

IMPLANTE DE POLIPIRROL SINTETIZADO POR PLASMA EN LA MEDULA ESPINAL DE RATAS DE LABORATORIO

Alvarez L.¹, Mondragón R.¹, Morales A.¹, Díaz A.², Rios C.²,
Salgado H.², Cruz G. J.³, Olayo M.G.³, Morales J.⁴, Olayo R.⁴

¹ UPIITA-Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional, Col. Ticomán, CP 07738, México, D.F.

² Departamento de Neuroquímica-Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

³ Departamento de Síntesis y Caracterización, ININ, Apdo. Postal 18-1027, CP 11801, México, D.F.

⁴ Departamento de Física, UAM-I, Av. Michoacán y Purísima, Col. Vicentina, CP 09340, México, D.F.

1- Introducción

La tecnología actual permite construir dispositivos artificiales biocompatibles capaces de imitar los movimientos naturales del cuerpo humano y convivir con él, pero, ninguno de estos puede ser controlado desde el cerebro, ni coordinado con otros órganos, entre otras cosas, por carecer de una interfase conductor-nervio. Algunos polímeros conductores o semiconductores pueden ser biocompatibles, como por ejemplo algunas variedades de polipirrol y polialilamina. La síntesis de estos polímeros juega un papel muy importante en la biocompatibilidad, ya que se requiere que adicionalmente el material tenga cierto grado de absorción o pasividad, según sea el caso, en el medio biológico. Por medio de descargas de resplandor es posible sintetizar polipirrol dopado *in situ* con yodo con conductividad eléctrica sensible a la concentración acuosa e iónica de medios biológicos.

Así, un electrodo polimérico hecho de esta forma puede responder ante la concentración iónica de un organismo viviente, que podría ser el cuerpo humano, con potenciales eléctricos y ser una interfaz biocompatible, capaz de recibir y/o enviar señales eléctricas y transformarlas en señales iónicas, o viceversa, entendibles por el sistema nervioso.

En este trabajo se presentan los resultados de la implantación de un polímero semiconductor en la médula espinal de ratas de laboratorio. Los animales fueron operados para cortar la médula espinal e inmovilizar las extremidades inferiores del cuerpo para después recibir implantes de materiales biocompatibles y reconectar la médula espinal.

2. Resultados y Discusiones

2.1 Caracterización del polímero

El polipirrol-yodo (PPy-I) se sintetizó en forma de película delgada por medio de una descarga de resplandor a una potencia de 18 W, frecuencia de 13.5 MHz y presión de 1.5×10^{-2} Torr. Una descripción detallada del método de síntesis se encuentra en la referencia [1]. El polímero se recuperó con acetona en forma de película delgada y posteriormente se molió para hacer una pastilla e implantarla en la médula espinal de las ratas.

2.1.1 Análisis de FT-IR

En la Fig. 1 se muestra el espectro FT-IR del polipirrol. En el espectro se encuentran las bandas de absorción amplias y complejas características de los materiales sintetizados por plasma. Destacan los picos de 3349 cm^{-1} y de 1630 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones de las aminas. En 2932 cm^{-1} se puede observar la vibración de los enlaces C-H alifáticos. La deformación de los grupos metilo (C-H) se encuentra en 1452 cm^{-1} y en 747 cm^{-1} se aprecian la vibración del enlace C-C. Finalmente, en 2200 cm^{-1} se presenta la vibración de los grupos nitrilos, los cuales indican fragmentación de anillos aromáticos.

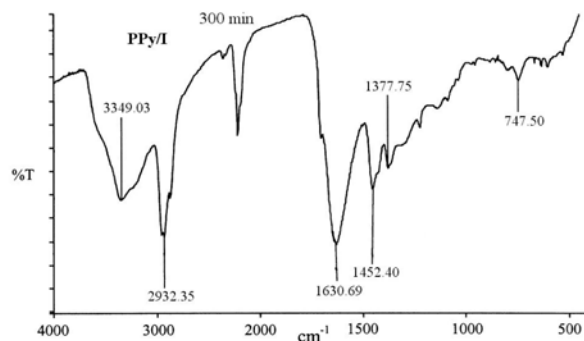


Fig. 1. Espectro FT-IR del PPy/I

2.1.2 Morfología

La morfología del PPy-I antes de formar las pastillas usadas como implantes se muestra en la Fig. 2. Se aprecia una superficie con pequeñas arrugas que forman líneas en todas direcciones. Los pliegues, por lo delgado del polímero, dan la impresión de estar compuesta por una serie de conductos por toda la superficie.

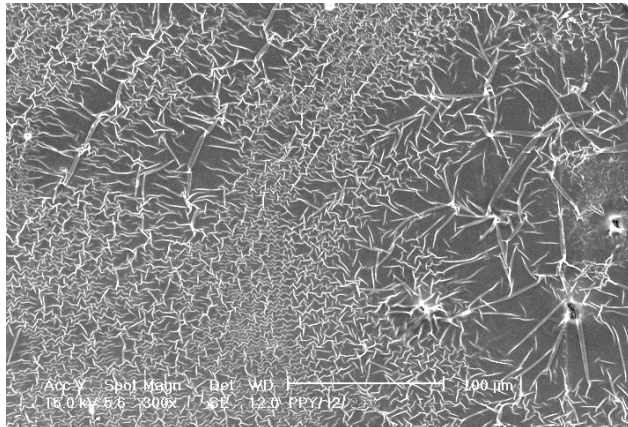


Fig. 2. Micrografía de PPy-I

2.1.2 Conductividad Eléctrica.

La resistencia eléctrica de la pastilla de polímero fue de $1.3 \text{ M}\Omega$ y la conductividad calculada fue de 21 nS/cm . La conductividad de este tipo de materiales aumenta hasta en 8 órdenes de magnitud cuando se encuentran en una humedad relativa del 92% [2]. Es posible que la conductividad de este material, una vez implantado, llegue hasta 1 S/cm .

2.2 Protocolo de Implantación

Se siguieron los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Título Séptimo de la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación), publicada en 1990.

Se utilizaron 9 ratas de la cepa Long Evans, hembras adultas entre 12 y 14 semanas de edad con peso corporal entre 230 y 250 g, divididas en 3 grupos. También se prepararon pastillas similares de copolímeros polipirrol-poietilenglicol (PPy/PEG) para hacer comparaciones con el material estudiado:

Grupo control: Se formó con 3 ratas a las que se les practicó una sección completa de la médula espinal a nivel de la 9ª vértebra torácica (T9).

Grupo I. PPy/I: Se formó por 3 ratas a las que se le aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y se les implantó una pastilla de PPy/I.

Grupo I. PPy/PEG: Se formó por 3 ratas a las que se le aplicó el mismo procedimiento quirúrgico y se les implantó una pastilla de PPy/PEG. Los animales fueron evaluados al siguiente día de la lesión para comprobar que no existiera movimiento de las extremidades inferiores y así tener la seguridad de que la cirugía se realizó de manera adecuada. Las evaluaciones funcionales se realizaron una vez por semana por medio de la escala BBB (desarrollada por Basso-Beattie-Bresnahan), que evalúa la marcha a través de 22 grados de recuperación motora. En la Tabla 1 se presentan detalles de los grupos formados.

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	15 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	15 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	15 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	22 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	22 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	22 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Grupo	Fecha	Procedimiento
I.PPy/PEG Rata 1	29 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/PEG
Control Rata 2	29 de Abril de 2004	control lesión por sección (LPS)
I.PPy/I Rata 3	29 de Abril de 2004	pastilla de 0.4mm Espesor, 3mm Diam LPS I.PPy/I

Tabla 1. Diseño experimental (grupos y fecha de procedimiento).

2.2.1 Lesión de sección de la médula espinal

Los animales se anestesiaron vía intramuscular con una mezcla de 77.5 mg de ketamina y 12.5 mg de hidrocloreuro de xilacina por Kg de peso corporal. Después de anestesiarse al animal y realizar la asepsia de la zona quirúrgica se practicó una incisión sagital en piel seguido de disección

de los músculos paravertebrales de las apófisis espinosas.

Se extirparon 3 apófisis espinosas de T9-T11 para observar los procesos laminares de esas vértebras. Finalmente, se realizó una laminectomía de 3 niveles, extendiéndola bilateralmente hasta los procesos facetarios. Las meninges se mantuvieron intactas. Una vez concluida la laminectomía se realizó una incisión longitudinal en meninges de aproximadamente 5 mm de largo, referenciando ambos lados de la incisión con un punto simple de sutura de 10-0 (Polipropileno deknatel), posteriormente se hizo un corte transversal completo de la médula espinal, y se corroboró mediante microscopio quirúrgico que ninguna vía nerviosa quedara conectada.

A los grupos I.PPy/I e I.PPy/PEG se les implantó una pastilla de polímero (según el caso) en posición transversal a la médula espinal.

2.2.2 Método de implantación del material

Inmediatamente después de terminar el proceso de lesión por sección de la médula espinal en las ratas, justo en el sitio de sección se introdujo en forma transversal un trozo de pastilla de polímero de aproximadamente 3 mm de diámetro. Después de la implantación se paso una sutura de 10-0 (poliamida 6 monofilamento) a través de las meninges con puntos simples de sutura. Finalmente, la incisión quirúrgica se suturó en 2 planos, la fascia muscular y la piel con puntos simples y continuos respectivamente de 5-0 (polipropileno monofilamento).

Después de la cirugía, los animales se mantuvieron en observación a temperatura ambiente en una misma jaula, con una dieta a base de alimento comercial y agua, a libre demanda, mezclada con tempra (10 ml en 2 l de agua durante 72 hrs). También se administro intramuscularmente penicilina benzatínica (1,200,000 u.i. como única dosis).

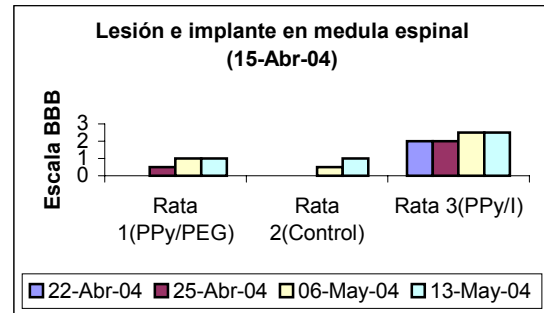


Fig. 3. Evolución motora del 1º conjunto intervenido.

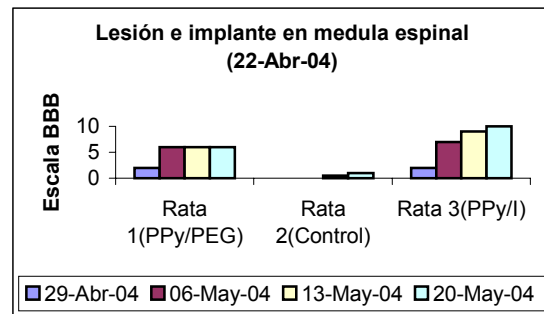


Fig. 4. Evolución motora del 2º conjunto intervenido.

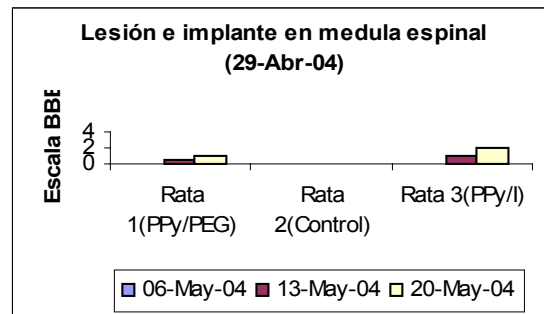
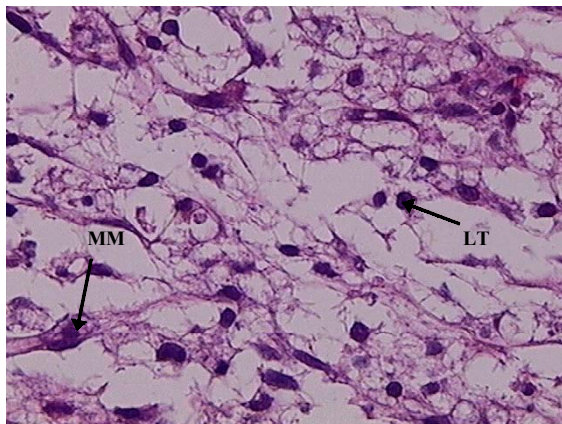


Fig. 5. Evolución motora del 3º conjunto intervenido.

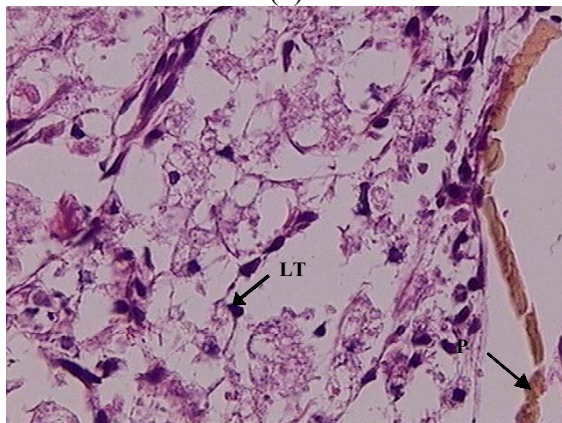
2.2.3 Sacrificio y análisis histológico

Para estudiar histológicamente la integración del material en la médula espinal, 1 mes después de la lesión, los animales se perfundieron vía intracardiaca. Al término de la perfusión se extrajo la médula espinal para obtener un segmento de 1.5 cm a partir de la región del epicentro de la lesión, hacia el segmento caudal y hacia el segmento cefálico de la médula. Se colocó el espécimen en fijador durante 5 días, al cabo del cual se siguió el procedimiento para ser embebido en parafina. Se realizaron cortes longitudinales secuenciales de 1 µm de espesor en un micrótom, seleccionándose los cortes en un intervalo

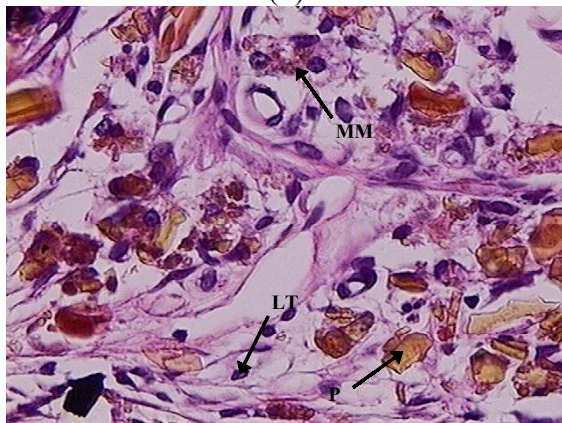
de 10 cortes obteniéndose 4 muestras. Los cortes seleccionados se pasaron a un baño de flotación con agua a 45°C (a cada litro de agua se le agregaron 0.5 g de gelatina bacteriológica) y luego se colocaron en laminillas de vidrio para ser teñidas con el procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris. Los resultados se muestran en la Fig. 6.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. Fotografías de cortes histológicos a 20X y 40X (procedimiento de hematoxilina y eosina de Harris). P → Polímero, LT → Linfocitos, MM → Macrófagos modificados.

En los animales implantados, ver Fig. 6, se observa que en el polímero transplantado de PPy/I se integro al tejido nervioso de la médula espinal (c). Al igual que, la presencia de células inflamatorias, linfocitos T y macrófagos modificados denominados células gigantes de cuerpo extraño. En los implantes con PPy/PEG (b) existe menos destrucción del tejido nervioso, no se presentan macrófagos de células gigantes de cuerpo extraño, sin embargo, hay presencia de macrófagos esponjosos, células inflamatorias y linfocitos T. En los animales control se muestra gran destrucción de tejido nervioso y mayor presencia de células inflamatorias (a).

3. Conclusiones

Las pruebas de BBB indican que los animales implantados con PPy-I tienen una buena respuesta a la conducción del impulso nervioso a través de la médula espinal como lo demuestra el movimiento de las extremidades inferiores de las ratas implantadas pese al corte de sección completa de la médula espinal.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Leticia Carapia del ININ por el análisis de microscopía electrónica de barrido y al CONACYT por el financiamiento al proyecto 33077.

4. Bibliografía

- 1 – J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, R. Olayo, *Journal of Applied Polymer Science*, 85, 263-270, 2002.
- 2 – G.J. Cruz, J. Morales, R. Olayo, *Thin Solid Films*, 342, 119-126, 1999.
- 3 – J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, M.M. Castillo, R. Olayo, *Journal of Polymer Science, Part B*, 38, 3247-3255, 2000.