

COMPORTAMIENTO DE MATERIALES HÍBRIDOS QUITOSANO-METACRILATO DE GLICIDILO-XANTANA EN MEDULA ESPINAL

E. A. Elizalde-Peña¹, M. E. Ortega-De Santiago¹, G. Luna-Bárceñas^{1,*}, A. Martínez-Ruvalcaba², S. M. Nuño-Donlucas², N. Flores-Ramírez³, S. R. Vásquez-García³, A. A. Gutiérrez-López⁴, A. Nuño-Licon⁴, J. González-Hernández.¹

¹ CINVESTAV, Unidad Querétaro, Libramiento Norponiente No. 2000, Fracc. Real de Juriquilla Querétaro, Qro., 76230 México. gluna@gro.cinvestav.mx

² Departamento de Ingeniería Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, 44430 México

³ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich., 58060 México

⁴ Instituto Nacional de Rehabilitación, D.F., 14389 México

Abstract- En este trabajo se presenta la síntesis y aplicación de hidrogeles basados en la reacción química de un híbrido de Quitosano–Metacrilato de glicidilo (Q-GMA) con Xantana. Teniendo diferentes relaciones estequiométricas para el híbrido, desde 1:1 hasta 1:4. Los hidrogeles se caracterizaron por diversas técnicas analíticas. La caracterización por espectroscopia de infrarrojo de los materiales confirma la unión química de los precursores. Lo anterior se basa en la presencia en los espectros de las bandas a menores longitudes de onda pertenecientes a la Xantana. En las pruebas de PVA muestran ser una buena barrera comparada con sistemas similares. Se realizaron pruebas en el Centro Nacional de Rehabilitación donde se utilizaron los polímeros como sustrato para la siembra de fibroblastos humanos, teniendo resultados favorables. Adicionalmente se implantaron en una lesión de medula espinal de ratas cepa Wistar, donde actuaron como pegamento de la médula en el lugar de lesión. Con la evidencia acumulada los materiales tienen una amplia posibilidad de ser utilizados en aplicaciones biomédicas.

Introducción

Un biomaterial adecuado es aquel que sirve restaurar, aumentar o remplazar las funciones naturales de los tejidos vivos u órganos del cuerpo humano. Los biomateriales también se utilizan en aplicaciones terapéuticas y diagnósticos clínicos.^{1,2}

El quitosano ($[-(1\rightarrow4)-2\text{-amino-2-desoxy-D-glucosa}]$) es un polisacárido natural, cuyas formas comerciales se producen de la N-desacetilación de la quitina.^{2,3} Se han preparado hidrogeles basados en quitosano con redes entrecruzadas no covalentes, sin embargo, los productos obtenidos son rígidos o frágiles con un bajo o alto peso molecular respectivamente. Estos hidrogeles pueden ser preparados utilizando complejos polielectrolíticos de quitosano y otros polímeros naturales como la carragenina o la goma xantana. Los complejos polielectrolíticos son materiales altamente hidrofílicos y forman sistemas con una alta absorción de agua. Algunos hidrogeles pueden ser preparados utilizando la goma xantana que tiene grupos carboxilo como un polisacárido ácido y el quitosano como un polisacárido básico débil con grupos amino.²⁻⁴

El hidrogel Quitosano-Xantana, figura 1, ha sido utilizado por Chellat y colaboradores en el 2000 en donde se realizaron modelos de biocompatibilidad in vitro e in vivo. Los resultados obtenidos muestran que los estudios in vivo basados en observaciones de luz

microscópicas muestran un reclutamiento de poblaciones celulares específicas responsables de preparar la reparación de la herida y la deposición de nuevas matrices.⁵

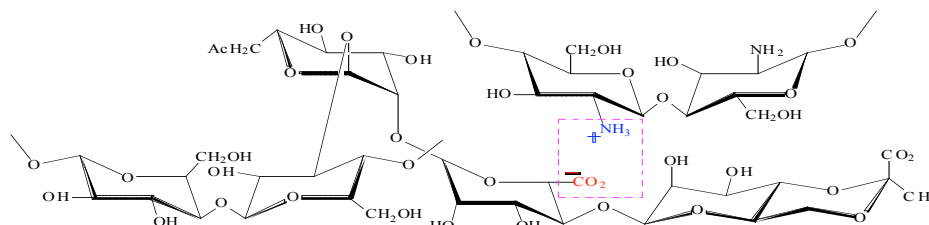


Figura 1. Modelo representativo de las interacciones Quitosano-Xantana para la formación del hidrogel.

Sección Experimental

Todos los reactivos comerciales fueron adquiridos de Aldrich Chemical y utilizados sin purificación adicional. La Xantana (X) utilizada es grado alimenticio con un peso molecular promedio de 4.96 KDa. El Quitosano (Q) utilizado tiene un grado de desacetilación de 87%, y un peso molecular promedio de 300 KDa. Las constantes α y K para la ecuación de Mark-Houwink fueron tomados de Milas et al⁵ para la Xantana y por Kassai et al⁶ para el Quitosano. El Metacrilato de Glicidilo (GMA) líquido con una pureza del 97%.

Síntesis del Hidrogel Quitosano-Metacrilato de Glicidilo-Xantana (Q-GMA-X).

Se colocó en un matraz erlenmeyer una cantidad conocida, en peso seco, de Q-GMA (0.25g) a la cual se disuelve en agua, el pH de la mezcla es de 6.3. Una vez que se disolvió el Q-GMA se adicionó lentamente la solución de Xantana, se cerró el vial y se le introduce un flujo constante de nitrógeno gaseoso, a una temperatura de 50 ± 1 °C con agitación magnética constante.

El tiempo óptimo de reacción es de cuatro horas. Se detiene el flujo del gas, el calentamiento y la agitación. Se enfría el producto final de la reacción en un baño de hielo durante 15 minutos a fin de detener la reacción.

Permeabilidad al vapor de agua

La transferencia de vapor de agua a través de una película se calculó utilizando un método gravimétrico de acuerdo al método ASTM E96-80.

Implante de Células

Tratamiento preliminar a los polímeros. Se activan los polímeros con etanol al 100% durante 30 minutos, al término se retira el etanol y se introducen en solución salina 0.9% por 24 horas. Al término de este tiempo se retira la solución salina y se dejan secar en ambiente estéril por 24 horas. Finalmente se esterilizan por Sterrad (radicales libres).

Implante sobre los hidrogeles. Se dejan los hidrogeles durante 2 horas en suero fetal bovino, al término de este período de tiempo se les adicionan los fibroblastos humanos

(500,000), en 100 μL de medio suplementado (MEM + 10% de Suero fetal bovino + 1% antibiótico)

Tinción. 24 horas después de haber implantado las células se tiñen con calceína ($2\mu\text{g/mL}$ en solución de Hanks) durante 30 minutos. Se retira la calceína y se añade a cada pozo medio suplementado.

Implante en Organismos Vivos

Se utilizan rata cepa Wistar a las cuales se les ocasiona una lesión quirúrgica en médula espinal (nivel T-8) anestesiadas con pentobarbital sódico (63 mg/Kg de peso).

Se coloca el polímero alrededor de la medula espinal, las ratas se sacrificaron a las 72 horas después de la cirugía y se les realiza un examen macroscópico.

Resultados y Discusión

La figura 2 muestra los espectros de infrarrojo de los hidrogeles QGMA-X. Se observan señales características a 3400 cm^{-1} , vibraciones de grupos $-\text{OH}$ y $-\text{NH}$, en 2920 y 2880 cm^{-1} estiramiento asimétrico y simétrico del $-\text{CH}_2$, a 1657 y 1597 cm^{-1} bandas del NH_2 y contribución de grupos carbonilo, un triplete en 1035 , 1075 y 1155 cm^{-1} por estiramientos asimétricos-simétricos tipo éter.

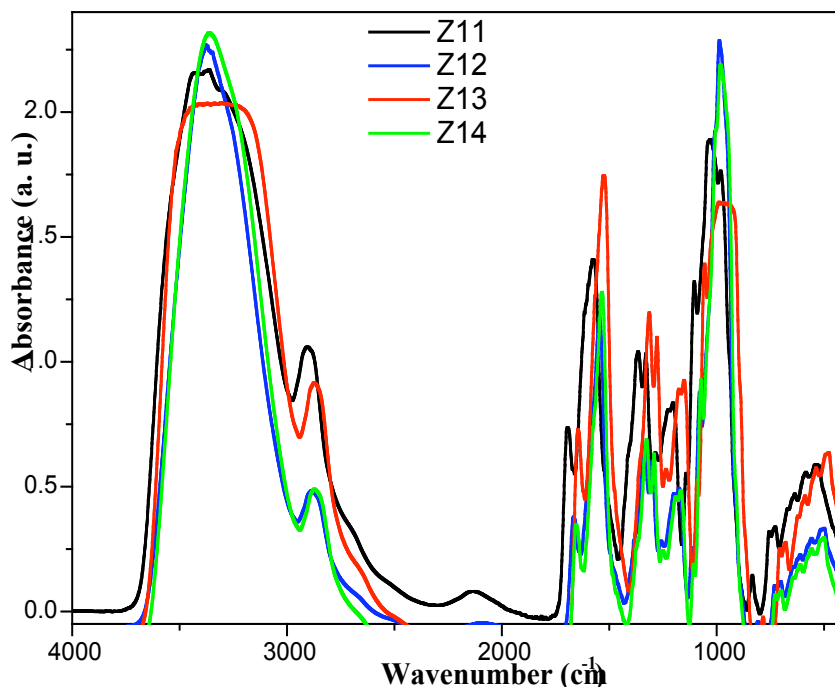


Figura 2. Espectros de IR de los hidrogeles QGMA-X

Además de estas en 1321 y 1263 cm^{-1} las bandas de vibraciones del enlace C-N que sugieren la presencia de acetonitrilo. Sin embargo en 817 y 792 cm^{-1} aparecen señales débiles debida a la deformación del enlace C-O del anillo del éter cíclico, sugiriendo un éter en posición cis, con la contribución de vibraciones de balanceo de grupos metileno

fuera del anillo del éter cíclico.⁷⁻¹⁰ Esto apunta fuertemente a la unión de X con el Q-GMA. Con la evidencia acumulada de los espectros de infrarrojo, así como las comparaciones realizadas entre ellos, se puede decir que el material existente es el producto de la reacción química entre las 3 especies involucradas.

En la Tabla 1 se muestran los valores de permeabilidad obtenidos para los hidrogeles QGMA-X, así como una comparación con diversos polímeros de origen natural.

Tabla 1. Valores de permeabilidad de los polímeros sintetizado y de diversos polímeros.

Polímero	P (mol m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Polímero	P (mol m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	Polímero	P (mol m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
QGMA-X 1:1	2.89 x 10 ⁻¹⁵	QGMA-X 1:2	---	Quitano	1.77 x 10 ⁻¹³
QGMA-X 1:3	2.59 x 10 ⁻¹⁵	QGMA-X 1:4	1.19 x 10 ⁻¹⁵	QTS-CS	5.5 x 10 ⁻¹²
Poliéster	1.08 x 10 ⁻¹²	Suero de leche:Glicerol (15:1)	2.92 x 10 ⁻¹³	Cera de abeja	5.71 x 10 ⁻¹⁰

Se observa que los valores de permeabilidad de los hidrogeles son de menor magnitud que los diversos polímeros, lo cual nos indica que son una buena barrera contra el paso del vapor de agua.

Para el implante de células los polímeros ofrecen una gran estabilidad frente al medio de cultivo es buena, ya que no viran el pH del mismo, haciendo factible el implante de los fibroblastos. Además de mantener la viabilidad de las células y disminuir su friabilidad. Como se observa en la figura 3, los polímeros tienen la capacidad de mantener a los fibroblastos vivos, aunque disminuye en todos los hidrogeles donde las células vivas son los puntos verdes brillantes de las células, observando que el polímero con mejores características es el QGMA-X 1:2, esto puede deberse a la arquitectura superficial de los hidrogeles.

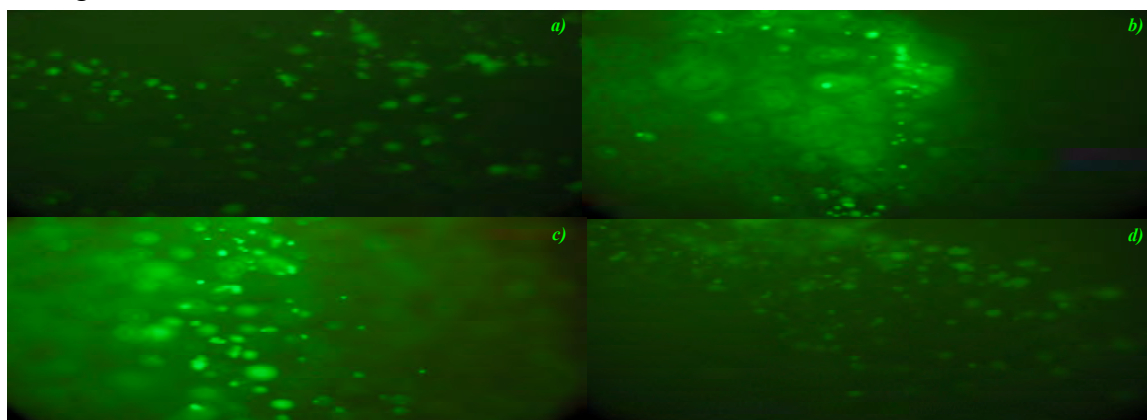


Figura 3. Imagen de los hidrogeles de QGMAX después del implante de fibroblastos, teñidos con calceína, a) QGMA-X 1:1, b) QGMA-X 1:2, c) QGMA-X 1:3 y d) QGMA-X 1:4.

Además de mostrar un cambio morfológico evidente en los fibroblastos, ya que se observan esféricos y no fusiformes que es su morfología característica.

En el implante de los polímeros en organismos vivos, la colocación presentó dificultades dado que el polímero al contacto con los líquidos corporales, pierde solidez y adquiere una consistencia gelatinosa muy difícil de manipular. 72 horas después del implante se sacrificó a las ratas y se procedió a la extracción de todo el cordón espinal, figura 4 y se ha enviado al departamento de histología del INR para su examen microscópico. En todos los casos se pudo observar en la zona de lesión que el polímero había adquirido una consistencia dura y una coloración café rojizo, probablemente por la retención de elementos celulares sanguíneos. Lo más importante es que los polímeros actúan como un pegamento entre las zonas de corte en las que fue colocado en médula espinal.



Figura 4. Imagen de a) procedimiento de extracción del cordón espinal y b) cordón espinal de la rata sacrificada observándose el implante.

Conclusiones

En este trabajo se presenta la evidencia de la síntesis de un hidrogel a partir de la reacción química de un el híbrido Q-GMA con Xantana. Con la espectroscopia de infrarrojo se tiene la evidencia de que en el material obtenido existen fuertes interacciones entre las especies involucradas. Además de esto la síntesis se lleva a cabo en un medio acuoso lo que aumenta su potencial de uso. Los hidrogeles mostraron ser una buena barrera al vapor de agua, aunque sean altamente hidrofílicos. Respecto a la viabilidad del uso de estos materiales en el implante de células humanas es una grande ya que ayudan a la preservación de las mismas. Al ser implantado el material en organismos vivos demuestra una gran estabilidad, además de servir como pegamento de la médula espinal de dichos organismo. Con toda la evidencia acumulada si el material es capaz de retener células, es de suponer su utilidad para implantar las células troncales en las zonas de lesión.

Referencias

1. Park, K., Shalaby, S.W.S., and Park, H.: Biodegradable Hydrogels for Drug Delivery, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1993, 1,1.
2. Martinez R. A., Rhéologie des solutions de chitosane et des hydrogels de chitosane-xanthane. Thèse de doctorat de génie (Ph. D.) Spécialité: génie chimique, Canada, 2001.
3. Flores-Ramírez N., Elizalde-Peña E. A., Luna-Bárcenas G., Vásquez-García S., González-Hernández J., Martínez-Ruvalcaba A., Sanchez I. C., Gupta R. B., Characterization and Degradation of Functionalized Chitosan with Glycidyl Methacrylate. Send to Journal of Biomaterials Science, February 2004.

4. Dumitriu S., Magny P., Montane D., Vidal P. F., Chornet E., Polyionic Hydrogels Obtained by Complexation between Xanthan and Chitosan: Their Properties as Supports for Enzyme Immobilization. *J. Bioactive and Compatible Polymers*, 1994, 9, 184-209.
5. Chellat F., Tabrizian M., Dumitriu S., Chornet E., Magny P., Rivard C. H., Yahia L., In vitro and in vivo Biocompatibility of chitosan/xanthan Polyionic complex, *J. Biomedical Mater. Res.*, 2000, 51, 107-116.
6. Milas M., Rinaudo M., Tinland B., *Polym Bull*, 1985, 14, 157
7. Kassai M. R., Arul J., Charlet G., Intrinsic Viscosity-Molecular Weight Relationship for Chitosan. *Journal of Polymer Science : Part B: Polymer Physics.*, 2000, 38, 2591-2598.
8. Pawlak A., Mucha M., Thermogravimetric and FTIR Studies of Chitosan Bleds. *Thermochimica acta*, 2003, 396, 153-166.
9. Lin-vien D., Colthup B. N., Ateley G. W., Graseelli G. J., *The Handbook of Infrared and Raman Characteristics Frequencies of Organic Molecules*, Academic Press, U.S.A, 1991, 227.
10. Pretsch E., Simon W., Seibl J., Clerc T., *Tables of Spectral Data for Structure of Organic Compounds*, Springer-Verlag, Germany, 1989, I5-I265