

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN SCAFFOLD POLIMÉRICO CON APLICACIONES EN MEDICINA REGENERATIVA

Navarro Arias, Diana Karime (1), Tavares Negrete, Jorge Alfonso (2), Quintero Ortega, Iraís Amaranta (3), Rosillo de la Torre, Argelia (4)

1 [Ingeniería Química Sustentable, Universidad de Guanajuato] | [navarroad2015@licifug.ugto.mx]

2 [Ingeniería Biomédica, Universidad de Guanajuato] | [tavaresnj2013@licifug.ugto.mx]

3 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [iraisq@fisica.ugto.mx]

4 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [rosilloa@ugto.mx]

Resumen

El quitosano es un polisacárido comúnmente utilizado para aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, ya que sus propiedades lo hacen ideal como andamio biodegradable. El objetivo de este trabajo es la síntesis de un hidrogel inyectable a base de quitosano y colágeno tipo I mediante una ruta de síntesis en la cual se utiliza etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS) como entrecruzantes, así como el análisis de algunas de sus propiedades. Los hidrogeles fueron caracterizados mediante espectroscopia FTIR y reología.

Abstract

Chitosan is a polysaccharide commonly used for biomedical applications such as tissue engineering, due to its properties which make it ideal as a biodegradable scaffold. The aim of this work is the synthesis of an injectable chitosan-collagen based hydrogel through a synthetic route in which ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N-Hydroxysuccinimide (NHS) are used as cross-linkers, as well as the analysis of some of its properties. The hydrogels were characterized by FTIR spectroscopy and rheology.

Palabras Clave

1; Biomateriales 2; Ingeniería de tejidos 3; Hidrogel inyectable 4; Entrecruzante 5; Cartilago.

INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos se ha convertido en uno de los temas más prometedores en investigación del área médica. Se trata de un área de amplio desarrollo en la cual participan investigadores de muchos campos diferentes por lo que existen una gran cantidad de métodos y técnicas para la elaboración de los materiales que se usan [1].

Osteoartritis es una enfermedad en la cual el cartílago de las articulaciones se desgasta causando dolor y discapacidad. Este efecto también puede ser causado por lesiones deportivas por lo que se convierte en un problema muy común que afecta a personas tanto de mediana edad como de la tercera edad. Existen diversas técnicas para tratar de solucionar este problema, sin embargo, la mayoría de estas involucran cirugía y no son completamente exitosas [2].

Existen principalmente tres tipos de lesión del cartílago [2], en este trabajo nos enfocamos en el segundo tipo, en el cual, la matriz está parcialmente dañada y los condrocitos (células presentes en el cartílago) no son capaces de repararlo por completo ya que estos tienen muy poca movilidad y no pueden migrar desde una zona sana del cartílago hacia la zona dañada, además de que el tejido con el que los condrocitos reparan la matriz no presenta la misma rigidez que el tejido original, lo cual origina que la lesión se agrave en un periodo corto de tiempo [3].

Los hidrogeles inyectables y biodegradables pueden ser utilizados para diversas aplicaciones en el área biomédica, como sistemas de liberación, cargadores de células y andamios para ingeniería de tejidos [4]. Los hidrogeles que se utilizan para aplicaciones de ingeniería de tejidos, además de tener las propiedades que se necesitan para realizar cierta función, también deben ser biodegradables, biocompatibles y biológicamente estables [5]. Una manera de sintetizar hidrogeles a base de polisacáridos naturales es mediante un agente entrecruzante, sin embargo, este método presenta la desventaja de que el compuesto

entrecruzante podría aumentar la toxicidad del hidrogel.

Colágeno y quitosano son biopolímeros comúnmente utilizados para aplicaciones de ingeniería de tejidos ya que son biodegradables, no son tóxicos y presentan una respuesta inmunológica muy débil. Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS) son entrecruzantes del tipo amida, los cuales presentan la ventaja de que su toxicidad es muy baja y tienen una mejor compatibilidad [6]. Con lo anterior se puede afirmar que los hidrogeles entrecruzados con EDC y NHS pueden ser utilizados para aplicaciones en el área médica.

El objetivo de este trabajo es la síntesis de hidrogeles biodegradables y no tóxicos a base de quitosano y colágeno tipo 1 extraído de colas de rata, mediante un entrecruzamiento con EDC/NHS. Se busca evaluar el efecto de la concentración de entrecruzante en las propiedades del hidrogel. Además, se analizará el potencial del proceso de extracción de colágeno de colas de rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Quitosano de peso molecular medio y grado de deacetilación del 85% (Lot#SLBH7118V), etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Lot#079K1395V) y N-hidroxisuccinimida (Lot#MKBK1707V) fueron comprados de Sigma-Aldrich. Ácido clorhídrico, ácido acético, buffer PBS, buffer PIPES, tritón, EDTA, etanol de grado analítico.

Extracción de colágeno de colas de rata

Para la extracción del colágeno tipo 1 el primer paso es exponer los tendones de las colas mediante un corte a 5 mm de la punta de la cola y quitando un pedazo de piel, estos se sujetan con unas pinzas y se jalan de manera horizontal, sujetando el otro extremo de la cola con la mano hasta que toda la fibra blanca haya salido de la cola. Se continúa cortando poco a poco la piel

hasta que queden aproximadamente 3 cm. Después de cada extracción de tendones, estos se deben sumergir en etanol absoluto y después en PBS. Cuando el proceso anterior haya finalizado, de 4.0 a 5.0 gramos de tendones se sumergen en 15 mL de etanol absoluto durante 1 hora, colocando la solución en un agitador orbital a 6 rpm. Los tendones se lavan con agua destilada y se sumergen en 50 mL de una solución que consta de 1 mL de tritón, 0.25 gramos de EDTA y lo que resta de PBS durante una hora. Al término de este plazo, los tendones son lavados nuevamente con agua destilada y se colocan en 200 mL de una solución de HCl 0.01M durante 8 días para que se lleve a cabo la hidrolización del colágeno.

Cuando el proceso de hidrolización termina, se lleva a cabo la cuantificación de la concentración de colágeno en la solución, siguiendo las instrucciones del Pierce™ BCA Protein Assay Kit de Thermo Scientific [7]

Síntesis de hidrogeles compuestos

Para la síntesis de los hidrogeles se utilizó un protocolo anteriormente reportado [6] con algunas modificaciones. Se tomaron 1.78 mL de la solución de colágeno y se mezcló con una solución de quitosano el 3% (w/v) en ácido clorhídrico 0.2M a 4°C, a ésta mezcla se le agregaron 1.94mL de buffer PIPES a la misma temperatura. Se realizaron soluciones de EDC/NHS en 1.70 mL de PIPES con diferentes concentraciones para poder observar el efecto que causa en las propiedades mecánicas del hidrogel el tener una mayor o menor cantidad de compuesto entrecruzante. Se realizaron tres relaciones diferentes, 1:2, 1:3 y 1:5, indicando gramos de colágeno y quitosano: gramos de entrecruzante EDC/NHS.

Después de la fabricación de los hidrogeles estos se mantuvieron a 4°C para la gelificación y cuando este proceso concluyó, se agregaron 0.5 mL de Na₂HPO₄ 0.1M para que se hidrolizara cualquier grupo o-acilisourea que hubiera quedado.

Caracterización de los hidrogeles

- *Espectroscopia FTIR*

Se realizaron los espectros de los tres hidrogeles compuestos, así como del colágeno, del quitosano

y de los compuestos entrecruzantes para llevar a cabo una comparación utilizando el equipo Nicolet iS5 de Thermo Fisher Scientific con un blanco de KBr. Para obtener el espectro de los hidrogeles fue necesario primero secar el hidrogel para después hacer la pastilla con KBr.

- *Evaluación de las propiedades mecánicas*

Se midió la viscosidad de cada uno de los tres hidrogeles compuestos utilizando el reómetro híbrido Discovery HR-2 de TA instruments con geometría de platos paralelos (4mm) a una temperatura de 37°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de colágeno de colas de rata

Después de realizar la extracción de los tendones de las colas de rata como se muestra en la imagen 1, se colocaron en la solución ácida y a lo largo del plazo de hidrolización se pudo observar como la solución se volvía cada vez más viscosa. Al término de los 8 días, la solución tenía una consistencia espesa.

Para determinar la concentración de colágeno en la solución se realizó una curva de calibración con el espectrofotómetro UV-VIS y se obtuvo la ecuación de la recta con una R² de 0.9974.

$$y = 0.3939x + 0.1358$$

Con esta información se obtuvo que la concentración de colágeno en la solución era de 6.18 ± 0.1 mg/ml.

Síntesis de hidrogeles compuestos

Los hidrogeles fueron fabricados a una temperatura de 4°C y se mantuvieron a la misma temperatura durante el proceso de gelificación. El tiempo de gelificación fue medido de forma manual y se observó que entre mayor fuera la cantidad de entrecruzante en la solución, el tiempo de gelificación era más corto. Los hidrogeles de radio 1:2 tardaron alrededor de 50 minutos, los de radio 1:3, 40 minutos y los de radio 1:5 tardaron media hora. Es importante hacer notar que la temperatura se mantuvo a 4°C porque se pudo observar que si los hidrogeles se mantenían a una temperatura más alta, el tiempo de gelificación se incrementaba considerablemente. Al término de la síntesis, los hidrogeles tenían una consistencia

viscosa a un grado que les permitía ser inyectables.

La reacción de entrecruzamiento en los hidrogeles ocurre de la siguiente manera, el compuesto entrecruzante EDC/NHS reacciona con los ácidos carboxílicos, grupos funcionales presentes en los aminoácidos del colágeno, formando la o-acilisourea que es un grupo éster activo e inestable en soluciones acuosas. La O-acilisourea es fácilmente atacada por las aminas primarias, grupos funcionales que se encuentran tanto en el quitosano como en el colágeno. La amina primaria

correspondiente a los grupos OH en un número de onda de 3400 cm^{-1} , lo mismo ocurre en el espectro del NHS, sin embargo, esta señal se observa más cuadrada debido a que se forman puentes de hidrógeno. Para el espectro del colágeno, la señal

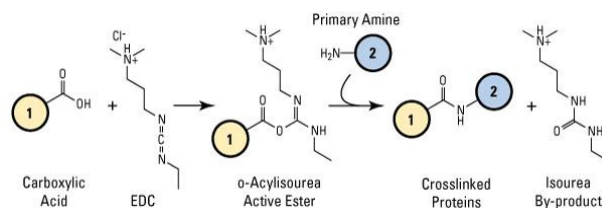


IMAGEN 2: Proceso de entrecruzamiento mediante una carbodiimida [8]. Los círculos 1 y 2 representan las proteínas.

que se encuentra alrededor de 1630 cm^{-1} corresponde a la amida I, la que se encuentra en 1533 cm^{-1} a la amida II y la que está alrededor de 1300 cm^{-1} a la amida III. Se encontraron las señales características del colágeno del que se realizó la extracción de colas de rata, por lo cual este colágeno si fue utilizado para la fabricación de los hidrogeles. Los cuatro espectros coinciden con lo reportado en la literatura.



IMAGEN 1: Extracción de tendones de colas de rata para la extracción de colágeno.

forma un enlace covalente con el ácido carboxílico original, formando de esta manera el entrecruzamiento entre las dos proteínas, estos enlaces se pueden dar entre el ácido carboxílico del colágeno con la amina del quitosano o con la amina del mismo colágeno. Finalmente, el intermediario que se utilizó para llevar a cabo el entrecruzamiento se hidroliza. Este proceso se ilustra en la imagen 2.

Spectroscopia FTIR

Los espectros obtenidos para los compuestos originales que son el colágeno, el quitosano y los entrecruzantes EDC y NHS se muestran en la imagen 3. Para el caso del colágeno y del quitosano se puede observar la “panza”

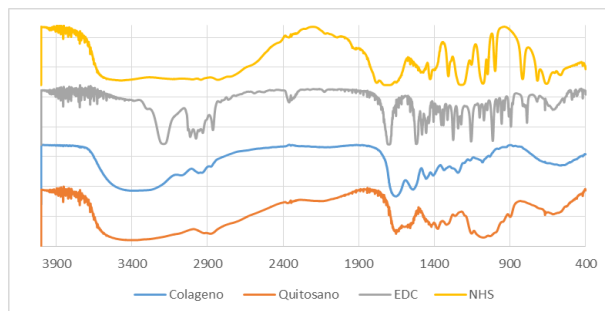


IMAGEN 3: Espectro FTIR de colágeno, quitosano, EDC y NHS.

Los espectros obtenidos para los tres hidrogeles se presentan en la imagen 4, como se puede observar, los tres espectros son iguales, con lo que se puede afirmar que el entrecruzamiento ocurrió en todos. Las señales que se observan en 2940 y 2700 cm^{-1} corresponden a los grupos CH_2 y CH_3 respectivamente, estos grupos provienen del quitosano. La señal presente en 1630 cm^{-1} corresponde a la amida I: $\text{C}=\text{O}$, la que se observa en 1550 cm^{-1} corresponde a la amida II: $\text{N}-\text{H}$, y la amida III: $\text{C}-\text{N}$ se observa a un número de onda de 1200 cm^{-1} , finalmente, se puede observar la señal correspondiente a la amina en 1055 cm^{-1} .

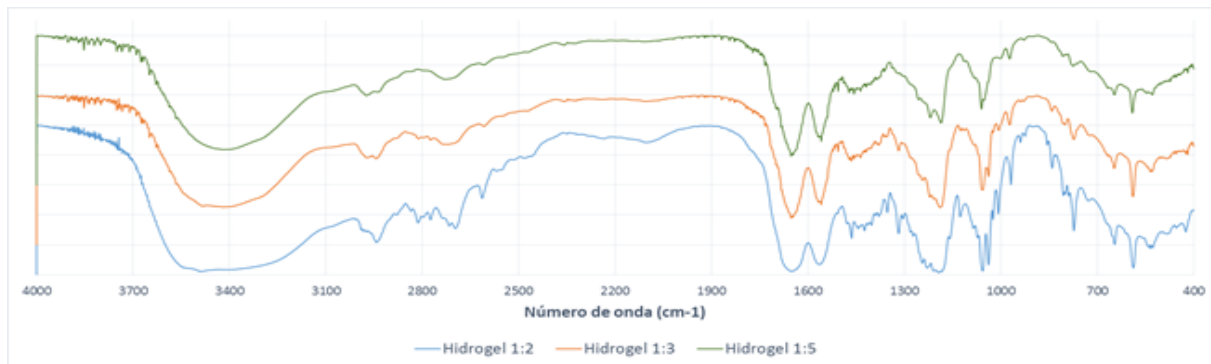


IMAGEN 4: Espectro FTIR de los tres hidrogeles compuestos

Evaluación de las propiedades mecánicas que los hidrogeles compuestos

Se midió la viscosidad de los tres hidrogeles con respecto al tiempo, los resultados se presentan en la imagen 5. Se puede observar que las tres curvas presentan el mismo comportamiento, sin embargo, el hidrogel más viscoso es el de radio 1:3, después el de radio 1:2 y el que tiene la menor viscosidad es el de radio 1:5.

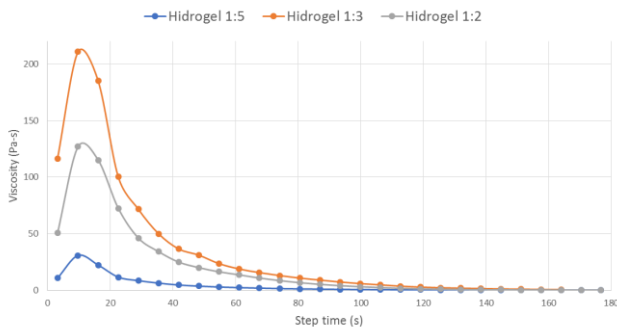


IMAGEN 5: Viscosidad de los hidrogeles compuestos

CONCLUSIONES

Se desarrollaron hidrogeles compuestos en los cuales, mediante un entrecruzamiento con EDC/NHS, se crearon enlaces covalentes entre moléculas de colágeno y de quitosano para dar lugar a un biomaterial con una estructura que le da buenas propiedades mecánicas para ser

inyectable, manteniendo las propiedades biológicas de las proteínas originales, lo cual da la posibilidad de que el material sea utilizado para aplicaciones biomédicas.

REFERENCIAS

- [1] Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J. & Wiesmann, H.P. (2009). *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin: Springer.
- [2] Temenoff, J. T. & Mikos, A.G. (2000) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21, 431-440.
- [3] Buckwalter, J.A. (1998). Articular cartilage: injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*. 28, 192-202.
- [4] Tan H., Chu, C.R., Payne, K.A. & Marra, K.G. (2009). Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 30, 2499-2506.
- [5] Mu, X., Dang, J., Du, Y., Li, X., Fan, D., Zhu, C., Hui, J., Ma, P. & Xun, W. (2014). A novel chitosan- collagen-based hydrogel for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. *J. Mater. Chem. B*, 2, 2749.
- [6] Rafat, M., Li, F., Fagerholm, P., Lagali, N.S, Watsky, M.A. Munger, R., Matsuura, T. & Griffith, M. (2008). PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. *Biomaterials* 29, 3960-3972.
- [7] Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific. Rockford, IL. Recuperado de https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- [8] Thermo Fisher Scientific, Carbodiimide crosslinker chemistry. Protein biology resource library. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemist>