



VII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

"GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"

16-18
junio 2016

Unidad de Seminarios, BUAP



CARACTERIZACIÓN DE LA FABRICACIÓN DE UN ANDAMIO DE ALCOHOL POLIVINILICO (PVA) PARA LA SOBREVIVENCIA CELULA

Abraham Estrada^{a, b}, O. Medina^{a, b}, R. Quispe^b, A. Martínez^c

^aInstituto Politécnico Nacional,UPIBI, Avenida Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, 07340 México, DF, México

^bDirección de Investigación, Unidad de Investigación y Desarrollo Tecnológico (UIDT), Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726, Ciudad de México, México

^cLaboratorio de Hematología Especial, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga", Dr. Balmis 148, Col. Doctores, 06726, Ciudad de México, México.

RESUMEN

En este trabajo se evalúa el efecto que produce la difusión de la glucosa inyectada en un andamio de PVA en forma de cápsula, debido a las variaciones del peso molecular de PVA de 85,000-124,000 y 145,000-185,000 y además de sus concentraciones en peso (5% y 7%). Se evaluaron 8 cápsulas de dos tamaños, 4 cápsulas (L = 1 cm, D = 0.6 cm) y 4 cápsulas (L = 2 cm, D = 0.6 cm). La construcción del andamio se basa en el fenómeno físico "crosslinking", resultando que cuatro ciclos de congelación de 20 minutos y descongelación de 40 minutos, permitieron obtener mejores resultados respecto a las propiedades mecánicas del andamio, como: resistencia mecánica, resistencia elástica y resistencia térmica. Previamente a evaluar la difusión de la insulina, la cápsula fue sometida a un proceso de deshidratación controlada, cada 15 minutos durante una hora para la cápsula pequeña y cada hora durante 24 horas para la cápsula grande, logrando expulsar el 10% de volumen en agua, lo que permitió reducir el estrés en el interior del andamio, y para la inyección de un mayor volumen de glucosa. La difusión de la glucosa se evaluó del interior al exterior de la cápsula, inyectando 10 unidades en cada una. El comportamiento de la liberación de la glucosa se presenta de forma exponencial, con pequeñas variaciones en la velocidad y en el valor máximo de estabilidad. Además se evaluó la difusión del exterior al interior de la cápsula, obteniendo como resultado una oscilación, esto nos demuestra que hay facilidad en la entrada y salida de la glucosa en este tipo de andamios. Con estos resultados de la difusión se comprueba que el andamio permite el intercambio de nutrientes para mantener la sobrevivencia celular.

1. INTRODUCCIÓN

El trasplante de órganos humanos empezó con una serie de estudios experimentales a comienzos del siglo XX. En ese informe se propone el uso de un andamio de PVA como sustituto de tejidos blandos, pues por sus características similares a estos, permitirá tener una mayor biocompatibilidad. El trasplante quirúrgico de órganos humanos de donantes fallecidos o vivos a personas enfermas o moribundas empezó después de la Segunda Guerra Mundial. En los últimos 50 años, el trasplante de células, tejidos y órganos humanos se ha convertido en una práctica mundial que ha alargado la duración y mejorado enormemente la calidad de cientos de miles de vidas. Gracias a la constante mejora de la tecnología médica, sobre todo en relación con el rechazo de tejidos y órganos, se ha producido un aumento de la demanda de éstos, que siempre ha sido superior a la oferta, a pesar del notable aumento de la donación de órganos de personas fallecidas y del aumento de las donaciones de personas vivas en los últimos años.

La escasez de órganos disponibles no sólo ha llevado a muchos países a elaborar procedimientos y sistemas destinados a aumentar la oferta, sino que también ha estimulado el tráfico comercial de



VII CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

"GENERACIÓN DE NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO"

16-18
junio 2016

Unidad de Seminarios, BUAP

órganos humanos, sobre todo de donantes vivos no emparentados con los receptores. Las pruebas de la existencia de ese comercio, y del tráfico de seres humanos que lo acompaña, se han hecho más evidentes en los últimos decenios. Además, la facilidad cada vez mayor para las comunicaciones y viajes internacionales ha llevado a muchos pacientes a viajar al extranjero para acudir a centros médicos que hacen publicidad de su capacidad para realizar trasplantes y suministrar órganos donados por una tarifa única que lo incluye todo.

En este trabajo nosotros caracterizamos un andamio de alcohol polivinílico (PVA) con las condiciones de intercambio de nutrientes para mantener la sobrevivencia celular, y que un futuro pueda ser usado en la clínica.

2. ALCOHOL POLIVINÍLICO (PVA)

Los hidrogeles se han aplicado en áreas como: medicina, biotecnología, farmacéutica e industria. Se han empleado como sistemas de suministro de medicamentos, apósitos húmedos, matrices para el cultivo de células, así como lentes de contacto, sensores y como reemplazo de tendones, piel, ligamentos y cartílago.

El alcohol de polivinilo (PVOH, PVA, o PVal), también llamado polietenol o poli (alcohol vinílico), es un polímero sintético soluble en agua, de fórmula química general $(C_2H_4O)_n$.

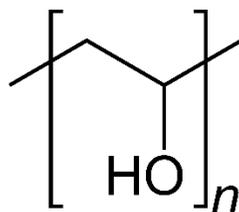


Fig.1 Estructura química del alcohol polivinílico.

El PVA, es un polímero hidrofílico, no tóxico, biocompatible, con buenas propiedades mecánicas y muy estables durante largos períodos en diferentes condiciones de temperatura y pH. Las características del alcohol polivinílico, su concentración, la temperatura y el proceso de fabricación determinan las propiedades del hidrogel obtenido; dependiendo de la aplicación que se desee. Las propiedades mecánicas de los hidrogeles, en general, dependen en gran medida del método de preparación, por tanto, es difícil asignar propiedades mecánicas específicas a un hidrogel.

Síntesis de hidrogeles

En la síntesis de un hidrogel, junto a los elementos habituales de cualquier reacción de polimerización, tales como el disolvente, monómero o monómeros y el iniciador, se necesita de un agente entrecruzante que va a ser el responsable de la estructura reticulada del gel.

Al sintetizar un hidrogel se puede elegir entre un gran número de monómeros, que dividiremos en tres categorías:

1. Monómero con sustituyentes laterales no ionizables: en esta categoría pueden incluirse la acrilamida, la N-vinilpirrolidona, el metacrilato de 2-hidroxietilo, etc.

2. Monómeros con grupos funcionales ionizables: como por ejemplo, los ácidos acrílicos, metacrílicos, itacónico, sulfónicos y aminas; de los cuales se obtienen hidrogeles que absorben gran cantidad de agua y sus propiedades mecánicas son muy pobres.



3. Monómeros switeriónicos o sales internas: el sustituyente lateral consiste en dos grupos cargados y unidos a la cadena principal. Su característica primordial es que para el polímero entrecruzado el hinchamiento de la red es mayor en disolución salina que en agua.

Los hidrogeles se preparan mediante el hinchamiento de una estructura entrecruzada en agua o fluidos biológicos que contienen grandes cantidades de ésta. En muchas ocasiones el fluido puede estar presente durante la formación de la estructura entrecruzada. Existen varios métodos de preparar hidrogeles entrecruzados como son:

- a) **Entrecruzamiento por radiación:** Esta reacción utiliza la emisión de electrones, rayos gamma, rayos X o luz ultravioleta para excitar el polímero y producir la estructura entrecruzada.
- b) **Entrecruzamiento por reacción química:** Este método es una reacción de copolimerización y entrecruzamiento entre uno o más monómeros y un monómero multifuncional el cual está presente en muy pequeñas cantidades, este último se denomina agente entrecruzante y presenta una masa molecular pequeña, se une a cadenas de peso molecular grande a través de sus grupos multifuncionales.
- c) **Entrecruzamiento por crosslinking:** Este método requiere de disminuir la temperatura de la mezcla en la que se encuentra el polímero, durante un tiempo establecido; así como de aumentar la temperatura para lograr su descongelación. Este proceso físico será un factor importante para llevar a cabo el entrecruzamiento del polímero.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Para esta investigación se preparó 4 mezclas de alcohol polivinílico (PVA), con grado de hidrólisis de 97% (Sigma Aldrich):

- Concentración 5%, MW = 85,000-124,000
- Concentración 5%, MW = 145,000-185,000
- Concentración 7%, MW = 85,000-124,000
- Concentración 7%, MW = 145,000-185,000

Para obtener el modelo del andamio, se utilizó una placa usada en la técnica ELISA (para un andamio de L=1cm), y capsulas de gelatina (para un andamio de 2cm), tal como se muestran en la fig. 2, que por sus características evita que se produzca una reacción química o física secundaria.

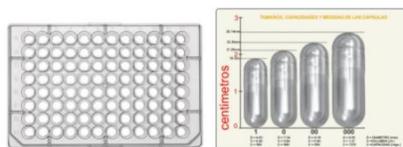


Fig.2 a) Placa usada en la técnica ELISA, b) cápsulas de gelatina

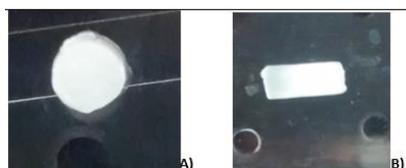


Fig.3 Andamio de PVA: A) Diámetro: 0.6 cm, B) Largo: 1cm



La mezcla viscosa de PVA se colocó en el molde requerido y se sometió a cuatro ciclos de congelación de 20 minutos, y descongelación de 40 minutos. Se obtuvieron hidrogeles con las siguientes características:

1. **Deshidratación:** La deshidratación del andamio se hizo a temperatura ambiente. Se midió la masa inicial y después de la deshidratación se midió la masa final, en intervalos de 5 minutos, luego se midió la longitud del andamio, con la mínima variación de la longitud se detuvo el proceso, para evitar modificación en la estructura microscópica del andamio. El proceso de deshidratación de la cápsula en sílica-gel se observa en la Fig. 4.



Fig.4 Proceso de deshidratación

2. **Capacidad de almacenaje:** Se emplearon dos soluciones, leche con colorante vegetal rojo y agua con colorante vegetal verde, esto porque tienen densidades similares a la de la sangre; se inyectó hasta antes que reviente el andamio, se observa en la Fig.5.

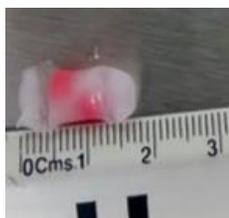


Fig. 5 Volumen soportado por una cápsula

3. **Elasticidad:** En un plano se colocó una regla con escala en centímetros, y con la ayuda de dos pinzas se sujetaron ambos extremos del andamio, colocando un extremo en cero y el otro extremo se estiró con la velocidad de 1mm/segundo hasta lograr el punto de elasticidad máxima (L=1.2cm) antes de la ruptura, tal como se observa en la fig. 6.



Fig.6 Elasticidad del andamio

4. **Deformación:** A un andamio al que se le inyectó un colorante vegetal se le aplicó una presión constante de 2Kg/cm² en un tiempo de 60 segundos, con una pinza de disección simple, como se muestra en la fig. 7. El colorante vegetal permite ver de manera cualitativa que esta presión ejercida es necesaria para mantener un sellado firme del andamio, después de haberlo comprometido con la jeringa, como se ve en la fig. 8.



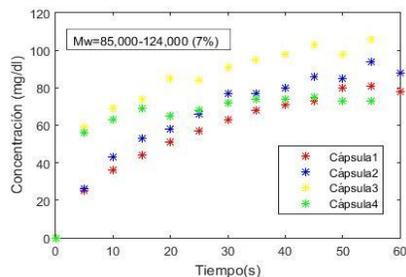
Fig. 7 Prueba de presión en el andamio



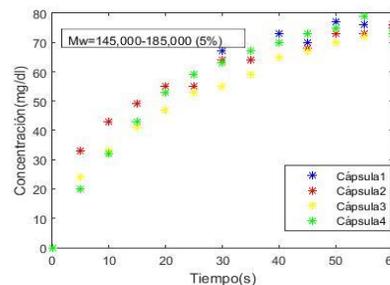
Fig. 8 Vista del sello realizado con pinzas de disección simple

5. Resistencia al calor: Se sumergió el andamio en agua desionizada y se sometió a una temperatura mayor a 40°C en una parrilla de calentamiento con agitación constante, logrando simular las condiciones del cuerpo humano. Después de 2 horas en estas condiciones el andamio no muestra fracturas por lo que es capaz de resistir a estas condiciones.

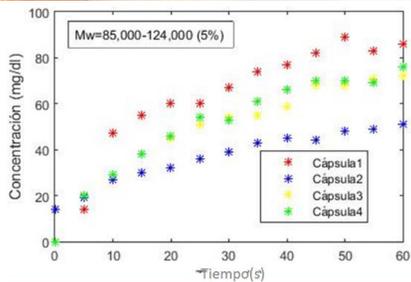
Las pruebas para verificar la permeabilidad de la porosidad del andamio, se realizaron de la siguiente forma. Se inyectó glucosa dentro de la cápsula con una jeringa para insulina, las cuales tienen un gauge menor (31G) que las agujas convencionales (28G). Se inyectó al andamio 30% menos del volumen establecido en la prueba de almacenaje de una solución de glucosa pura en agua desionizada, se selló con la pinza lisa y se sumergió en 20 ml de solución fisiológica (suero comercial utilizado en hospitales) con agitación constante de 200 rpm a 37 °C y con ayuda de un glucómetro se tomaran medidas en intervalos de 5 min, empezando en el tiempo 0 hasta los 60 min. Obteniendo las siguientes curvas, para cada cápsula, tal como se observan en la fig. 9.



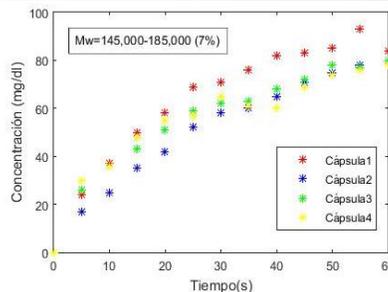
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 9 (a) Concentración 5%, $M_w = 85,000-124,000$, (b) Concentración 5%, $M_w = 145,000-185,000$. (c) Concentración 7%, $M_w = 85,000-124,000$ y (d) Concentración 7%, $M_w = 145,000-185,000$

4. CONCLUSIONES

La permeabilidad del andamio permitirá la migración de los nutrientes del exterior al interior de la cápsula, así como la liberación de los mismos del interior al exterior de la cápsula hasta alcanzar el equilibrio y permitir la sobrevivencia celular. Además de que esta permeabilidad parece tener un comportamiento similar dependiente de la concentración, peso molecular y tamaño, pues a mayor peso molecular la liberación parece ser más estable que cuando se utiliza uno de menor peso molecular, y la velocidad de liberación es más grande.

BIBLIOGRAFÍA

1. PRINCIPIOS RECTORES DE LA OMS SOBRE TRANSPLANTE DE CÉLULAS, TEJIDOS Y ORGANOS HUMANOS. OMS. 2010.
2. Vázquez, M.V., Estudio y aplicaciones de la difusión en nanoestructuras y sistemas biológicos (2010). UAM-Iztapalapa.