

# DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CHITOSANO Y FOSFATOS CÁLCICOS PARA LA CESIÓN SOSTENIDA DE PROTEÍNAS

*J. J. Delgado Perera, A. Delgado Hernández, C. Évora García*

Dpto. de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Tenerife. Spain

## Resumen / Abstract

Este trabajo es un estudio previo realizado con proteínas modelo cuyo objetivo final es la formulación de sistemas biodegradables y osteoinductores conteniendo factores de crecimiento (GF) para la regeneración de grandes defectos óseos.

This work is a preliminary study made with model proteins for development and characterization of biodegradable and osteoinductor delivery systems containing growth factors (GF) for bone regeneration.

## Introducción

La importancia de los Factores de crecimiento (GF) en los procesos de regeneración ósea se ha puesto en evidencia en estos últimos años [1, 2], con el uso de concentrados de plaquetas como fuente de GF con un papel activo en la regeneración tisular.

El reto actual es desarrollar un vehículo o sistema que permita obtener el máximo beneficio terapéutico de estos factores. El papel que debe jugar este sistema es lograr controlar la liberación de estas proteínas en la zona afectada durante un período de tiempo suficiente para estimular la regeneración ósea y, por otro lado, proporcionar un entorno favorable para la adherencia y proliferación de la población celular.

Los primeros pasos a abordar consisten en la puesta a punto del método de elaboración del sistema. Por ello el objetivo de este trabajo es la formulación y caracterización in vitro de un sistema a base de chitosano y fosfatos cálcicos

para la cesión sostenida de proteínas. Se han elegido como proteínas modelo la albúmina de suero bovino (BSA) y la calcitonina bovina (Ct) ya que cubren el intervalo de pesos moleculares de factores de crecimiento (GF) de interés en la regeneración ósea (6,1 kDa del factor de crecimiento epidérmico y 45 kDa del factor de crecimiento vascular endotelial)

## Materiales y Métodos

### Materiales

Tripolifosfato como sal pentasódica anhidra (TPP) (Sigma), fosfato tricálcico purísimo (TCP) (Panreac), <sup>125</sup>I en forma de disolución de NaI (Amersham Biosciences).

Chitosano (Aldrich) de peso molecular medio 400 kDa, grado de deacetilación (DD) 75-85% y una viscosidad (solución al 1% en acético 1%, 20°C) de 200-800 cps.

Albúmina de suero bovino (BSA, Merck) y Calcitonina bovina (Ct, Sigma)

### Elaboración de gránulos de chitosano conteniendo proteína

Los gránulos fueron elaborados siguiendo el método de gelificación iónica.

Para ello se disuelve una cierta cantidad de chitosano (CHT) en ácido acético (HAc) y se filtra a través de un lecho de algodón. La disolución de chitosano conteniendo cierta cantidad de proteína modelo se deja reposar durante 3 horas a 4°C, tras lo cual se adiciona, gota a gota, sobre una disolución de TPP 5% bajo agitación magnética de 800 rpm (agitador IKA-WERK®), utilizando una bomba de infusión a una velocidad de 0,3 ml/min dispuesta con una inclinación de

unos 50°. Una vez añadido el contenido de la jeringa, se mantiene en agitación durante 20 minutos más. En la elaboración de algunos lotes se aplicó una corriente de aire frío en la dirección de goteo. En todos los lotes elaborados (Tabla 1) la relación entre cantidad (mg) de chitosano y el volumen (ml) de TPP 5% se fijó en 1,875. Los gránulos formados se recogen sobre un tamiz, se lavan con 20 ml de agua destilada y se liofilizan.

#### Elaboración del gel

El gel elaborado se compone de una mezcla a partes iguales (w/w) de fosfato tricálcico (TCP) y chitosano al 3% disuelto en la mínima cantidad de ácido acético glacial. La mezcla se homogeniza, se liofiliza y reconstituye en una relación de 75,6 mg liofilizado/ml de agua para su administración in vivo.

#### Marcaje de proteínas y estudios de estabilidad

Para determinar el rendimiento de incorporación y estudiar la cesión in vitro, las proteínas fueron marcadas con <sup>125</sup>I empleando Cloramina-T, según una modificación del método propuesto por Sjödin et al [4].

Las proteínas marcadas fueron almacenadas a -80°C, en tampón fosfato 0,01 M pH 7,5 en el caso de la albúmina, y con la adición de un 20% (v/v) de acetona y 1% de BSA para la calcitonina. La estabilidad del marcaje fue estudiada en las condiciones de almacenamiento, así como durante el proceso de elaboración de los gránulos y el ensayo de cesión in vitro.

#### Caracterización in vitro

- *Rendimiento de incorporación*: En los lotes elaborados con un 2% de albúmina, el rendimiento de incorporación se estimó a partir de la valoración espectrofotométrica de una alícuota del sobrenadante empleando el método de Lowry [3]. En los lotes elaborados incorporando un trazador radiactivo, dicho rendimiento se estimó a partir de la radiactividad incorporada (contador Packard-Autogamma) en los gránulos con respecto al total.

- *Morfología*: Las características morfológicas de los gránulos de chitosano obtenidos se

estudiaron mediante microscopía electrónica de barrido (Jeol JSM-6300).

- *Distribución de tamaños*: Los diámetros mayor y menor de los gránulos se determinaron por observación a microscopio óptico (Olimpus), provisto de un objetivo (10x) con micrómetro.

- *Cesión in vitro*: Los ensayos de cesión se llevan a cabo en tampón fosfato 0,066 M, pH 7,4, isotónico, conteniendo un 0,02% de azida sódica, a 37°C, sin agitación y por triplicado.

#### Ensayos in vivo

Los ensayos in vivo se realizaron en ratas Wistar a las que se les practica una perforación, en la región intercondílea del fémur, con una fresa dental de 1,2 mm adaptada a un motor eléctrico (Minicraft®) que alcanza unas 1200 rpm. Los gránulos de chitosano fueron introducidos en el defecto óseo practicado dispersos en la mínima cantidad de gel.

El porcentaje de proteína cedida se estima midiendo (contador Packard-Autogamma) la radiactividad remanente en el fémur, una vez extraído de la rata.

#### **Resultados y Discusión**

Con el fin de estudiar las diferentes variables que podían influir en la forma, tamaño de los gránulos y cinética de cesión de las proteínas se elaboraron tres lotes de gránulos (A1, A2 y A3) (Tabla 1) conteniendo un 2% BSA

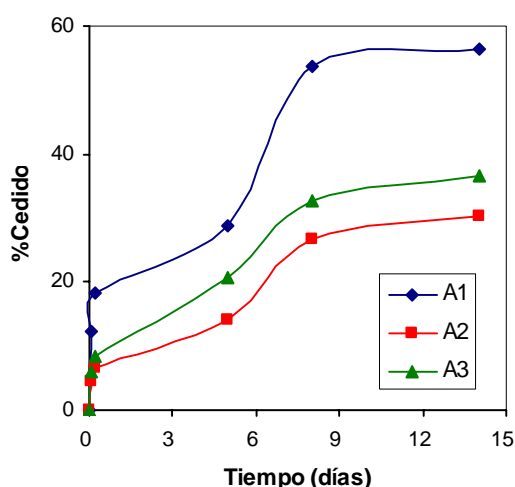
Lote	CHT (%)	HAc (%)	Aire	% Proteína	R.I. (%)
A1	1	1	No	2% BSA	35,6
A2	2	2	No	2% BSA	55,6
A3	3	3	No	2% BSA	93,9
A4	2,5	3	Si	0,02% <sup>125</sup> I-BSA	53,5
A5	2,5	3	Si	0,02% <sup>125</sup> I-BSA+ 0,02 %Ct.	56,0
C1	2,5	3	Si	0,02% <sup>125</sup> I-Ct	20,6
C2	2,5	3	Si	0,02% BSA+ 0,02% <sup>125</sup> I-Ct.	32,6

**Tabla 1.- Lotes de gránulos de chitosano elaborados conteniendo proteína. R.I.: Rendimiento de Incorporación.**

Los gránulos obtenidos presentaron un tamaño en torno a los 2 mm y una forma muy irregular y alargada. En cuanto al rendimiento de incorporación, éste aumenta con la concentración de quitosano.

En cuanto al perfil de cesión, también se observa (Figura 1) que la velocidad de cesión disminuye con el aumento en la concentración de quitosano, probablemente debido a que se obtiene una estructura más compacta de los gránulos.

De acuerdo con estos resultados se fijó la concentración de quitosano en un 2,5% en ácido acético al 3% y se aplicó una corriente de aire en la dirección de goteo (Tabla 1) lográndose así gránulos de menor tamaño y una ligera forma ovalada, presentando unos diámetros medios acumulados del 50% de 950 y 750  $\mu\text{m}$ , para los diámetros mayor y menor, respectivamente.



**Figura 1.-** Perfiles de cesión de los lotes A1(1% CHT, 1% HAC), A2 (2% CHT, 2% HAC), y A3 (3% CHT, 3% HAC)

Los lotes (A4, A5, C1 y C2) fueron elaborados con una carga de proteína mucho más baja, de un 0.02% de BSA o de Ct, según los casos (Tabla 1), y utilizando el correspondiente trazador radiactivo para su posterior valoración. Estas cargas de proteína simulan mejor las dosis que se requerirán de factores de crecimiento.

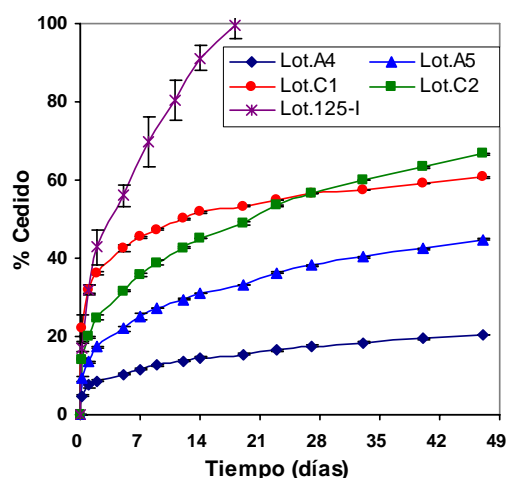
El rendimiento de marcaje de las proteínas modelo con  $^{125}\text{I}$  se situó en torno al 60%, resultando estable en las condiciones de

almacenamiento durante más de 20 semanas en el caso de la BSA, y al menos 4 semanas para la calcitonina. La unión también resultó estable durante el proceso de elaboración de los gránulos, así como en el medio de cesión, durante al menos 4 semanas para la BSA y 9 semanas para la Ct.

Los rendimientos de incorporación obtenidos en la elaboración de estos lotes (contador Packard-Autogamma) fueron menores con la calcitonina que con la albúmina de acuerdo con el mayor peso molecular de ésta última, sin observarse que la encapsulación conjunta de las dos proteínas aumente de forma importante dicho rendimiento (Tabla 1).

Los ensayos de cesión in vitro (Figura 2) muestran que tras una liberación inicial, la cesión de las proteínas desde los lotes A4 y C1 es excesivamente lenta y a partir de 2 semanas no significativa. Ésta circunstancia nos llevó a utilizar mezclas de proteínas con el fin de que la liberación de cada una de ellas influyera en la otra por formación de poros. Tal y como era de esperar, la cesión desde los lotes A5 y C2 es más completa que la mostrada por los lotes conteniendo cada una de las proteínas por separado.

En todos los casos la cesión de calcitonina ha sido más rápida y completa que la de albúmina, de acuerdo con su menor peso molecular.



**Figura 2.-** Perfiles de cesión de los lotes A4 (ALB\*), A5 (ALB\*+Ct), C1 (Ct\*) y C2 (Ct\*+ALB), junto con el perfil de cesión del trazador  $^{125}\text{I}$  encapsulado en forma de INA.

También se elaboró un lote conteniendo sólo  $^{125}\text{I}$ Na para comprobar el grado de interacción del trazador radiactivo con el polímero y asegurar que la lenta cesión observada era debida a la proteína y no a la interacción del trazador libre con el polímero. El rendimiento de incorporación fue muy bajo, de tan sólo el 6% y, como se puede observar (Figura 2), el perfil de cesión desde este lote es mucho más acusado que desde cualquiera de los que contienen proteína, lo que nos indica que las cesiones observadas en el resto de los lotes corresponden al trazador unido a proteína.

La reproducibilidad del método de elaboración fue comprobada con la formulación A4, de la cual se elaboraron un total de cuatro replicados, realizándose el ensayo de cesión desde cada uno de ellos por triplicado. El rendimiento de incorporación resultó ser del  $53,1 \pm 4,76\%$ . La comparación de los perfiles de cesión se realizó empleando el factor de similitud  $f_2$  [5]. Tanto en la comparación intralote como interlote el valor de  $f_2$  fue superior a 50, lo que indica que los perfiles de cesión difieren en menos de un 10%, por lo que podemos considerarlos similares y por tanto el método de elaboración reproducible.

Finalmente se realizó un ensayo in vivo administrando gránulos del lote C1 en un defecto óseo practicado en el fémur de ratas Wistar. Este ensayo nos permitió fijar la dosis máxima de gránulos a administrar en aproximadamente 5 mg dispersos en la mínima cantidad de gel (pH 6,2)

Al cabo de dos semanas de su administración se midió la radiactividad remanente en el fémur de las ratas. Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de calcitonina cedido in vivo al cabo de este tiempo (51%), es muy similar al que se obtuvo in vitro, lo que nos hace pensar que se pudiera establecer una correlación entre ambos perfiles.

## Bibliografía

[1] Sánchez M., Azofra J., Anitua E., Andía I., Padilla S., Mujika I., "Enhanced Acholes tendon healing whit autologous plasma rich in growth factors" Int. J. Sports Med., 35 (2003) 1648-1652.

[2] Fuerst G., Gruber R., Tangl S., Sanroman F., Watzek G., " Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs". Clin. Oral Implants Res., 15 (2004), 301-307

[3] Lowry O.H., Rosebroug N.J., Farr, A.L. y Randall R.J., "Protein measurements with the Folin-Phenol reagent" J. Biol. Chem., 193, (1951) 265-275.

[4] Sjödin L., Nederman T., Prahl M. And Montelius K. "Radioreceptor assay for formulations of salmon calcitonin" International Journal of Pharmaceutics, 63, (1990),135-142.

[5] Moore JW., Flanner HH. "Mathematical comparison of dissolution profiles". Pharm. Tech., 20, (1996), 64-74.

## Agradecimientos

Este trabajo está financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF-2002-03686). El primero de los autores de esta comunicación es becario FPU del Ministerio de Educación y Ciencia (AP2002-2946).

## Autor de contacto

Juan José Delgado Perera

e-mail; [juanjodp@hotmail.com](mailto:juanjodp@hotmail.com)

Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de la Laguna.

Avda. Astrofísico Francisco Sánchez s/n  
38200 La Laguna. Tenerife. España.

Tel: 922318507

Fax: 922318506