



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* de biomateriales basados en Polietilenglicol-
Quitosano”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Q.F.B. Jimena Garibay García

Comité de Tutores

Tutor académico: Ph.D. Miriam V. Flores Merino
Tutor interno: Dra. Julieta Castillo Cadena
Tutor externo: Dr. Jorge Humberto Serment Guerrero

Toluca, Estado de México

2017

ÍNDICE

	No. página
Resumen	4
1. Marco teórico	
1.1. Ingeniería de tejidos	7
1.2. Biomateriales	8
1.3. Hidrogeles	11
1.3.1. Red polimérica interpenetrada	
1.3.2 Hidrogeles de quitosano	
1.3.3 Hidrogeles de polietilenglicol	
1.4. Biocompatibilidad	14
1.4.1 Citotoxicidad	
1.4.2 Genotoxicidad	
2. Antecedentes	19
3. Planteamiento del Problema	22
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	24
6. Justificación	25
7. Material y Métodos	
7.1. Diseño de estudio	26
7.2. Variables de estudio	26
7.3 Operacionalización de variables	27
7.4 Procedimientos	28
7.4.1 Síntesis y polimerización	
7.4.2 Evaluación de la citotoxicidad	
7.4.3 Evaluación de la genotoxicidad	
7.5 Implicaciones Bioéticas	33
7.6. Análisis Estadístico	33
8. Resultados	
8.1 Artículo	34
8.2 Resultados adicionales	47
9. Conclusión	
9.1 Conclusiones generales	56
9.2 Limitaciones	56
9.3 Recomendaciones	57
10. Referencias	58

Anexos

I	Documento de consentimiento informado para el uso de muestras de sangre con fines de investigación biomédica	64
II	Reactivos y soluciones	66
III	Antibióticos usados para el cultivo de las cepas para genotoxicidad	69

Resumen

La medicina regenerativa es la ciencia que tiene como objetivo reemplazar o regenerar células humanas, tejidos u órganos, para restaurar o establecer una función normal. La ingeniería de tejidos es una disciplina científica que se basa en la medicina regenerativa para generar nuevos tejidos, ambas buscan la comprensión de la estructura y función de los tejidos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar su función. Estas disciplinas han dado origen a los biomateriales, que son fabricados por procesos que usan o imitan fenómenos biológicos. Se puede decir que se trata de cualquier material, natural o sintético, usado en contacto con tejido vivo. Esto incluye que no sean tóxicos, inmunogénicos, trombogénicos, carcinogénicos ni irritantes.

Los hidrogeles son biomateriales conformados por redes poliméricas entrecruzadas que absorben una gran cantidad de agua u otro fluido sin mostrar alteraciones en su conformación tridimensional. Sus características les permiten servir como andamiaje ya que se trata de materiales blandos, flexibles y porosos, además de permitir el paso de oxígeno, nutrientes y otros metabolitos, lo que los hace ideales para aplicaciones que necesitan imitar una matriz celular.

El quitosano es un biomaterial natural que se extrae de los caparazones de crustáceos como camarones y cangrejos. El polietilenglicol (PEG) es un biopolímero soluble en agua, se considera como biocompatible y tiene una baja inmunogenicidad. Antes de utilizar éste material, debe funcionalizarse, proceso que permitirá formar las redes del polímero y dará lugar al PEGDA (polietilenglicol diacrilado). Las características de éstos polímeros los llevan a ser blancos de investigación para la ingeniería de tejidos.

Normas internacionales como la ISO10993 acerca de la evaluación de dispositivos biomédicos sugieren que se realicen ciertas pruebas antes de poner cualquier material en contacto con el ser humano por cierto periodo de tiempo. La primera de las pruebas es comprobar su biocompatibilidad la cual se refiere a la capacidad de un material para actuar de forma adecuada sin causar una respuesta no deseable. Este término engloba otros como lo es la toxicidad: citotoxicidad y genotoxicidad. La citotoxicidad es el daño que se le causa a una célula tal que altere su integridad o sus funciones, o bien, la lleve a apoptosis o muerte. La genotoxicidad por otro lado, es la capacidad de un agente de ocasionar daño al material genético, originando efectos adversos.

Con el objetivo de crear nuevos materiales útiles para la curación de heridas en la piel como las úlceras de pie diabético y las quemaduras graves, cuyo tratamiento es largo y generalmente costoso, se ha sintetizado un nuevo biomaterial conformado a partir de estos dos polímeros, PEGDA y quitosano, el cual se espera que tenga las ventajas de ambos, minimizando sus desventajas.

Antes de llevarlo a pruebas en pacientes, debe comprobarse la seguridad del material. Con este fin, se valoró la citotoxicidad y genotoxicidad de los hidrogeles de PEGDA-quitosano de acuerdo a la norma ISO 10993. Se realizaron las pruebas de resazurina, cromosoma SOS y Ames (mutación reversa bacteriana) en los nuevos biomateriales (PEGDA 1%, quitosano 0.05, 0.1, 1, 2 y 4%).

El ensayo de citotoxicidad se realizó sobre linfocitos humanos y fibroblastos (ratón, 3T3 swiss), células encontradas en heridas de piel, poniendo en contacto los biomateriales durante 24, 48 y 72 horas con las células elegidas para después realizar el ensayo de resazurina, prueba que mide la actividad metabólica celular. La genotoxicidad fue evaluada por Cromoensayo SOS y prueba de AMES. Para el primer caso, los biomateriales se pusieron en contacto con *E. coli* cepa PQ37 durante 90 minutos. La respuesta SOS se midió como un indicador de daño genético de la actividad de β -galactosidasa, así como la fosfatasa alcalina mostrando el potencial genotóxico del agente. La prueba de Ames muestra el potencial mutagénico de los materiales, dichos materiales se pusieron en contacto con 5 cepas diferentes de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA102 y TA1535) durante 30 minutos a 37° C para después ser sembradas por medio de siembra en superficie. Las placas fueron incubadas 48 horas a 37°C y se contó la cantidad de colonias mutantes. También se realizó una prueba de spot, como apoyo a la prueba de Ames, en ella se sembraron las bacterias en superficie y después se colocaron los materiales directamente sobre el agar. Se incubaron durante 48 horas a 37°C.

La mayoría de las muestras de células mostraron viabilidad superior al 80% en la prueba de citotoxicidad tanto para fibroblastos como para linfocitos, los cultivos de fibroblastos con mayor actividad metabólica a las 24 horas fueron los que estuvieron en contacto con materiales con 0 y 0.1% de quitosano ($97.96\% \pm DE 0.011$ y $92.24\% \pm DE 0.01$, respectivamente), a las 48 horas fueron aquellos con 0.05 y 1% de quitosano, superando los resultados del control ($101.04\% \pm DE 0.017$ y $114.97\% \pm DE 0.007$, respectivamente) y finalmente a las 72 horas todos excedieron superaron el control, siendo los mayores los de 2 y 4% de quitosano ($114.81\% \pm DE 0.005$ y $110.67\% \pm DE 0.013$, respectivamente). En el ensayo con linfocitos el cultivo con mayor actividad metabólica a las 24 horas fue el de 1% de quitosano ($93.58\% \pm DE 0.01$), a las 48 horas fue el de 4% de quitosano ($96.90\% \pm DE 0.001$) y a las 72 horas fue el de 4% de quitosano, sobrepasando el valor del control ($101.71\% \pm DE 0.02$). Lo que estos resultados indican es que los materiales son seguros para su uso en contacto con estas células.

Hablando sobre las pruebas de genotoxicidad, los resultados del factor de inducción (FI) del Cromoensayo SOS fueron inferiores al doble del FI basal en todos los materiales y no presentan relación dosis respuesta, por lo que no reúnen las condiciones necesarias para ser considerados genotóxicos según ésta prueba. Finalmente, para la prueba de mutagenicidad de AMES con y sin activación enzimática, no hay ningún indicio de actividad mutagénica ya que no hay cambios en la cantidad de colonias en ninguna de las cepas utilizadas comparadas con su respectivo control, bajo las condiciones evaluadas.

En conclusión, bajo las condiciones estudiadas, no hay evidencia de que los biomateriales de PEGDA-quitosano sintetizados con 1%, de PEGDA y 0.05, 0.1, 1, 2 y 4% de quitosano en nuestra institución, son citotóxicos o genotóxicos en los sistemas de prueba utilizados. A pesar de que pruebas adicionales deben ser realizadas antes de llevar estos materiales a pruebas clínicas, se

puede considerar que son seguros para su uso en tratamientos cortos. Esto representa el primer paso en el camino a que un nuevo material, con un costo menor a los existentes, sea usado para la curación de heridas de tratamiento especial, material orgullosamente creado en la Universidad Autónoma del Estado de México.

Palabras clave: PEGDA-quitosano, Resazurina, Prueba de AMES, Citotoxicidad, Genotoxicidad.