

Hidrogeles de Colágeno entrecruzado con Oligouretano trifuncional para potenciales aplicaciones biomédicas

P. U. Muñoz González¹, J. A. Claudio², J. Delgado¹, L. E. Castellano³, I. A. Quintero¹, A. Vega¹, J. L. Mata², B. Mendoza^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Química, Electrónica y Biomédica, DCI, Universidad de Guanajuato, León, México.

²Departamento de Química, DCNE, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

³Departamento de Ciencias Aplicadas al Trabajo, DCS, Universidad de Guanajuato, León, México.

*bmnovelo@dcu.ugto.mx

Resumen- El presente trabajo reporta la obtención de hidrogeles constituidos de colágeno tipo I entrecruzado con oligouretano bloqueado derivado de poli(óxido de etileno) tri-OH y hexametildiisocianato. El grado de entrecruzamiento de los geles de colágeno con el oligouretano trifuncional se incrementa con el tiempo de maduración y por consiguiente, se incrementa la capacidad de hinchamiento y la viabilidad de macrófagos humanos sobre los geles. A su vez, la concentración del oligouretano desplaza de manera directa el tiempo de degradación de los geles de colágeno. El ajuste de las características del hidrogel híbrido representa un factor clave para evaluar su aplicación en el tratamiento de heridas crónicas.

Palabras clave- Colágeno, Hidrogel, Entrecruzamiento

I.- INTRODUCCION

Los hidrogeles representan una plataforma para el desarrollo de andamios para ingeniería de tejidos, i. e. matrices tridimensionales apropiadas para que células conlleven a la formación de tejido *de novo* [1]. La química de las superficies, la densidad de entrecruzamiento y la rigidez de un biomaterial influyen en la interacción célula-material y consecuentemente, en la actividad regenerativa de los andamios [2-3]. El ajuste de las propiedades fisicoquímicas de los hidrogeles puede lograrse mediante la combinación de diferentes precursores líquidos de origen natural o sintético. Por ejemplo, la porosidad, la velocidad de degradación y las propiedades mecánicas de colágeno pueden optimizarse mediante la modificación con polímeros sintéticos biocompatibles [4].

La polimerización de colágeno ocurre como resultado de la neutralización (pH 7) y calentamiento (37°C) a partir de una solución ácida, dando lugar a una red tridimensional altamente hidratada. Posterior a este proceso, el colágeno es comúnmente entrecruzado para estabilizar el gel y a la vez mejorar su desempeño por ejemplo en la inducción de la regeneración de piel y nervio periférico [2]. En un intento

de imitar el entrecruzamiento *in vivo* del colágeno durante la formación de fibrillas, la polimerización de colágeno puede llevarse a cabo en presencia de los entrecruzantes. Los geles de colágeno preparados en presencia del agente de acoplamiento carbodiimida mostraron un incremento en las propiedades mecánicas comparado con geles obtenidos por un método secuencial [5].

Por otro lado, el poli(óxido de etileno) (PEO) puede modificarse con el objetivo de generar hidrogeles híbridos adecuados para incorporar moléculas de señalización celular, encapsular células o formación en el sitio de implantación [4,6]. La química de isocianato (NCO) es ampliamente utilizada en la modificación de proteínas [7-8]. Nuestro grupo ha explorado el uso de oligouretano soluble en agua, derivado de la oligomerización de PEO diol con diisocianato y bloqueo con bisulfito de sodio, como un agente de entrecruzamiento de tejido descelularizado [9]. El desbloqueo de los grupos protegidos del oligouretano en medio acuoso y a pH neutro induce la generación de grupos NCO y su consecuente reacción con grupos amina (-NH₂) del colágeno.

Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo la obtención de hidrogeles mediante la polimerización de colágeno tipo I y su entrecruzamiento simultáneo con oligouretano derivado de PEO trifuncional (Fig. 1). La relación de la concentración del oligouretano y el tiempo de maduración con el grado de entrecruzamiento, el hinchamiento, la degradación y la citotoxicidad se investigaron como etapa inicial en el desarrollo de geles híbridos para aplicaciones en regeneración de tejido suave.

II.- METODOLOGIA

1) Obtención de colágeno en solución: Los tendones de colas de rata Wistar (10 hembras adultas, 180-220 g) se extrajeron, esterilizaron (etanol 75%) y descelularizaron (EDTA 0.5M, etanol 10%, solución amortiguada de fosfato PBS pH 7, 10 rpm, 1h).

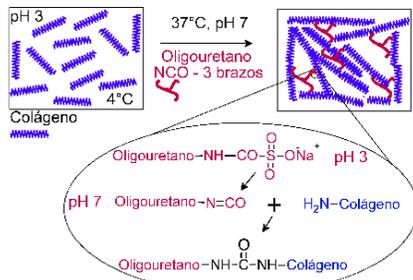


Fig. 1. Representación esquemática de la formación de gel híbrido en respuesta a cambio de pH y temperatura.

Los tendones se hidrolizaron (ácido acético 100 mM, 7 días, 4°C, 10 mg de tendón por mL), el hidrolizado se centrifugó para eliminar sólidos, el sobrenadante se diluyó 1:1 (ácido acético 100mM) y se almacenó a 4°C sin purificación adicional. Finalmente la concentración de proteína se determinó utilizando el método BCA (Ácido bicinonínico, *Pierce*).

2) Síntesis del oligoureterano bloqueado trifuncional: PEO base glicerol etoxilato (0.010 moles, M_n 1000 g mol^{-1} , *SigmaAldrich*) se mezcló con hexametildiisocianato (0.030 moles, *Fluka*) a 40°C durante 5 min. La primera etapa de reacción consistió en la oligomerización (100°C, 2h, 400 rpm) y la segunda en el bloqueo agregando NaHSO_3 (1.5 M, 20 mL, 40°C, 2h). Bandas FT-IR: 3326cm^{-1} ($\nu\text{N-H}$), 1514cm^{-1} (δNH y $\nu\text{C-N}$), 2930cm^{-1} , 2852cm^{-1} ($\nu\text{C-H}$), 1708cm^{-1} (νCO de uretano).

3) Análisis del colágeno: El colágeno en solución (4 mg mL^{-1}) se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE y se compararon con una muestra de colágeno comercial (*Sigma*, CAT C4243). En un segundo análisis, la solución de colágeno se neutralizó (pH 7, NaOH 1M, PBS 10X) y se calentó a 37°C para evaluar la cinética de formación de fibrillas de colágeno mediante turbidimetría. Para esto los geles de colágeno se polimerizaron en cubetas de cuarzo (1 cm *pathlength*) y la transmisión de luz a través de los geles se midió con un espectrofotómetro UV-Vis (longitud de onda 406 nm).

4) Preparación y caracterización de geles: Las soluciones de oligoureterano y colágeno se mezclaron (4/996 ó 8/992 μl , lo que equivale a 40% ó 80% $m_{\text{oligoureterano}}/m_{\text{colágeno}}$), neutralizaron y moldearon en discos (diámetro 15 mm, 37°C, 1, 3 ó 7 días). Los geles se analizaron mediante espectroscopia de infrarrojo ATR-FTIR. Los grupos $-\text{NH}_2$ residuales del colágeno se cuantificaron mediante el método TNBS (ácido 2,4,6

Trinitrobenzensulfónico). Los geles se acondicionaron en NaHCO_3 (4.0%, 2mL, 30 min), reaccionaron con TNBS (0.5%, 1 mL, 2h, 40°C), lavaron (4x) e hidrolizaron (0.2 mL HCl 25%, 60°C, 60min). El hidrolizado se aforó a 5 mL y la absorbancia se leyó a 344nm. $[\text{NH}_2]$ se reporta en mmoles por mg de proteína (coeficiente de absorción molar de $14,600 \text{ mL mmol cm}^{-1}$). En otro ensayo, los geles se secaron (37°C, 24h), se pesaron y se rehidrataron (PBS pH 7) para evaluar el porcentaje de hinchamiento como resultado de la captación de agua. Por otro lado, los geles hidratados de masa conocida se colocaron en solución de colagenasa I (1.4, 14 y 72 U, Tris-HCl 50mM, NaN_3 0.3%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5mM) o en medio de cultivo DMEM (4 mL, *Dulbecco's modified Eagle's medium*). La masa de los geles fue monitoreada a diferentes plazos para evaluar su hinchamiento/degradación.

5) Ensayo de viabilidad celular: Los monocitos/linfocitos se separaron de sangre periférica de donadores adultos sanos mediante un gradiente de densidad (centrifugación 700xg, 30 min), lavados (PBS estéril), centrifugados (700xg, 5 min) y suspendidos en medio de cultivo RPMI suplementado (suero fetal bovino/FBS 10% y antibióticos penicilina/estreptomicina 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, anfotericina B 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las células se cultivaron (37°C, 5% CO_2) y el medio de cultivo se renovó después de 2 h para eliminar linfocitos (células en suspensión, no adheridas). Los monocitos adheridos se diferenciaron a macrófagos durante 9 días en presencia de medio RPMI suplementado que contenía factor estimulante de colonias de macrófagos (30 pg mL^{-1} , M-CSF). Los macrófagos se sembraron (1×10^6 células) sobre los geles moldeados en microplacas de 24 pocillos y se cultivaron durante 1, 2 y 4 días. Finalmente, la viabilidad celular sobre los geles se evaluó mediante el reactivo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) y se comparó con células cultivadas en ausencia de los geles.

III.- RESULTADOS

A.- Características del colágeno I

El colágeno mostró una cinética de polimerización en forma de curva sigmoide (Fig. 2a). Una primera etapa de latencia ocurrió de 0 a 3 min con un incremento de 0.092 unidades de absorbancia (AU) por minuto, una segunda etapa con crecimiento exponencial (0.92 AU por minuto) ocurrió de 3 a 5 min y finalmente una etapa del minuto 5 al 15 (0.007 AU por minuto). El análisis por electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones de desnaturalización de los

hidrolizados de tendón de rata así como del colágeno comercial de piel bovina mostró bandas para colágeno tipo I que incluyen las cadenas α (100-130 kDa) y β (230-280 kDa) características (Fig. 2b). Los grupos funcionales del enlace amida se detectaron mediante espectroscopia FT-IR en los geles de colágeno de acuerdo al número de modos vibracionales característicos (Fig. 2c). La banda de amida I asociada con la vibración de estiramiento C=O y relacionada a la conformación del esqueleto de la proteína se observó de 1700 a 1600 cm^{-1} . Además se observó la banda de amida II derivada de la vibración de doblamiento N-H y estiramiento C-N y la banda de amida III (1350-1250 cm^{-1}).

B.- Características de geles colágeno I - oligouretano

La formación de geles de colágeno en presencia de oligouretano trifuncional resultó en la disminución de los grupos amino libres del colágeno (Fig. 3a). El entrecruzamiento, relacionado con la disminución de los grupos amino libres, se incrementó con el tiempo de maduración de los geles pero no se vio alterado significativamente por la concentración del oligouretano. La capacidad de hinchamiento de los geles de colágeno en PBS se incrementó después de su entrecruzamiento con oligouretano (Fig. 3b). Un mayor entrecruzamiento produjo un mayor hinchamiento.

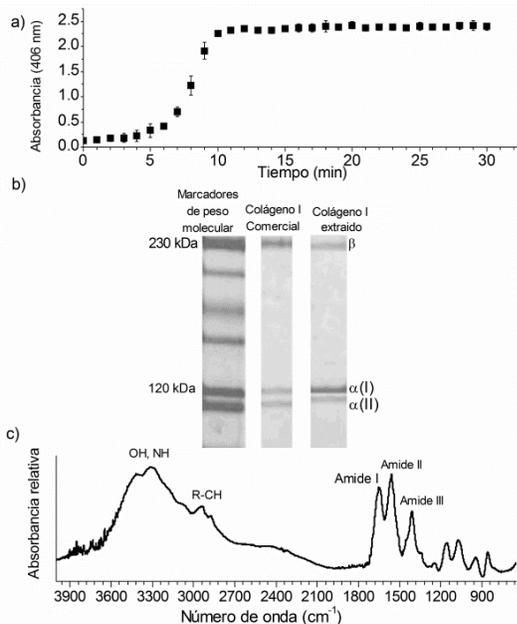


Fig. 2. Análisis del colágeno derivado de tendón de rata descelularizado. a) Cinética de formación de fibrillas seguida por turbidimetría (37°C, pH 7, 4 mg ml⁻¹, media±D.E., n=3). b) Bandas de Electroforesis SDS-PAGE del colágeno. c) Espectro de ATR FTIR.

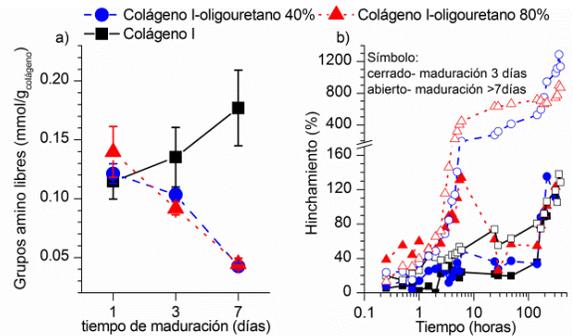


Fig. 3. Efecto del tiempo de maduración sobre a) el contenido de grupos NH₂ libres (Media±D.E., n=3) y b) el hinchamiento (PBS, 37°C, n=2) de geles de colágeno entrecruzado con oligouretano.

El tiempo de degradación de los hidrogeles de colágeno I con colagenasa se desplazó después de su modificación con oligouretano en modo que depende de la concentración del entrecruzante (Fig. 4). En presencia de una mayor actividad enzimática los geles colágeno-oligouretano mostraron un proceso de hinchamiento (Fig. 4a). La tabla I resume las diferencias de la pérdida de masa para los hidrogeles híbridos en cada uno de los cuatro métodos de degradación.

C.- Efecto del entrecruzamiento sobre viabilidad de macrófagos.

La viabilidad de macrófagos humanos cultivados sobre los hidrogeles híbridos fue menor que sobre los geles de colágeno libre de oligouretano cuando la maduración ocurrió durante 1 día (Fig. 5a). Sin embargo, estas diferencias se redujeron cuando el tiempo de maduración se extendió a 7 días (Fig. 5b).

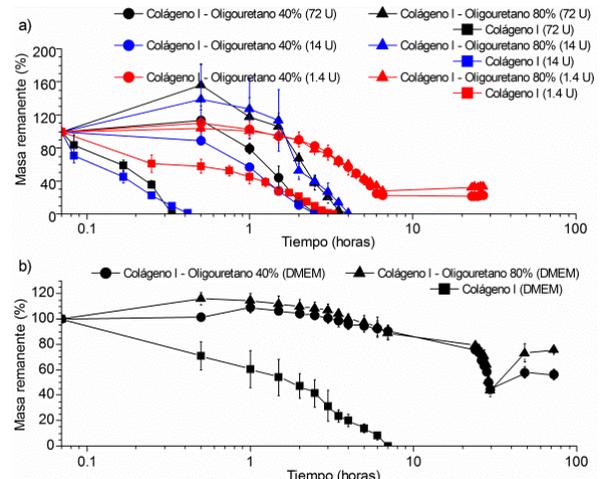


Fig. 4. Perfiles de pérdida de masa de los geles (7 días de maduración) en presencia de (a) tres diferentes unidades de actividad de colagenasa I y (b) medio de cultivo DMEM. Media±D.E., n=3.

TABLA I
EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO SOBRE EL TIEMPO DE
DEGRADACIÓN DE LOS GELES DE COLÁGENO.

Método de degradación	Tiempo (horas) requerido para perder el 80% de masa		
	Colágeno I	Colágeno I-oligourretano 40%	Colágeno I-oligourretano 80%
Colagenasa I (72U)	0.2	2	3
Colagenasa I (14U)	0.3	1.5	3.3
Colagenasa I (1.4U)	2	6.5	6.5
Medio DMEM	4	30*	30*

*Tiempo para perder el 56% de masa (máxima detectada)

IV.- DISCUSIÓN

El colágeno purificado de tendones de cola de rata retuvo las características de colágeno tipo I (Fig. 2b). El proceso de autoensamblaje del colágeno en respuesta al cambio de pH y temperatura produce una red fibrilar de colágeno altamente hidratada. El incremento en la turbidez (Fig. 2a) de la solución de colágeno durante el proceso de polimerización se ha asociado a un aumento del espesor de fibrillas [10]. La manejabilidad de este hidrogel es incrementada con la incorporación del oligourretano trifuncional durante el proceso de gelificación. Este incremento puede estar asociado con reacciones de entrecruzamiento (Fig. 1) las cuales se ven incrementadas con el tiempo de maduración (Fig. 3a). Una red más entrecruzada aumenta la capacidad de hinchamiento de los geles en medio libre de colagenasa I (Fig. 3b) y en presencia de actividad enzimática (Fig. 4). La concentración del oligourretano (Tabla I, Fig. 4a), sin que implique un aumento en la densidad de entrecruzamiento, incrementa la resistencia a la degradación enzimática de los geles (Fig. 3a). Esto puede asociarse al recubrimiento de las fibras de colágeno con el oligourretano, proporcionando protección a los enlaces peptídicos.

Para investigar el efecto de la incorporación del oligourretano sobre la biocompatibilidad, se evaluó la viabilidad de macrófagos sobre de los hidrogeles híbridos. Los macrófagos son células de sistema inmune innato con actividad secretora de moléculas de señalización celular, e. g., factores de crecimiento e interleucinas [11]. La posible citotoxicidad, resultado de la reacción de grupos isocianato del oligourretano, parece ser disminuida conforme el tiempo de maduración (7 días) permite la completa reacción con el colágeno (Fig. 3a). La producción de moléculas de señalización celular por macrófagos humanos cultivados en los geles colágeno-oligourretano, así como el cocultivo con fibroblastos, representa una oportunidad de trabajo futuro para evaluar el potencial de los geles presentados aquí en el tratamiento de heridas crónicas mediante principios de ingeniería de tejidos. Asimismo, es necesario estudiar la relación entre la función celular y las características del hidrogel como porosidad y comportamiento viscoelástico.

V.- CONCLUSIONES

Los hidrogeles híbridos se obtuvieron mediante un proceso simultáneo (fibrillogénesis y entrecruzamiento) a partir de colágeno tipo I, purificado de tendones de cola de rata, y oligourretano trifuncional en solución acuosa. El grado de entrecruzamiento de los geles de colágeno con el oligourretano trifuncional se incrementó con el tiempo de maduración aumentando la capacidad de hinchamiento y la viabilidad de macrófagos humanos. El tiempo de degradación y la concentración del oligourretano en los geles de colágeno guardaron una relación directa.

RECONOCIMIENTOS

P. Muñoz agradece a Estefanía Montoya, Juan Ruvalcaba, Luis Gómez y Osmany Falcón por su colaboración en el análisis de resultados de turbidimetría como parte de un proyecto para el curso de Bioestadística Enero-Junio 2014 (Prof. Miguel Vargas). Asimismo, los autores agradecen a María C. Lona por su asistencia en los ensayos de viabilidad celular. Este trabajo se realizó gracias al apoyo del CONACyT (Proyecto CB2011/164440), PROMEP-SEP (proyecto UGTO-PTC299) y CONVOCATORIA CIO-UG 2013.

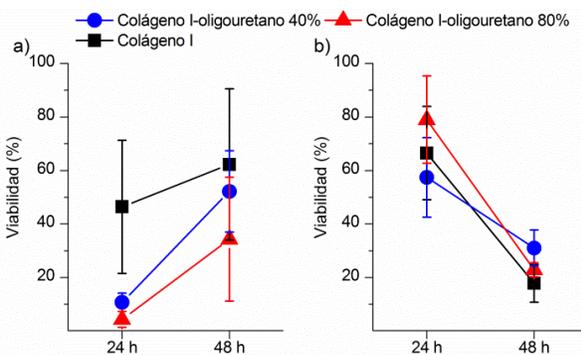


Fig. 5. Viabilidad de macrófagos humanos cultivados sobre los geles con a) 1 día y b) 7 días de maduración. Media±D.E., n=4. 100% representa la viabilidad de células cultivadas sobre pocillos de poliestireno.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. Peppas, "Hydrogels in regenerative medicine" *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 32-33, pp. 3307-3329, 2009.
- [2] E. C. Soller, D. S. Tzeranis, K. Miu, P. T. So and I. V. Yannas. "Common features of optimal collagen scaffolds that disrupt wound contraction and enhance regeneration both in peripheral nerves and in skin" *Biomaterials*, vol. 33, no. 19, pp. 4783-4791, 2012.
- [3] P. M. Kharkar, K. L. Kiick and A. M. Kloxin, "Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments" *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 17, pp. 7335-7372, 2013.
- [4] T. D. Sargeant, A. P. Desai, S. Banerjee, A. Agawu and J. B. Stopek, "An in situ forming collagen-PEG hydrogel for tissue regeneration" *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 1, pp 124-132, 2012.
- [5] S. Yunoki and T. Matsuda, "Simultaneous processing of fibril formation and cross-linking improves mechanical properties of collagen" *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 3, pp. 879-885, 2008.
- [6] E. A. Phelps, N. O. Enemchukwu, V. F. Fiore, J. C. Sy, N. Murthy, T. A. Sulchek, T. H. Barker and A. J. García, "Maleimide cross-linked bioactive peg hydrogel exhibits improved reaction kinetics and cross-linking for cell encapsulation and in situ delivery", *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 1, pp. 64-70, 2012
- [7] G. Tronci, A. T. Neffe, B. F. Pierce and A. Lendlein, "An entropy-elastic gelatin-based hydrogel system" *J. Mater. Chem.*, vol. 20, no. 40, pp. 8875-8884, 2010.
- [8] A. M. Jonker, D. W. P. M. Löwik and J. C. M. van Hest, "Peptide- and protein-based hydrogels" *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 5, pp. 759-773, 2012.
- [9] B. Mendoza, J. L. Mata, A. Vega, J. V. Cauich and Á. Marcos, "Synthesis and characterization of protected oligourethanes as crosslinkers of collagen-based scaffolds" *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 19, pp. 2874-2882, 2014.
- [10] J. Zhu and L. J. Kaufman, "Collagen I Self-Assembly: Revealing the Developing structures that generate turbidity" *Biophysical J.*, vol. 106, no. 8, pp. 1822-1831, 2014.
- [11] S. L. Franz, S. Rammelt, D. Scharnweber and J. C. Simon, "Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials" *Biomaterials*, vol. 32, no. 28, pp. 692-709, 2011.