la adhesión celular al colocar la membrana al liofilizador antes de colocar las células, para que se adhiriera al pozo. El método de tinción más eficiente fue el MTT, permitió observar el crecimiento de fibroblastos sobre la membrana, ésta no se tiñó con el compuesto.

## **Palabras clave**

matrices, colágeno, quinta cultivo *in vitro*, fibroblastos, ingeniería de tejidos.

## **Introducción**

### ***La piel como órgano fundamental.***

La piel es el órgano de mayor tamaño que posee el cuerpo cubriéndolo completamente, su espesor varía de 0,5 mm en los párpados a los 4 mm en el talón, se encarga de proteger los tejidos internos y constituye cerca del 15% del peso corporal. (Ramos *et al.*, 2006)

Este órgano cumple muchas funciones importantes como social, fisiológica y de protección. Dentro del aspecto social, indica el buen aspecto de la epidermis o del cutis, también da un indicio de la edad; en el rasgo fisiológico, evita la pérdida de fluidos, como lo es el proceso de deshidratación corporal, también permite darle forma al cuerpo. Además, controla la temperatura corporal, la absorción de muchas sustancias y la excreción de otras. Por último, provee una barrera biológica al cuerpo contra los microorganismos, hongos, bacterias, entre otros.

Debajo de la dermis se extiende una capa que está compuesta en su mayoría de grasa y es llamada hipodermis, ésta se adhiere firmemente a la dermis mediante fibras de colágeno. La hipodermis, también conocida como tejido subcutáneo, ayuda a que el cuerpo se mantenga cálido y pueda absorber impactos, como por ejemplo, golpes o caídas.

### ***Definición de Ingeniería de Tejidos***

El avance en el descubrimiento de antisépticos y antibióticos, así como la mejora en normas de higiene han incidido en el incremento de la expectativa de vida: La ciencia de los biomateriales se desarrolló en el siglo XX, como una respuesta a la necesidad de tratar una serie de afecciones como traumatismos, quemaduras y otros desastres. En forma paralela se produjo el desarrollo de materiales novedosos que han mejorado la calidad de vida de los pacientes.

La ingeniería de tejidos es una nueva disciplina que tiene como objeto aprovechar los conocimientos de la bioingeniería, la ciencia de los materiales y la biología para el control de procesos de regeneración de tejidos (Monteiro y San Román, 2004). El cultivo de fibroblastos dérmicos se considera un proceso de regeneración de tejidos *in vitro* con el

empleo de un soporte o matriz polimérica, porosa y biodegradable para su implantación en el organismo con el fin de lograr la regeneración de piel para cicatrización con uso de apósitos o membranas (Ikada, 2006).

En 1981, se reportó la aplicación del primer injerto de queratinocitos para tratar pacientes quemados. Se aisló un pequeño segmento de piel, se hicieron crecer células *in vitro* del mismo paciente (autólogas), con las que, posteriormente cubrieron la herida. Desde entonces, el cultivo de células epidérmicas se realiza en centros de investigación y en empresas biomédicas de muchos países para la producción comercial.

Un artículo de revisión presentado por Langer & Vacanti (1993) con el título "Ingeniería de tejidos" ha contribuido en gran medida a la promoción de la investigación de ingeniería de tejidos en todo el mundo. El propósito de la investigación en ingeniería de tejidos es muy claro, establecer una nueva tecnología clínica que hace posibles tratamientos para las enfermedades difíciles de curar por métodos existentes (Ikada, 2006). Los métodos que actualmente se utilizan para obtener sistemas total o parcialmente biodegradables como tejidos humanos o animales con el fin de restaurar, mejorar y sustituir órganos humanos dañados se denomina ingeniería de tejidos.

A pesar de que se han realizado numerosas investigaciones para generar diversos tipos de tejido, todavía hay muchos factores críticos que inciden en la medicina regenerativa, en las que se incluyen: la fuente de las células, la constitución del soporte o matriz, el cultivo de las células, el entorno del cultivo la metodología para la producción de la matriz y las propiedades mecánicas de la membrana o soporte. (Ikada, 2006; Han *et al.*; 2010).

Treinta años después de acuñado el término: "ingeniería de tejidos", se puede afirmar que éste representa un nuevo concepto enfocado en la regeneración de nuevos tejidos a partir de células con el aporte de nuevos biomateriales y factores de crecimiento. Para la regeneración de tejidos, la ingeniería biomédica utiliza tres herramientas básicas: células, un soporte temporal, y factores de crecimiento, los que no siempre se usan en forma simultánea (Ikada, 2006).

### ***Importancia e implicaciones***

Los procedimientos terapéuticos generados por la ingeniería de tejidos se emplean en el tratamiento de úlceras, epidermólisis bulosa, así como en traumatismos y quemaduras de la piel. Básicamente se cultivan los queratinocitos, que son las células más externas de la piel sobre una base de fibroblastos irradiados con Rayos Gamma y posteriormente se injertan al mismo paciente para permitir cicatrizar la zona afectada. Se reporta que probablemente los aloinjertos (autólogos) sobreviven por largo tiempo. Las células pueden ser colocadas directamente sobre las heridas o colocadas en matrices poliméricas (Han *et al.*; 2010).

Uno de los principales productos que ofrece esta rama son las matrices extracelulares porosas en las que se lleva a cabo el crecimiento o proliferación de células. Posteriormente esta matriz es absorbida por el organismo (Ramírez, 2006). Esta matriz es un material implantado en un ser vivo que debe reunir y cumplir con una serie de factores que aseguren una buena función. La principal función del soporte es similar al rol de la Membrana Extra Celular (ECM), que contribuye a la proliferación, diferenciación y biosíntesis de las células, además, es el lugar de regeneración de las células. El soporte proporciona el entorno adecuado para que las células cumplan eficazmente sus funciones.

### ***Biomateriales empleados en las matrices***

Dentro de los principales biomateriales utilizados en este tipo de productos se encuentran algunos derivados de tejidos mamíferos, como los son la membrana amniótica, dermis acelular, submucosa intestinal; proteínas como colágeno, gelatina, albúmina; y polisacáridos como almidón, quitina y quitosano, entre otras (Kumar *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2006)

El colágeno, es un polímero natural que contiene residuos de aminoácidos tanto básicos, como ácidos y por lo tanto puede estar cargado positiva o negativamente dependiendo del ambiente. La estructura y las características físicas y químicas del colágeno, en forma de fibras, natural o desnaturalizado, entrecruzado o no, tiene una notable influencia sobre la morfología y la fisiología de las células (Wang *et al.*; 2004).

El colágeno es uno de los principales constituyentes de las pieles de tilapia y de la concha de camarón, el quitosano es un compuesto que se obtiene de desprotenizar y desacetilizar las conchas. Estos compuestos no existen juntos, como mezclas en la naturaleza, pero las propiedades específicas de cada uno, pueden ser usadas para producir un material que le confiere propiedades estructurales y mecánicas únicas. Estos biomateriales poseen propiedades específicas con gran potencial para el desarrollo de una nueva generación de implantes, son de bajo costo de producción y con su uso se da valor agregado a desechos agroindustriales (Sionkowska *et al.*; 2003).

Respecto, a las relaciones adecuadas para el complejo colágeno – quitosano, no se ha encontrado alguna que satisfaga las propiedades deseadas para un adecuado soporte de para su aplicación en ingeniería de tejidos, por lo que, basándose en el trabajo realizado por Sionkowska y colaboradores (2003), quienes al realizar estudios sobre las interacciones moleculares de la mezcla colágeno-quitosano, encontraron que la relación 80:20 y 20:80 colágeno-quitosano, es la adecuada. E esta investigación se estudió esta relación para observar su comportamiento térmico, físico y mecánico, con el fin de conseguir una relación óptima (Sionkowska *et al.*; 2003).

Si los queratinocitos y fibroblastos se colocan sobre una matriz polimérica a base, por ejemplo de colágeno o quitosano, se obtiene una bicapa celular tridimensional similar a la estructura natural. Con este apósito se estimulan dos propiedades muy importantes para la recuperación del tejido efectuado, a saber la neovascularización y la reinervación. (Auger *et al.*, 2005). Así los pacientes que sufren afecciones epidérmicas tendrían una recuperación más rápida y efectiva, lo que incidiría en mejorar su calidad de vida y en la disminución de costos hospitalarios

### ***Problemática en Costa Rica***

Un número considerable de hospitalizaciones en Costa Rica, se debe a afecciones epidérmicas, una alta proporción de los pacientes con padecimientos epidérmicos corresponde a la población infantil, del 2000 al 2004 se registraron más de 1000 casos de niños quemados. El Hospital Nacional de Niños es el centro médico que registra la mayor cantidad de personas atendidas con lesiones por quemaduras. (Dpto. Estadísticas HNN, 2005).

Sin embargo, en el país no se dispone de un material adecuado para el tratamiento de la mayoría de pacientes con afecciones epidérmicas que facilite la verdadera re epitelización y por consiguiente, se logre una recuperación más rápida y menos dolorosa que incida en

la calidad de vida del paciente. Disminuyendo así los costos de recuperación a la CCSS y logrando que el paciente se reincorpore a las labores cotidianas en menor tiempo.

La obtención de un soporte tridimensional para el crecimiento de tejido epitelial es una nueva forma de potencializar los diferentes biomateriales y disponer de los mismos dentro del área quirúrgica de muchos hospitales, específicamente en el departamento de injerto de tejido epitelial. Esta es la causa primordial por la cual las diferentes instituciones académicas se han vinculado en una constante lucha de investigación científica y de esta manera desarrollar un material compuesto que presente buenas aplicaciones biomédicas en el área de ingeniería de tejidos. Esto también podría implicar otras ventajas, a mediano plazo, debido a que la utilización de soportes biodegradables disminuye los costos de los tejidos artificiales hasta casi en un 90 %.

En una alianza estratégica el Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) y el Centro de Investigaciones biotecnológicas del Instituto Tecnológico de Costa Rica (CIB) se avocaron a la búsqueda de un biomaterial que tuviera las propiedades adecuadas para ser utilizados como soporte o apósito biológico. De esta manera durante los últimos años han desarrollado un trabajo en equipo en esta línea de investigación. por medio de tesis, trabajos de graduación, y proyectos como el presente,

Resultado de estas investigaciones se han obtenido mezclas de quitosano y colágeno con muy buenas propiedades térmicas y mecánicas, pero de baja porosidad. Una mezcla de colágeno quitosano de 2 a 8 partes respectivamente, que potencia las propiedades particulares de ambos biopolímeros y a su vez permite obtener un biomaterial tridimensional.

### ***Empleo de las matrices***

Alrededor del siglo VI se dan los primeros indicios en la realización de injerto de piel, ya que cirujanos hindúes estaban involucrados en este tipo de reconstrucciones. Para el siglo XVI, el médico italiano Gaspare Tagliacozzo trajo la técnica al área de medicina occidental; ya para el siglo XX, los injertos de piel se realizaron utilizando piel propia del paciente o por donación de otro individuo, aunque el órgano epitelial se extraía de una zona del cuerpo en el paciente a otra sin rechazo, los injertos de un donador a un receptor contemplaban situaciones más drásticas de rechazo, siendo este tipo de injerto de tejido o trasplante el más problemático. Para 1980 investigadores médicos e ingenieros químicos, trabajaron en el campo de células biológicas y fabricación de plásticos, con el fin de desarrollar la ingeniería de tejidos y al mismo tiempo reducir los índices de infección y el rechazo. (Ramos *et al.*, 2006)

La producción de capas de queratinocitos, es decir, las células más externas de la piel, fue un primer desarrollo biotecnológico logrado hace más de tres décadas (en 1975), por los científicos Rheinwald y Green, los cuales describieron un método para el cultivo de queratinocitos humanos sobre una capa de fibroblastos; los desarrollos posteriores se han enfocado a la producción de materiales tridimensionales sustitutos de la piel, que se han producido mediante geles, matrices extracelulares y autoensamblaje. (Calderón *et al.*, 2002) En el caso de geles, se ha utilizado principalmente colágeno, para la regeneración de piel, esta proteína fibrosa compone la mayoría de los tejidos conectivos de los mamíferos. (Liu *et al.*, 2004)



Las matrices son una forma muy utilizada para estimular la recuperación y crecimiento del tejido epitelial, con ello se logran recuperar dos propiedades muy importantes como lo son la neovascularización y la reinervación. La estructura porosa tridimensional es necesaria para que las células puedan proliferar manteniendo su morfología y función celular específica; ejemplo de ello es el producto Apligraf®, fibroblastos (célula del tejido conjuntivo que elabora y segrega proteínas de colágeno) obtenidos de prepucio colocados sobre una base de colágeno, posteriormente se colocan los queratinocitos, obteniéndose una bicapa celular tridimensional similar a la estructura natural. (Ramos *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2006) En el caso del autoensamblaje, se trata de que los fibroblastos construyan su propia matriz, colocando un substrato a base de colágeno o quitosano, según lo plantea Lie y col (2003); Chien-Yang y col (2007); Ramos y col (2006).

Los andamios o soportes poliméricos son esenciales para la tecnología en ingeniería de tejidos, ya que éstos dirigen una variedad de procesos celulares basados sobre las propiedades estructurales y bioquímicas de los mismos. Por lo cual deben de poseer una serie de propiedades mecánicas y químicas muy concretas, como por ejemplo: conductible, para permitir la migración de células; inducidas a permitir la proliferación celular; permeables, para permitir el intercambio de nutrientes; adherencia, entre muchas otras. (Lie *et al.*, 2003).

Las esponjas de colágeno se han utilizado en la creación de andamios pero éstas siempre perdían su fase y tamaño por contracción ya que la rápida degradación venía por el contacto con los fluidos corporales o en un medio de cultivo. Más tarde se reportó que una tela o soporte entretejido de fibra de quitina y una película de quitosano podrían promover la sanación de heridas en la piel cuando fuese usado como vendaje. La quitina y el quitosano son biodegradados lentamente, estas esponjas permanecían estables en fase y tamaño durante la exposición durante un medio de cultivo. (Jianbiao *et al.*, 2000)

Gran número de investigaciones en el campo de ingeniería de tejidos se ha enfocado al desarrollo de estrategias apropiadas para la reparación y regeneración de tejidos biológicos. Los soportes poliméricos artificiales en tercera dimensión sirven como un soporte físico para proveer tejidos con la arquitectura apropiada para el cultivo celular *in vitro*. Un desafío significativo en la producción de soportes poliméricos tridimensionales es el desarrollo de andamios con tamaños y forma adecuada, con una arquitectura de micro- y macroporos, además de las propiedades mecánicas que estos deben poseer. Esto es un paso crucial para promover el control de la vascularización y el crecimiento o regeneración de tejido. (Cao *et al.*, 2005)

#### ***Propiedades ideales de los sustitutos de piel.***

En décadas pasadas muchos sustitutos de piel como el xenografts y allografts (piel de cadáver humano), y autograft (piel propia del paciente) eran empleados para sanar heridas. Por lo tanto, se comenzaron a desarrollar muchos estudios con el fin de promover la regeneración de tejido para mantener y recobrar la función de los órganos. (Ramos *et al.*, 2006) Idealmente todos los sustitutos biosintéticos de la piel deberían cumplir las siguientes propiedades:

- Adhesión rápida y sostenida en el lugar de la herida
- Impermeable a bacterias exógenas
- Emisión de vapor de agua similar al de la piel normal

- La estructura de la superficie permita la emigración de las células, la proliferación y en el crecimiento de nuevo de tejido
- Flexibilidad que permita la conformación de una superficie irregular en la herida, elasticidad que permita el movimiento de los tejidos subyacentes
- Resistencia lineal a tensiones de cizallamiento
- Prevención de proliferación de flora en la superficie de la herida
- Resistencia a la fuerza de tracción cuando esta es retirada
- Biodegradabilidad (importante para membranas “permanentemente” implantada)
- Bajo costo.
- Tiempo de caducidad indefinido.
- Mínimos requisitos de almacenamiento.
- Tejido compatible.
- Ausencia de toxicidad local o sistémica.

Un factor crucial es la construcción de un andamio tridimensional que provee una matriz extracelular (ECM) análoga con funciones de infiltración y soporte físico para guiar la proliferación y diferenciación celular dentro de tejidos y órganos funcionales. Los biomateriales empleados en la elaboración de soportes porosos tridimensionales son vitales para el estudio de la interacción célula-andamio, síntesis de tejido y regeneración de órganos. Estos actúan como una estructura de soporte físico y como un regulador de la actividad biológica. (Tangsadthakun *et al.*, 2006).

El tamaño y la estructura del poro en un soporte biodegradable pueden influir dramáticamente el comportamiento celular, por lo que este efecto podría ser explotado en la fabricación y caracterización de este tipo de material compuesto en ingeniería de tejidos. Para los soportes porosos un macroporo apropiado da paso a la proliferación celular requiriendo muchas veces para ello tamaños de poro de 100-200  $\mu\text{m}$ ; esponjas microcelulares con diámetros de poro de 10-100  $\mu\text{m}$  demuestran óptimos crecimientos de fibroblastos en la regeneración de tejidos. Tejidos fibrovasculares podrían invadir o proliferar un soporte si los poros son grandes con aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con este tamaño de poro se produciría un incremento en la velocidad de proliferación celular, además el factor de porosidad total o densidad de poro también es un punto de gran importancia en este tipo estructuras y en los casos ideales se requiere de un 90 % de porosidad. (Cao *et al.*, 2005)

Para cumplir las funciones de matriz, en ingeniería de tejidos, el soporte debe cumplir una serie de requisitos. En primer lugar, debe presentar microporos interconectados, para que las células se puedan anidar y migrar al interior, incrementando el número de células, además el sistema debe permitir el suministro de nutrientes. Los poros deben permitir la formación de capas de células y el transporte de residuos. Esto es importante para la supervivencia de las células en la matriz. Además, el apósito debe tener una porosidad óptima que permita la neovascularización y presentar resistencia mecánica. La cinética de absorción del biomaterial es crítica y varía según los tejidos a generar (Ikada, 2006; Han *et al.*; 2010).

Para el tratamiento por ingeniería de tejidos de la piel, el soporte no tiene que permanecer más de un mes. Si el apósito permanece durante más tiempo que el deseado, el material restante puede retardar la regeneración de tejidos en lugar de promoverla. Esto indica que la cinética de absorción del material del soporte afectará profundamente la tasa de éxito de regeneración del tejido (Ikada, 2006; Han *et al.*; 2010).

### **Empleo de Colágeno y Quitosano como biomateriales**

El colágeno es un constituyente significativo de la matriz extracelular natural. Los andamios hechos de colágeno son utilizados en una variedad de aplicaciones ya que este actúa como un agente cicatrizante, además de poseer buenas características mecánicas para el uso de este material en ingeniería de tejidos. Este biomaterial ha sido utilizado para la proliferación celular, adhesión y crecimiento de tejido epitelial. También poseen excelentes propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. Sin embargo, la rápida descomposición así como bajo esfuerzo mecánico son el problema que limita el promover el uso de este material. (Tangsadthakun *et al.*, 2006)

El quitosano es utilizado ampliamente en aplicaciones biomédicas. En muchos casos la modificación química y física de los grupos hidroxilo y amino del quitosano tiene aplicaciones en ingeniería de tejidos, ya que induce a los fibroblastos en la migración y proliferación celular. En la fase inflamatoria este compuesto tiene únicas y excelentes propiedades cicatrizantes. Estructuras de doble capa de películas de quitosano han sido desarrolladas para crear nuevas pieles artificiales, ya que la capa externa en la película podría controlar la evaporación de los fluidos corporales y la capa interna porosa como un andamio para la unión y crecimiento de fibroblastos. (Tangsadthakun *et al.*, 2006)

Por la eficiencia de ambos biomateriales estos son objeto de estudio en la fabricación de andamios de colágeno:quitosano según sus relaciones. Dentro de las principales características que les amerita a estos compuestos se pueden citar las siguientes:

Con miras a mejorar los apósitos obtenidos, se introdujo en esta línea de investigación el uso de agentes porógenos con el objetivo de obtener apósitos de características tridimensionales, con alto contenido de poros.

Para la extracción del colágeno de la piel de tilapia se siguió la metodología propuesta por Nagai y Suzuki (2001), que en términos generales se basa en, remover los pigmentos y las proteínas no colagenasa, con NaOH por y liofilizar. El material liofilizado se extrajo con ácido acético y el extracto se centrifugó. El residuo se re-extrajo con la misma solución y el extracto se centrifugó. El colágeno se obtuvo por precipitación con NaCl.

El quitosano se purificó al adicionar ácido acético hasta disolver totalmente. Posteriormente se filtró al vacío. Se precipitó con NaOH se le agregó etanol y por último se hicieron lavados con agua no destilada hasta lograr pH neutro.

Elaboración del biomaterial en POLIUNA

Para la elaboración del copolímero se disolvieron el colágeno y el quitosano en ácido acético, hasta obtener una mezcla homogénea con diferentes relaciones. Se agitó a temperatura hasta obtener una mezcla homogénea. Esta mezcla se colocó en un molde de teflón hasta secarlos para obtener la película. Finalmente se procedió a liofilizarla. Una vez obtenida esta película se esterilizó por varios métodos: irradiación con luz ultravioleta de 240 nm, sin inmersión por 12 horas en etanol al 95% y exposición al óxido de etileno. Después de este proceso, se colocaron fibroblastos humanos obtenidos de biopsia de descarte y se procedió a evaluar la respuesta al material de soporte

En este trabajo se desarrollaron soportes tridimensionales a partir de colágeno/quitosano en diferentes proporciones, con porosidad adecuada para aumentar la superficie de

crecimiento celular de fibroblastos, que pueden ser utilizados como materiales compuestos biodegradables en ingeniería de tejidos

## **Objetivos general y específicos**

### ***Objetivo general***

Diseñar y ensayar biomateriales tridimensionales compuestos a partir de colágeno de la dermis de tilapia y de quitosano del exosqueleto de camarón, para la realización de pruebas preliminares que demuestren su potencial terapéutico en afecciones epidérmicas.

### ***Objetivos específicos***

1. Elaborar nuevos biomateriales tridimensionales, como apósitos biológicos, para el crecimiento celular de fibroblastos humanos utilizando quitosano y colágeno provenientes de las actividades pesqueras y acuícola, proponiendo una nueva metodología de entrecruzamiento químico.
2. Evaluar las matrices poliméricas tridimensionales como soporte para el crecimiento de células epidérmicas
3. Realizar pruebas preliminares para probar la antigenicidad del biomaterial

## **Materiales y métodos**

### ***Mantenimiento de la línea celular de fibroblastos 3T3***

#### ***Amplificación de fibroblastos***

Cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia, se levantaron y subcultivaron las células y se sembró el contenido en dos frascos para amplificar. Se extrajo cuidadosamente todo el medio del frasco de cultivo y se descartó. Se agregó tripsina 0,05%-EDTA 0,2% al frasco de cultivo y se colocó en la incubadora se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, por varios minutos hasta que se verificó en el microscopio invertido el desprendimiento de las células. Se agregó 5ml de medio DMEM con 10% de SFB. Se agitó suavemente para inactivar la tripsina. Se transfirió la suspensión celular a un tubo de centrifuga y se centrifugó a 1200 rpm 3 minutos. Se re suspendió el pellet en 2-3ml de DMEM (dependiendo de la cantidad de pellet) al 10% SFB. Se realizó el conteo celular, con el empleo de una cámara Neubauer. Se tomó una alícuota de 10 µl de la suspensión celular y se mezcló con el mismo volumen de azul tripán al 4%. De esa mezcla, se tomaron 10 µl y se dispensaron en una cámara de Neubauer. Se contaron las células vivas y las células muertas en los cuatro cuadrantes esquineros. Posteriormente se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/ml} = (\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas} / 4) \times 2 \times 10^4$$

Se dispuso de una concentración de al menos 1 millón de células/ml, para congelar (1ml) para su uso en ensayos posteriores y las restantes se sembraron para amplificar el cultivo.

#### *Cambio de medio de cultivo*

El cambio de medio en los cultivos de fibroblastos se realizó cada 2 o 3 días. Con una pipeta de 10ml, se extrajo cuidadosamente todo el medio de cultivo del frasco y se descartó. Seguidamente se agregó medio de cultivo DMEM con 10% SFB y 1% de Estreptomicina y Penicilina al frasco con las células. Finalmente, se colocó en la incubadora de CO<sub>2</sub> con la tapa ligeramente abierta. El procedimiento se realizó rápidamente, ya que las células se empiezan a deshidratar y morir. El volumen de medio de cultivo que contenían los frascos fue el siguiente:

7ml en los frascos T25

24ml en los frascos T75

32ml en los frascos T150

#### *Criopreservación*

Se dispensó en el criovial, el medio DMEM con 30% SFB, sin antibióticos en 900µl conteniendo las células (1 millón células/ml), previamente resuspendidas en medio de congelamiento.

Seguidamente se colocó el criovial en una cama de hielo y con una micro pipeta se agregaron 100ul de DMSO, lentamente, gota a gota. El criovial se agitó suavemente y se incubó por 20 minutos en la cama de hielo. Se colocó a -20°C por 2 horas, y posteriormente a -70° C toda la noche. Posteriormente se transfirió al tanque de almacenamiento de Nitrógeno líquido.

#### *Descongelamiento*

Se seleccionó un criovial con células 3T3 en un pasaje bajo. Se descongelaron las células de este criovial en cámara de flujo laminar, en un frasco T25, colocando 9ml de medio DMEM completo al 20% de SFB. Esto se realizó de la siguiente manera: se sacó el criovial del tanque de congelamiento y se colocó en un beaker con hielo picado durante unos minutos hasta que se observó el descongelamiento parcial, luego el criovial se sumergió rápidamente en agua a 37°C, sin descongelar completamente. Posteriormente dentro de la cámara, se removió el contenido del criovial pipeteando un par de veces. Seguidamente se dispensó el contenido del criovial en el frasco de cultivo preparado con medio e inmediatamente se colocó en la incubadora, se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con la tapa ligeramente abierta. Todo el proceso se realizó rápidamente ya que contenía DMSO, que es tóxico para las células. Este reactivo se lavó con los cambios de medio de cultivo.

## **Esterilización de las matrices**

### *Esterilización con rayos X.*

Originalmente se planeó proporcionar una dosis de 50 KGy para la esterilización de las membranas, pero el equipo de rayos X de la Escuela de Ciencia e Ingeniería de los Materiales del ITCR no tiene la capacidad para suministrar esa dosis, por lo cual se procedió a trabajar con 50 Gy (0.05KGy), una medida que puede ser letal a subletal para la mayoría de los organismos vivos, sin embargo, esto se compensó modificando las condiciones de distancia desde la fuente de irradiación y tiempo de exposición, de manera que considerando la altura de los platos Petri, así como la dosis requerida, la estudiante Diana Michelle López calculó las dos condiciones de tiempo y distancia de exposición que se utilizaron: 0.4m y 0.2m de distancia de exposición por 80 y 20 minutos respectivamente.

Además, las membranas fueron colocadas en platos Petri de plástico sellados con parafilm en secciones cuadradas de alrededor de 2.5cm<sup>2</sup>. A continuación, se incluye un extracto de la práctica dirigida de esta estudiante.

#### **1. Conversiones para los cálculos**

$$50 \text{ Gy} \times \frac{1 \text{ KGy}}{1000 \text{ Gy}} = 0.05 \text{ KGy}$$

$$100 \text{ Rad} = 1 \text{ Gy}; 5000 \text{ Rad} = 50 \text{ Gy}$$

#### **2. Intensidad del equipo a 250 KV**

$$\text{Intensidad} = 2.0 \frac{\text{Rad} \cdot \text{m}^2}{\text{mA} \cdot \text{min}}, (\text{Intensidad máxima recomendada})$$

Para realizar los siguientes cálculos, se suponen todas las distancias las exposición, considerando que la distancia máxima sea de 0.4 m y la mínima de 0.2 m, todas ubicadas a partir del centro del tubo de cobalto al nivel del suelo.

Se realizó el análisis de cuatro condiciones, donde por la similitud de los datos, solo se seleccionaron dos tipos.

**Cálculo de exposición, condición 3**

$$2.0 \frac{\text{Rad} * \text{m}^2}{\text{mA} * \text{min}} \times 5 \text{ mA} \times \frac{1}{(0.4 \text{ m})^2} = 62.5 \frac{\text{Rad}}{\text{min}}$$

0.4 m, Distancia de exposición

5 mA → 240  $\frac{\text{KVp}}{\text{V}}$ , Condiciones de trabajo del equipo

Total de dosis requerida (Tiempo de exposición)

$$50 \text{ Gy} \rightarrow 5000 \text{ Rad}$$

$$5000 \text{ Rad} \times \frac{1}{62.5} = 80.00 \text{ min}$$

**Cálculo de exposición, condición 4**

$$2.0 \frac{\text{Rad} * \text{m}^2}{\text{mA} * \text{min}} \times 5 \text{ mA} \times \frac{1}{(0.2 \text{ m})^2} = 250 \frac{\text{Rad}}{\text{min}}$$

5 mA → 240  $\frac{\text{KVp}}{\text{V}}$ , Condiciones de trabajo del equipo

Total de dosis requerida (Tiempo de exposición)

$$50 \text{ Gy} \rightarrow 5000 \text{ Rad}$$

$$5000 \text{ Rad} \times \frac{1}{250} = 20.00 \text{ min}$$

Cuadro 1. Condiciones de esterilización por rayos X.

<b>Condición</b>	<b>Condiciones de trabajo</b>	<b>Distancia de exposición</b>	<b>Tiempo de exposición</b>
3	5 mA -240 kvp/V	0.4 m	80 min
4	5 mA -240 kvp/V	0.2 m	20 min

Fuente: (López, 2010). Práctica dirigida “Diseño y confección de un mecanismo de sujeción para membranas biopoliméricas”

Cuadro 2: Muestras tratadas con rayos X\*.

<b>Grupo</b>	<b>Películas Biopoliméricas</b>	<b>Cantidad de muestras</b>
<b>Grupo A</b>	8-2 C-Q	4
	2-8 C-Q	4
	4-6 C-Q	2
	0-10 C-Q	3

<b>Grupo B</b>	6-4 C-Q	1
	4-6 C-Q	1
	8-2 C-Q	3

\* El grupo A se diferencia del B en el sentido que el grupo B consiste en membranas elaboradas mediante la técnica de entrecruzado. Fuente: (López, 2010).

#### *Evaluación del tratamiento con rayos X*

La presencia o ausencia de microorganismos en las membranas irradiadas fue determinada según el siguiente protocolo:

1. Utilizando pinzas y tijeras estériles y trabajando en cámara de flujo laminar, se cortaron delgados fragmentos de 3 de los 4 bordes de las membranas tratadas con rayos X, extrayendo 6 fragmentos de cada membrana.
2. Cada fragmento fue inoculado en placas multipozo de 6 pozos mediante la técnica de vertido, agregando 3-4 ml de agar papa dextrosa para evaluar la presencia de hongos y levaduras, o 3-4ml de agar de recuento estándar para evaluar la presencia de bacterias y levaduras. Estos dos medios de cultivo permiten evaluar la presencia general de contaminantes microbianos ambientales.
3. Se realizaron tres repeticiones para cada membrana en cada medio de cultivo.
4. La presencia o ausencia de microorganismos se evaluó a los 5 días y a 1 semana.

#### *Esterilización con acetona de las matrices seleccionadas para el crecimiento de fibroblastos*

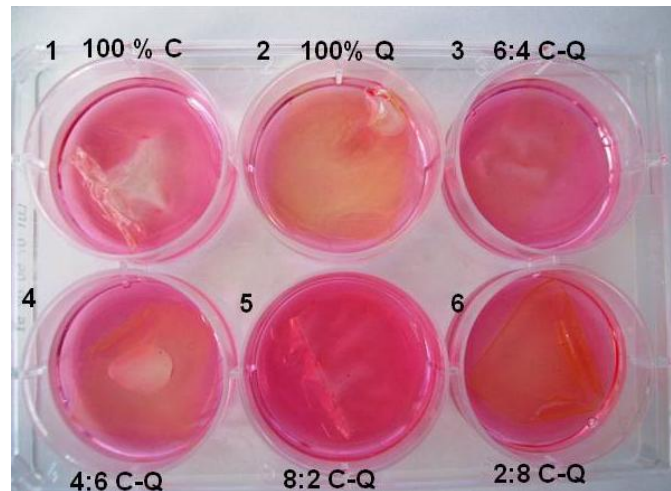
Se trabajó preferiblemente con las matrices 2:8,8:2, 6:4 y 4:6 (colágeno: quitosano respectivamente), que mostraron buenos resultados en ensayos anteriores. Se cortaron un fragmentos cuadrados de membrana que se ajustaban a las dimensiones del anillo de sujeción, procurando que los segmentos fueran ligeramente de mayor tamaño para que el ajuste no fuera muy forzado. Luego se esterilizaron en la cámara de flujo laminar, de la siguiente manera: se sumergió el fragmento de membrana 5 minutos en acetona previamente esterilizada por filtración utilizando un filtro de jeringa (0,22 µm), inmediatamente, se sumergió el fragmento 5 minutos en etanol 70%, previamente esterilizado por filtración (0,22 µm) y se hicieron dos lavados con PBS



estéril. Finalmente, se incubaron en DMEM completo (10% SFB) se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, durante 5 minutos para rehidratar.

*Diseño y elaboración de aros de sujeción para las membranas biopoliméricas.*

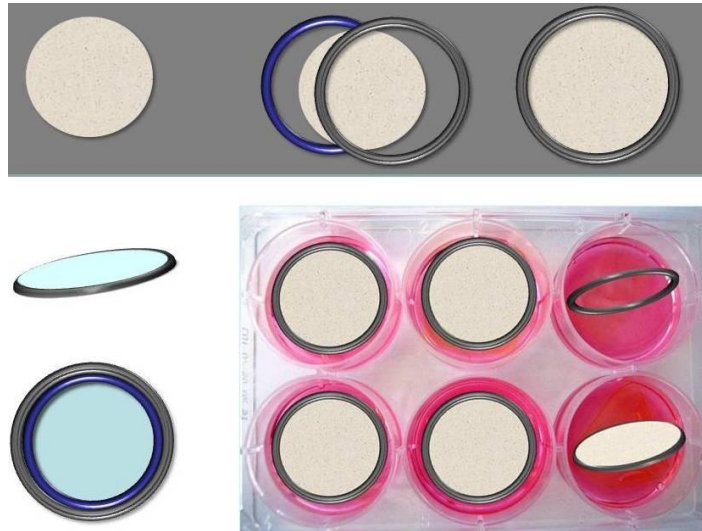
Luego de diversos ensayos para observar el comportamiento de las membranas biopoliméricas, bajo las condiciones de cultivo celular *in vitro* requeridas, se encontró que las membranas se enrollaban sobre sí mismas, flotaban y se arrugaban en el medio de cultivo. Esto es indeseable ya que dificulta el cultivo de las células sobre las mismas, como se observa en la Fig.1.



**Figura 1. Matrices biopoliméricas inmersas en medio de cultivo para fibroblastos.**

C: colágeno, Q: quitosano. Nótese que las matrices no están sujetas a la superficie, se encuentran flotando y presentan arrugas y dobleces.

Por otro lado, el trabajo de graduación de la Ing. en Biotecnología, Silvia Castro: “Modelos experimentales para el manejo *in vitro* de queratinocitos y fibroblastos humanos para su utilización con una matriz con potencial en ingeniería de tejidos” realizado en el Hospital Austral, en Buenos Aires, Argentina (Anexo 4) determinó que las membranas deben estar tensadas para la adecuada adhesión y proliferación celular. Debido a esto, se diseñó el sistema de sujeción mostrado en la figura 2 para ajustar las membranas a manera de prensa dentro de los platos de cultivo de 6 pozos. La idea original fue propuesta por la Ing. Silvia Castro, y el diseño de los aros fue elaborado por la Ing. Laura Calvo.



**Figura 2. Diseño de los aros metálicos tipo prensa como mecanismo de sujeción para las membranas biopoliméricas.**

Como parte de la práctica dirigida de la estudiante de Ingeniería de los Materiales del ITCR Diana Michelle López, se afinó el diseño en término de los materiales a utilizar (arandelas de acero inoxidable) y se elaboraron los aros metálicos para la sujeción de las membranas con diferentes grosores, mostrados a continuación. De estas cinco variantes, se eligió el aro número 3, dado que sus dimensiones fueron las que aportaron el mejor ajuste con las membranas. Se utilizó una calidad de acero especial de manera que los aros pudieran ser autoclavados para su esterilización, y así ser utilizados y reutilizados en cultivo celular.

Cuadro 3: Dimensiones de los anillos confeccionados

Número de Anillo	Aro de mayor diámetro Externo (mm)		Aro de menor diámetro Interno (mm)		Luz entre aros (mm)
	Característica	Valor (mm)	Característica	Valor (mm)	
1	Ancho	1.9	Ancho	2.3	0.4
	Espesor	2.5	Espesor	2.4	
	Diam. Inter	30.1	Diam. Inter	25.5	
	Diam. Exter	34.1	Diam. Exter	29.7	
2	Ancho	1.9	Ancho	2	0.9
	Espesor	2.4	Espesor	1.9	
	Diam. Inter	30	Diam. Inter	25.7	
	Diam. Exter	33.3	Diam. Exter	29.1	
3	Ancho	1.9	Ancho	2.2	0.7
	Espesor	2.4	Espesor	2.5	
	Diam. Inter	30.2	Diam. Inter	25.2	
	Diam. Exter	33.9	Diam. Exter	29.5	
4	Ancho	1.9	Ancho	2.3	0.6
	Espesor	2.4	Espesor	1.4	
	Diam. Inter	30.1	Diam. Inter	25.4	
	Diam. Exter	33.9	Diam. Exter	29.5	
5	Ancho	1.9	Ancho	1.8	0.7
	Espesor	2.4	Espesor	1.7	
	Diam. Inter	30.4	Diam. Inter	26.2	
	Diam. Exter	33.9	Diam. Exter	29.7	

Fuente: (López, 2010).

**Preparación y esterilización de las matrices biopoliméricas seleccionadas.**

*Esterilización Anillos de sujeción*

Los anillos disponibles para la sujeción de las membranas se esterilizaron en autoclave. Para evitar su oxidación, se lavaron previamente de la siguiente manera:

- a. Se enjuagaron brevemente con cloro al 1%(v/v).
- b. Se lavaron con esponja suave con jabón neutro (no enzimático).
- c. Se sumergieron en alcohol al 70%.
- d. Se lavaron 3 veces con agua destilada.
- e. Se secaron y se autoclavaron, empacando por separado el anillo inferior y el anillo superior para permitir la esterilización de la zona de traslape.

Al finalizar los ensayos, los anillos se lavaron inmediatamente para evitar que permanecieran húmedos o sucios.

### *Preparación de matrices con anillos de sujeción*

Se tomó un fragmento de la membrana previamente esterilizado y se prensó entre el anillo pequeño y el anillo grande, teniendo cuidado de no romper ni rasgar la membrana. Seguidamente se recortó con tijeras estériles, los bordes sobrantes de membrana.

Una vez sujeta la misma, el anillo con la membrana se introdujeron dentro del pozo de una placa multipozo de 6 pozos. Con cuidado de manipular todo el sistema de sujeción, las membranas y el frasco se manejaron con sumo cuidado para mantener la asepsia de las membranas.

### ***Verificación de la adhesión celular a las membranas y determinación de la viabilidad***

#### *Verificación de la adhesión celular a las membranas*

Se realizaron observaciones periódicas de las células, con el empleo del microscopio invertido para determinar la confluencia, y estudiar la morfología celular así como la presencia de posibles contaminantes. Se realizaron pruebas con hisopados en ACC (agar de conteo completo) y APD (agar papa dextrosa) para descartar contaminación por levaduras, mohos y bacterias.

Se realizaron cambios de medio cada 8 horas, durante 48 horas. En cada cambio de medio se determinó el número de células vivas y muertas presentes en el medio de cultivo que se extrae de las muestras.

#### *Tinciones con MTT, Azul Tripán y Diacetato de Fluoresceína*

A las 48 horas de incubación, se realizó una tinción con MTT para verificar las células adheridas a la membrana.

Se preparó adicionando 50mg del reactivo (Sigma) en 1ml de PBS, esto se colocó en agitación por 2 horas para que este se disolviera. Se cubrió con papel aluminio ya que es fotosensible y se guardó en refrigeración a 4°C.

Se dispensaron 10ul de MTT por cada 100 ul de medio que había en el pozo. Se colocaron en la incubadora de CO<sub>2</sub> aproximadamente por 3 a 4 horas. Se observaron al microscopio invertido las células teñidas de morado que se adhirieron a la membrana.

Con el mismo tiempo de incubación se realizó una tinción con Azul Tripán para verificar la adhesión celular, utilizando una solución al 0.04% en proporción 1:1 con medio existente en los pozos de las placas de cultivo que colocaron por 3 a 4 horas en la incubadora de CO<sub>2</sub>. El último método de tinción utilizado fue con Diacetato de Fluoresceína (1mg/ml), realizado en iguales proporciones y tiempo que el método anterior.

#### *Incremento de la adhesión celular*

Se emplearon distintas técnicas para mejorar la adhesión celular. Por un lado, dado que las membranas no son porosas, se hicieron agujeros en la membrana con una aguja 22Gx1 para mejorar la aireación. Además, para promover la adhesión las membranas al fondo del pozo de

cultivo, se sumergió cada membrana en SFB durante 5 minutos y se colocaron en el fondo del pozo y se sometieron a 2 minutos de liofilización a  $-45^{\circ}\text{C}$  y 0,036 Torr.

Antes de determinar la presencia de fibroblastos sobre las membranas, éstas se lavaron con PBS para eliminar las células no adheridas y se transfirieron a placas Petri nuevas.

## Resultados y Discusión.

### ***Mantenimiento de la línea celular de fibroblastos 3T3***

Los protocolos de cultivo, subcultivo, crioconservación y descongelamiento mostraron ser efectivos para suministrar el número de fibroblastos que se requerían para los ensayos. Asimismo las células presentaban características morfológicas normales típicas.

Se utilizaron células a partir del pasaje 13, pues el crecimiento fue mucho más rápido y mejor lo que redundó en una disminución en la cantidad de células utilizadas para obtener adhesión y proliferación celular.



**Fig. 3.** Crecimiento de fibroblastos a los 2 días de del pasaje. A) Pasaje 4, B) Pasaje 9, C) Pasaje 17.

### ***Esterilización mediante rayos X.***

Tal y como se describió en el informe previo (2008), la esterilización de las matrices es fundamental para la obtención de cultivos celulares asépticos. Algunos de los métodos de esterilización empleados resultaron poco efectivos, obteniendo contaminación remanente (únicamente reducción de la carga microbiana) y otros muy agresivos, afectaron la integridad de las membranas o la adherencia y crecimiento de los fibroblastos. Comparaciones espectroscópicas infrarrojas (FT-IR) realizadas en POLIUNA, demostraron que todos los métodos de esterilización utilizados e incluso la exposición de las matrices a condiciones rutinarias de cultivo, incidían en la estructura física y química de las matrices a diferentes niveles. Sin embargo, también se observó que los métodos de esterilización no alteraron significativamente la estructura macroscópica de las matrices.

Con base en esta información, se concluye que cualquier método de esterilización tendrá efectos físicos y químicos sobre las matrices, de manera que se dispuso continuar trabajando con los métodos de esterilización que presentaban ventajas en términos de costo, tiempo y disponibilidad, como lo son la exposición a alcohol 70% y a óxido de

etileno, así como la irradiación con rayos X. Durante el I semestre del 2010, se estandarizaron las condiciones de esterilización mediante rayos X (López, 2010). Mediante este trabajo, se trataron membranas en todas sus proporciones colágeno:quitosano (excepto 100% colágeno) utilizando una dosis de 50Gy bajo dos condiciones: 0.4m de distancia de exposición con 80 minutos de exposición, y 0.2m de distancia de exposición con 20 minutos de exposición. Se obtuvo un 56% de éxito en términos de esterilización (Cuadro 5), se observó que el 100% de membranas esterilizadas presentaban en su composición mayor presencia de colágeno que de quitosano, por lo que son más delgadas en comparación a las demás matrices. Esto se podría explicar porque los rayos X, penetran más fácilmente la membrana, por el menor grosor de la membrana. Además, la contaminación en la mayoría de los casos implicó la proliferación de hongos y no de bacterias, por lo que se considera la dosis utilizada afectó más a las bacterias que a los hongos.

Cuadro 5: Evaluación microbiológica de los tratamientos con rayos X.

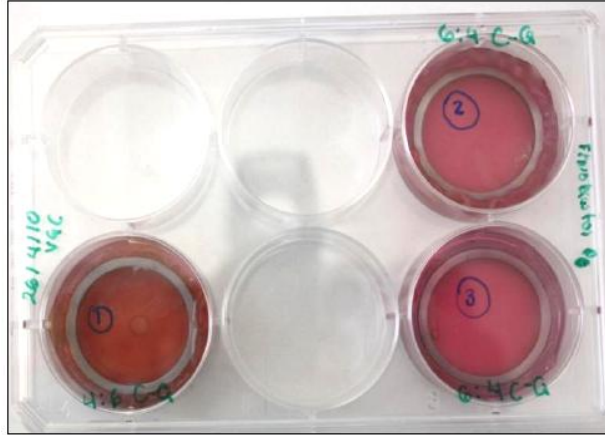
Composición	Condición	Grupo	Muestra	Réplicas					
				ACC			APD		
10 Q	4	A	Y	-	-	-	-	+	-
8-2 C-Q	4	A	Y	-	-	-	-	-	-
8-2 C-Q	3	A	Y	-	-	-	-	-	-
8-2 C-Q	4	A	X	-	-	-	-	-	-
4-6 C-Q	4	A	X	-	-	-	+	+	+
2-8 C-Q	3	A	X	-	-	-	+	-	+
2-8 C-Q	4	A	Z	-	-	-	+	+	-
10 Q	4	A	X	-	-	-	+	+	-
6-4 C-Q	4	B	X	+	+	+	+	+	+
4-6 C-Q	4	B	X	+	+	-	+	+	-
8-2 C-Q	4	B	X	+	+	+	+	+	+
8-2 C-Q	4	B	Y	+	+	-	+	+	+
2-8 C-Q	4	A	Y	-	-	-	-	-	+
4-6 C-Q	3	A	X	+	+	+	-	+	-
8-2 C-Q	3	B	X	+	+	+	+	+	+
10 Q	3	A	X	-	-	-	-	-	-

Fuente: Laboratorio de tejidos del Centro de Investigación de Biotecnología, Instituto tecnológico de Costa Rica

(-): ausencia de microorganismos, (+): presencia de microorganismos.

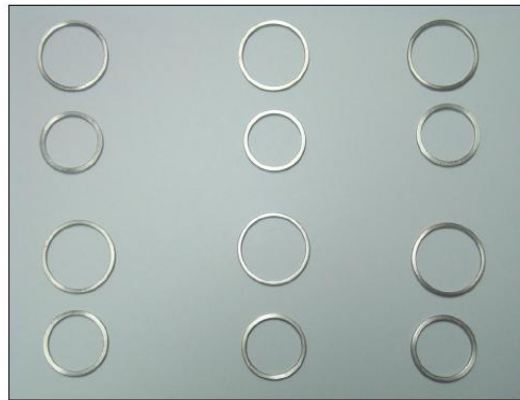
### **Elaboración de los aros de sujeción**

Tal y como se puede observar en la figura 3, el aro 3 mantiene la membrana tensa y sin arrugas y fue el único fabricado en el cual no se observó desgarre de las membranas tanto al prensarlas inicialmente como al desprenderlas. Debido a esto, se fabricaron 6 aros con estas dimensiones para realizar cultivo celular sobre las membranas tensadas en los mismos. Además, otra ventaja de los aros es que pueden ser fácilmente esterilizados en autoclave.



**Figura 4. Evaluación de la eficacia de los aros de sujeción para mantener tensas las membranas bajo las condiciones de cultivo *in vitro*.** La numeración 1, 2 y 3 se refiere a las dimensiones de los aros según el cuadro 4.

En la figura 5 se muestra la apariencia final de los aros fabricados por Diana Michelle López.



**Figura 5. Apariencia final de los aros de sujeción fabricados.**

***Preparación y esterilización de las matrices biopoliméricas seleccionadas.***

La efectividad de los aros para mantener las membranas tensadas se comprobó manteniendo membranas en cultivo durante dos semanas prensadas con el aro número 3, durante este tiempo no se observó la presencia de arrugas ni pérdida de la integridad estructural de la membrana, ni contaminación fúngica ni bacteriana.

***Verificación de la adhesión celular a las membranas y determinación de la viabilidad***

Los resultados de estos ensayos demuestran que los fibroblastos crecieron normalmente (en comparación con ensayos en los cuales no había matrices adheridas a los frascos de cultivo), sin diferencias observables entre los ensayos inoculados con fibroblastos 3T3 y

fibroblastos humanos, lo que indica que las matrices no tuvieron efectos citotóxicos sobre las células. Sin embargo, se observó que las células presentan mayor crecimiento sobre la superficie de los pozos de cultivo, y que además al parecer “chocan” con los bordes de las matrices, siendo que el “escalón” entre la superficie expuesta de la matriz y el fondo del plato de cultivo se recubre con fibroblastos (Figs 6 y 7).

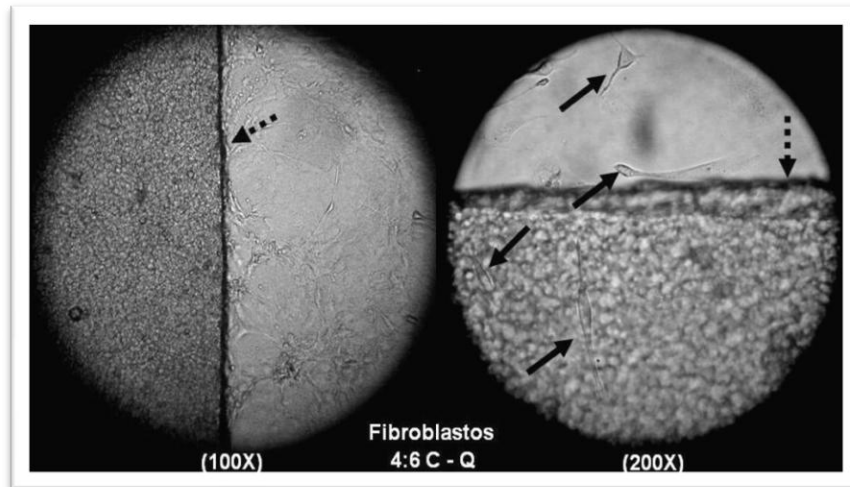
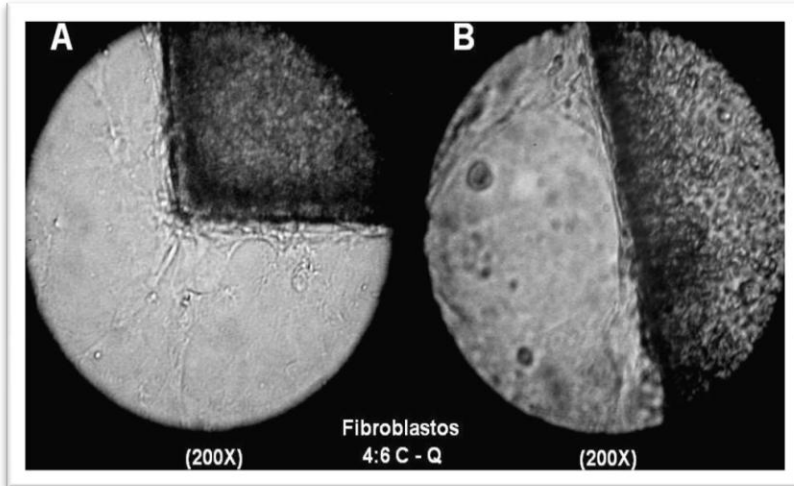


Fig. 6. Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica. Las flechas de línea continua indican fibroblastos, mientras que las flechas de línea punteada indican el borde límite donde termina la membrana, siendo que la sección más opaca corresponde a la matriz y la sección más oscura corresponde a la superficie del plato de cultivo. Nótese la presencia de fibroblastos individuales (B) que parecen estar creciendo sobre o bajo la matriz. Nótese también la alta confluencia celular, alrededor de 85% (A).

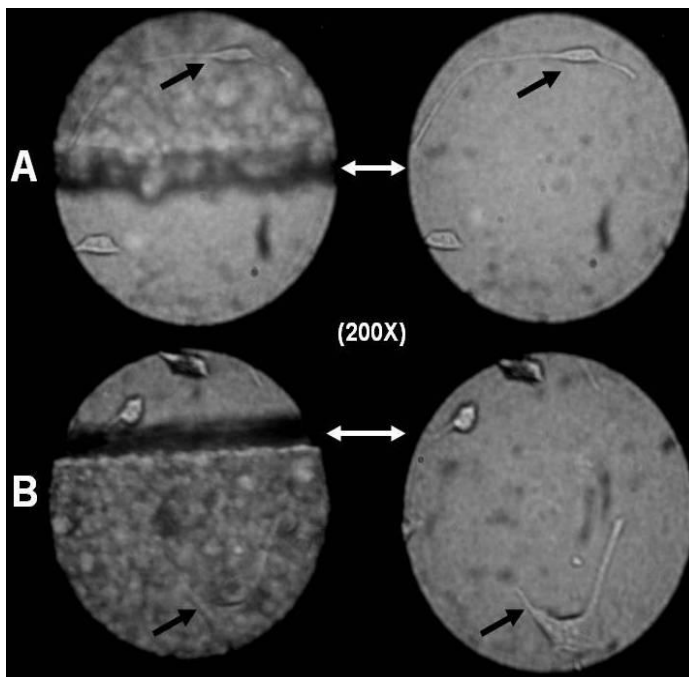
Se observó después de que luego de 8 horas de realizado el cultivo sobre las membranas, las células no adheridas no se adherirán más tarde. Así, si se sembraron 50 mil células en total, y a las 8 horas se contaron 25 mil células en suspensión, quiere decir que se adhirió un 50% del inóculo inicial.

Por otro lado, para verificar la superficie a la cual se observaron adheridos los fibroblastos, se ubicaron fibroblastos que parecían adheridos la matriz biopolimérica. La matriz fue desprendida y se esperaba que los fibroblastos se desprendieran con ella, pero se observó que los fibroblastos crecieron por debajo de la matriz sobre la superficie del plato de cultivo (Fig.7), de manera que no se encontró adhesión a la matriz en ninguno de los ensayos (Fig.8).





**Fig. 7. Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica.** Las regiones opacas corresponden a la superficie de la matriz biopolimérica, mientras que las regiones claras es la superficie del plato de cultivo. Nótese la región de “choque” de los fibroblastos con el borde de la matriz.



**Fig. 8.** Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica antes y después de remover la matriz del plato de cultivo. Las flechas blancas indican el borde la matriz (opaca). Las flechas negras indican fibroblastos individuales que parecían adheridos a la matriz. Sin embargo, tal y como se observa en las imágenes de la derecha, al remover la matriz del plato de cultivo, las células se mantienen adheridas al plato de cultivo y no a la matriz.

Se observó crecimiento celular en todas las membranas utilizadas (Fig.9), con mayor densidad de células en la membrana 2-8 C-Q, ya que se logró obtener más del 50% de confluencia.

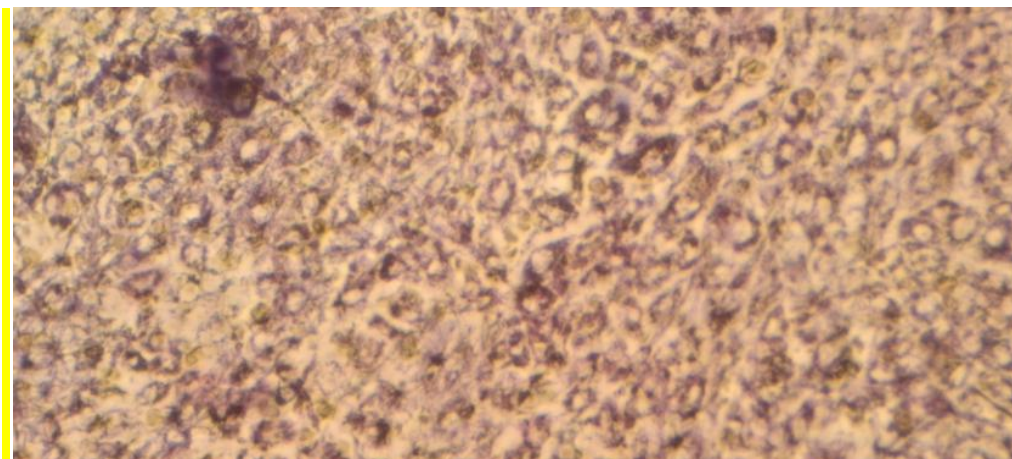


Fig. 9. Fibroblastos adheridos a matrices 4:6 (A), 6:4 (B) y 2:8 (C) colágeno:quitosano teñidas con MTT luego de ser inoculadas con fibroblastos 3T3 sobre su superficie e incubadas durante 48 horas. Se puede afirmar que las células están adheridas a la matriz por su morfología fusiforme, la cual adquieren sólo al adherirse a un sustrato. Además, su coloración morada indica que están metabólicamente activas, dado que redujeron el MTT (100x).

Inicialmente se dificultó verificar la adhesión celular, ya que las membranas son muy opacas, lo que impidió observar la presencia o ausencia de células sobre las mismas. Se utilizaron dos métodos de tinción para este efecto, el azul tripán y el diacetato de fluoresceína (DFA). Sin embargo, el azul tripán tiñó las membranas biopoliméricas en su totalidad, y el DFA produjo una fluorescencia del quitosano, e impidió detectar la presencia de células. Para resolver este problema, se estandarizó el protocolo de tinción utilizando MTT, un reactivo específico para detección de la actividad metabólica celular.

A las 48 horas de estar en contacto las matrices biopoliméricas con los fibroblastos el medio de cultivo se tornó amarillo, denotando un pH más ácido, y en algunos pozos se presentaron burbujas debajo de la membrana sin embargo no se observó ninguna contaminación. Esto se debió probablemente a la adhesión y crecimiento de fibroblastos en la superficie inferior del pozo, lo que produjo una alta concentración de  $\text{CO}_2$ , que acidificó el medio de cultivo, por lo que se hicieron poros en la membrana con una aguja 22Gx1, para incrementar el intercambio de gases.

Se logró el crecimiento celular en la membrana 2-8 C-Q 4, Z, A. Se determinó que se requieren 200,000 células para lograr detectar la presencia de fibroblastos en la membrana. A las 2 semanas de estar incubando las membranas la mayoría estaban disueltas en el medio, las únicas que permanecieron intactas fueron: la 4-6 C-Q 3, x, z y la 2-8 C-Q 4, Z, A. (Fig. 10).

Para comprobar la presencia de fibroblastos en la membrana se realizaron ensayos de tinción con MTT, los cuales se compararon con resultados obtenidos con azul tripán y diacetato de fluoresceína.

El empleo del FDA fue descartado en los ensayos debido a que el espesor de membrana no permitió la visualización de las células al microscopio de fluorescencia, además tiñó el quitosano, (Fig. 7). por otro lado al teñir con azul tripán, se coloreó la membrana en conjunto con las células lo que no permitió distinguir los fibroblastos.

El MTT es una forma de tinción eficiente ya que a diferencia de los otros métodos de tinción utilizados, el MTT demostró ser más eficiente, probablemente porque este para generar color debe ser absorbido y metabolizado por la célula. En el interior de la células el MTT ingresa en la mitocondria donde es oxidada en formazán lo que le genera un color azul- violeta; lo que permite observar los fibroblastos y por la misma razón, la membrana no se tiñe.

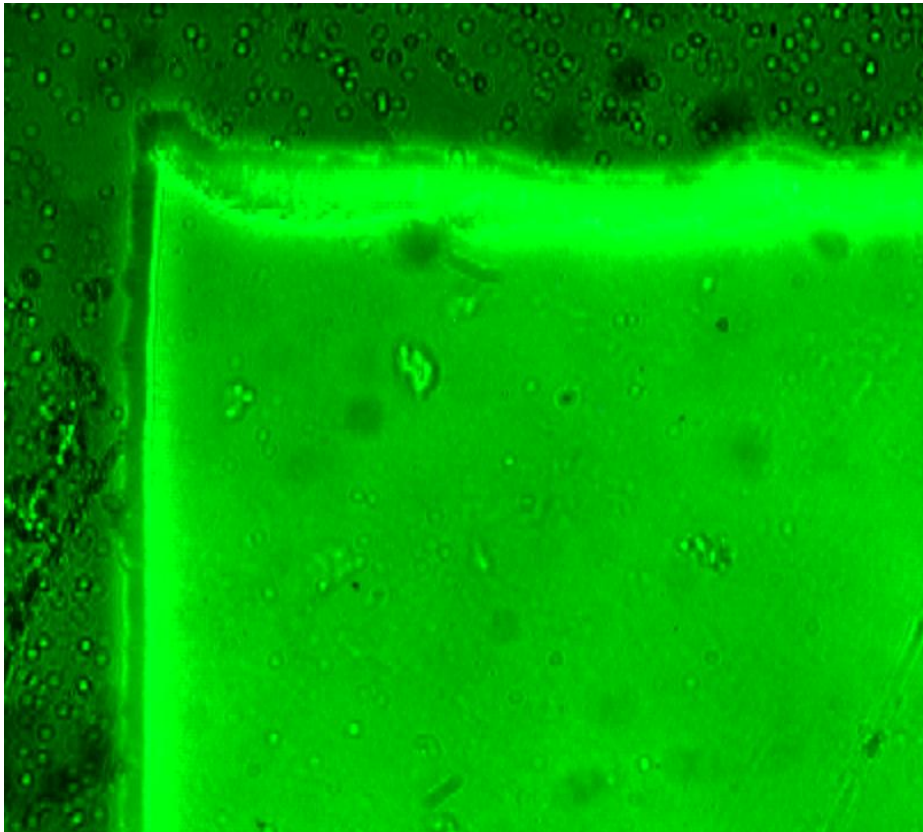


Fig. 10. Membrana de quitosano teñida con FDA. Se observa la fluorescencia de la membrana en contraste con el medio oscuro.

Con la aplicación del MTT se logró observar las células teñidas y no así la membrana, y esto se pudo comprobar al comparar los resultados con los controles (FIG 11).

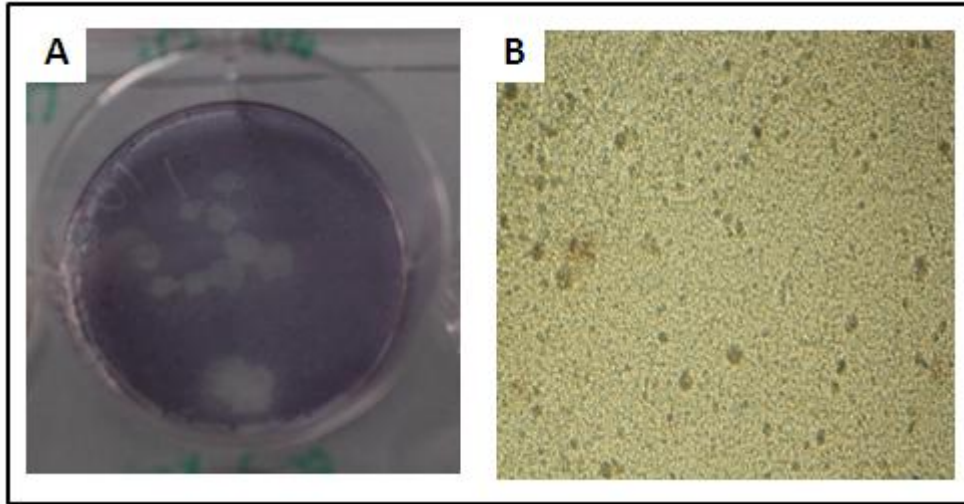


Fig. 11. Control positivo (A) de fibroblastos 3T3 en monocapa teñidos con MTT y control negativo (B) de membrana 6:4 teñida con MTT pero sin haber sido inoculada con fibroblastos. Las imágenes muestran que las células se tiñen pero la membrana no.

## CONSIDERACIONES FINALES

1. El desarrollo *in vivo* de las células epiteliales, tanto su diferenciación como su multiplicación, dependen de complejas interacciones con la matriz extracelular, así como de diferentes estímulos procedentes de los fibroblastos y sus productos. Para diseñar un sustituto de piel el primer paso fue establecer un sistema *in vitro* en el cual las células cultivadas puedan crecer en matrices biodegradables, las cuales proveen señales físicas y químicas que ayudan a controlar la correcta formación espacial-temporal del tejido *in vivo*.
2. La razón por la que se llevan a cabo las pruebas con las matrices biopoliméricas es que en general, las células cultivadas son dependientes de anclaje, es decir necesitan adherirse a un sustrato para poder sobrevivir. Estos sustratos pueden ser recipientes especiales para el cultivo de tejidos, que pueden estar recubiertos con componentes de la membrana extracelular para aumentar sus propiedades de adhesión y proporcionar otras señales necesarias para el crecimiento y diferenciación.
3. Los procedimientos de aislamiento y siembra inicial de los fibroblastos son clave para un buen desarrollo *in vitro*, por lo cual se debe de ser muy específico al brindarle las mejores condiciones respectivas, con el fin de lograr una buena confluencia.

4. Los fibroblastos, requieren un período de adaptación a las condiciones de cultivo (fase lag), una vez superado este período, su expansión y mantenimiento *in vitro* se hace de una manera fácil, sin grandes requerimientos y es posible lograr una buena amplificación de los mismos.
5. Otro tipo de cultivo adherente es el cultivo organotípico que consiste en cultivar las células en un ambiente tridimensional (o una membrana extracelular artificial) a diferencia de las placas de cultivo bidimensionales. Este tipo de cultivo 3D es bioquímica y fisiológicamente similar al tejido vivo. Sin embargo, la elección del andamio a utilizar presenta dificultades técnicas importantes.

## CONCLUSIONES

1. Al comparar los diferentes métodos de esterilización (solución de antibióticos, acetona, luz ultravioleta y otros) el más eficiente fue la irradiación de las membranas con rayos x, aunque este protocolo varía según el grosor y composición de los biomateriales.
2. Las membranas 2-8 y 6:4 C-Q, mostraron el mayor crecimiento de fibroblastos. En conjunto con el nuevo soporte de anillos y el método de colocación de la membrana se logró optimizar la adhesión celular al colocar la membrana al liofilizador antes de colocar las células, para que se adhiriera al pozo.
3. El uso de los anillos sujetadores resulta favorable dado que mantienen la tensión de la membrana y con esto mejoran el ensamblaje de los elementos del citoesqueleto para el adecuado crecimiento de las células sobre las membranas
4. El método de tinción más eficiente fue el que utiliza MTT, ya que permitió observar el crecimiento de fibroblastos en la membrana, debido a que ésta no se tiñó con el compuesto. Por último, la tinción con MTT se prefiere antes que los otros métodos de tinciones utilizados debido a que el MTT demostró ser más específico al teñir las células y no las membranas, probablemente porque éste, para generar color, debe ser absorbido y metabolizado por la célula.

## Aportes y alcances:

### ***Aspectos en que el proyecto colaboró para el aumento de la cooperación entre las universidades y la conformación del Sistema Interuniversitario de Investigación***

Dado que el proyecto de investigación fue ejecutado en forma complementaria entre dos laboratorios de investigación del sistema nacional de educación superior estatal, esto permitió potenciar las fortalezas de cada uno, permitiendo la ejecución de acciones conjuntas que de no ser de esta manera no se podrían llevar a cabo. La

interdisciplinariedad desarrollada en este proyecto fortaleció la formación académica de los estudiantes a nivel de la interacción profesional y la adquisición de conocimientos, permitiéndoles trabajar en grupos de investigación donde cada participante es tan importante como el otro y mejorando la visión interdisciplinaria de estos futuros profesionales, lo cual será de gran beneficio para el desarrollo del país. Por otro lado, la vinculación estratégica establecida entre los sectores pesquero y salud, permitió establecer un punto de partida para que las universidades, especialmente los laboratorios involucrados en el proyecto, se fortalezcan académicamente en el desarrollo de investigación aplicada. De esta manera, se establece que la cooperación interuniversitaria es no sólo utilitaria para el desarrollo científico, sino que también es factible y necesaria para el despegue de la investigación aplicada y el desarrollo intelectual y práctico de la ciencia en Costa Rica.

***Impacto que el proyecto alcanzó en los ámbitos científico, social, cultural, ambiental y económico***

**Cuadro 6: IMPACTO DEL PROYECTO EN DIVERSOS ÁMBITOS.**

<b>ÁMBITO</b>	<b>IMPACTOS</b>
<b>Científico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Obtención de un nuevo biomaterial.</li> <li>- Práctica de protocolos de cultivo de células epidérmicas en Costa Rica.</li> <li>- Espacio para trabajos de graduación de estudiantes de grado y postgrado.</li> <li>- Potenciación de las cualidades académicas y científicas de los laboratorios de la UNA y el ITCR participantes.</li> <li>- Intercambio dinámico de conocimientos entre los laboratorios participantes.</li> </ul>
<b>Social</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Establecimiento de contacto interdisciplinario entre la UNA y el ITCR.</li> <li>- Vinculación con el sector productivo pesquero y el sector salud.</li> </ul>
<b>Cultural</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Divulgación del proyecto de la experiencia científica al sector público nacional, resaltándolo no sólo como un proceso de innovación de nuevos materiales de utilidad en biomedicina, sino como una base para fomentar el desarrollo científico en esta área en el país.</li> </ul>
<b>Ambiental</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aprovechamiento de desechos acuáticos que representan actualmente en nuestro país un gran problema ambiental.</li> </ul>

***Comentarios adicionales o recomendaciones a los investigadores del proyecto***

Este proyecto ha permitido complementar el trabajo de dos grupos de investigadores lo ha conllevado que la investigación pueda proseguir, pues las características físico-químicas

de las membranas deban ser mejoradas a fin de poder soportar el crecimiento de las células. Adicionalmente se está trabajando en el método de esterilización de las mismas que no afecte las características antes señaladas.

## **Bibliografía**

Adekogbe, I.; A. Ghanem. 2005. Fabrication and Characterization of DTBP-crosslinked Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Biomaterials*. 26: 7241-7250.

ASTM. Designación E 1131-03: Standard Test Method for Compositional Analysis by Thermogravimetry.

ASTM. Designación D 2857: Viscosidad de disoluciones diluidas de polímeros.

ASTM. Designación D 3417: Standard Test Method by Dynamic Mechanical Analyzer.

ASTM. Designación E 3418-99: Standard Test Method for Transition Temperatures of Polymers by Differential Scanning Calorimetry.

Auger, F., Berthod, F., Moulin, V, Pouliot, G & Germain, L. (*Biotechnol. Appl. Biochem.* (2004). 39, 263-275.

Cao, Y., Vacanti, J. P., Paige, K. T., Upton, J.&Vacanti, C. A. 1997 Transplantation of chondrocytes utilizing a polymercell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of human ear. *Plast. Reconstr. Surg.* 100, 297–302.

HAN, C.; ZHANG, L.; , SUN, J., SHI, H, ZHOU, J.;, GAO, C. 2010. Application of collagen-chitosan/fibrin glue asymmetric scaffolds in skin tissue engineering. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)* 11(7):524-530.

Higham, M. C.; Dawson, R.; Szabo, M.; Short, R.; Haddow, D. B. and S. McNeil. 2003. Development of a stable Chemically Defined Surface for the Culture of Human Keratinocytes under Serum-Free Conditions for Clinical Use. *Tissue Engineering*. 9(5):919-929.

Ikada, Y. 2006. Challenges in tissue engineering. *REVIEW J. r. SOC Interface* (2006) 3: 589–601.  
doi:10.1098/rsif..0124 2006.

Jian, X. L.; W. Chen; Zhong. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carboh. Pol.* 54: 457-463.

Jianbiao M.; H. Wang; B. He; J. Chen. 2000. A Preliminary *in vitro* Study on the Fabrication and tissue Engineering Applications of a Novel Chitosan Bilayer Material as a Scaffold of Human Neonatal dermal Fibroblasts. *Biomaterials*. 20: 331-336.

Kalyanaraman, B and Boyce, S. 2007. Assessment of an Automated Bioreactor to Propagate and Harvest Keratinocytes for Fabrication of Engineered Skin Substitutes. *Tissue Engineered Skin Substitutes* 13(5): 983-993.

Lie Ma, Changyougao, Zhengweimao, Jiacong Shen, Xueqinghu and Chunmao Han. 2003. Thermal dehydration treatment and glutaraldehyde cross-linking to increase the biostability of collagen-chitosan porous scaffolds used as dermal equivalent. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 14, No. 8, pp. 861-874.

Monteiro F. J. San Román, J. 2004. BIOMATERIALES: INTRODUCCIÓN Y DESARROLLO HISTÓRICO. **EN:** BIOMATERIALES. Edtado por R. Sarte, S. De Aza y J. San Román. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Biomateriales para la salud. CYTED. Madrid, España.p:17-26.

Nagai T, Yamashita E, Taniguchi K, Kanamori N, Suzuki N. 2000. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chemistry*. Pp 1-5.

Ramírez, C.H. (2006). Matrices y Biomateriales en Ingeniería de Tejidos. En: Medicina Regenerativa y Stem Cells. Agibay P. (compilador). Universidad Nacional de Quilmas. PP. 462.

Parkinson, E. K.; Hume, W. J.; Potten, C. S: 1986. The radiosensitivity of cultured human and mouse keratinocytes. *INT. J. RADIAT. BIOL.* Vol 50(4):717-726.

Peniche, C.; W. Argüelles; A. Gallardo; C. Elvira; J. San Román. 2001. Quitosano: Un Polisacárido Natural Biodegradable y Biocompatible con Aplicaciones en Biotecnología y Biomedicina. *Rev. Plast. Mod.* 81: 81-91.

Prenosil, J.E.; Villeneuve, P.E. 1998. Automated Production of Cultured Epidermal Autografts and Sub-Confluent Epidermal Autografts in a Computer Controlled Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 59(6):679-683.

Ramos, C.; C. Becerril; J. Cisneros; M. Montaña. 2004. El Miofibroblasto, una Célula Multifuncional en la Patología Pulmonar. *Rev. Inst. Nac. Enf. Resp.* 3: 215-231.

Ramos H.; A. Acosta; J. Díaz. 2006. Piel Artificial. *Rev. Col. Tecnol. Av.* 2: 41-47.  
Sastre, R.; Aza, S. & Román, J. 2004. Polímeros biodegradables para aplicaciones biomédicas. *Biomateriales*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC. España. Pp 219-237.

Sionkowska A, Wisniewski M, Skopinska J, Kennedy C.J, Wess T.J. 2003. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomateriales*. Polonia (**Tesis de grado**)

Tangsadthakun, C.; S. Kanokpanont; N. Sanchavanakit; T. Banaprasert; S. Damrongsakkul. 2006. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. *Journal of Metal, Mat. Min.* 16: 37-44.

Wang, X; Yan, Y.; Xiong, Z.; Lin, F.; Wu, R.; Zhang, R.; Lu, Q . 2004. Preparation and Evaluation of Ammonia-Treated Collagen/Chitosan Matrices for Liver Tissue Engineering. *Tsinghua University, Beijing 100084, People's Republic of China.*

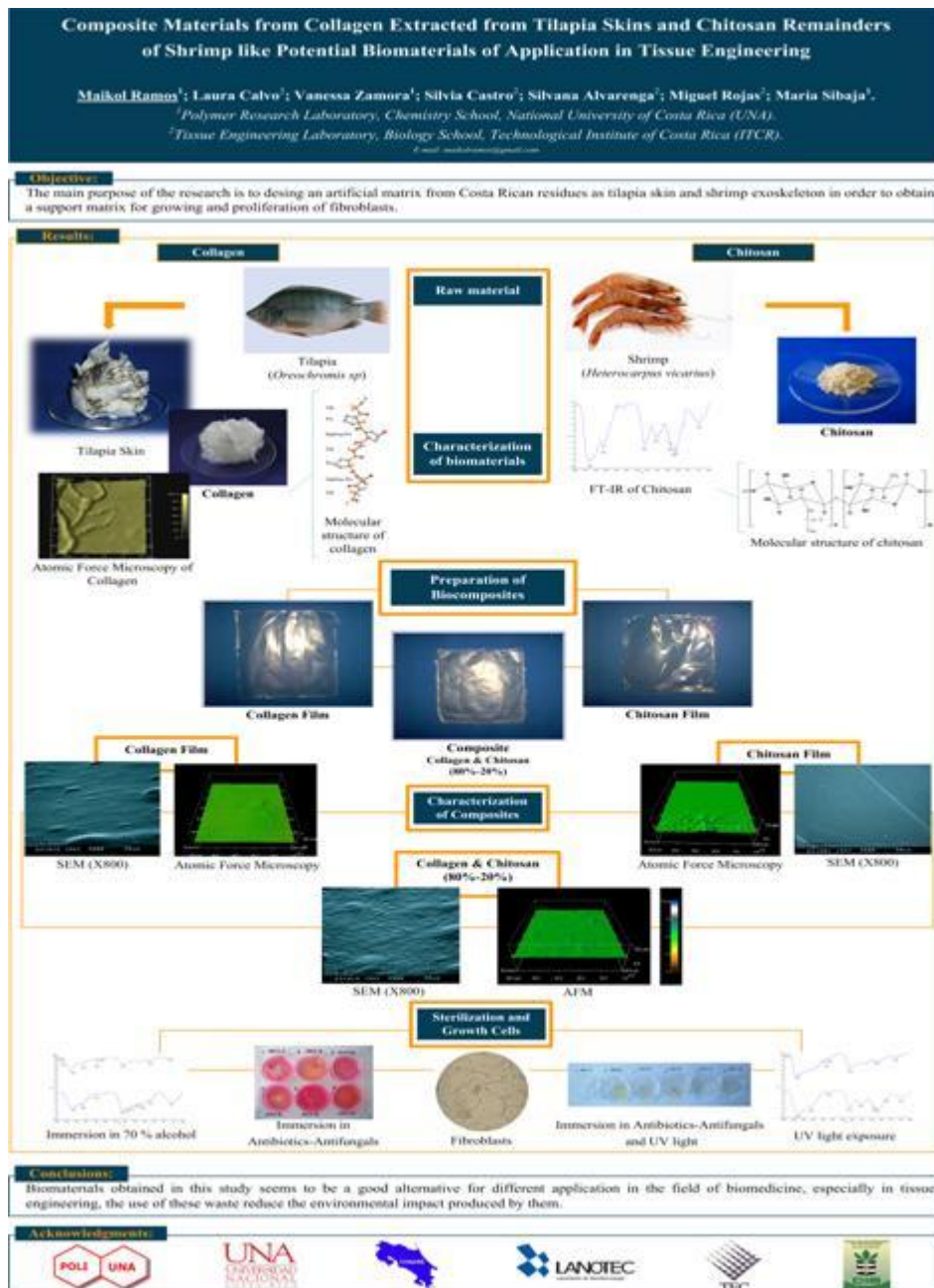


Wolf, K.L.; P.J.A. Fobral; V.R.N. Telif. 2006. Characterization Collagen fiber for Biodegradable Films Production. J. Biomater. Sci. P

Yannas, I. V. 2005 Similarities and differences between induced organ regeneration in adults and early foetal regeneration. J. R. Soc. Interface 2, 403–417. (doi:10.1098/rsif.2005.0062)

## ANEXOS

**Anexo 1. Póster presentado en el Congreso Mundial de la Sociedad Internacional de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos en el 2009.**



**Anexo 2. Folleto informativo del Laboratorio de Ingeniería de Tejidos, en sus versiones en Inglés y Español.**

**Contrapartes y  
Financiamiento**

**CONTACTO**

Centro de Investigación en Biotecnología  
Escuela de Biología  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

Los siguientes constituyen el equipo interdisciplinario que colabora con el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos

**Contrapartes Académicas y Técnicas**

Centro de Investigación en Biotecnología, ITCR  
Dpto. de Dermatología, Hospital Nacional de Niños  
Unidad de Quemados, Hospital Nacional de Niños  
Laboratorio de Citogenética, Hospital Nacional de Niños  
Dpto. de Dermatología, Hospital San Juan de Dios  
Unidad de Quemados, Hospital San Juan de Dios  
Dpto. de Radioterapia, Hospital San Juan de Dios  
Dpto. de Dermatología, Hospital México  
Laboratorio de Biopolímeros, Escuela de Química, UNA



**Fuentes de Financiamiento**

Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA)  
Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS)  
Instituto Científico Pfizer  
Fondo Estatal para la Educación Superior (FEES)  
Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR)  
Universidad Nacional (UNA)



**Instituto Tecnológico de Costa Rica**

Cartago, Costa Rica



**Laboratorio de  
Ingeniería de Tejidos**  
Tel. (506) 2550-2474  
Fax. (506) 2550-2700  
E-mail: mltorjas@itcr.ac.cr





**Escuela de Biología**  
Tel. (506) 2550-2285  
Fax. (506) 2550-2479  
E-mail: biologia@itcr.ac.cr



Laboratorio  
de Ingeniería  
de Tejidos



Ingeniería de Tejidos

Laboratorio de Ingeniería de Tejidos

“Aplicación de los principios y los métodos de la Ingeniería para el desarrollo de sustitutos biológicos”

Crit. Rev. Oral Biol. Med. 9(3):333-334 (1998)

Capacidad del ITCR para la Ingeniería de Tejidos

Dos laboratorios de ambiente controlado completamente equipados

Áreas para la preparación de medios y soluciones y para el almacenamiento a diferentes temperaturas bajo cero.

Criopreservación con acceso a equipos de descenso controlado de la temperatura y con disponibilidad de un generador de nitrógeno líquido.

Personal permanente de 5 investigadores profesionales capacitados en Ing. de Tejidos y 7-8 estudiantes asistentes o tesarios.

“La Ingeniería de Tejidos podrá mejorar la calidad de vida y la salud en Costa Rica”

Proyectos

Producción de piel humana *in vitro*

Optimización del proceso de producción *in vitro* de células de piel humana para tratar pacientes con diversas afecciones en la piel.



Implementación y producción de Biopolímeros

Desarrollo de matrices biopoliméricas a partir del colágeno de la piel de tilapia y del quitosano del exoesqueleto de camarón y su evaluación preliminar como un biomaterial con potencial para la Ingeniería de Tejidos.

Investigación en Biología Molecular y Celular

Validación molecular del protocolo de cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos para optimizar su producción con fines terapéuticos en Costa Rica.

Banco de Tejidos

Establecimiento de los procedimientos para la producción y el manejo de una matriz dérmica acelular radioesterilizada como base para la creación de un Banco de Tejidos en Costa Rica.



34

## Counterparts and Financing

## Contact Information

Biotechnology Research Center  
Biology Faculty  
Technological Institute of Costa Rica

The following represent the inter-institutional and interdisciplinary team that collaborates with LAINTEC

### Technological Institute of Costa Rica

#### Academical and technical counterparts

Biotechnology Research Center, ITCR  
Dermatology Department, Hospital Nacional de Niños  
Burn Unit, Hospital Nacional de Niños  
Cytogenetics Laboratory, Hospital Nacional de Niños  
Dermatology Department, Hospital San Juan de Dios  
Burn Unit, Hospital San Juan de Dios  
Radiotherapy Department, Hospital San Juan de Dios  
Dermatology Department, Hospital México  
Polymers Research Laboratory, Chemistry Faculty, UNA



#### Projects Funding Sources

International Atomic Energy Agency (IAEA)  
Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS)  
Pfizer Scientific Institute  
Fondo Estatal para la Educación Superior (FEES)  
Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR)  
Universidad Nacional (UNA)



#### Tissue Engineering Laboratory

Tel. (506) 2550-2474  
Fax. (506) 2550-2700  
E-mail: mirejas@itcr.ac.cr



TEC



#### Biology Faculty

Tel. (506) 2550-2285  
Fax. (506) 2550-2479  
E-mail: biologia@itcr.ac.cr



## Tissue Engineering Laboratory



## Tissue Engineering

## Tissue Engineering Laboratory

**"Application of the principles and methods of engineering toward the development of biological substitutes"**

*Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9(3):333-334 (1998)

### ITCR qualification for Tissue Engineering

Two aseptic and fully equipped laboratories

One laboratory for media preparation and storage at different subzero temperatures

Access to cryopreservation with controlled descending temperature systems and liquid nitrogen generator

A permanent staff of 5 trained professional researchers and 7-8 internship students

There are no other similar approaches in Central America

**"Tissue Engineering will improve the health status and quality of life in Costa Rica"**

### Projects

#### Human skin cells *in vitro* production

Optimization of the human skin cells *in vitro* production system to treat patients with diverse epidermal affections in Costa Rica



#### Biopolymers production and implementation

Biological matrixes development from tilapia skin collagen and shrimp exoskeleton chitosan and its preliminary evaluation as a potential biomaterial with a tissue engineering application

#### Molecular and Cellular Biology Research

Molecular validation of a human keratinocytes *in vitro* culture protocol in order to optimize their production with a therapeutic application in Costa Rica

#### Tissue Banking

Procedures establishment for the production and handling of a radiation-sterilized acellular dermal matrix as a basis for the creation of a Tissue Bank in Costa Rica



Anexo 3. Diapositivas de la ponencia “Experiencia costarricense en el establecimiento de cultivos primarios de piel para fines terapéuticos” en el Simposio Internacional “Traducción Clínica en Tecnologías de Ingeniería de Tejidos” efectuado los días jueves 13 y sábado 14 de Mayo en Buenos Aires, Argentina, organizado por la Unidad de Traducción Clínica del Hospital Universitario Austral.



## Costa Rica's experience in the establishment of primary skin cells cultures for therapeutic approaches



Centeno-Cerdas C., Calvo-Castro L.,  
Alvarenga S., Guerrero M. y Rojas M.



## Skin affections in Costa Rica

\$4,5 million per year  
per hospital



\$25 million per year



# Tissue Engineering Laboratory

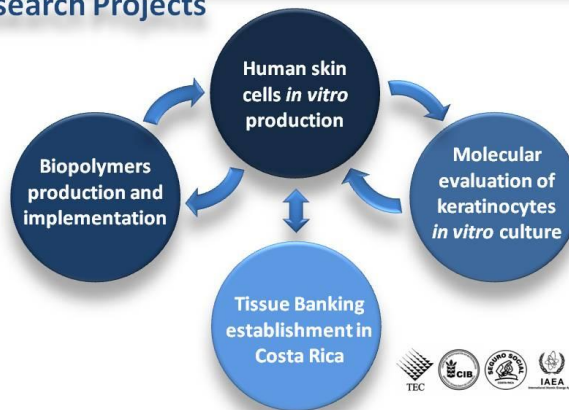


<b>Personnel</b>	<b>Infrastructure</b>	<b>4 research projects</b>
5 Researchers	2 clean rooms	2 thesis
6 Assistants	1 general area	
1 Technician		



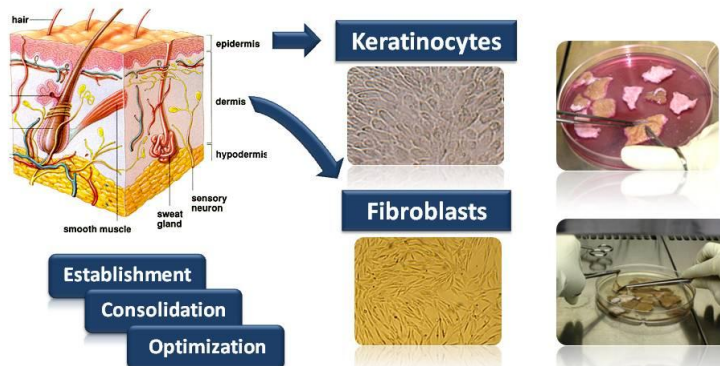
# Tissue Engineering Laboratory

## Research Projects

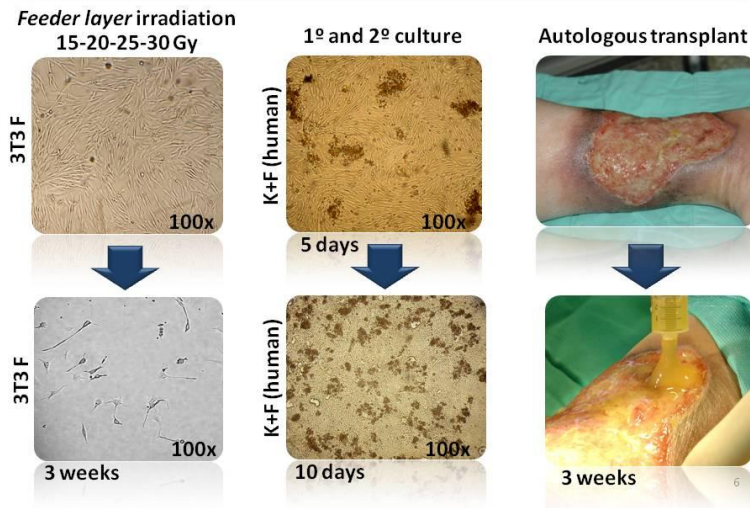


# Human skin cells *in vitro* production

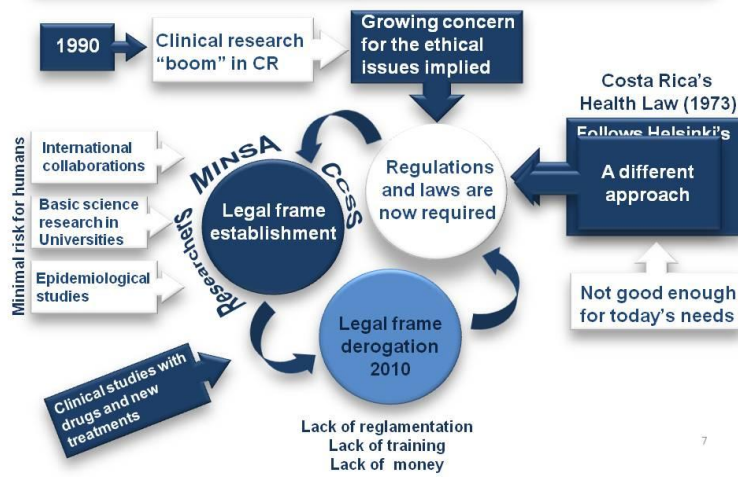
“Optimization of the human skin cells *in vitro* production system to treat patients with diverse epidermal affections in Costa Rica”



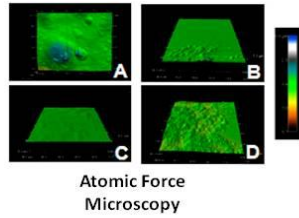
## Human skin cells *in vitro* production



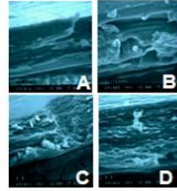
## Clinical research legislation in Costa Rica



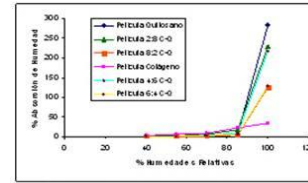
Morphological analysis



Atomic Force Microscopy



SEM



Humidity adsorption

Cell culture assays

**Sterilization**



- 70% ethanol immersion
- UV light exposure
- Antibiotic immersion
- UV light + antibiotics
- Ethylene oxide
- 70% ethanol + acetone

**Skin cells culture over composites**



Queratinocitos Fibroblastos

Skin cells

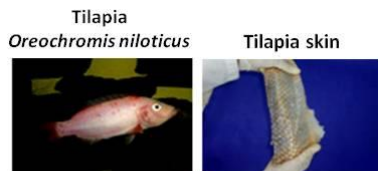
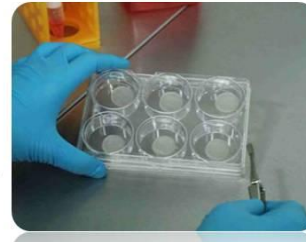
Patients treatment

# Biopolymers

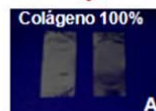
“Biological matrixes development from tilapia skin collagen and shrimp exoskeleton chitosan and its preliminary evaluation as a potential biomaterial with a tissue engineering application”



- Non pyrogenic, non immunogenic
- Non toxic
- Non carcinogen
- Should be metabolized by the organism
- Durability and availability
- Chemically, physically and biologically stable
- Easily manufactured
- Cell culture compatible



Denaturalization temperature  
Infrared analysis  
Thermo gravimetric analysis



Raw material characterization

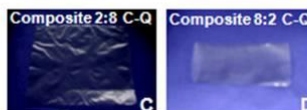


Molecular weight  
Deacetylation level  
Denaturalization temperature  
Thermogravimetric and infrared analysis



Biopolymers characterization

Biocomposites elaboration



# Conclusions

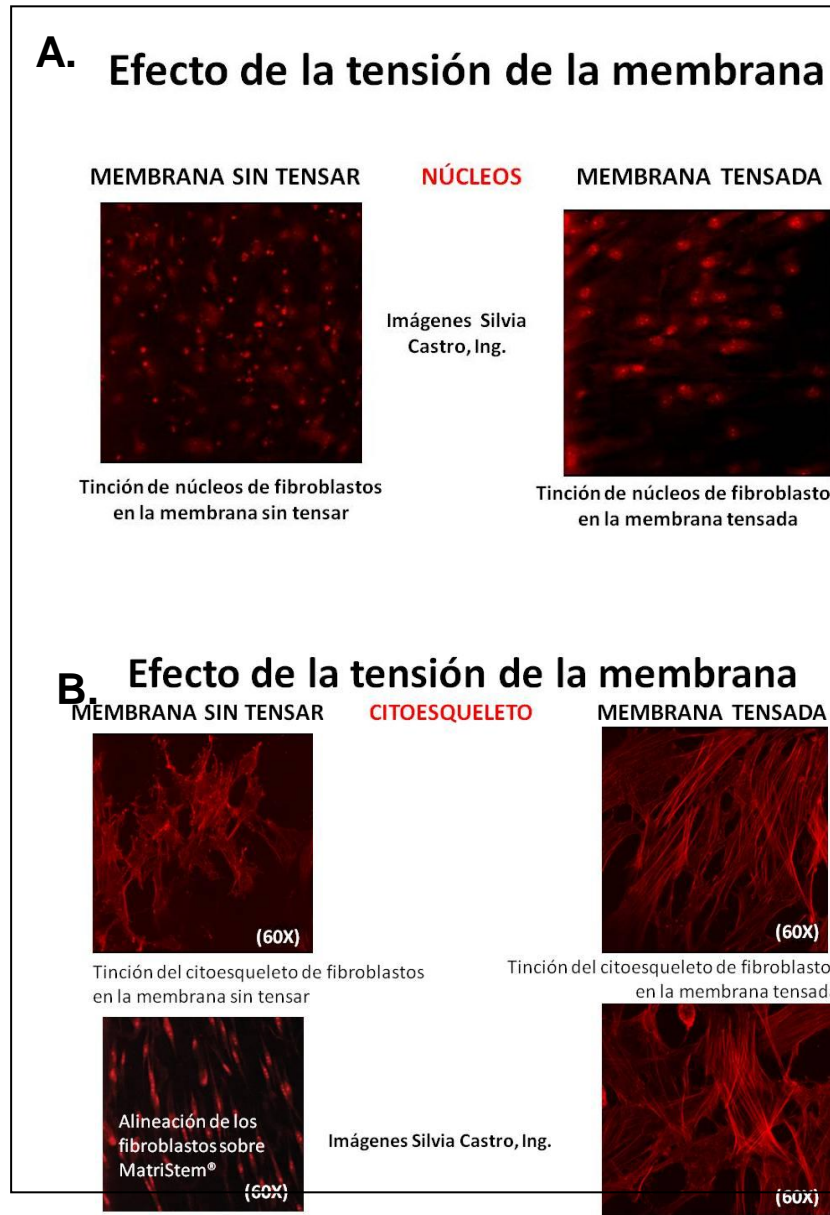


# THANK YOU FOR YOUR ATTENTION





**Anexo 4. Resultados de trabajo de graduación de la Ing. en Biotecnología, Silvia Castro:**  
**“Modelos experimentales para el manejo in vitro de queratinocitos y fibroblastos humanos para su utilización con una matriz con potencial en ingeniería de tejidos” realizado en el Hospital Austral, en Buenos Aires, Argentina.**



**Figura 3. efecto de la tensión de la membrana sobre la morfología celular.**

En la figura 3 se muestra el efecto de la tensión de las membranas sobre la proliferación y fisiología celular. En el panel A. se compara la morfología nuclear de células inoculadas sobre membranas tensas y no tensadas, mediante una tinción fluorescente de los núcleos con yoduro de propidio. Nótese la condensación de la cromatina (compactación del núcleo), lo cual es un indicio de que las células se encuentran en una fase pre-apoptótica

(muerte celular programada). En el panel B. se compara la morfología del citoesqueleto de células inoculadas sobre membranas tensas y no tensadas, mediante una tinción fluorescente de las fibras de actina con faloidina. Se puede observar claramente la desorganización de las fibras de actina, indicador de estrés y de un estado pre-apoptótico.

**Anexo 5. Protocolo de esterilización de las membranas biopoliméricas con alcohol 70% y acetona.**

- a. Cortar fragmentos de membrana de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>.
- b. En cámara de flujo laminar, sumergir cada fragmento 5 minutos en acetona previamente esterilizada por filtración (filtro de jeringa, acetato de celulosa, 0.22 µm).
- c. Inmediatamente, sumergir cada fragmento 5 minutos en etanol 70% previamente esterilizado por filtración (filtro de jeringa, acetato de celulosa, 0.22 µm).
- d. Lavar dos veces con PBS estéril.
- e. Incubar en DMEM completo (10% SFB) durante 5 minutos para rehidratar.
- f. Descontaminar con alcohol 70% un desecador de vidrio y colocarlo durante 10 minutos en la cámara de flujo laminar con la tapa abierta.
- g. Colocar el fragmento de membrana rehidratado completamente estirado en la superficie de un pozo de una placa multipozo (6 pozos). Colocar la placa multipozo **con la tapa cerrada** en el desecador y conectar a una bomba de vacío durante 2 – 3 horas, hasta que se observe la membrana completamente seca.
- h. Incubar la placa multipozo con la membrana durante 2-3 horas a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 90% humedad.

**1. Inoculación de las membranas con fibroblastos humanos o fibroblastos 3T3 (*Mus musculus*).**

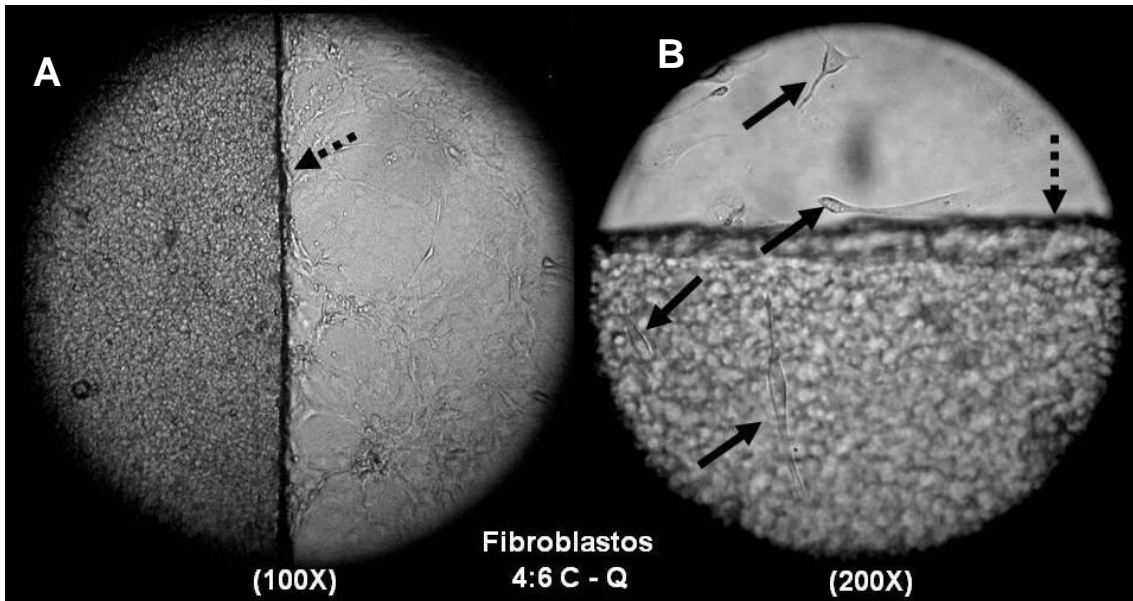
- a. Colocar sobre la membrana un inóculo de células a estudiar de 2,5x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>, para un volumen máximo de 3 ml en medio de cultivo DMEM completo (10% SFB).
- b. Incubar a 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 90% humedad. Realizar cambios de medio cada 2-3 días.

## **Anexo 6. Evaluación del cultivo de fibroblastos con membranas biopoliméricas.**

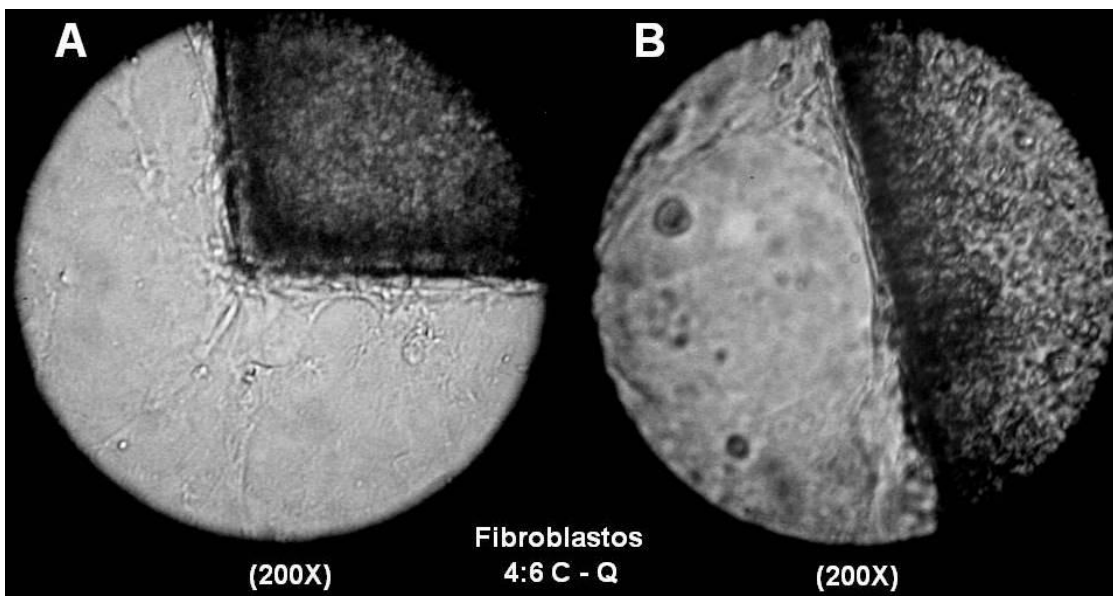
(Tomado del Informe Técnico ITCR-UNA II Semestre 2009)

- a. *Adhesión de las células al biomaterial.* En pruebas preliminares, se cortaron fragmentos de alrededor de 3 cm de diámetro de las matrices (esterilizadas con anitbióticos y antimicóticos) en todas sus variantes (100% colágeno, 100% quitosano, 2:8, 8:2, 6:4 y 4:6 colágeno-quitosano); los fragmentos se colocaron en los pozos de placas multipozo estériles (6 pozos) y se recubrieron con 3 ml de DMEM al 10% suero fetal bovino (SFB). Las muestras se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en una incubadora y se valoró el estado de las membranas a través del tiempo. En pruebas subsecuentes, fragmentos de la matriz 4:6 colágeno-quitosano de alrededor de 1,5 cm<sup>2</sup> fueron esterilizados con alcohol 70% y acetona tal como se indicó previamente. Los fragmentos fueron rehidratados por inmersión en DMEM al 10% SFB durante 5 minutos y colocados humedecidos y estirados sobre la superficie de placas multipozo estériles de 6 pozos. Con la tapa cerrada, fueron colocados dentro de un desecador de vidrio conectado a una bomba de vacío. Las muestras se incubaron de esta manera durante 2-4 horas, con lo cual se extrajo todo el aire dentro del desecador y se logró la adhesión de las matrices a la superficie de los platos multipozo. Seguidamente, se inocularon 50.000 fibroblastos por pozo en medio de cultivo DMEM al 20% de suero fetal bovino (SFB). Se incubó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en una incubadora. En algunos ensayos se utilizó un inóculo de fibroblastos murinos 3T3, mientras que en otros ensayos se utilizó un inóculo de fibroblatos humanos obtenidos de un cultivo primario de una muestra donada por un colaborador anónimo.
- b. *Tasa de crecimiento, proliferación celular y confluencia.* Se monitoreó el crecimiento y proliferación celular de los fibroblastos inoculados sobre las matrices adheridas a las placas multipozo con base en la observación de la confluencia a lo largo del tiempo, donde se evalúa el porcentaje de superficie cubierta por las células (fibroblastos) y la densidad celular. Al alcanzar aproximadamente un 70-80% de confluencia, con una pinza estéril se desprendieron las matrices de los pozos y se observó al microscopio de luz.

Los resultados de estos ensayos demuestran que los fibroblastos crecen de manera normal (en comparación con ensayos en los cuales no habían matrices adheridas a los frascos de cultivo), sin diferencias observables entre los ensayos inoculados con fibroblastos 3T3 y fibroblastos humanos, lo que indica que las matrices no tienen efectos citotóxicos sobre las células. Sin embargo, se observó que las células presentan preferencia al crecimiento sobre la superficie de plástico de los platos de cultivos, y que además al parecer “chocan” con los bordes de las matrices, siendo que el “escalón” entre la superficie expuesta de la matriz y el fondo del plato de cultivo se recubre con fibroblastos.

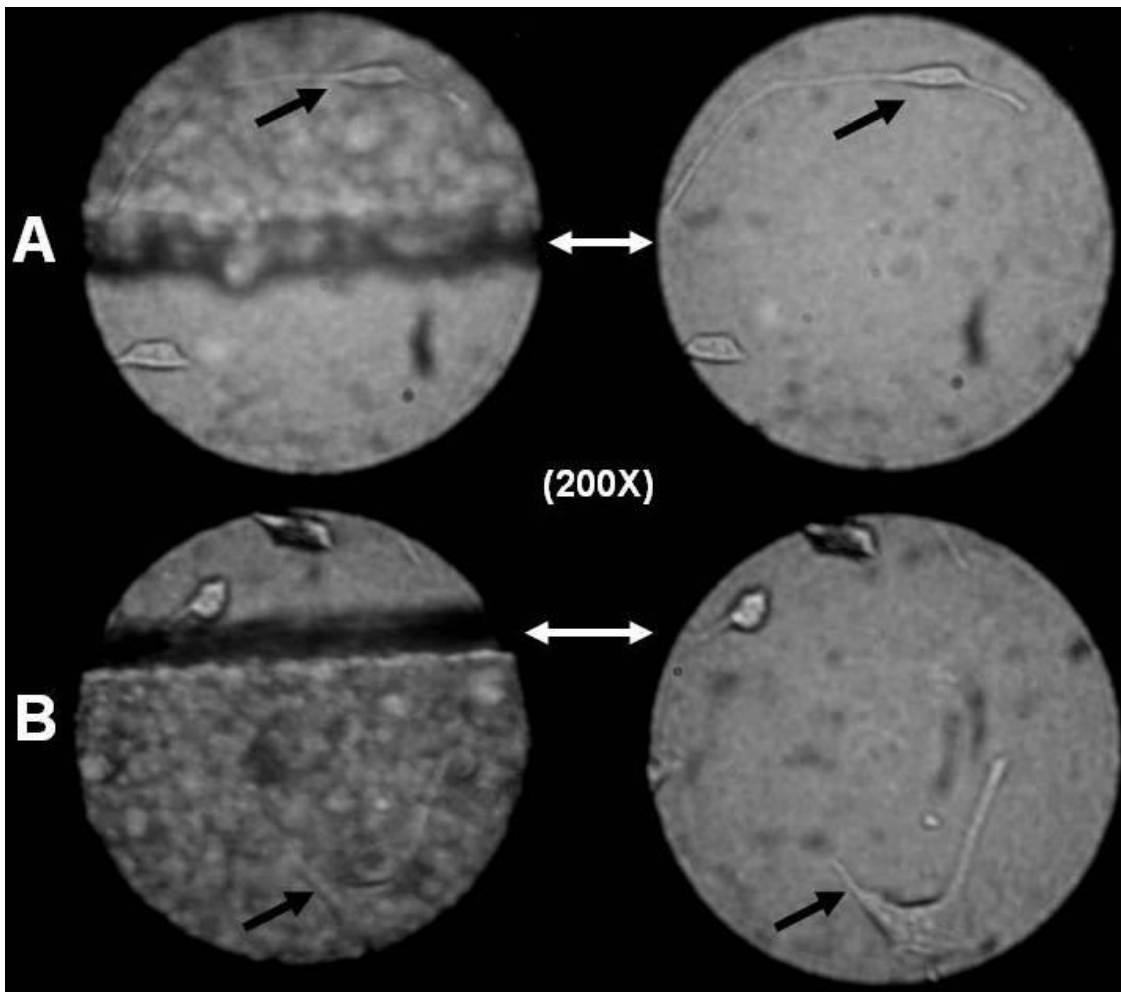


**Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica.** Las flechas de línea continua indican fibroblastos, mientras que las flechas de línea punteada indican el borde limitrofe donde termina la membrana, siendo que la sección más opaca corresponde a la matriz y la sección más oscura corresponde a la superficie del plato de cultivo. Nótese la presencia de fibroblastos individuales (B) que parecen estar creciendo sobre o bajo la matriz. Nótese también la alta confluencia celular, alrededor de 85% (A).



**Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica.** Las regiones opacas corresponden a la superficie de la matriz biopolimérica, mientras que las regiones claras es la superficie del plato de cultivo. Nótese la región de “choque” de los fibroblastos con el borde de la matriz.

Por otro lado, para verificar la superficie a la cual se observaron adheridos los fibroblastos, se ubicaron fibroblastos que parecían adheridos a la matriz biopolimérica. La matriz fue desprendida y se esperaba que los fibroblastos se desprendieran con ella, pero se observó que los fibroblastos crecieron por debajo de la matriz sobre la superficie del plato de cultivo, de manera que no se encontró adhesión a la matriz en ninguno de los ensayos.



**Fibroblastos inoculados sobre una matriz biopolimérica antes y después de remover la matriz del plato de cultivo.** Las flechas blancas indican el borde la matriz (opaca). Las flechas negras indican fibroblastos individuales que parecían adheridos a la matriz. Sin embargo, tal y como se observa en las imágenes de la derecha, al remover la matriz del plato de cultivo, las células se mantienen adheridas al plato de cultivo y no a la matriz.