

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

**“SÍNTESIS DE UN HIDROGEL DE QUITOSÁN PARA LIBERACIÓN
DE L-ARGININA “**

**TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN
ORTODONCIA**

PRESENTA:

**MARÍA JOSÉ MEDINA PÉREZ
MATRÍCULA: 218450017**

DIRECTOR DE TESIS:

**D.C. MIGUEL ÁNGEL CASILLAS SANTANA
ID. 100526485**

ASESOR DISCIPLINARIO:

**M.O. FARID ALFONSO DIPP VELÁZQUEZ
ID. 100408155**

ASESOR METODOLÓGICO:

**D.C. BRENDA ERENDIDA CASTILLO SILVA
ID. NSS526469**

ASESOR EXTERNO:

JUAN FERNANDO ARISTIZABAL

LECTOR DE TESIS:

DR. MARCO FELIPE SALAS OROZCO

PUEBLA, PUE. JUNIO 2020



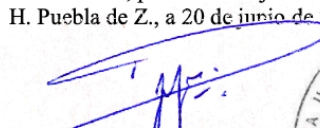
Oficio No. FESIEP/129/2020

C. María José Medina Pérez
Matrícula: 218450017
Alumno de la Maestría en Estomatología
Con opción Terminal en Ortodoncia
De la Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
P R E S E N T E.

*El que suscribe, **MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez**, Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio me permito informar a usted que esta Secretaría **aprueba la impresión de la Tesis titulada “Síntesis de un hidrogel de quitosán para liberación de l-arginina”**, misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de **Maestro en Estomatología con Opción Terminal en Ortodoncia**.*

Sin más por el momento, deseándole lo mejor, le reitero mi distinguida consideración.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 20 de junio de 2020.


MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



Facultad de Estomatología | 31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESINA RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: **Maestro(a) en Estomatología con opción terminal en Ortodoncia**
Registro CIFE: 2019116 Fecha: 20 - junio - 2020

Título de la Tesis: "Síntesis de un hidrogel de quitosán para liberación de L-arginina"

Nombre del alumno: MARÍA JOSÉ MEDINA PÉREZ Matrícula: 218450017

Domicilio: AV. 17 PTE #1306 INT.12, BARRIO DE SANTIAGO C.P. 724130 PUEBLA, PUEBLA.

Tel: (644) 150-3114 **Fecha de ingreso a la Facultad:** Enero 2018

Firma: 

Director de tesis: D.C. Miguel Ángel Casillas Santana Grado académico: **Doctor en Ciencias**

Odontológicas Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: **100526485** TEL: **(444) 846 7645**

Firma: 

Director disciplinario: M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez Grado académico: **Maestría en Ortodoncia**

Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: **100408155** Tel: **(222) 161 4778**

Firma: 

Director metodológico: D.C. Brenda Erendida Castillo Silva Grado académico: **Doctorado en Ciencias**

Odontológicas Adscripción: **Facultad de Estomatología** ID: **NSS526469** Tel: **(444) 242 6077**

Firma: 

Asesor Externo: Mtro. Juan Fernando Aristizabal Grado académico: **Maestro en Ciencias Odontológicas**

Adscripción: **Universidad de Valle Cali, Colombia** Tel: **(317) 423-0002**

Firma: 

Lector: Mtro. Marco Felipe Salas Orozco Grado académico: **Maestro en Ciencias Biomédicas Básicas**

Adscripción: **Especialidad de Ortodoncia Facultad de Estomatología UASLP** Tel: **(481)111-1397**

Firma: 

Nombre y firma de aprobación del responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia

M.O. Laura Mónica López Pérez Franco

Firma: 

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología, autoriza la impresión de la Tesis.


M.O. Farid Alfonso Dipp Velázquez



Fecha: 20 - junio - 2020

Sello _____

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	8
INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES.....	10
1.1 HIDROGEL.....	10
1.2 FABRICACIÓN DE HIDROGELES.....	10
1.3 QUITOSÁN.....	11
1.4 ÓXIDO NÍTRICO	13
1.5 L-ARGININA	15
1.6 MOVIMIENTO DENTAL.....	16
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	20
3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
3.3 JUSTIFICACIÓN	21
3.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	22
3.4.1 Objetivo general.....	22
3.4.2 Objetivos específicos.....	22
3.5 HIPÓTESIS	22
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODO	23
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	23
4.2 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL.....	23
4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	23
4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN	23
4.4.1 INCLUSIÓN	23
4.4.2 EXCLUSIÓN	23
4.4.3 ELIMINACIÓN	23
4.5 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN	24
4.6 RECURSOS	24
4.6.1 HUMANOS	24
4.6.2 MATERIALES	25
4.7 METODOLOGÍA	26
4.7.1 SÍNTESIS HIDROGEL	26
4.7.2 HIDROGEL QUITOSÁN + L-ARGININA 30%	26
4.7.3 HIDROGEL QUITOSÁN + L-ARGININA 40%	26
4.7.2 LIBERACIÓN	27
4.7.3 HINCHAMIENTO.....	31

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
5.1 RESULTADOS.....	33
5.1.1 LIBERACIÓN	33
5.1.2 HINCHAMIENTO	34
5.2 DISCUSIÓN.....	35
5.3 CONCLUSIONES.....	36
5.4 REFERENCIAS.....	37

GLOSARIO

SÍMBOLOS MATEMÁTICOS	UNIDADES
μl	Microlitros
° C	Grados centígrados
%	Porcentaje
g	Gramos
Nm	Nanómetros
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mg	Miligramos
min	Minutos
hrs	Horas

SÍMBOLOS (ABREVIATURAS)	DESIGNACIÓN
RAP	Fenómeno de Aceleración Regional
RPM	Revoluciones por minuto
NO	Óxido Nítrico
OTM	Movimiento dental ortodóncico
PDL	Ligamento Periodontal
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducida
IL-1	Interlucina 1
TNF	Factor de necrosis tumoral
IFN-γ	Interferon gamma
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
IL-8	Interlucina 8
IL-10	Interlucina 10
NLA	Nitro-L-arginina
NOS	Sintasas del óxido nítrico
GTP	Guano- sintrifosfato
GMPc	Guanosinmonofosfato cíclico
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
cNOS	Sintasas de óxido nítrico constitutivas

AGRADECIMIENTOS

Dedico este trabajo de investigación a los dos grandes motores de vida MIS PADRES, quienes han depositado su confianza, orgullo y esfuerzo en mí. Su amor, dedicación y pasión son los que me impulsan a seguir adelante, este logro es de ustedes.

Este proyecto no hubiera sido posible sin la ayuda de personas tan increíbles que tuve la oportunidad de conocer a través de estos 3 años, que me compartieron de su tiempo y una parte de sus conocimientos en el área. Gracias a la Dra Diana, Dr Jerezano, Dr Dionisio, Mtro Eric, mis profesores de maestría, a mis asesores Dr Farid, Dra Brenda, Dr Juan Fernando Aristizabal y en especial a mi director de tesis el Dr Miguel quien fue mi mano derecha a lo largo de este trabajo y quien me introdujo al maravilloso mundo de los hidrogeles.

Agradezco también a mi nueva familia, mis hermanitos PAULINA, YARELI, ISELA y JAVIER que sin duda alguna lograron que esta experiencia fuera de lo más inolvidable.

Ç

INTRODUCCIÓN

Reducir el tiempo del tratamiento ortodóncico es una de las metas de todo ortodoncista y una de las principales peticiones de los pacientes al iniciar su tratamiento. En la actualidad han surgido técnicas, creado diseños innovadores de brackets e incluso descrito distintos métodos para acelerar el movimiento dental en ortodoncia con excelentes resultados, entre los cuales se incluyen métodos quirúrgicos, el uso de estimulación mecánica o física, así como también el uso de biomoduladores entre los cuales podemos encontrar el uso de L-arginina como precursor de óxido nítrico.

Diversos estudios realizados en modelos murinos, han demostrado que el óxido nítrico juega un papel importante en la fisiología humana incluyendo el remodelado óseo, por lo que se ha implementado su uso en estudios de modelos murinos para aceleración del movimiento dental en ortodoncia obteniendo resultados favorables, sin embargo, la vía de administración aplicada en dichos estudios ha sido por medio de inyecciones en el área a tratar, en los cuáles es necesario repetir el procedimiento cada 24 horas por lo que un sistema de liberación prolongada como lo son los hidrogeles, pudiera llegar a facilitar su aplicación reduciendo dicho procedimiento.

Los hidrogeles son un biomaterial con una alta biocompatibilidad debido a sus diversas propiedades similares a las de los tejidos biológicos, se han utilizado por años y hoy en día siguen siendo de alto impacto en el área de investigación, ya que se han logrado grandes avances en cuanto a sus aplicaciones y formulaciones, dentro de las cuales los hidrogeles a base de quitosán han demostrado tener distintas propiedades favorables para su uso en liberación prolongada de fármacos

Es por eso que se plantea como propósito sintetizar y caracterizar un hidrogel de quitosán como sistema de liberación prolongada de L-arginina para su posterior uso en ortodoncia acelerada.

PALABRAS CLAVE

L-arginine, Nitric Oxide, Drug Delivery System, Chitosan, Hydrogel.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1.1 HIDROGEL

En 1894 la palabra “hidrogel” se publicó por primera vez, el material descrito en el artículo era diferente al conocido actualmente, constaba de un gel a base de sales inorgánicas con excelentes propiedades de absorción y fue utilizado durante años en distintas áreas (1).

Fue en 1960 gracias al trabajo descrito por Wichterle y Lim, cuando se publica el primer material en red de metacrilato de hidroxietilo, en el cuál se buscaba una estructura que permitiera el contenido de agua deseable y permeabilidad de metabolitos para su posterior uso en contacto directo con tejidos vivos. Este presentaba excelentes propiedades hidrofílicas y un gran potencial de biocompatibilidad por lo que durante años ha sido de gran interés en el área biomédica (2).

Los hidrogeles son materiales de alto contenido de agua, pero sin disolverse debido a sus uniones físicas y químicas formadas por cadenas de polímeros hidrofílicos. El agua penetra estas uniones causando absorción desde 10-20% hasta miles de veces su peso seco en agua y dando forma al hidrogel, aun presentando una alta afinidad por los medios acuosos, los hidrogeles exhiben sólo hinchamiento y no se disuelven en estos medios como consecuencia de los entrecruzamientos presentes en la estructura del hidrogel. Tienen una consistencia suave, elástica, de baja tensión superficial con el agua y fluidos biológicos; debido a estas características se ha encontrado que existe nula irritación en los tejidos adyacentes después de ser implantados (3) (4) (5) (6) (7) (8).

Por su gran valor dentro de la biomedicina, los hidrogeles se han explorado para la regeneración tisular por más de 35 años en aplicaciones como: encapsulación tisular, reparación de cartílagos, rellenos después de cirugía, así como también en matrices de liberación de drogas (Drug Delivery Systems DDSs), ya que son capaces de proporcionar suministro local sostenido debido a sus características aditivas (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15).

1.2 FABRICACIÓN DE HIDROGELES

Existe una gran variedad de posibles composiciones para fabricar hidrogeles, como se muestra en la Tabla 1, los cuales pueden ser a base de polímeros sintéticos, naturales o híbridos (16), por lo cual para fabricar el hidrogel ideal se ha enfocado en estudiar la biocompatibilidad del material, costo de fabricación, toxicidad y la capacidad de liberación del fármaco, así como también valorar factores que puedan llevar a una pobre actividad como lo es una baja biodisponibilidad, velocidad de liberación y la medida en la que el fármaco llega al sitio objetivo y la respuesta de los receptores en el tejido diana a la droga (17) (18) (19) (20).

Tabla 1: Clasificación de hidrogeles según su composición.

POLÍMEROS SINTÉTICOS	Alcohol de polivinilo, poliacrilamida, glicol polietileno
POLÍMEROS NATURALES	Quitósán, fibrina, colágeno, alginato, ácido hialurónico, celulosa
HÍBRIDOS	P(PEG-co-peptidos), alginato-g-(PEO-PPO-PEO), P(PLGA-co-serina), colagena-acrilato, alginato-acrilato, P(HPMA-g-peptido), P(HEMA/Matrigel), HA-g-NIPAAm

1.3 QUITOSÁN

La quitina, precursor del quitosán, es un polímero natural que después de la celulosa es el segundo polisacárido en abundancia. La principal fuente de este biomaterial son los polímeros de animales o vegetales tales como hongos, exoesqueleto de insectos y/o crustáceos (Tabla 2), de los cuales a través de un proceso de N-desacetilación, en donde la quitina (poli (β -N-acetil-glucosamina)) elimina un 50% de sus grupos acetilo, se obtiene quitosán (poli(β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)) figura 1. De igual forma es posible encontrarlo de manera natural en paredes celulares de algunas plantas y hongos, sin embargo, la fuente más importante de quitosán, a nivel industrial, lo constituye la quitina (21) (22) (23) (24) (25) (26).

La disponibilidad de la quitina en forma de quitosán ha permitido utilizarlo en distintas aplicaciones biológicas, ambientales e industriales, ha generado gran interés en el área médica, farmacéutica y se aplica en lentes de contacto, suturas, parches de curación y cómo entrega controlada de medicamentos (27) (28) (29).

Tabla 2: Obtención de quitina en organismos.

ORGANISMO		CONTENIDO DE QUITINA%
Insectos	Moscas	51.2
	Mariposa de azufre	66.3
Hongos	<i>Aspergillus niger</i>	40.0
	<i>Mucorrouxii</i>	42.8
Crustáceos	Camarón	67.7
	Cangrejo	70.6
	Langosta	67.6

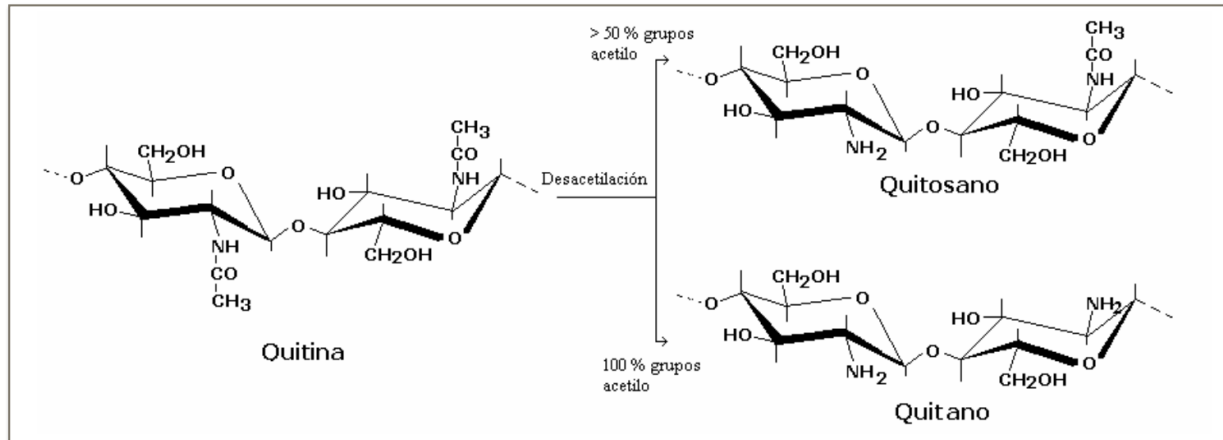
El quitosán se identificó por primera vez en los hongos en 1811 por el francés Henri Braconnot y desde entonces se ha sido sujeto de investigación en el área biomédica debido a que cuenta con una gran variedad de propiedades:

- Biocompatible
- Biodegradable (degradado por algunas enzimas del cuerpo humano)
- Efectos bacteriostáticos
- Puede ser esterilizable
- pH neutro
- Propiedades mucoaditivas
- Nula toxicidad
- Estable

Dichas propiedades convierten a este polímero en un candidato ideal para utilizar como sistema de liberación controlado de fármacos, los cuales ofrecen liberación localizada de agentes terapéuticos. Debido a la diversidad del tamaño de las moléculas liberadas y su estructura química, la liberación controlada en cualquier hidrogel puede variar su aplicación. El método en el cual los fármacos son cargados crea un impacto en su disponibilidad de liberación, entre lo cuáles encontramos: (30) (31)

- Adición directa de fármacos a hidrogeles.
- Incorporación de sistemas de liberación separados en el hidrogel.
- Fijación covalente al polímero formador de hidrogel.

Figura 1: Obtención de quitosano y quitano por desacetilación de quitina.



1.4 ÓXIDO NÍTRICO

En 1980 Furchgott y Zawadzki (32) denominaron al Óxido Nítrico (NO) factor relajante derivado del endotelio y se demostró su importancia cardiovascular ya que es el principal responsable de mantener un estado de vasodilatación regulada (33), el cual además de causar relajación en las células del músculo liso arterial y venoso inhibe su proliferación (34) (35) (36).

Palmer y cols. en 1987 descubrieron que el NO es sintetizado en el cuerpo humano por células vasculares del endotelio, el cual en la actualidad se conoce que es una de las moléculas más versátiles que producen las células mamíferas.

El NO es un gas incoloro de vida corta (menos de 6 milisegundos) en solución acuosa por lo que al estar en condiciones aerobias este se oxida a nitrito y nitrato. Tiene una estructura de Lewis que se muestra en la figura 2, es un segundo mensajero químico el cual tiene acciones intracelulares como intercelulares, activa la enzima guanil ciclasa y modula acciones de varios péptidos bioactivos así como transmisores neuronales.



Figura 2: Estructura de Lewis del NO. Centelles J, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico: un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. En: OFFARM, editor. Ámbito farmacéutico Bioquímica. OFFARM; 2004 p. 96- 102

El NO regula una gran cantidad de funciones fisiológicas y celulares importantes como:

- Vasodilatación
- Homeostasis cardiovascular
- Neurotransmisión
- Efecto antiagregante plaquetario
- Evita la adhesión leucocitaria local.
- Regula la remodelación ósea.

Las amplias acciones del NO están determinadas en gran medida por el sitio y la tasa de síntesis de NO, la cantidad generada y la naturaleza del entorno en el que se libera (37) (38) (39) (40) (41)

El NO puede formarse por distintas vías, estas se dividen en dos categorías: constitutiva e inducida. Dentro de la expresión constitutiva se encuentran las isoformas endotelial (eNOS) y neuronal (nNOS), las cuales producen NO en menor cantidad en sus tejidos de origen en respuesta a los cambios de concentraciones de calcio intracelular (dependientes de calcio), se encuentran en el tejido nervioso y en células vasculares del endotelio. La isoforma inducida (iNOS) por el contrario es independiente de calcio y una vez inducida produce grandes cantidades de NO. Puede expresarse por una gran cantidad de células cuando se exponen a citocinas inflamatorias como lo es la interleucina 1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF), interferon gamma (IFN- γ) o endotoxinas y tiene un potente efecto en la reabsorción ósea (42).

Las 3 isoformas que presenta el NO se han identificado en el hueso y su interés radica en las distintas acciones que ejercen sobre el tejido óseo. El NO derivado de la isoforma eNOS es esencial para la función normal de los osteoblastos y también media los efectos anabólicos de los estrógenos sobre el tejido óseo. La iNOS media los efectos proinflamatorios de las citocinas sobre el hueso mientras que la nNOS se encuentra presente en tejidos óseos, pero en niveles bajos (43).

Se ha demostrado que el NO se encuentra en condiciones basales en el hueso y que tiene un efecto bifásico en la reabsorción ósea dependiendo de sus concentraciones. Niveles bajos de NO median la acción de citocinas como IL-1 y TNF α potenciando la resorción ósea. En niveles altos de NO inhiben la resorción ósea por inducción de apoptosis de progenitores de osteoclastos. Por el contrario, los resultados de otros trabajos sugieren que son los altos niveles de producción de NO los que causan la resorción ósea, ya que activan procesos inflamatorios, mientras que niveles bajos de NO inhiben la resorción ósea y/o activan la formación de hueso mientras se les ejerzan fuerzas controladas, por lo que a concentraciones altas tienen un efecto catabólico en lugar de anabólico como normalmente pasaría en huesos largos. La producción de NO ya sea por donadores o por estimulación de citocinas se asocia a la acumulación intracelular de cGMP (44).

1.5 L-ARGININA

Fue en 1895 cuando por primera vez se descubrió que la arginina era un componente de la proteína animal, poco tiempo después, en 1924, se descubrió que era un aminoácido importante en la proteína del esperma de los peces, pero fue hasta el año 1930 cuando se dedujo su síntesis por mamíferos (45) (46).

Debido a estos grandes descubrimientos, el estudio de la arginina tomo auge en el área nutricional obteniendo como resultado a finales de los años 70's que es un aminoácido dispensable pero no esencial para adultos humanos mayores, pero un aminoácido esencial para mamíferos jóvenes y en crecimiento (47) (48) (49).

La L-Arginina es un aminoácido sintetizado a partir de glutamina, glutamato y prolina a través del eje intestinal-renal en humanos y en la mayoría de los otros mamíferos incluidos los cerdos, ovejas y ratas. Diversos estudios en humanos y animales, han comprobado que el uso de L-arginina tiene efectos en la fisiología humana, demostrando ser efectivo en tratamientos de obesidad disminuyendo el índice de masa corporal, mejora las respuestas cardiovasculares, así como el perfil metabólico (50).

La importancia de este aminoácido semi - esencial radica en que funciona como precursor de la síntesis de NO. El proceso consiste en una oxidación-reducción del átomo de nitrógeno del grupo guanidino de la arginina se oxida de -3 a +2, el oxígeno pasa de 0 a -2, se requiere la participación del dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADPH), que funciona como un segundo agente reductor. La reacción transcurre en 2 etapas con formación del intermediario N^ω-hidroxi- L-arginina (figura 3).

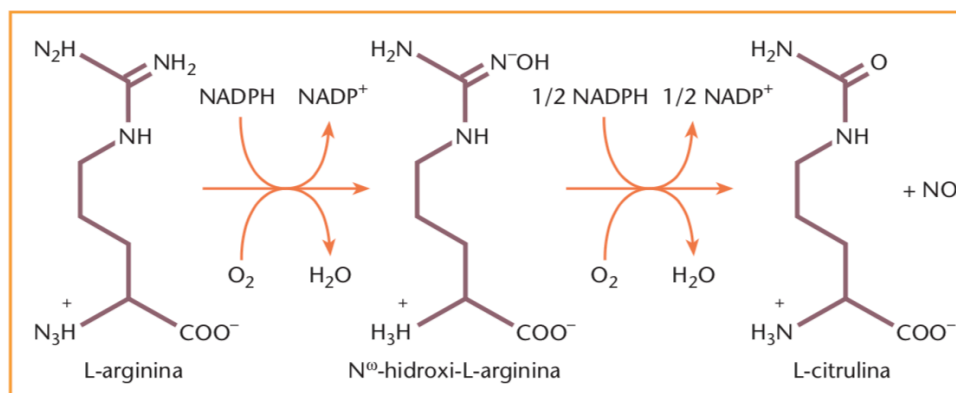


Figura 3: Producción de ON y citrulina a partir de L-arginina. Centelles J, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico: un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. En: OFFARM, editor. Ámbito farmacéutico Bioquímica. OFFARM; 2004 p. 96- 102

Las enzimas que catalizan este proceso se denominan NOS (cualquiera de sus 3 isoformas) las cuales catalizan 5 electrones del grupo guanidina de la L-arginina a L-citrulina, produciendo así NO el cual se difunde a través del endotelio y principalmente se une al grupo Hemo de la guanilato ciclasa, favoreciendo la conversión de guanosintrifosfato (GTP) a guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) que finalmente favorece la relajación vascular y mejora la función endotelial (51) (52) (53).

1.6 MOVIMIENTO DENTAL

El movimiento dental se obtiene por el remodelamiento del ligamento periodontal (PDL) y las respuestas del hueso alveolar a las fuerzas mecánicas (54).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En la actualidad, acelerar el movimiento dental en tratamientos de ortodoncia, es una necesidad tanto para los pacientes como para los especialistas en el área, ya que al reducir la duración del tratamiento se puede disminuir el riesgo de enfermedades orales asociadas al uso prolongado de aparatología como lo es la inflamación gingival, reabsorción radicular, caries dental y descalcificación de esmalte. Han surgido protocolos y diseños innovadores de brackets, sin embargo, se ha encontrado que si se busca acelerar el movimiento dental es necesaria la estimulación del ligamento periodontal o iniciar una cascada de inflamación para ocasionar un incremento de osteoclastogénesis por medio del Fenómeno de Aceleración Regional (RAP). Existen métodos que han comprobado reducir la duración del tratamiento satisfactoriamente, estos se pueden dividir en métodos quirúrgicos (corticotomías), estimulación física/mecánica (láser terapéutico, vibraciones) y el uso de biomoduladores entre los cuales se encuentra el uso L-arginina como precursor de NO (55).

Hayashi et al, examinaron el rol del NO en el movimiento ortodóncico utilizando inhibidores específicos de NOS en un estudio de boca dividida aplicado en 22 modelos murinos. Ambos primeros molares superiores se movieron hacia bucal con un resorte de expansión previamente estandarizado con una fuerza inicial de 165 millinewtons. Las soluciones utilizadas fueron: N-nitro-L-arginine metil éster HCl (L-NAME) como inhibidor general de NOS a concentraciones de 1 mg/mL y 10 mg/mL, y N -(1-iminoetil)-L- lisina 2HCl (L-NIL) un inhibidor selectivo de iNOS a concentraciones de 1 mg/mL y 5 mg/mL. Se infiltraron 50 µl en la zona subperióstica adyacente al primer molar superior izquierdo cada tercer día durante 21 días, el lado derecho funcionó como control aplicando inyecciones de solución salina. Los resultados obtenidos demuestran que la aplicación local de L-NAME como inhibidor de NOS produce una reducción significativa del movimiento dental ortodóncico (OTM), mientras que en los grupos L-NIL no se mostró ningún cambio, comprobando por primera vez que el NO es un mediador importante en la respuesta periodontal hacia las fuerzas ortodóncicas y que son producidas mediante la actividad de cNOS (56).

Ford y colaboradores, decidieron medir los niveles de NO del líquido crevicular en humanos después de aplicar fuerzas ortodóncicas. Se seleccionaron 13 pacientes masculinos con un rango de edad de 11 a 18 años los cuales requirieran tratamiento ortodóncico sin realizar extracciones. Se recolectaron muestras del líquido crevicular gingival antes de colocar aparatología fija, 1 hr después de aplicar fuerza y 3-4 días después. Las muestras fueron tomadas de labial y lingual de incisivos centrales superiores, primeros y segundos molares superiores. Los segundos molares superiores no se incluyeron en el arco ya que funcionaron como control. Las muestras fueron tomadas con Periopaper y se dejaron en el surco gingival durante 60 segundos, inmediatamente después fueron congeladas con nitrógeno líquido. Debido a que el NO es un gas con vida corta muy difícil de medir, se tomaron en cuenta los niveles de nitrito, el cual es un producto del NO no volátil. Se obtuvieron como resultados que en los sitios de presión a 1 hr de aplicación de fuerzas los niveles de NO aumentaron, por el contrario, en los lados de tensión los niveles de NO aumentaron hasta el día 3-4, por lo que se

puede interpretar que el aumento tardío de NO en el lado de tensión está asociado con el rol del NO en disminuir la reabsorción al disminuir la actividad y formación osteoclástica. Por lo que se puede concluir que el NO juega un rol importante en etapas tempranas del OTM y que se encuentra en el líquido crevicular de pacientes sanos (57).

En 2002 Shirazi et al, evaluaron de igual manera el rol del NO utilizando 48 modelos murinos divididos al azar en 4 grupos L-arginina, L-NAME como inhibidor de NOS, salino y grupo control. Se les colocó coil cerrado de 5 mm níquel-titanio ligado entre el incisivo maxilar derecho y el primer molar aplicando una fuerza inicial de 60 g. Todas las inyecciones se realizaron en la mucosa del primer molar derecho cada 48 hrs desde el primer día hasta el día 13 de aplicación de fuerza. Desde el tercer día hasta el final del experimento el grupo que recibió L-arginina mostró un aumento significativo de movimiento dental, mientras que el grupo L-NAME mostró disminución significativa comparado con los otros dos grupos. Estudios histopatológicos revelaron un gran número de osteoclastos en el grupo L-arginina, mientras que en L-NAME el número de osteoclastos fue significativamente menor en comparación con los grupos salino y control (58).

Akın, Gurton, y Ölmez, investigaron como la actividad osteoclástica se ve afectada por la liberación de NO en el OTM en 54 modelos murinos. Se realizaron perforaciones en los incisivos maxilares y se colocó un alambre de acero inoxidable-con doblez aplicando una fuerza de 20 gramos. Se utilizó L-NAME como inhibidor de NOS y nitro-L-arginina (NLA) como precursor de NOS a distintas concentraciones, se administraron inyecciones de 20 μ l en el área subperióstica adyacente al incisivo maxilar derecho e izquierdo cada 12 hrs durante 5 días. En los grupos NLA se mostró osteoclastos multinucleados, lagunas de Howship, vascularización capilar y nuevamente un aumento significativo de OTM comparado con L-NAME y los grupos controles (59).

Jerônimo et al, evaluaron la contribución de L-arginina administrada oral y tópica en procesos de curación de heridas. Se administró a ratones después del procedimiento de laparotomía, las heridas fueron analizadas para evaluar el tejido de granulación incluidas la producción de citocinas e iNOS, se utilizaron modelos murinos sanos, inmunosuprimidos y diabéticos, todos los grupos fueron tratados a distintas concentraciones de L-arginina por vía tópica. En la vía tópica se utilizaron concentraciones del 5%, 10%, 15% y 40% en el grupo de modelos murinos sanos, en ratas diabéticas se utilizaron concentraciones del 10% y 15%, los animales inmunosuprimidos fueron tratados con L-arginina al 10% y 15%. Las aplicaciones fueron tópicas durante 7 días. Los resultados obtenidos demuestran mejoría en su recuperación al quinto día, los mejores resultados se obtuvieron en las concentraciones del 10 y 15%. El grupo tratado con L-arginina al 40% se observó un intenso proceso de inflamación con un aumento de depósito de colágeno y células polimorfonucleares. La expresión de iNOS y TGF- β en los grupos a los que se les aplicó concentraciones de 15% y 40% mostraron niveles de iNOS mayores en comparación con el grupo control, todos los grupos mostraron aumento de TGF- β siendo el grupo del 10% con un aumento mayor. La expresión de proteínas involucradas en el proceso inflamatorio como lo son TNF- α , IL-8,

IL-10 y CCR-1 mostraron un aumento en el grupo tratado con concentraciones al 40%. Por lo que se sugiere que el uso de L-arginina tópica es un importante factor en la recuperación de tejidos acelerando este proceso, dicho proceso de recuperación requiere la interacción de diversas citocinas como lo son las TNF- α , IL-8, IL-10, CCR-1 entre otras involucradas en el proceso de inflamación. En el remodelado ósea por medio de la aplicación de fuerzas ortodoncias muestran un proceso inflamatorio en el que participan las mismas citocinas, por lo que se puede interpretar que las altas concentraciones de L-arginina aplicadas de manera tópica, pudieran acelerar el proceso de OTM (60).

Con base en investigaciones previas se puede sugerir que el NO es un mediador importante en el OTM y las inyecciones del aminoácido L-arginina como precursor de NO aumenta la producción de este gas provocando un mayor número de osteoclastos en dientes sometidos a fuerzas ortodóncicas y así un mayor movimiento dental. Sin embargo, al aplicar este tipo de terapias por medio de inyecciones en pacientes, puede causar cierto temor al ser un tratamiento mínimamente invasivo y la necesidad de realizar constantes visitas al consultorio dental las cuales pueden ser un poco inconvenientes, por lo que un método de liberación prolongada no invasiva sería una opción favorable para el paciente como para el ortodoncista.

La liberación prolongada de drogas se ha aplicado clínicamente con éxito desde inicios de los años 60's gracias a las aportaciones de Vincent Gott y James Whiffen, quienes probaron clínicamente la liberación sostenida de heparina, utilizado como anticoagulante, mediante superficies de polímeros (61) (62). Entre ellos encontramos a los hidrogeles a base de quitosán, los cuales son polímeros naturales que cuenta con distintas propiedades como biocompatibilidad, nula toxicidad, biodegradables y que además poseen propiedades mucoaditivas y antimicrobianas por las cuáles ha llamado la atención a distintas áreas incluyendo la dental (63).

CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento de ortodoncia es uno de los más extensos en el área dental, estos tienden a tener una duración que oscila entre los 12 a los 48 meses, lo cual representa una gran preocupación por parte de los pacientes y ortodoncistas, ya que extender la duración del tratamiento puede traer consigo ciertas complicaciones que pudieran repercutir en la salud oral del paciente como lo son: reabsorción radicular, mayor predisposición a caries dental, recesión gingival, descalcificación del esmalte e inflamación gingival.

La L-arginina es un aminoácido semiesencial presente en el cuerpo humano el cuál tiene distintas funciones en el organismo humano dentro de las cuales sobresale su participación en el remodelado óseo. Este se encuentra en condiciones basales demostrando tener un efecto bifásico al aplicar fuerzas mecánicas controladas, a mayor concentración de NO existe una mayor reabsorción ósea debido a una alta actividad osteoclástica, a bajas concentraciones se muestra una mayor actividad de osteoblastos. La L-arginina ha probado ser un aminoácido prometedor en estudios animales, pero hace falta evidencia clínica en el área de ortodoncia.

Sin embargo, la metodología existente para lograrlo no tiene resultados contundentes e involucra una aplicación invasiva por medio de infiltraciones locales provocando temor e incomodidad al paciente, además de constantes citas ya que se requiere una aplicación cada 24 hrs para lograr efectos favorables.

Los hidrogeles a base de quitosán presentan distintas propiedades los cuales lo convierten en un excelente material como método controlado de liberación de fármacos y han sido de gran interés en distintas áreas de la biomédica incluyendo la dental, por lo que se sugiere que al utilizar este polímero como andamio de L-arginina pudiera llegar a simplificar en gran medida su futura aplicación en tratamientos de ortodoncia para disminuir su duración.

Debido a esto surge la siguiente pregunta:

3.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La síntesis del hidrogel de quitosán permitirá la liberación de L-arginina?

3.3 JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, las investigaciones para acelerar el movimiento dental y reducir así el tiempo en el tratamiento dental han tomado auge, surgiendo innovadores diseños de brackets junto con protocolos de tratamiento. Sin embargo, la única forma efectiva de reducir la duración del tratamiento es estimular la respuesta biológica de los tejidos adyacentes, lo que involucra procedimientos quirúrgicos invasivos como lo son las corticotomías y la piezo-insición, provocando incomodidades al paciente debido a que se requiere un tiempo de recuperación además de ser doloroso. Investigaciones previas han evaluado la opinión de los pacientes respecto a los métodos actuales para la aceleración del tratamiento ortodóncico y tanto los pacientes, padres de familia y ortodoncista prefieren procedimientos menos invasivos, entre los cuales podemos encontrar métodos de estimulación física/mecánica y el uso de biomoduladores.

El uso de biomoduladores ha sido extensamente estudiado mostrando resultados favorables utilizando vitamina D, prostaglandinas, bifosfonatos y L-arginina.

La L-arginina funciona como precursor del NO, el cuál se ha identificado como uno de los principales componentes en el remodelado óseo. Diversos estudios en modelos murinos, han reportado resultados favorables en el uso de L-arginina por medio de infiltraciones a nivel de surco gingival con el fin de aumentar los niveles de NO en el ligamento periodontal y así promover el movimiento dental cuando es sometido a fuerzas ortodóncicas, dichas infiltraciones es necesario aplicarlas cada 24 hrs para que produzcan el efecto deseado. Sin embargo, el infiltrar consecutivamente tiende a ser una tarea complicada y dolorosa para el paciente, por lo que un sistema de liberación prolongada de fármacos podría simplificar y optimizar su aplicación. La L-arginina y el quitosán, son materiales biocompatibles por lo cual aplicarlos en humanos no repercute en su salud, sin embargo, en este estudio no se busca ese objetivo aún.

En el área dental se han utilizado hidrogeles como andamios cargados de distintos fármacos, entre ellos encontramos a los geles de quitosán. Dichos hidrogeles presentan diversas propiedades que los convierten en el andamio ideal. Al utilizar dichos andamios como liberación controlada de fármacos, pudiera ayudar a disminuir la cantidad de aplicaciones del fármaco deseado (en este caso L-arginina como precursor de NO) sin provocar dolor al paciente, favoreciendo el movimiento dental por el aumento de NO y así mismo la actividad osteoclástica, aumentando el movimiento dental cuando se utilizan fuerzas ortodóncicas y reduciendo la duración del tratamiento y sus posibles complicaciones.

3.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

3.4.1 Objetivo general

Sintetizar un hidrogel de quitosán para liberación de L-arginina.

3.4.2 Objetivos específicos

- Realizar una curva de calibración para la liberación de L- arginina.
- Determinar liberación de L-arginina por espectrofotometría (ensayo de Bradford).
- Determinar hinchamiento del hidrogel mediante técnica de swelling.

3.5 HIPÓTESIS

Hi: La síntesis del hidrogel de quitosán permite la liberación de L-arginina.

Ho: La síntesis del hidrogel de quitosán NO permite la liberación de L-arginina.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODO

4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, longitudinal, observacional, *in vitro*.

4.2 UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

- Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento (DITCo) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, antiguo CUVyTT
- Laboratorio multidisciplinario FEBUAP

4.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

- Muestreo asignación aleatoria simple.
- Universo: Hidrogel de quitosán/L-arginina al 30% y 40%.

4.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

4.4.1 INCLUSIÓN

Hidrogeles que presenten características deseables (color, consistencia).

4.4.2 EXCLUSIÓN

Hidrogeles con más de 15 días de síntesis.

4.4.3 ELIMINACIÓN

Daño de los hidrogeles, incapacidad de medir las variables de estudio.

4.5 DEFINICIÓN DE VARIABLES Y ESCALA DE MEDICIÓN

	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición y unidades	Categoría
Liberación	Cuantificar liberación de L-arginina.	Se realizará prueba de liberación, para su análisis se teñirán las muestras con azul de Coomassie y después analizadas en espectrofotómetro.	Cuantitativa, razón, nanómetros.	Dependiente
Hinchamiento	Capacidad de retención de agua de un hidrogel.	Mediante prueba de hinchamiento (swelling).	Cuantitativa, razón, gramos.	Dependiente
Hidrogel quitosán/L-arginina al 30% y 40%			Ordinal, cuantitativa, razón, gramos	Independiente

4.6 RECURSOS

4.6.1 HUMANOS

- Tesista: Alumna de Maestría en estomatología con opción terminal en Ortodoncia: María José Medina Pérez
- Director de tesis: D.C. Miguel Ángel Casillas Santana
- Director metodológico: D.C. Brenda Eréndira Castillo Silva
- Director disciplinario: Mtro. Farid Alfonso Dipp Velázquez
- Asesor externo: Dr. Juan Fernando Aristizabal

4.6.2 MATERIALES

- Quitosán, alto peso molecular, Sigma-Aldrich®
- L-arginina, Sigma-Aldrich®
- Agua destilada
- Ácido acético
- Glicerol
- Colorante azul brillante Coomassie G-250
- Saliva artificial, Viarden
- Espectrofotómetro visible Genesys™ 20
- Agitador, IKA® Vortex 3
- Celda de cuarzo
- Micropipeta 100 - 1000 microlitros, Labsystems 4500
- Puntas azules
- Balanza analítica, OHAUS®, Adventurer™Pro
- Frascos con tapa
- Vasos de precipitado
- Probeta
- Parrilla de agitación magnética, StableTemp™, Cole-Parmer®
- Incubadora
- Cámara fotográfica, Canon

4.7 METODOLOGÍA

4.7.1 SÍNTESIS HIDROGEL

La síntesis de hidrogel de quitosán se realizó con una modificación de la técnica reportada en el artículo de Sámano-Valencia y col (71). Se pesaron en balanza analítica, OHAUS®, Adventurer™ Pro, 5 g de quitosán, alto peso molecular, Sigma-Aldrich® y se midió en Micropipeta 100 - 1000 µl, Labsystems 4500, 500 µl de ácido acético, 10 mL de agua destilada y 200 µl de glicerol. Se colocaron las soluciones en vaso de precipitado y se mezcló manualmente durante 5 min hasta que se formó el hidrogel.

4.7.2 HIDROGEL QUITOSÁN + L-ARGININA 30%

Una vez preparado el hidrogel de quitosán, se agregó 3 g L-arginina, Sigma-Aldrich® y 700 µl de ácido acético (de 100 µl en 100 µl), se mezcló manualmente durante 5 min hasta que se formó el hidrogel.

4.7.3 HIDROGEL QUITOSÁN + L-ARGININA 40%

Una vez preparado el hidrogel de quitosán, se agregó 4 g L-arginina, Sigma-Aldrich® y 1000 µl de ácido acético (de 100 µl en 100 µl), se mezcló manualmente durante 5 min hasta que se formó el hidrogel, Tabla 3.

Tabla 3: Concentraciones para síntesis de hidrogel al 30% y 40%.

	HIDROGEL AL 30%	HIDROGEL AL 40%
Ácido acético	500 µl	500 µl
Quitósan	5 g	5 g
Agua destilada	10 mL	10 mL
Glicerol	200 µl	200 µl
L-arginina	3 g	4 g
Ácido acético	700 µl	1000 µl

4.7.2 LIBERACIÓN

La prueba de liberación de L-arginina se obtuvo por medio del método de Bradford (72). Primero se realizó la curva de calibración patrón de concentración de L-arginina, se definieron las concentraciones para curva de calibración Tabla 4.

Tabla 4: Concentraciones para curva de calibración.	
SALIVA	L-ARGININA
500 μ l	0.25 g
500 μ l	0.5 g
500 μ l	0.75 g
500 μ l	1 g
500 μ l	1.25 g
500 μ l	1.5 g
500 μ l	1.75 g
500 μ l	2 g
500 μ l	2.25 g
500 μ l	2.5 g

Una vez establecidas las concentraciones, se pesó en balanza analítica la L-arginina y se agregó 500 μ l de saliva artificial, Viarden, se mezcló en Agitador, IKA® Vortex 3 hasta disolver L-arginina figura 4.

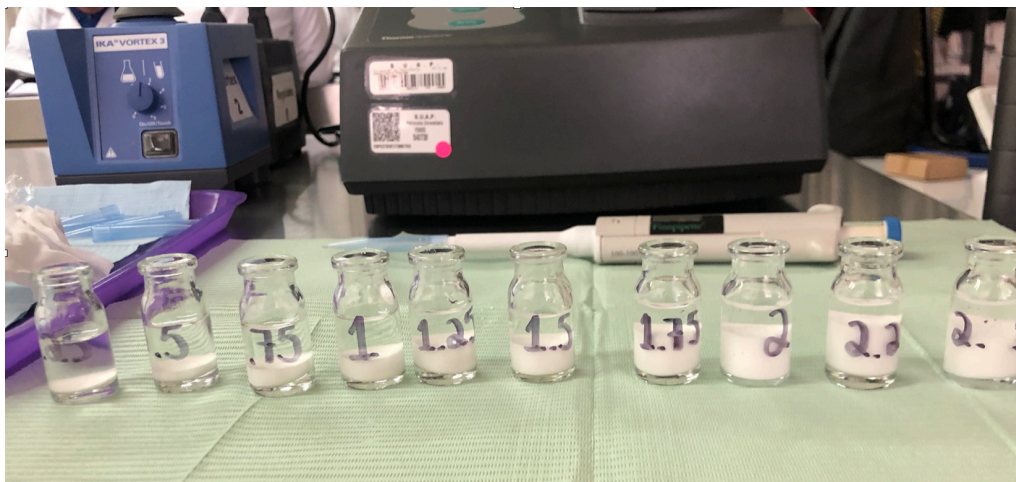


Figura 4: Muestras de L-arginina + saliva artificial listas para mezclar. *Fuente propia.*

Una vez mezclada y disuelta la L-arginina, se realizaron concentraciones 1:1 de muestra + solución Coomassie + agua destilada Tabla 5, se mezclaron en Agitador, IKA® Vortex 3 y se dejaron reposar unos minutos Figura 5.

Muestra (saliva + l-arginina)	200 μ l
Agua destilada	800 μ l
Coomasie	1000 μ l



Figura 5: Concentraciones 1:1 listas para lectura de curva de calibración. *Fuente propia.*

La lectura en espectrofotómetro se configuró al usar la saliva como blanco (Espectrofotómetro visible Genesys™ 20) a 620 nm, una vez configurado el blanco se tomó lectura por triplicado colocando 1000 μ l de concentración 1:1 en una celda de cuarzo, se obtuvo la media Tabla 6 y después se realizó la curva de calibración Figura 6.

Tabla 6: Media lectura espectrofotómetro para curva de calibración.

L-ARGININA	MEDIA LECTURA ESPECTROFOTÓMETRO
0 g	0.3625 nm
0.25 g	0.761 nm
0.5 g	0.90525 nm
0.75 g	0.9765 nm
1 g	1.12575 nm
1.25 g	1.33375 nm
1.5 g	1.37375 nm
1.75 g	1.3795 nm
2 g	1.57025 nm
2.25 g	1.34525 nm
2.5 g	1.59125 nm

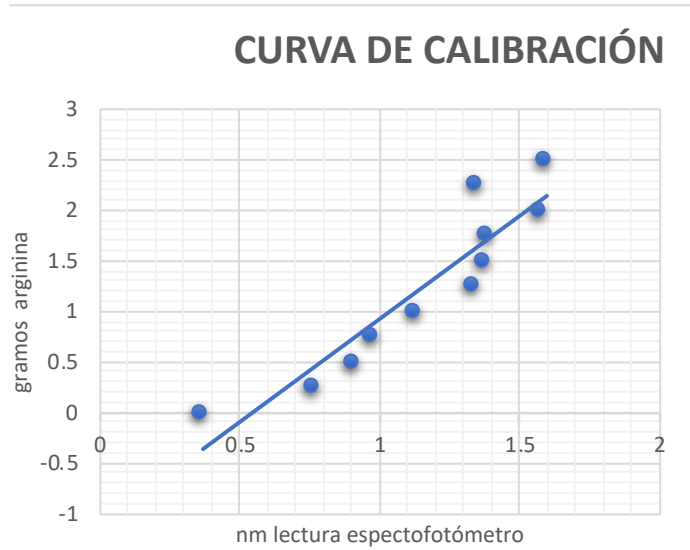
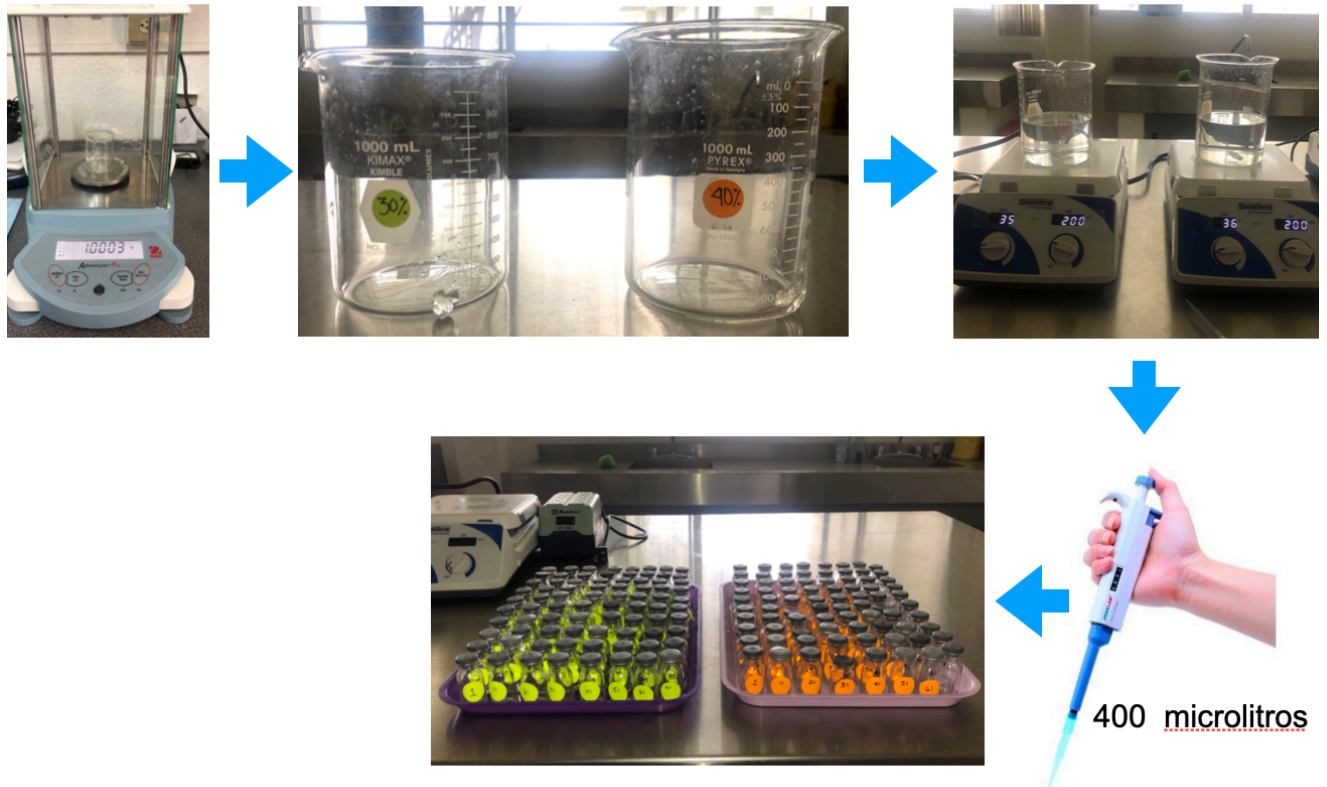


Figura 6: Curva calibración para liberación de L-arginina. *Fuente propia.*

Para la prueba de liberación de L-arginina se pesó en la balanza analítica, OHAUS®, Adventurer™ Pro, 1g de cada uno de los hidrogeles previamente sintetizados (30% y 40%), cada uno se depositó en vasos de precipitado separados, se les colocó 500 mL de saliva artificial a cada vaso y se colocaron en Parrillas de Agitación Magnética, StableTemp™, Cole-Parmer® a 37°C y a 200 revoluciones por minuto (RPM) simulando la temperatura corporal y movimientos de la cavidad oral. Se tomó 400 µL de saliva artificial de cada uno de los vasos a tiempos predeterminados durante 24 hrs, cada toma se depositó en frascos rotulados Figura 7.

Figura 7: Procedimiento prueba liberación de L-arginina. *Fuente propia.*



Una vez obtenidas las muestras se realizaron concentraciones 1:1 con azul de Coomasie y agua destilada Tabla 7 para su lectura en espectrofotómetro.

Tabla 7: Concentraciones 1:1 para lectura en espectrofotómetro.

Muestra (saliva + l-arginina)	400 μ l
Agua destilada	1600 μ l
Coomasie	2000 μ l

Obtenidas las concentraciones, se configuró blanco con saliva artificial en Espectrofotómetro visible Genesys™ 20 a 620 nm, una vez configurado el blanco se tomó lectura por triplicado colocando 1000 μ l de concentración 1:1 de cada una de las muestras en una celda de cuarzo, se realizó media y se graficaron los resultados.

4.7.3 HINCHAMIENTO

Se peso en balanza analítica OHAUS®, Adventurer™Pro, 1g de hidrogel de ambos porcentajes por triplicado. Posterior a esto, todas las muestras fueron inmersas en 15 ml de saliva artificial, se colocaron en incubadora en agitación orbital a 37°C y 50 RPM simulando la temperatura corporal y movimientos de la cavidad oral. Se retiraron los hidrogeles de la saliva artificial cuidadosamente a predeterminados intervalos de tiempo (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 220, 260, 300, 340, 380, 420 y 720 min) para ser nuevamente pesados en la balanza analítica y despues se regresaron al contenedor con saliva artificial del que fueron retirados Figura 8.

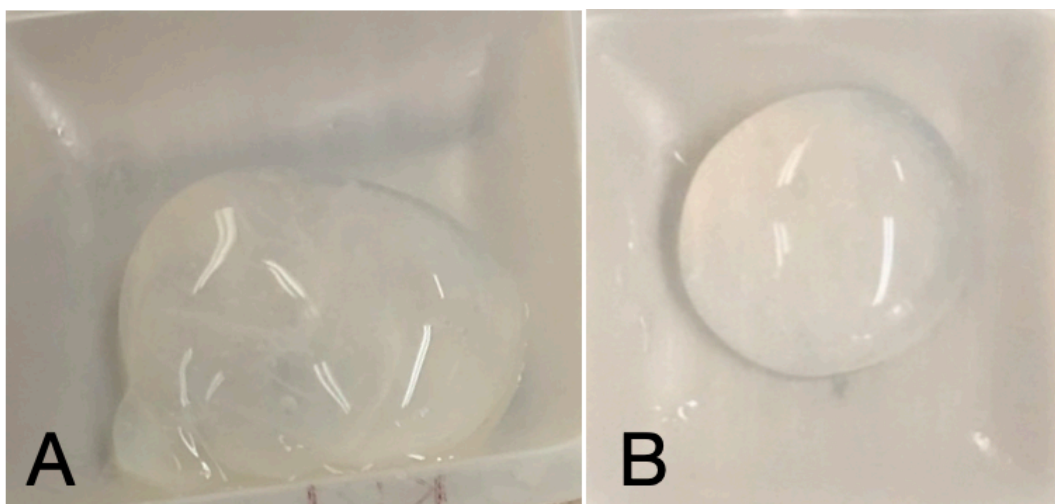


Figura 8: A. Hidrogel L-arginina 40% al iniciar prueba de hinchamiento B. Hidrogel al terminar prueba de hinchamiento. *Fuente propia.*

El peso, el volumen y las dimensiones del hidrogel cambian durante el proceso de hinchamiento, cualquiera de estos parámetros puede ser utilizado para caracterizar el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles. En este trabajo, el hinchamiento de las muestras se determinó mediante su cambio de peso, razón por la cual, se utilizó la ecuación (73) :

$$H(\%) = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100$$

donde H es el porcentaje de líquido atrapado en la red, W_f es el peso del polímero húmedo y W_0 el peso del polímero seco, antes de ser sumergido en la saliva artificial.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva, para variables cualitativas, así como también porcentajes y gráficos correspondientes.

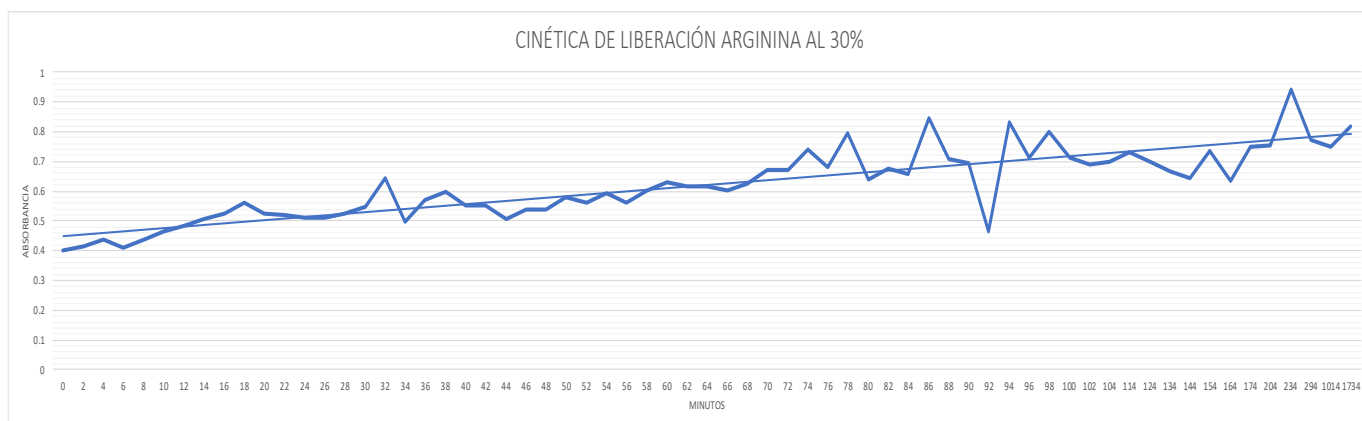
CAPÍTULO 5.

5.1 RESULTADOS

5.1.1 LIBERACIÓN

En las Figuras 9 y 10 se muestra la cinética de liberación de L-arginina de los hidrogeles al 30% y 40% en función del tiempo obtenida por el método de Bradford. Ambos hidrogeles liberaron L-arginina, sin embargo, el hidrogel al 30% mostró un mejor comportamiento al ser más constante su liberación en función del tiempo. La toma final fue al minuto 1734, el hidrogel al 30% se puede observar que presenta una liberación más homogénea y controlada mientras que el hidrogel al 40% presenta una mayor cantidad de picos en la cinética de liberación, ambos hidrogeles aun no presentan una meseta de liberación de L-arginina.

Figura 9: Comportamiento cinética de liberación de L-arginina del hidrogel de Quitosán + L-arginina al 30%. *Fuente propia.*



5.1.2 HINCHAMIENTO

La curva de absorción de líquido en función del tiempo describe la velocidad de absorción del fluido del hidrogel. En la Figura 11 se muestra el porcentaje de absorción de los hidrogeles al 30% y 40% en función del tiempo

Se puede observar que ambos hidrogeles mantuvieron un porcentaje de hinchamiento constante durante las primeras 4 hrs. El hidrogel de quitosán + L-arginina al 40% representado en color naranja, mostró un aumento de hinchamiento en el min 300 y fue de 171%, siendo este el porcentaje más alto dentro de la prueba. El ultimo peso de los hidrogeles se obtuvo al minuto 720 (12 hrs) y se puede apreciar que ambos hidrogeles aun no alcanzaban su equilibrio.

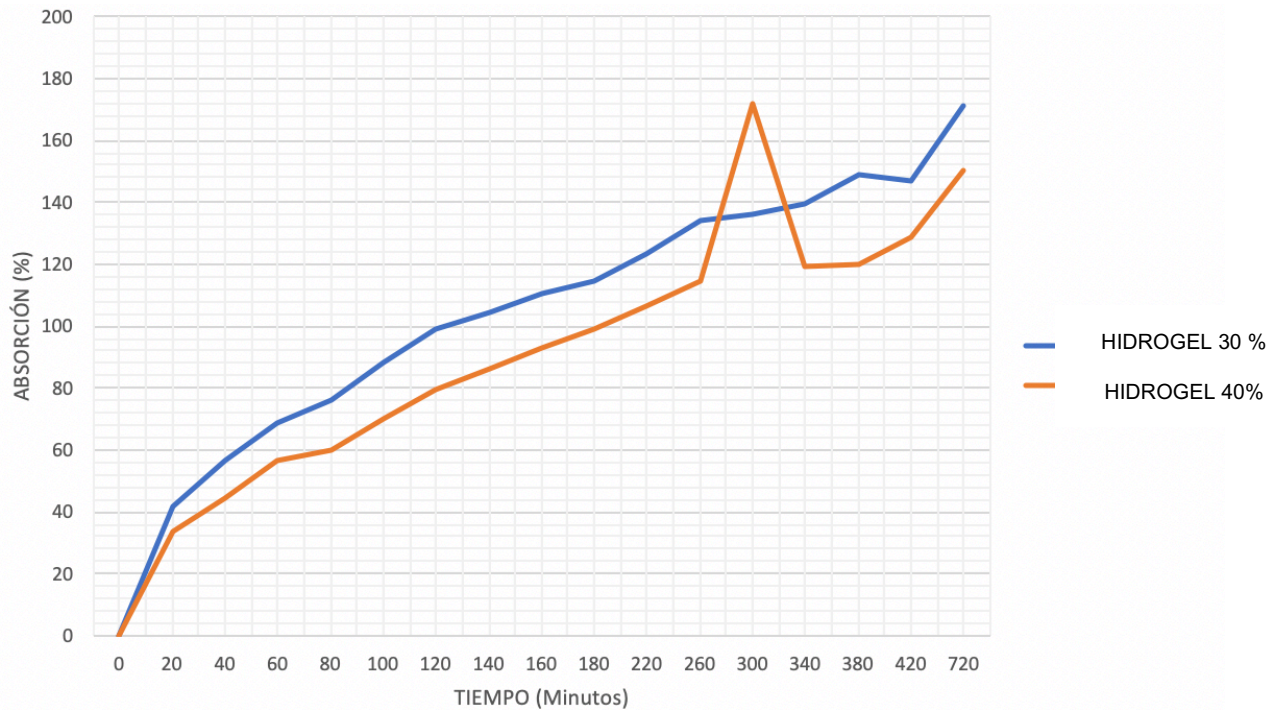


Figura 11: Comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles de Quitosán + L-arginina al 30% (azul) y Quitosán + L-arginina al 40% (naranja). *Fuente propia.*

5.2 DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente en este trabajo, estudios previos han utilizado L-arginina como precursor de NO por medio de infiltraciones locales en modelos murinos para aceleración de movimiento dental. Akin, Gurton, y Ölmez realizaron infiltraciones cada 12 hrs, obteniendo resultados favorables con un aumento significativo del OTM.

Los hidrogeles de quitosán fueron sintetizados con un porcentaje de 30% y 40% de L-arginina, con la finalidad de evaluar si la síntesis del hidrogel, utilizada en este estudio, favorecería la liberación de L-arginina, además, evidenciar por primera vez su cinética de liberación, así como su posible aplicación a futuro como un sistema de liberación prolongado de uso tópico en la mucosa oral y de aplicación en ortodoncia acelerada.

En base a lo anterior, se decidió exponer los hidrogeles a un medio que simulara las condiciones orales, para mimetizar las condiciones futuras de su posible uso, y evaluar de esta forma el proceso de liberación de L-arginina, en caso de que existiese, para tal fin, se usó el método de Bradford, el cual es una prueba ampliamente aceptada debido a que es simple, rápida, barata y sensible de realizar. Este método se utiliza para evidenciar la presencia de proteínas en una muestra ya que se basa en la unión directa de colorante azul de Coomassie 250 G a algunos aminoácidos, entre ellos principalmente los residuos de arginina (74).

Como se observa en la figura 9 y 10, la prueba de liberación se realizó durante 1734 min, los estudios de Akin, Gurton, y Ölmez realizaron infiltraciones en el área a tratar cada 12 hrs, mientras que en el estudio de Shirazi et al se realizaron cada 48 hrs. Al observar los resultados obtenidos en este estudio, la liberación de L-arginina fue de manera constante durante más de 24 hrs, por lo que si se pretende utilizar este gel de manera tópica no es necesario realizar aplicaciones constantes, reduciendo así los costos que estos pudieran generar en un futuro.

La característica principal de los hidrogeles es su comportamiento hidrófilo, siendo esta una característica importante ya que la cantidad de líquido que son capaces de absorber se encuentra directamente relacionada con su comportamiento mecánico. La capacidad de retención de agua de un hidrogel es de gran importancia por que esta ligada con la estabilidad del mismo, con sus propiedades funcionales, textura y el costo de producción; la absorción de líquido depende de ciertos factores, como la naturaleza de la disolución en las que se encuentren inmersos, la estructura de la red polimérica, la presencia o ausencia de poros en el hidrogel y su densidad de entrecruzamiento (75).

Así las pruebas de hinchamiento son útiles para conocer la cinética de absorción de los hidrogeles, es decir, la cantidad de líquido que pueden almacenar en su red polimérica en función del tiempo. Además, de manera paralela, brindan un primer acercamiento para intuir la densidad de entrecruzamiento de la red (76).

La curva de absorción de líquido en función del tiempo describe la velocidad de absorción de fluido del hidrogel. En la Figura 11 se muestra el porcentaje de absorción de los hidrogeles/L-arginina al 30% y 40% en función del tiempo. En el hidrogel al 40% en color

naranja, se presentó el efecto sobre-respuesta el cual se caracteriza por un comportamiento super absorbente durante los primeros minutos de hinchamiento, posteriormente se observa un deshinchamiento gradual del hidrogel. El ultimo peso de los hidrogeles se obtuvo al minuto 720 (12 hrs) y se puede apreciar que ambos hidrogeles aun no alcanzaban su equilibrio.

En base a los resultados obtenidos, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis científica que se estableció para este estudio, ya que ambos hidrogeles de quitosán/L-arginina (30% y 40%) liberaron L-arginina. Sin embargo, es importante hacer notar que existieron limitaciones externas en la realización de este estudio y la caracterización de los hidrogeles, por lo que se sugiere dar seguimiento a la línea de investigación, como manejar distintos porcentajes de L-arginina para observar su comportamiento, así como estudios celulares para cumplir con el propósito de aplicación en humanos en un futuro.

5.3 CONCLUSIONES

Se pueden derivar las siguientes conclusiones de este estudio:

- (1) Los hidrogeles de quitosán/L-arginina al 30% y 40% liberan L-arginina.
- (2) Los hidrogeles de quitosán/L-arginina al 30% y 40% presentan características ideales de hinchamiento.
- (3) El hidrogel de quitosán/L-arginina al 30% presentó una cinética de liberación homogénea en función del tiempo.

5.4 REFERENCIAS

1. Kopecek J. Polymer chemistry: swell gels. *Nature*. 2002; 417.
2. Wichterle O, Lim D. *Nature*. 1960; 185.
3. Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Hydrogel Nanoparticles in Drug Delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60.
4. Ratner BD, Hoffman AS, Ratner BD, Hoffman AS. Synthetic hydrogels for biomedical applications. Am Chemical Society. 1976.
5. Hennink WE, Van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002; 54.
6. Escobar J, García D, Zaldivar D, Katime I. *Rev. Iberoam. Polim*. 2002; 3(3).
7. Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials*. 1998; 19.
8. Prestwich GD, Marecak DM, Marecak JF, Vercruyse KP. Controlled Chemical Modification of Hyaluronic Acid. *J Controlled Release*. 1998; 53.
9. Gelain F, Bottai D, Vescovi A, Zhang S. Designer Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffolds for Adult Mouse Neural Stem Cell 3-Dimensional Cultures. *PLoS ONE*. 2006; 1(1).
10. Nafea EH, Et al. Immunisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: Focus on hydrogels. *J. Control Release*. 2011; 154.
11. Bodugoz-Senturk H, Et al. Poly(vinyl alcohol)–acrylamide hydrogels as load-bearing cartilage substitute. *Biomaterials*. 2009; 30.
12. Huynh CT, Nguyen MK, Lee DS. Injectable Block Copolymer Hydrogels: Achievements and Future Challenges for Biomedical Applications. *Macromolecules*. 2011; 44.
13. Lei Y, et al. Hyaluronic acid and fibrin hydrogels with concentrated DNA/PEI polyplexes for local gene delivery. *J Control Release*. 2011; 153.
14. Angeloni NL, Et al. Regeneration of the cavernous nerve by Sonic hedgehog using aligned peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*. 2011; 32.
15. Bodugoz-Senturk H, Et al. One-Step Synthesis of Biodegradable Curcumin-Derived Hydrogels as Potential Soft Tissue Fillers after Breast Cancer Surgery. *Biomaterials*. 2009; 30.
16. Peng C, Chauhan A. Extended cyclosporine delivery by silicone–hydrogel contact lenses. *J Control Release*. 2011; 154.
17. Deng C, Et al. Collagen and glycopolymer based hydrogel for potential corneal application. *Acta Biomater*. 2010; 6.
18. Bajaj G, Et al. Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors. *J Control Release*. 2012 158.
19. Narayanan RP, Et al. Photodegradable Iron(III) Cross-Linked Alginate Gels. *Biomacromolecules*. 2012; 13.
20. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62.
21. Heller K, Claus L, Huber J. . 1959; 14.
22. LáreznVelásquez C. *Avances en Química*. 2006; 1(15).

23. Hernández Cocolletzi H, Et al. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*. 2009; 22(3).
24. Benavides CM. *Los Polímeros del futuro: CDT ASTIN*. 2002.
25. Periyah M, Halim A, Saad AZ A. Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research. *Pharmacogn Rev*. 2016; 10(19).
26. HERNANDEZ I, HERVER R, OLIVOS M. Elaboración de un hidrogel a partir de quitosano para la eliminación de metales pesados (Cu) en una muestra modelo de agua. *Rev de Simulación y Lab*. 2016; 3(9).
27. Cascone MG, Barbani N, Cristallini C, Giusti P, Ciardelli G, Lazzeri L. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J of Biomaterials Science, Polymer Ed*. 2001; 12(3).
28. Berge J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European J of Pharm and Biopharm*. 2004; 57.
29. Volesky B, Holan ZR. *Biotechnol Prog*. 1995; 11.
30. Bhattarai N, Et al. Chitosan based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010; 62.
31. Periyah M, Halim A, Saad A, Periyah MH, Halim AS, Saad AZ. Chitosan: A Promising Marine Polysaccharide for Biomedical Research. *Pharmacogn Rev*. 2016; 10(19).
32. Furchgott RF, Zawadzki JV. *Nature (London)*. 1980; 288.
33. Duarte Mote K, Bravo A, Araujo A, Bustamante Q, Trujillo F. Toxicidad y efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina y su modulación por azul de metileno. Comparación con L-arginina, nitrito y nitrato. *Arch Cardiol Mex*. 2001; 71.
34. Ignarro L, Buga G, Wood K, Byrns R, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84.
35. Garg U, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo- cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 1989; 83.
36. Kullo I, Schwartz R, Pompili V, Et al. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in coronary artery smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17.
37. Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2).
38. Ignarro L, Buga GM G, Wood K, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84(24).
39. Palmer R, Ferrige A, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327(6122).
40. Lowenstein C, Dinerman J, Snyder S. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*. 1994; 120(3).
41. Wimalawansa S. Rationale for using nitric oxide donor therapy for prevention of bone loss and treatment of osteoporosis in humans.. *Ann NY Acad Sci*. 2007; 1117.

42. Gross S, Wolin M. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Ann Rev Physiol.* 1995; 57.
43. Margolis R, Wimalawansa S. Novel targets and therapeutics for bone loss. *Ann NY Acad Sci.* 2006; 1068.
44. Zhang X, Laubach V, Alley E, Edwards K, Sherman P. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukocyte Biol.* 1996; 59.
45. Hedin S. *Z. Physiol. Chem.* 1895; 21.
46. Kossel A, Gross RE. *Z. Physiol. Chem.* 1924; 135.
47. Wolf P, Corley R. *Am. J. Physiol.* 1939; 127.
48. Borman A, Wood T, Black HC, Anderson E, Osterling MJ, Womack M, et al. *J. Biol. Chem.* 1946; 166.
49. Wu G, Morris SM. *Arch. Biochem. Biophys.* 1952; 38.
50. Wu G, Bazer F, Davis T, Kim S, Li P, Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease.. *Amino Acids.* 2009; 37.
51. Bredt D, Snyder SH S. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annual Review of Biochemistry.* 1994; 63.
52. Knowles R, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biochemical Science.* ; 17(10).
53. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitricoxide pathway. *N Engl J Med.* 1993; 329(27).
54. Masella R, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129.
55. Sheneva S, Nayak K, Bhaskar, V, Nayak A. Accelerated Orthodontics - A Review. *International Journal of Scientific Study.* 2014; 1(5).
56. Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *AmJ OrthodDentofacialOrthop.* 2002; 122.
57. Ford H, Suri S, Nilforoushan D, Manolson M, Gong S. Nitric oxide in human gingival crevicular fluid after orthodontic force application. *Archives of Oral Biology.* 2014; 59.
58. Shirazi M, Et al. The role of Nitric Oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 2002; 72.
59. Akın E, Gurton U, Ölmez H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *AJODO.* 2004; 126.
60. Jerônimo M, do Prado Barros A, Elor V. Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2016; 31(9).
61. Plate N, Valuev L. Heparin-containing polymeric materials. *Adv. Polymer Sci.* 1986; 79.
62. Gott V, Koepke D, Daggett R, Zarnst. *Surgery.* 1931; 50.
63. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery.. *Drug Dev Ind Pharm.* 1998; 24.
64. Amith Raja B, Muralidhar Reddy Y, Sreekanth CAB, et al. Speedy Orthodontics, A Comprehensive Review. *Int J Oral Health Med Res.* 2016; 2(6).

65. Ford H, Suri S, Nilforoushan D, Manolson M, Gong SG. Nitric Oxide in Human Gingival Crevicular Fluid After Orthodontic Force Application. *Archives of Oral Bio.* 2014; 59.
66. Hayashi K, Igarashi K, Miyoshi K, Shinoda H, Mitani H. Involment of Nitric Oxide in Orthodonti Tooth Movement in Rats. *Am J Orthod.* 2002; 122.
67. Akın E, Gurton U, Ölmez H H. The Role of Nitric Oxide in Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Am J Orthod.* 2004; 124.
68. Shirazi M, et al. The Role of Nitric Oxide in Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Angle Orthod.* 2002; 72.
69. Park S, Kim HS, Kim WJ, Yoo HS. *Int J Pharm.* 2012.
70. Hoffman AS. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 43.

71. Sámano-Valencia C, Martínez-Castañón G, Martínez-Gutierrez F, Ruíz F. Characterization and Biocompatibility of Chitosan Gels with Silver and Gold Nanoparticles. *J of Nanoaterials.* 2014; 11.
72. Assays for Determination of Protein Concentration. En: Wiley. *Current Protocols in Protein Science*; 2007. p. 3.4.1-3.4.29
73. A. K. Yadav, P. Mishra, S. Jain, P. Mishra, A. K. Mishra and G. P. Agrawal, *J. Drug Targeting*, 2008, 16, 464.
74. Farias, E., Yasunaga, K., Peixoto, R., Fonseca, M., Fontes, W. and Galera, P., 2013. Comparison of two methods of tear sampling for protein quantification by Bradford method. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(2), pp.261-264.
75. Park K. Omidian H. Introduction to hydrogels. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook.*
76. C.G. (Kees) de Kruif, Skelte G. Anema, Changjun Zhu, Palatasa Havea, and Chris- tina Coker. Water holding capacity and swelling of casein hydrogels. *Food Hydroco- lloids*, 44:372 – 379, 2015.