

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SOPORTES DE ALCOHOL POLIVINÍLICO Y QUITOSANO PARA CULTIVO CELULAR

Ana Ma. Almonacid¹, Marta E. Londoño L¹., Carriña Gartner², Claudia E. Echeverri C¹.

1: Escuela de Ingeniería de Antioquia –Universidad CES. Envigado, Colombia.

2: Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia

* Contacto: pfmalon@eia.edu.co

RESUMEN

La ingeniería de tejidos busca reemplazar o crear un ambiente propicio para que los tejidos del cuerpo humano puedan regenerarse. Una de las soluciones planteadas para lograr este objetivo es la creación de soportes o matrices para facilitar el crecimiento y proliferación celular. En el presente trabajo se desarrollaron matrices para cultivo celular a partir de alcohol polivinílico (PVA) y quitosano mediante la técnica de espumado/lixiviado. Se realizaron pruebas mecánicas, espectroscopia infrarroja (FTIR), microscopia electrónica de barrido (SEM) y finalmente, se efectuó un cultivo preliminar con células de hámster chino (CHO) donde se evaluó la adhesión celular por medio de la tinción Giemsa. Las microscopías exhibieron alta porosidad e interconectada con un tamaño de poro mayor a 10 μ m. Las matrices de PVA y quitosano obtenidas son estables mecánica y estructuralmente. Adicionalmente, los resultados de la tinción Giemsa en el cultivo preliminar revelaron células adheridas y embebidas en la matriz.

Palabras Clave: *Matriz celular, PVA, quitosano, espumado/lixiviado*

ABSTRACT

Tissue engineering seeks for the possibility of the human body to regenerate itself by the creation of an artificial environment appropriate for cells. One of the approaches has been the development of scaffolds will allow the cells to grow and proliferate. In this research PVA-chitosan scaffolds were developed using gas foaming/particulate leaching technique. Mechanical compression tests, scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (FTIR) and a preliminary cell culture with Chinese hamster ovary cell line (CHO) was performed. Cell adhesion was evaluated by Giemsa stain. PVA-chitosan scaffolds showed mechanical and structural stability and an adequate porosity and interconnectivity. Pore sizes were larger than 10 μ m. Finally, Giemsa results for the preliminary cell culture revealed cells adhesion within the scaffold.

Keywords: *Cellular scaffold, PVA, chitosan, gas foaming/particulate leaching*

1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de matrices celulares es hoy en día un tema de gran interés debido a la necesidad de reemplazar tejidos y órganos del cuerpo humano. Los soportes celulares podrían permitir la adhesión y proliferación celular, además de proporcionar el intercambio químico indispensable

para que se forme un nuevo órgano. Esto se puede conseguir mediante un diseño que garantice biocompatibilidad, porosidad, interconectividad entre poros, estabilidad mecánica y estructural del soporte. Implementar el uso de matrices celulares puede mejorar la calidad de vida de los seres humanos, ya que se reducen los problemas de inmunocompatibilidad y de transmisión de enfermedades asociados al trasplante de órganos. Los soportes celulares pueden ser de origen natural, xenogénico o alogénico; sus propiedades mecánicas y características físicas y químicas, los hacen aptos para el crecimiento celular, aunque su mayor desventaja es la compatibilidad debido a la presencia natural de anticuerpos no humanos, para el caso de los derivados animales [1]. A causa de estas complicaciones y a la difícil obtención de este tipo de matrices (origen y procesamiento), se han buscado otras soluciones a partir de la transformación de polímeros de origen natural como el ácido hialurónico, el quitosano y el alginato [2]. Además, se encuentran soportes de origen sintético como el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli(orto-ésteres), entre otros [3].

El PVA es un polímero sintético destacado por su buena resistencia química, propiedades físicas, biodegradación y biocompatibilidad [4]. El quitosano, por otro lado, es un polímero derivado de la quitina (elemento estructural del exoesqueleto de crustáceos) [5] con características de biocompatibilidad, biodegradación, hemostasia, propiedades antibacterianas y características similares a los proteoglicanos de la matriz extracelular, lo que posibilita la señalización celular [6]. En esta investigación se realizó una matriz celular a partir de PVA y quitosano entrecruzado con trimetafosfato de sodio (STMP), utilizando la técnica de espumado -lixiviado usando como agente espumante bicarbonato de amonio y como lixiviado NaCl, para crear la porosidad. Se evaluaron sus propiedades a través de pruebas mecánicas, microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja (FTIR) y la tinción Giemsa. Se espera entonces que al combinar estos dos materiales se pueda obtener un soporte celular que contenga las propiedades mecánicas y químicas necesarias para la proliferación celular.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Las matrices se prepararon con PVA de 130000 Da y grado de hidrólisis 99% (Sigma-Aldrich), quitosano de 320000 Da y 16% de grado de acetilación (Sigma-Aldrich), ácido acético, NaOH, NaCl, bicarbonato de amonio y trimetafosfato de sodio (STMP) como entrecruzante, todos grado analítico y usados sin purificación posterior. Para el cultivo celular se usó la línea celular CHO.

2.2 Métodos

La solución de PVA al 5% p/v se obtuvo mediante agitación por 4 horas a 90°C. La solución de quitosano se preparó mezclando 1,5% p/v de éste con solución al 1% v/v de ácido acético y agitando por 4 horas a temperatura ambiente. Luego, ambas soluciones se mezclaron con las soluciones de STMP, preparadas en concentraciones de 1 y 5% p/v en medio básico y se dispusieron seis tratamientos como se describe en la tabla 1. La porosidad de las matrices se obtuvo al añadir bicarbonato de amonio en una proporción 4:1 con respecto a la cantidad de polímero y, luego, se liofilizó por 24 horas. Las matrices obtenidas fueron lavadas tres veces en agua destilada y sometidas a sonicación.

Las matrices fueron caracterizadas mediante pruebas mecánicas en una máquina universal INSTRON 3345 (EEUU). Para el ensayo de compresión las probetas de $(12,9 \pm 1,12)$ mm de diámetro con un espesor de $(2,12 \pm 0,29)$ mm siguiendo el protocolo ASTM D945-06.

Tabla 1. Descripción de los seis tratamientos realizados para obtener las matrices de PVA/quitosano

Muestra	% PVA	% Quitosano	% STMP	% NaOH
M1	80%	20%	5%	2,5%
M2	80%	20%	1%	0,5%
M3	80%	20%	-	-
M4	90%	10%	5%	2,5%
M5	90%	10%	1%	0,5%
M6	90%	10%	-	-

La morfología se evaluó usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 5910 LV y la caracterización estructural se llevó a cabo en un espectrofotómetro infrarrojo con cristal de ATR Spectrum 100 (Perkin Elmer, EEUU). Para evaluar la adhesión celular se usó la tinción de Giemsa sobre 500000 células/cm² de la línea celular estándar, CHO, mantenida con medio de cultivo MEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂. Se evaluó la viabilidad celular por técnicas de tinción con azul de tripano. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Inspección visual

La figura 1 muestra la apariencia física de las matrices de PVA/quitosano, son sistemas tridimensionales de color blanco, suaves, esponjosos y mecánicamente estables al tacto.



Figura 1. Matriz celular de PVA y quitosano entrecruzada con STMP y agente porogénico

3.2 Pruebas mecánicas

En la tabla 2 se reportan los resultados de la prueba de compresión realizada a las 6 matrices obtenidas en este trabajo. El esfuerzo de compresión resultante para cada tratamiento estuvo entre 0,491 MPa y 0,851 MPa. Se puede observar que para un mayor contenido de PVA aumenta el esfuerzo de compresión y en general, mejoran las propiedades mecánicas. Los tratamientos control poseen menor esfuerzo de compresión en comparación con las muestras entrecruzadas. Por otra parte, se observó que la porosidad del material determina sus propiedades mecánicas, entre más poroso el material puede fallar con mayor facilidad [7]. Además, entre menor tamaño de poro, mayor área de superficie y por tanto una mayor fuerza a la compresión [8], lo que

permite deducir que la muestra menos porosa corresponde a M6 (90% PVA-10% quitosano) y la más porosa a M3 (80% PVA-20% quitosano).

Tabla 2. Resultados de los ensayos de compresión

Probeta	Módulo de Young (MPa)	Carga máxima de compresión (N)	Energía la carga máxima de compresión (J)	Esfuerzo de compresión a la carga máxima (MPa)
M1	2,467 ± 0,333	84,467	0,034	0,623
M2	3,865 ± 0,385	100,004	0,027	0,683
M3	2,037 ± 0,469	74,569	0,026	0,491
M4	3,937 ± 0,608	86,671	0,022	0,851
M5	4,554 ± 0,548	100,006	0,027	0,780
M6	4,822 ± 0,071	100,004	0,020	0,626

3.3 Morfología

En la figura 2 se reportan las microscopías en corte transversal de las muestras después de secado de punto crítico. En las imágenes se aprecian matrices con poros entre 10 y 50 μm . Se observó una apariencia de material esponjoso y con una porosidad interconectada.

Las matrices con entrecruzante se ven con vetas y estrías, mientras que las que no tienen el STMP presentan un aspecto con poros despejados. Las muestras con mayor cantidad de PVA presentan paredes con mayor engrosamiento. De acuerdo con Atala y Zippel, poros mayores a 10 μm de diámetro permiten infiltración celular y poros de menos de 35 μm de diámetro posibilitan la angiogénesis [8] [9].

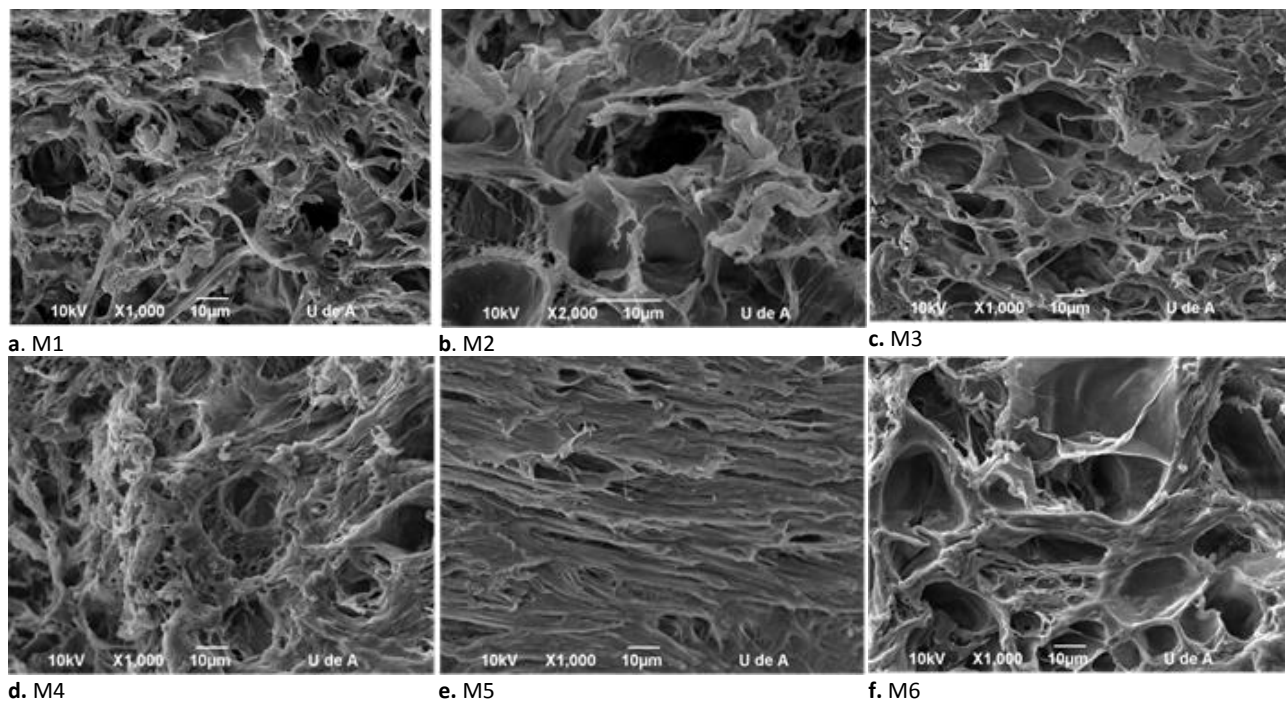


Figura 2. SEM de matrices de PVA/quitosano **a.** M1, **b.** M2, **c.** M3, **d.** M4, **e.** M5, **f.** M6

3.4 FTIR

Los espectros infrarrojos de las matrices que se muestran en la figura 3, exhibieron bandas en 3289cm^{-1} características de los estiramientos de los enlaces O-H del PVA, que iban aumentando a medida que disminuía la cantidad de quitosano. En 1565 cm^{-1} se presenta una banda correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$ que decreció con el mayor contenido de PVA en las matrices, al igual que lo reportado por Jen Ming Yang [10]. La banda en 1099cm^{-1} correspondiente a la extensión del grupo C-O, se encuentra presente tanto en el PVA como en el quitosano. En las matrices mezcladas y entrecruzadas con 5% de STMP se hace evidente la disminución de la transmitancia en ese punto, confirmando la presencia de éste en las muestras que contienen un mayor porcentaje del entrecruzante. En las matrices se distinguen nuevas bandas entre 1415 y 650cm^{-1} aproximadamente, que pueden estar relacionadas con interacciones entre el agente entrecruzante y los polímeros, lo cual debe ser analizado con otras técnicas complementarias. En general no se observó una gran diferencia entre los distintos tratamientos.

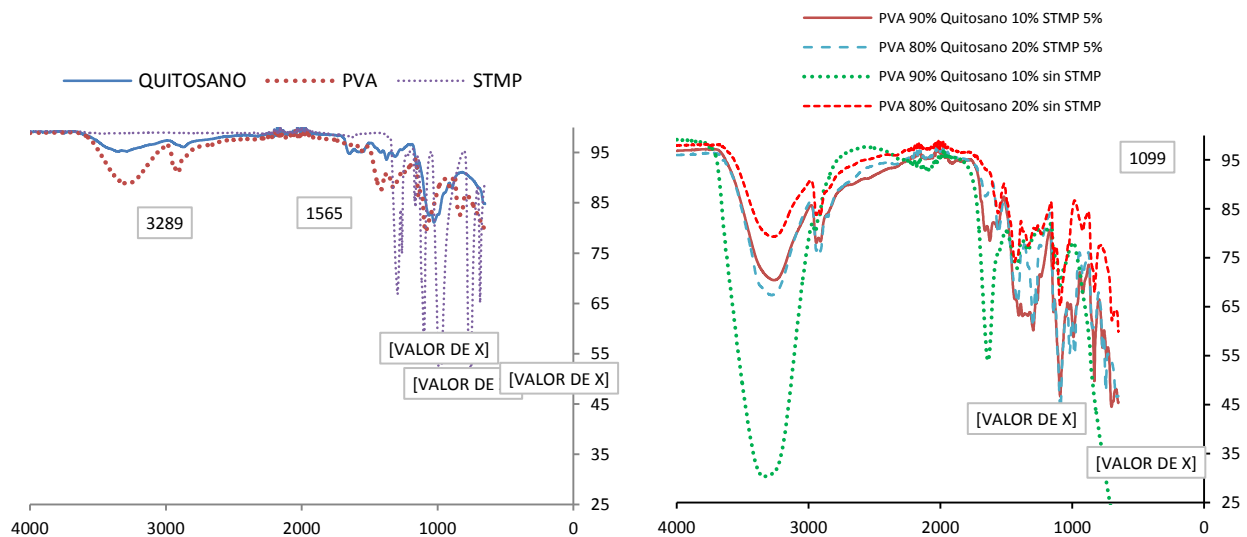
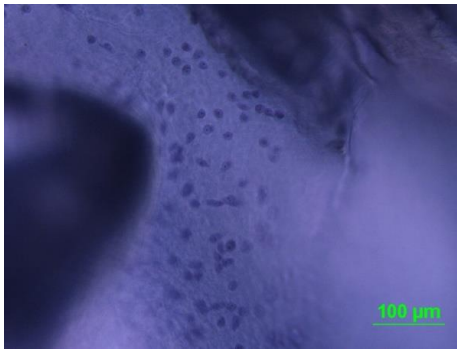


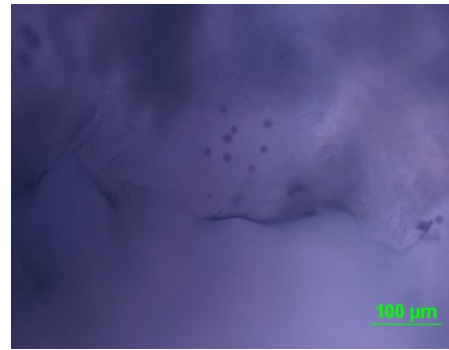
Figura 3. FTIR de las matrices de PVA/Quitosano

3.5 Tinción Giemsa

El tamaño de las células es aproximadamente de $10\ \mu\text{m}$ como se aprecia en la Figura 3. En todos los tratamientos se observaron células adheridas. Se aprecian células distribuidas en toda el área de la matriz mientras que en otras se ven aglomeraciones en los bordes rodeando grandes poros como es el caso de M3 (no mostrada), posiblemente debido a la formación de colonias de células.



a. M6 (90%PVA-10%quitosano sin entrecruzante)



b. M4 (90%PVA-10%quitosano y 5% de STMP)

Figura 3. Tinción Giemsa 20X Nikon LV100, **a.** células con forma alargada **b.** células redondas

En las fotografías se pueden ver las células sembradas sobre las matrices. En algunos tratamientos como M6 se encontraron las células adheridas al sustrato y con forma fibroblástica sin embargo, no se pudo determinar el mecanismo de adhesión, se requieren ensayo posteriores para determinar la proliferación asociada a la adhesión.

4 CONCLUSIONES

Se obtuvo un protocolo sencillo y económico a partir de la técnica espumado/lixiviado, para la elaboración de matrices interconectadas y porosas de PVA y quitosano, entrecruzadas químicamente con STMP, el cual es un entrecruzante no citotóxico.

Las matrices obtenidas mostraron una porosidad en un rango que promueve la infiltración celular y la angiogénesis, además, según las propiedades mecánicas obtenidas tienen estabilidad dimensional para ser sometidas al cultivo de células. Las técnicas implementadas permitieron la generación de soportes con poros interconectados, que varían de porosidad en presencia del entrecruzante, similares entre todos los tratamientos y que permiten la adhesión celular. Adicionalmente, se deben hacer estudios complementarios de porosimetría para determinar con certeza el tamaño y la distribución de éstos.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. S. F. Badyak, "Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction," *Transplant immunology*, vol. 12, no. 3-4, pp. 367-77, Apr. 2004.
2. R. Gauvin, R. Parenteau-Bareil, M. R. Dokmeci, W. D. Merryman, and A. Khademhosseini, "Hydrogels and microtechnologies for engineering the cellular microenvironment," *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*, vol. 4, pp. 235-46, 2011.
3. H. Maya, S. Madduri, G. Rita, S. Tullio, H. Hall, and D. Eberli, "Scaffolds for the Engineering of Functional Bladder Tissues," in *Tissue engineering*, 2010, pp. 119-141.
4. C. Marcio and L. Nunes, Renata; Guenther, Bluma; Pessan, "Poly(vinyl alcohol)/sulfonated Polyester Hydrogels Produced by Freezing and Thawing Technique: Preparation and Characterization," *Materials Research*, vol. 10, no. 1, pp. 43-46, 2007.

5. U. Zanariah, M. Diah, A. H. Rashid, and A. S. Halim, "The Development, Characterization and Application of Water Soluble Chitosan," in in *Biotechnology of biopolymers Edited by Magdy Elnashar*, 2011, pp. 109–130.
6. X. Yang, Q. Liu, X. Chen, F. Yu, and Z. Zhu, "Investigation of PVA/ws-chitosan hydrogels prepared by combined γ -irradiation and freeze-thawing," *Carbohydrate Polymers*, vol. 73, no. 3, pp. 401–408, Aug. 2008.
7. S.-Y. Lee, B. P. Pereira, N. Yusof, L. Selvaratnam, Z. Yu, a a Abbas, and T. Kamarul, "Unconfined compression properties of a porous poly(vinyl alcohol)-chitosan-based hydrogel after hydration," *Acta biomaterialia*, vol. 5, no. 6, pp. 1919–25, Jul. 2009.
8. A. Atala, R. Lanza, J. A. Thomson, and R. M. Nerem, *Principles of Regenerative Medicine*, Second. Elsevier, 2011, p. 1202.
9. N. Zippel, M. Schulze, and E. Tobiasch, "Biomaterials and mesenchymal stem cells for regenerative medicine.," *Recent patents on biotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–22, Jan. 2010.
10. J. M. Yang, W. Y. Su, T. L. Leu, and M. C. Yang, "Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes," *Journal of Membrane Science*, vol. 236, no. 1–2, pp. 39–51, Jun. 2004.