

SÍNTESIS DE UN HIDROGEL INYECTABLE BASE QUITOSANO PARA REGENERACIÓN DE CARTÍLAGO

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

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

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

3 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, DCI Universidad de Guanajuato Campus León] | [rosilloa@ugto.mx]

4 [Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, DCI Universidad de Guanajuato Campus León] | [iraisq@ugto.mx]

Resumen

La osteoartritis afecta aproximadamente al 15% de las personas de la tercera edad como resultado del incremento de la expectativa de vida y la sobrecarga mecánica de las actividades diarias. Esta enfermedad es acelerada por la degradación de la matriz extracelular secretada por los condrocitos, y está conformada principalmente por agua y colágeno. Un hidrogel polimérico entrecruzado es propuesto como un andamio de matriz extracelular, utilizando quitosano como la cadena principal debido a su buena biocompatibilidad, propiedades antibacteriales y fortaleza estructural. Incorporando colágeno por su flexibilidad y resistencia a la tensión, incluyendo almidón dialdehído (DAS) un polisacárido natural funcionalizado como entrecruzante. La síntesis del biomaterial fue llevada a cabo por acetilación y la reacción de Schiff, variando la concentración del almidón dialdehído se obtuvieron diferentes porcentajes de entrecruzamiento. Las propiedades reológicas de los hidrogeles fueron estudiadas y se caracterizaron los andamios extracelulares mediante Espectroscopia Infrarroja.

Abstract

Degenerative osteoarthritis affects approximately 15% of the third age people due to the increase in life expectancy and as a result of mechanical overload due to daily activities. This disease is accelerate by the degradation of the cartilage extracellular matrix secreted by chondrocytes, formed mainly by water and collagen. A polymer crosslinked hydrogel is proposed as a extracellular matrix scaffold, using chitosan as the main component providing good biocompatibility, antibacterial proprieties and structural strength. Collagen is incorporated for their flexibility and tensile strength, including dialdehyde starch (DAS) a natural functionalized polysaccharide as a crosslinker.

The synthesis of this biomaterial was performed by acetylation and Schiff base reaction, varying the concentration of dialdehyde starch gives different ratios of crosslinking. The rheological properties of the hydrogels were studied and Fourier Infrared Spectroscopy was performed to characterized the extracellular matrix scaffold.

INTRODUCCIÓN

Esquelético (SME) son considerados por el Instituto Nacional de Rehabilitación de México como un problema de salud pública [1], invirtiéndose en México hasta el 0.4% del PIB en su tratamiento, siendo la mayoría enfermedades crónicas [2].

Dentro de los padecimientos del SME se encuentran aquellos que afectan al cartílago, tejido elástico útil para amortiguar la carga mecánica y evitar el desgaste por fricción en el esqueleto. El cartílago está conformado principalmente por agua, colágeno tipo II y glicosaminoglicanos (GAGs) siendo los condrocitos las células especializadas encargadas de producir la matriz cartilaginosa.

El tratamiento actual de las enfermedades del SME involucra mayoritariamente la terapia farmacológica y la rehabilitación sin obtener buenos resultados.

La regeneración natural del cartílago está limitada por el bajo metabolismo de los condrocitos y la pobre vascularización, por lo que en medicina regenerativa se ha propuesto el uso de andamios sólidos e hidrogeles con el reto de ofrecer resistencia mecánica similar al tejido nativo, fomentar la migración celular del huésped y la regeneración de las microfracturas de cartílago.

Tratar de imitar las condiciones naturales de la matriz extracelular del cartílago mediante el uso de biomateriales es una de las maneras de promover la regeneración, por lo que el uso de hidrogeles con colágeno ha sido estudiado con perspectivas de mejora en la síntesis, biocompatibilidad, propiedades mecánicas y costos de producción.

El propósito de este trabajo fue sintetizar un hidrogel a partir de quitosano con características tanto químicas como físicas parecidas a las del cartílago. Se compararon dos métodos de obtención de colágeno proveniente de cola de rata, y se utilizó almidón dialdehído como entrecruzante. Los hidrogeles se caracterización por espectroscopia infrarroja y reologicamente para conocer el efecto que tiene el entrecruzamiento en las propiedades del material.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El quitosano (peso molecular medio, grado de deacetilación del 85%, lote SLBH7118V), el almidón de maíz (lote MKBW7231V) y el peryodato de sodio (lote MKBW4508V) fueron comprados a Sigma-Aldrich Trading Company. El colágeno liofilizado de cola de rata fue adquirido Roche Germany. Todos los solventes y reactivos fueron de grado analítico.

Métodos

- *Preparación de Almidón dialdehído (DAS)*

Se siguió el procedimiento previamente descrito por Zuo et al [3] con algunas modificaciones, se disolvieron 3g de peryodato de sodio en 30ml de HCl 0.6M, 2.05g de almidón de maíz fueron agregados. Se colocó el frasco cerrado en baño maría a 35°C con agitación y control de temperatura por 2h. El precipitado fue lavado con acetona y agua destilada para proceder a filtrarlo por gravedad a 40°C durante 48h.

- *Cuantificación de grupos dialdehído*

0.2g de DAS fue disuelto en 10ml de NaOH 0.25M, la solución fue colada en baño María con agitación y control de temperatura a 70°C por dos minutos, dejando enfriar a temperatura ambiente por 10 min. Se obtiene una mezcla rojo oscuro a la cual se le agregaron en agitación 15ml de H₂SO₄ 0.125M, hasta que el color de la solución cambió a amarillo pálido. Posteriormente se agregaron 0.2g de carbón activado y se agitó. La solución fue filtrada por gravedad hasta obtener un líquido incoloro, después dos gotas de fenolftaleína 1% fueron agregadas y se tituló con una solución de NaOH 0.1M. Cuando la solución se tornó purpura y no cambió su color por 30s, la titulación llegó a su punto final.

- *Obtención de colágeno*
- *Método lento*

Se extrajeron los tendones de la cola de rata sumergiéndolos en etanol 70% y después en PBS 1x. Se sumergieron los tendones en 15ml de

etanol absoluto y se colocaron en agitación orbital por 1.0h a 6rph. Posteriormente se lavaron los tendones con agua destilada para sumergirlos en una solución de Tritón, EDTA y PBS 1x por 1h. Se decantaron los tendones y fueron sumergidos en 200ml de HCl 0.01M en agitación y refrigeración por una semana.

- *Método rápido*

Se utilizó el protocolo escrito por Gómez et al [4], en el cual el tendón de cola de rata es disuelto en una solución de ácido acético 0.5M en agitación y refrigeración por tres días.

- *Cuantificación de colágeno*

Se utilizó el kit Pierce® BCA Protein Assay de Thermo Fisher Scientific, utilizando una curva de calibración elaborada con colágeno liofilizado grado cultivo celular con concentraciones en el intervalo de 2 a 0 mg/ml.

Para evitar saturación en las mediciones se prepararon alícuotas de las muestras de colágeno a medir, se obtuvieron las absorbancias de los blancos, la curva y las muestras con UV-Vis a 562nm.

- *Preparación de hidrogeles*

Se siguió la metodología de Ma et al [5] con algunas modificaciones para la preparación de hidrogeles, donde se prepara una solución 2% p/v de quitosano en ácido acético 1% v/v, se neutraliza la solución de colágeno obtenido de tendones de cola de rata con concentraciones cuantificadas, se disuelve en baño María a 90°C por 60m el entrecruzante DAS en una solución 2% p/v en agua y posteriormente se neutralizo.

La síntesis de los hidrogeles fue en temperatura ambiente realizando una mezcla volumétrica 2:1 de colágeno con quitosano, agregando diferente cantidad de DAS de acuerdo a la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los hidrogeles con colágeno obtenido de dos procedimientos distintos y con variaciones en la concentración de DAS.

- *Espectroscopia Infrarroja*

La espectroscopia infrarroja de los colágenos, quitosano, almidón, almidón dialdehído y los hidrogeles fueron tomadas en sólido seco utilizando el equipo Nicolet iS5 de Thermo Fisher Scientific.

Reometría

Las propiedades reológicas de los hidrogeles fueron obtenidas con el reómetro Discovery HR2, TA Instruments, mediante la geometría de platos paralelos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de grupos dialdehído

La fórmula de cuantificación se muestra a continuación:

$$-CHO\% = \frac{(C_1V_1 + C_2V_2 - 2x \cdot C_3V_3) \cdot 161}{m \cdot 1000} \cdot 100\%$$

Donde $C_1 = 0.25M$, $V_1 = 25ml$, $C_2 = 0.1M$, $V_2 =$ volumen de NaOH utilizado en l titulación, $C_3 = 0.125M$ y $V_3 = 15ml$, m es la masa del almidón dialdehído y 161 es la masa molecular promedio de cada unidad de glucosa del DAS.

El porcentaje de grupo aldehídos contenidos en el almidón dialdehído corresponde al $43.4\% \pm 0.3$. La reacción de oxidación entre el almidón el $NAIO_4$ y el HCl es fotosensible por lo que se debe procurar realizarlo en un cuarto oscuro.

- *Cuantificación de colágeno*

Tras preparar la curva de calibración y analizarla se realizó un ajuste lineal obteniendo la ecuación de la recta y coeficiente de dispersión $R^2 = 0.9973$, la Tabla 1 muestra la comparación de concentración de colágeno obtenido por dos métodos distintos.

Hidrogel	Concentración de colágeno (mg/ml)	Método de obtención de colágeno	Colágeno/ quitosano (ml)	DAS (ml)	Agua destilada (ml)
HA 1.5	6.18 ±0.1	Lento	3.5	1.5	0
HA 1.0	6.18 ±0.1	Lento	3.5	1.0	0.5
HB 1.5	3.88 ±0.05	Rápido	3.5	1.5	0
HB 1.0	3.88 ±0.05	Rápido	3.5	1.0	0.5

Tipo de obtención	Concentración (mg/ml)
Método lento	6.18 ±0.1
Método rápido	3.88 ±0.05

Tabla 1. Concentración de colágeno obtenido por método rápido tras 7 días y método lento después de 3 días.

El último paso en el proceso de obtención de colágeno sirve para hidrolizarlo, teniendo dos protocolos donde el tiempo de espera es diferente, existe una relación entre el tiempo de espera y la concentración final obtenida, se debe de considerar también la concentración de los ácidos en los que son colocados los tendones y la reactividad de los mismos.

Espectroscopia Infrarroja

- Almidón y almidón dialdehido

La Ilustración 1 Espectro infrarrojo del almidón y el almidón dialdehido (DAS), muestra el espectro del almidón y el almidón dialdehido, observando una curva en la longitud de 3310cm⁻¹ corresponde a grupos O-H presentes en el almidón, a 2930cm⁻¹ se perciben grupos C-H, en 1625cm⁻¹ se observa un pico característico a la unión de agua con el almidón, los picos relevantes característicos de la presencia de aldehídos se encuentran a 1720cm⁻¹ correspondientes a grupos carboxilo C=O y encontrándose un pico a 1210cm⁻¹ correspondiente a enlace C-O, los últimos dos picos no se encuentran presentes en el almidón, pero sí en el DAS, lo que confirma la presencia de grupos dialdehido en el DAS.

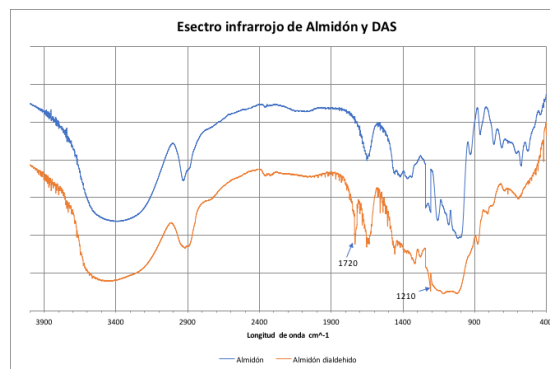


Ilustración 1 Espectro infrarrojo del almidón y el almidón dialdehido (DAS).

- Hidrogeles

En la Ilustración 2 se observan los espectros infrarrojos obtenidos de los hidrogeles sintetizados.

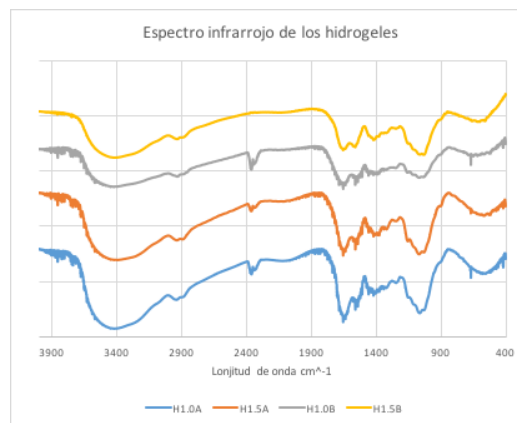


Ilustración 2 Espectro infrarrojo de los hidrogeles sintetizados.

La curva a 3433cm⁻¹ corresponde a un grupo NH₂ sobrepuesto a una unión O-H, en 1646cm⁻¹ se observan interacciones C=N y en 1150cm⁻¹ y 1025cm⁻¹ está asociada a uniones C-O-C. Estos resultados comprueban la formación de enlaces por reacción de Schiff y acetilación.

- Reometría

En la Ilustración 3 se muestra una curva de flujo, donde se compara la resistencia de los hidrogeles a esfuerzos cortantes y la velocidad de cizalladura, en donde se observa que el hidrogel HA1.5 el cual tiene mayor cantidad de entrecruzante y colágeno

ofrece una mayor resistencia en comparación con los otros hidrogeles con menor cantidad de colágeno y DAS.

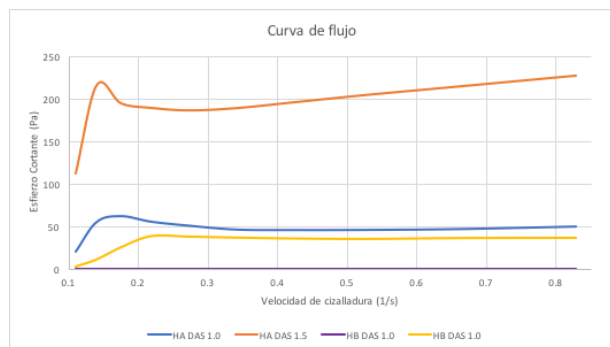


Ilustración 3 Curva de flujo comparativo entre los cuatro hidrogeles sintetizados.

Pudiendo así deducir que aquellos hidrogeles con mayor concentración de colágeno y entrecruzarte, tendrán a tener un mayor grado de entrecruzamiento aumentando la viscosidad.

CONCLUSIONES

Con el uso de la espectroscopia infrarroja se ha podido caracterizar de manera química los hidrogeles y el entrecruzarte preparado, la comparación de varios métodos de obtención de colágeno nos permitió identificar la efectividad de los diferentes protocolos y los estudios reológicos nos dieron a conocer las propiedades físicas de los hidrogeles permitiendo identificar la metodología idónea para obtener las propiedades de interés para la regeneración de cartílago.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por la gestión de espacios, al Dr. J.J. Delgado y la Dra. Laura Edith Castellanos por sus valiosas contribuciones.

REFERENCIAS

- [1] Guillermo Ibarra L., Segura García V.H. (2013) Las enfermedades y traumatismos del Sistema Músculo Esquelético. Un análisis del Instituto Nacional de Rehabilitación de México, como base para su clasificación y precencion. Recuperado de <http://www.inr.gob.mx/Descargas/ops-oms/lasEnfermedadesTraumatismosSistemaMusculoEsqueletico.pdf>
- [2] March LM, Bachmeir CJ. (1997). Economics of osteoarthritis. A global perspective. *Baillieres Clin Rheumatol*, 11, 817-834.
- [3] Zuo Y., Liu W., Xiao J., Zhao X., Zhu Y., Wu Y. (2017). Preparation and characterization of dialdehyde starch by one-step acid hydrolysis and oxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 1257-1262.
- [4] Gómez K. K., Del Prado M. L., Piña M. C., García de León M. C., (2012). Extraction and characterization of collgaen from different biological tissues. *AIP Publishing*, 149, 1494-1500.
- [5] Ma X., Deng J., Du Y., Li X., Fan D., Zhu C., Hui J., Ma P., Xue W. (2014). A novel chitosan-collagen-based hydrogel for use as a dermal filler: inital in vitro and in vivo investigations. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 2749-2763.