

03-018

COLLAGEN-BASED HYDROGELS WITH POTENTIAL APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

*Pérez-Puyana, Víctor ⁽¹⁾; Rojas-Sánchez, Ana ⁽¹⁾; Jiménez-Rosado, Mercedes ⁽¹⁾;
Guerrero, Antonio ⁽¹⁾; Romero, Alberto ⁽¹⁾*

⁽¹⁾ Universidad de Sevilla

Tissue Engineering emerged as a research field to solve problems arising in tissues and organs with the development of scaffolds, in which cell growth and proliferation takes place. Scaffolds are biomaterials with specific properties depending on their application. In this work, collagen-based hydrogels were developed to act as scaffolds with potential application in tissue engineering. To assess their applicability, the influence of different parameters involved in the manufacturing process (pH, gelation time, concentration of raw material, etc.) on the properties of hydrogels was analyzed. A design of experiments was carried out in order to evaluate the combined influence of the different parameters, indicating those that cause a greater influence on the structure of these biomaterials. The different elaborated systems were characterized by means of rheological (strain and frequency sweep tests) and morphological measurements (porosity evaluation and SEM microscopy). The results allowed selecting the most suitable conditions to obtain collagen-based hydrogels.

Keywords: collagen-based hydrogels with potential application in tissue engineering

HIDROGELES BASADOS EN COLÁGENO CON POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS

La Ingeniería de Tejidos surgió como un campo de investigación para resolver problemas derivados surgidos en tejidos y órganos, mediante el desarrollo de andamios en los que tiene lugar el crecimiento y proliferación celular. Los andamios son biomateriales con propiedades específicas según la aplicación en las que intervienen. En este trabajo se han elaborado hidrogeles basados en colágeno que pueden actuar como andamios con potencial aplicación en ingeniería de tejidos. Para evaluar su aplicabilidad, se analizó la influencia de diferentes parámetros involucrados en el proceso de fabricación (pH, tiempo de gelificación, concentración de materia prima, etc.) sobre las propiedades de los hidrogeles. Para ello, se ha realizado un diseño de experimentos con el que es posible evaluar la influencia combinada de los diferentes parámetros, indicando aquellos que causan una influencia mayor en la estructura de dichos biomateriales. La caracterización de los distintos sistemas elaborados se llevó a cabo mediante medidas reológicas (barridos de deformación y frecuencia) y morfológicas (medidas de porosidad y microscopía SEM). Los resultados permitieron seleccionar las condiciones más adecuadas para la obtención de hidrogeles basados en colágeno.

Palabras clave: colágeno; hidrogeles; diseño de experimentos; ingeniería de tejidos

Correspondencia: Víctor Manuel Pérez Puyana vperez11@us.es



©2020 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

La Ingeniería de Tejidos es un campo de investigación prometedor y multidisciplinar que incluye una combinación de biología, ciencia de materiales, química, biología molecular, ingeniería y medicina. El objetivo de la Ingeniería de Tejidos es preservar, recuperar y regenerar órganos o tejidos dañados mediante la combinación de células nativas, materiales biocompatibles y moléculas bioactivas (Aydogdu et al., 2018).

Los componentes principales de la Ingeniería de Tejidos son los andamios, estructuras tridimensionales (3D) en las que se insertan las células y factores de crecimiento y así, se garantiza el desarrollo y la diferenciación. El diseño adecuado de los andamios es vital para garantizar el éxito en el desarrollo del tejido (Pérez-Puyana et al., 2018). Teniendo todo esto en cuenta, los andamios deben cumplir varios requisitos:

- **Biocompatibilidad.** La propiedad fundamental que mide la aplicabilidad de los andamios es la biocompatibilidad. Se define como la cualidad de un material de ser compatible con el entorno biológico que le rodea, es decir, su capacidad para interactuar con los tejidos vivos sin causar daño. Además, se requiere que tanto el material en sí como los productos derivados sean biocompatibles y carezcan de toxicidad.
- **Bioactividad.** Deben ser capaces de formar una superficie que se unirá con el tejido nativo.
- **Propiedades mecánicas.** Sus propiedades mecánicas deben ser similares a las del tejido que será reemplazado. Las propiedades mecánicas de los materiales poliméricos dependen tanto de su estructura y composición, como de la frecuencia de aplicación de los esfuerzos y la temperatura.
- **Porosidad.** Los andamios deben tener poros interconectados para permitir el transporte exitoso de alimentos y oxígeno desde las células, así como la eliminación de residuos. Es esencial alcanzar un consenso con la porosidad, ya que mientras mayor es esta propiedad más favorable es la proliferación celular pero también se reducen las propiedades mecánicas de los andamios.
- **Biodegradabilidad.** Estas estructuras deben ser biodegradables y lentamente absorbibles, de manera que su velocidad de degradación sea similar a la de regeneración y extensión del tejido formado (Vukajlovic et al., 2019).

Durante la última década, los andamios hechos de hidrogeles se han considerado como potenciales candidatos para Ingeniería Tisuar. Esto se debe a su capacidad para imitar la matriz extracelular (ECM) natural de los tejidos nativos y su potencial para soportar la proliferación y supervivencia celular.

Los hidrogeles son sistemas tridimensionales (3D) formados por polímeros hidrófilos reticulados a través de enlaces covalentes o atracciones físicas intramoleculares e intermoleculares (El-Sherbiny y Yacoub, 2013). Además, dichos sistemas son capaces de absorber y retener una gran cantidad de agua. Esto se debe a los grupos hidrófilos que forman la red polimérica, lo cuales se hidratan al encontrarse en un medio acuoso, creando así la estructura del hidrogel (Hennink y van Nostrum, 2012). El origen de los hidrogeles es variado aunque particularmente, aquellos fabricados a partir de polímeros naturales, tienen grandes ventajas, como son la no toxicidad y la biodegradabilidad (Li et al., 2019).

Entre los polímeros naturales que pueden usarse para fabricar hidrogeles, el colágeno se ha vuelto popular debido a sus buenas propiedades (Aydogdu et al., 2018). Además, el colágeno

es uno de los principales componentes de la matriz extracelular (ECM) y posee una notable biocompatibilidad, biodegradabilidad y una baja inmunogenicidad; las cuales son propiedades que juegan un papel importante en permitir a la unión celular, la migración y la proliferación. Teniendo todo en cuenta, el colágeno se posiciona como potencial candidato para la preparación y producción de andamios (Si et al., 2019).

En este contexto, la contribución innovadora de este trabajo es el estudio de la influencia de algunos parámetros críticos que intervienen en el proceso de fabricación de hidrogeles, en particular: la concentración de materia prima (en este caso colágeno), el pH y el tiempo de gelificación. Con este objetivo, se realizó un diseño de experimentos que evaluase la influencia combinada de los parámetros mencionados sobre las propiedades mecánicas de los hidrogeles.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es analizar la influencia de la concentración de colágeno, del pH y del tiempo de gelificación sobre las propiedades de los hidrogeles para Ingeniería de Tejidos. Así, es posible estudiar cómo estos factores y su sinergia pueden afectar la aplicabilidad y las características deseadas de los hidrogeles.

Este objetivo global se ha conseguido a partir de los siguientes objetivos específicos:

- Realización de un Diseño Compuesto Central (CCD) a través de la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM), para obtener un modelo matemático que permita optimizar el proceso.
- Evaluación de la aplicabilidad de hidrogeles mediante medidas reológicas (barridos de deformación y frecuencia) y medidas morfológicas (porosidad y microscopía electrónica de barrido, SEM).

3. Metodología

3.1 Materiales

La fabricación de hidrogeles se realizó a partir de soluciones hechas de diferentes tampones con diferentes proporciones de colágeno. Cada uno de los tampones se preparó in situ, para asegurar un nivel de pH fijo. La proteína de colágeno utilizada para las soluciones fue colágeno tipo I de cerdo, suministrado por Essentia Protein Solutions (Grasten, Dinamarca). El contenido del mismo incluía un 92% de concentrado de proteína, un 6% de humedad, un 0,8 % de proteínas, un 0,7 % de lípidos y otros componentes minoritarios.

3.2 Fabricación de hidrogeles

Los hidrogeles se obtuvieron a partir de un proceso consistente en dos pasos. En primer lugar se prepararon disoluciones de colágeno que se centrifugaron a 12000xg durante 7 minutos a 4 °C. A continuación, las muestras se dejaron a 4 °C durante los diferentes tiempos de gelificación propuestos (0, 1 y 2 horas).

3.3 Caracterización de hidrogeles

3.3.1 Caracterización reológica

Los hidrogeles se evaluaron mediante ensayos de barrido de deformación y frecuencia a 25 °C en un reómetro de esfuerzo controlado AR 2000 (TA Instruments, EE. UU.). Los barridos de deformación se llevaron a cabo en un rango de deformación entre 0,10 y 100% con una frecuencia de 1 Hz. Este ensayo permite determinar el intervalo viscoelástico lineal, así como la deformación crítica. La deformación crítica es un parámetro fundamental, ya que una deformación inferior a la crítica permite al hidrogel deformarse sin alterar su estructura. Por otro lado, los barridos de frecuencia se realizaron en un rango de frecuencia entre 0,02 y 200 Hz, a una deformación del 1%, encontrándose dicha frecuencia dentro del intervalo viscoelástico lineal (es decir, por debajo de la deformación crítica).

3.3.2 Caracterización morfológica

La evaluación morfológica de los hidrogeles se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de crio-barrido (Crio-SEM) usando un Zeiss EVO (Zeiss, EE. UU.) a un voltaje de aceleración de 10 kV. Las muestras se enfriaron con nitrógeno líquido y se cubrieron con una película de Au en una máquina de recubrimiento por pulverización catódica de alta resolución (Leica, EE. UU.).

3.4 Metodología de Superficie de Respuesta (RSM)

El método de Superficie de Respuesta (RSM) es un grupo de técnicas estadísticas utilizadas para estudiar las relaciones entre las respuestas medidas (variables de salida) y los factores independientes (o variables de entrada) (Box et al., 1978). El RSM se compone de tres etapas principales:

- **Diseño de Experimentos.** Es la herramienta estadística que verdaderamente dirige y minimiza la experimentación que se necesita. Así, se consigue un modelo matemático preciso y robusto que relacione las variables de entrada y de salida.
- **Método de mínimos cuadrados.** Tras la experimentación, se ajustan los resultados al modelo matemático previamente seleccionado. El objetivo de este método es disminuir la diferencia entre el resultado del valor experimental y el predicho por el modelo.
- **Optimización.** Por último, una vez se dispone del modelo que describe el proceso en cuestión, se determinan las mejores condiciones de operación para la consecución de los objetivos (función objetivo). Para ello la superficie de respuesta del modelo debe contener al menos un punto crítico.

3.4.1. Diseño de Experimentos (DoE)

Para llevar a cabo el diseño de experimentos se propuso un diseño central compuesto (CCD) de dos factores.

En concreto, se tomaron como factores o variables de entrada la concentración de colágeno (definida como C) y el valor del pH. Además, este mismo diseño se repitió para tres tiempos de gelificación distintos (0, 1 y 2 horas). Los factores se analizaron en cinco niveles diferentes

cuyos valores extremos se han elegido de acuerdo a estudios previos. Estos valores extremos (“- α ” y “+ α ”), así como la interpolación codificada, se resumen en la Tabla 1:

Tabla 1. Valores mínimo y máximo para cada factor

	Valor mínimo (- α)	-1	0	+1	Valor máximo (+ α)
Concentración de colágeno (mg/mL)	5,0	7,2	12,5	17,8	20,0
pH	3,0	3,7	5,5	7,3	8,0

Las variables de salida consideradas se obtuvieron de las medidas reológicas, y fueron la deformación crítica y la viscosidad del hidrogel. Como se propuso un proceso de respuesta múltiple, fue necesario utilizar la función de deseabilidad, que es uno de los métodos clásicos para la optimización de procesos de respuesta múltiple en la industria (e-Handbook of Statistical Methods, 2003). De esta forma se consiguió analizar las dos variables de salida de forma conjunta.

Tabla 2. Matriz para el experimento CCD

Nº ensayo	Concentración de colágeno	pH
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	- α	0
6	+ α	0
7	0	- α
8	0	+ α
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

La matriz de diseño que indica la relación de las variables de cada uno de los ensayos realizados se muestra en la Tabla 2. Finalmente, es necesario recordar que esta experimentación se repitió para los tres tiempos de gelificación que se habían propuesto (0, 1 y 2 horas). Así, fue posible analizar la influencia del tiempo de gelificación sobre el hidrogel.

4. Resultados y Discusión

4.1 Metodología de la Superficie de Respuesta

A partir de las mediciones reológicas (barridos de deformación y frecuencia), se obtuvieron la deformación crítica y la viscosidad de cada hidrogel. Estas respuestas se usaron para estimar una variable de salida combinada llamada función de deseabilidad (denominada D). Esta función permite maximizar al mismo tiempo tanto la viscosidad como la deformación crítica. Después de llevar a cabo el Método de los mínimos cuadrados, el modelo matemático obtenido para la función de deseabilidad (D) fue:

- Para la muestra sin proceso de gelificación:

$$\hat{D} = 0,0865 + 0,0720 \cdot C - 0,0614 \cdot \text{pH} - 0,1093 \cdot C \cdot \text{pH} \quad (1)$$

- Para un tiempo de gelificación de 1h:

$$\hat{D} = 0,1289 + 0,1269 \cdot C - 0,0384 \cdot C^2 - 0,0580 \cdot \text{pH}^2 \quad (2)$$

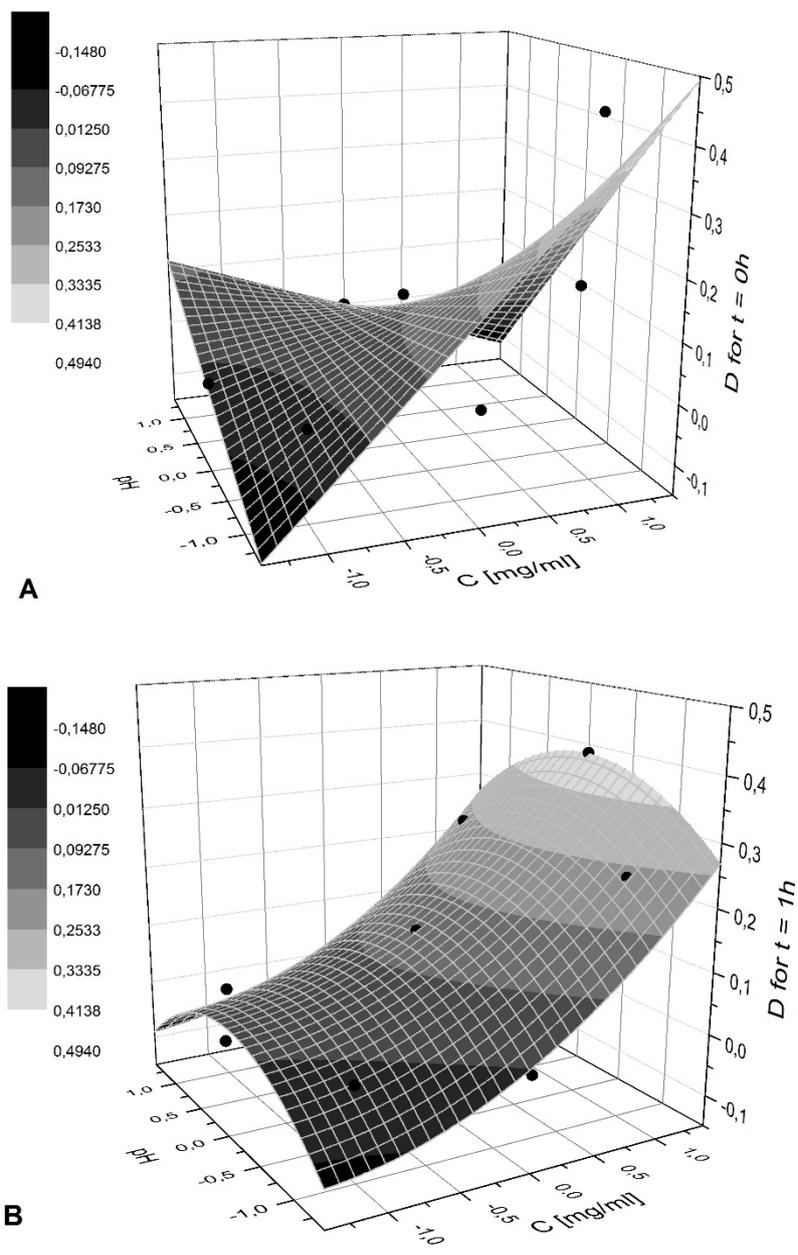
- Para un tiempo de gelificación de 2h:

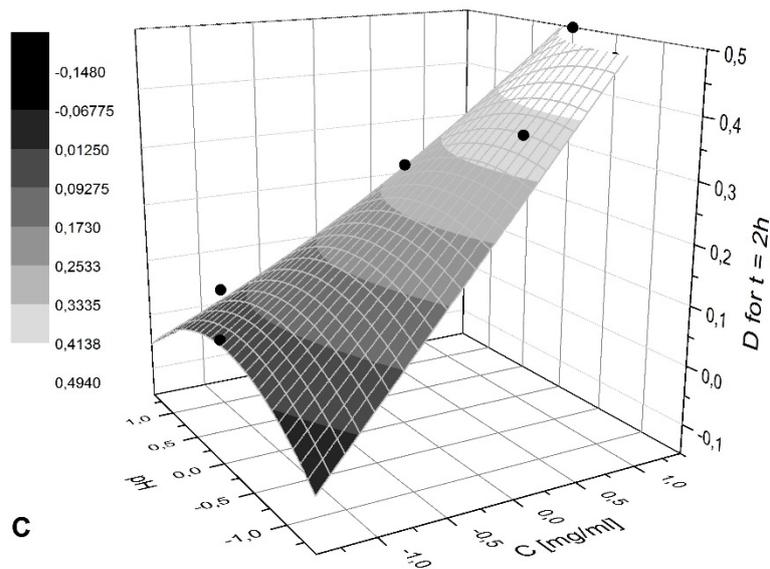
$$\hat{D} = 0,2839 + 0,1665 \cdot C - 0,0888 \cdot \text{pH} - 0,0646 \cdot C \cdot \text{pH} - 0,0534 \cdot \text{pH}^2 \quad (3)$$

Para la muestra sin proceso de gelificación y con un tiempo de gelificación de 2h, el modelo matemático muestra una interacción significativa entre la concentración de colágeno y el valor de pH. Esta interacción supone que la influencia conjunta de dichos parámetros sobre el resultado final es distinta a la influencia por separado. Esto es, hay un efecto sinérgico entre ambos parámetros.

Para analizar la relación entre el modelo obtenido y los valores reales de la función de deseabilidad, se han representado las superficies 3D de cada caso en la Figura 1. Los puntos negros sobre la superficie 3D representan cada uno de los puntos obtenidos en la experimentación, es decir, los valores reales obtenidos.

Figura 1. Superficie 3D para la función de deseabilidad: (A) Sin proceso de gelificación, (B) Tiempo de gelificación de 1 h y (C) Tiempo de gelificación de 2 h





Tras analizar las gráficas de la Figura 1, se puede decir que a medida que aumenta el tiempo de gelificación, la superficie 3D se vuelve más plana. También es interesante analizar que la tendencia en las Figuras 1B y 1C (después de cierto tiempo de gelificación) es similar, mientras que en la Figura 1A (sin considerar tiempo de gelificación después de la centrifugación) la tendencia es completamente diferente.

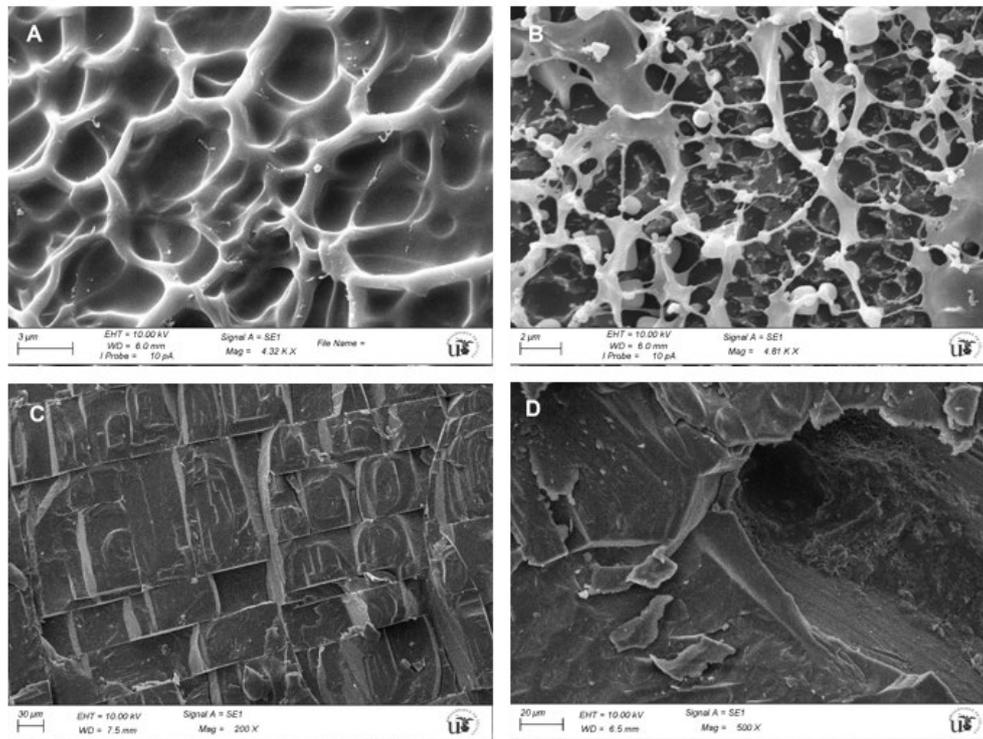
Por otro lado y a partir de los datos anteriores, se pueden obtener las condiciones que maximizan la función de deseabilidad, lo cual realmente implica la maximización de la viscosidad y la deformación crítica al mismo tiempo.

- Para las muestras sin proceso de gelificación, las mejores condiciones son una concentración de colágeno de 17,8 mg/mL (" +1" como valor codificado) y un pH de 3,7 (" -1" como valor codificado).
- Para el tiempo de gelificación de 1 h, las mejores condiciones son una concentración de colágeno de 20,0 mg/mL (" + α " como valor codificado) y un pH de 5,5 (" 0" como valor codificado).
- Para el tiempo de gelificación de 2 h, las mejores condiciones son una concentración de colágeno de 18,4 mg/mL (" +1,1" como valor codificado) y un pH de 4,3 (" -0,7" como valor codificado).

4.2 Medidas morfológicas

Para controlar las diferencias en la microestructura de los hidrogeles debidas al hecho de variar la concentración de colágeno o el pH, se realizó una microscopía de Crio-SEM. La Figura 2 muestra las imágenes obtenidas a través de Crio-SEM:

Figura 2: Imágenes de Crio-SEM de los hidrogeles procesados bajo diferentes condiciones: (A) Ensayo 3, (B) Ensayo 4, (C) Ensayo 7 y (D) Ensayo 8



Las imágenes 2A y 2B representan los ensayos 3 y 4, respectivamente. En ambos casos, el pH fue el mismo, 3,7 (que es "-1" como valor codificado). La concentración de colágeno fue de 17,8 mg/mL ("+ α" como valor codificado) para el ensayo 3 y 7,2 mg/mL ("- 1" como valor codificado) para el ensayo 4. Por lo tanto, parece que el uso de este nivel de pH conduce a estructuras más redondeadas, mientras que las diferentes concentraciones de colágeno afectan la compactación.

Las imágenes 2C y 2D pertenecen al ensayo 7 y 8, respectivamente. Dichos ensayos están referidos a la misma concentración de colágeno (12,5 mg/mL que es "0" como valor codificado). El pH considerado para el ensayo 7 fue 3,0 ("- α" como valor codificado) y 8,0 ("+ α" como valor codificado) para el ensayo 8. Tras analizar las imágenes, se observa que el uso de altas concentraciones de colágeno hace que las estructuras sean más densas. Por otro lado, los niveles de pH más bajos producen estructuras más regulares, mientras que los más altos tienden a originar estructuras irregulares.

5. Conclusiones

Como conclusión general, se ha estudiado la influencia de la concentración de colágeno y del pH, encontrando qué condiciones generan hidrogeles más adecuados para su aplicación en Ingeniería de Tejidos.

Los modelos matemáticos de respuesta combinada (viscosidad y deformación crítica de los hidrogeles) basados en la concentración de colágeno y el pH se han obtenido mostrando un gran ajuste. La influencia del tiempo de gelificación es clara, haciendo que la superficie sea menos curvada. Además, es interesante observar la existencia de un efecto sinérgico para

hidrogeles sin proceso de gelificación y con un tiempo de gelificación de 2h. Este término desaparece para el tiempo medio de gelificación.

La importancia relativa de cada factor (relación de colágeno y pH) también varía con el tiempo de gelificación. Cuando el tiempo de gelificación es el máximo considerado (2h), el número de factores que influyen en el modelo matemático es el máximo (C, pH, C·pH y pH²). Sin embargo, los factores más influyentes para los otros casos no son los mismos. Para el tiempo de gelificación igual a 0h, aparece el efecto combinado de C y pH (el efecto sinérgico mencionado anteriormente) y no hay términos cuadrados. Para el tiempo de gelificación igual a 1h, el efecto combinado de C y pH desaparece, pero se necesitan términos cuadrados.

Según las imágenes SEM, la influencia de la relación de colágeno y el pH también es clara. Niveles más bajos de pH conducen a hidrogeles con un mayor número de poros, así como tamaños de poros menores y estructuras más regulares. Por lo tanto, se puede concluir que para obtener una porosidad exitosa, son necesarios niveles más bajos de pH. Además, esta conclusión puede corroborarse con los datos obtenidos de la maximización de la función de deseabilidad (como se muestra en los resultados del análisis estadístico y la superficie 3D), ya que los máximos valores siempre se refieren a niveles bajos de pH. Por otro lado, los niveles más altos de concentración de colágeno conducen a estructuras más compactas, siendo siempre preferible mantener estos valores como se puede concluir también de las condiciones que maximizan la función de deseabilidad (siempre niveles altos de concentración de colágeno).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir finalmente que el mejor sistema es aquel obtenido utilizando altas concentraciones de colágeno y bajos niveles de pH (3,0).

Agradecimientos

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. RTI2018-097100-B-C21). Los autores agradecen su apoyo financiero. Los autores también agradecen al "Ministerio de Educación y Formación Profesional" por la beca predoctoral de M. Jiménez-Rosado (FPU2017 / 01718). Los autores también agradecen a los Servicios de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por conceder acceso y asistencia con los servicios de microscopía.

Referencias

- Aydogdu, M.O., Oner, E.T., Ekren, N., Erdemir, G., Kuruca, S.E., Yuca, E., Bostan, M.S., Eroglu, M.S., Ikram, F., Uzun, M., & Gunduz, O. (2018). Comparative characterization of the hydrogel added PLA/ β -TCP scaffolds produced by 3D bioprinting. *Bioprinting*, 46, 1-10.
- Box, G., Hunter, W., & Hunter, J. (1978). *Statistics for experimenter: An introduction to design, data analysis and model building*. USA: John Wiley & Sons.
- El-Sherbiny, I.M., Yacoub, M.H. (2013). Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Global Cardiology Science and Practice*, 38, 317-342.
- Hennink, W.E., van Nostrum, C.F. (2012). Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 223-236.

Li, L., Yu, F., Zheng, L., Wang, R., Yan, W., Wang, Z., Xu, J., Wu, J., Shi, D., Zhu, L., Wang, X., & Jiang, Q. (2019). Natural hydrogels for cartilage regeneration: Modification, preparation and application. *Journal of Orthopaedic Translation*, 17, 26-41.

NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. (2003). Obtenido el 9 de abril de 2020, desde <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/>

Perez-Puyana, V.M., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2018). Highly porous protein-based 3D scaffolds with different collagen concentrates for potential application in tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 47954, 1-10.

Si, J., Yang, Y., Xing, X., Yang, F., & Shan, P. (2019). Controlled degradable chitosan/collagen composite scaffolds for application in nerve tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*, 166, 73-85.

Vukajlovic D., Parker, J., Bretcanu, O., & Novakovic, K. (2019). Chitosan based polymer/bioglass composites for tissue engineering applications. *Materials Science & Engineering C*, 96, 955-967.

Objetivos de Desarrollo Sostenible

El objetivo de Desarrollo Sostenible que se persigue en este trabajo es “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades” (Objetivo 3):

