

# BIOMATERIALES: DESARROLLO DE ANDAMIOS PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS

**Rubio Valle, José Fernando\*;** Pérez Puyana, Víctor Manuel; Félix Ángel, Manuel; Romero García, Alberto

*TEP-229: Grupo de Tecnología y Diseño de Productos Multicomponentes. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.*

\*E-mail: [josfrubval@gmail.com](mailto:josfrubval@gmail.com)

## RESUMEN

El presente trabajo se centra en el desarrollo de andamios basados en colágeno (C) y/o quitosano (CH) mediante variaciones del método de fabricación basado en la creación de hidrogeles y posterior secado por liofilización. Con objeto de evaluar la composición y el método de fabricación de los andamios, se evalúan sus propiedades mecánicas mediante barridos de deformación y de frecuencia, así como su estructura y disposición de las fibras mediante porosimetría y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos demuestran que las propiedades de los andamios experimentan una fuerte dependencia tanto con la proporción de las materias primas (C y CH), así como con el método de fabricación. De hecho, se encuentra que se produce una sinergia relevante cuando se emplean sistemas con la misma proporción de colágeno y quitosano en su composición.

## PALABRAS CLAVE

Ingeniería Tisular, Biomaterial, Propiedades mecánicas, Porosidad, Microestructura.

## ABSTRACT

The present work focuses on the development of scaffolds based on collagen (C) and / or chitosan (CH) by variations of the manufacturing method by creation of hydrogels and subsequent freeze-drying. To evaluate the composition and method of manufacture of the scaffolding, its mechanical properties are evaluated by deformation and frequency sweeps, as well as its structure and arrangement of the fibers by means of porosimetry and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained show that the properties of the scaffolds experience a strong dependence both with the proportion of the raw materials (C and CH), as well as with the manufacturing method. In fact, it is found that a relevant synergy occurs when systems with the same proportion of collagen and chitosan in their composition are used.

## KEYWORDS

Tissue Engineering, Biomaterial, Mechanical properties, Porosity, Microstructure.

## **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

El término “Ingeniería Tisular” se acuñó en 1988 [1] definiéndose como un nuevo campo de investigación, de rápido desarrollo, cuyo objetivo es la fabricación de tejidos [2]. Tuvo que ser más adelante cuando se diera una definición más completa, siendo Reddi (2000) quien definió la Ingeniería Tisular (IT) como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismo y enfermedades (medicina regenerativa). De forma general, la Ingeniería Tisular es un campo interdisciplinar que precisa fundamentalmente de tecnología de células cultivadas, ingeniería de materiales para el desarrollo de estructuras 3D (andamios) que pueden imitar la estructura de un órgano y factores de crecimiento, que permiten el control preciso y continuo de las condiciones de crecimiento celular [3].

El presente trabajo se centrará en el desarrollo de andamios (scaffolds) para IT. Un andamio es una matriz principalmente polimérica, biodegradable y bioabsorbible cuya función principal es servir de plataforma de anclaje para la adhesión de células y permitir así su crecimiento [4]. El objetivo principal consistirá en el desarrollo de andamios mediante vía hidrogeles usando colágeno y quitosano como materias primas, evaluando la influencia de sus proporciones (composición); así como el efecto que tienen los diferentes métodos de fabricación (protocolos) en las propiedades globales finales. Además, se pretende alcanzar una relación entre las composiciones y métodos de fabricación con la estructura interna de la matriz porosa y sus propiedades mecánicas. Para alcanzar el objetivo global se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de diferentes métodos de fabricación de una matriz porosa vía hidrogeles basada en colágeno y quitosano que pueda servir de andamio para IT.
- Relación entre el método de fabricación y los porcentajes de colágeno y/o quitosano utilizados para los andamios con sus propiedades microestructurales y mecánicas; y caracterización de la morfología de la estructura creada (andamio) en relación a su porosidad y el tamaño de poros.

## METODOLOGÍA

### Materiales

Como materias primas se ha utilizado colágeno y quitosano. El colágeno procede de la empresa HENAN BOOM GELATIN CO.LTD (China), la ficha técnica indica que se trata de colágeno tipo I obtenido a partir de piel de pescado, con un porcentaje de materia proteica superior al 90%. El quitosano procede de la empresa SIGMA ALDRICH S.A. (Alemania), es un polisacárido de bajo peso molecular ( $PM= 130.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ). Como disolvente se ha utilizado ácido acético con un pH ácido de 3,2 [5] que solubiliza en gran medida y al mismo tiempo al colágeno y al quitosano.

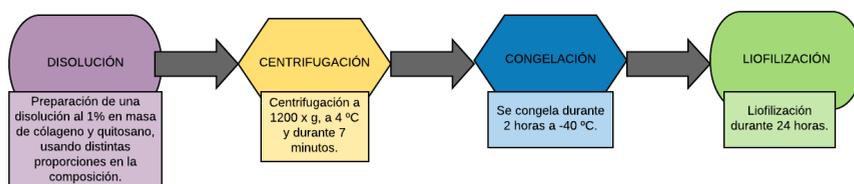
### Métodos de fabricación de andamios (protocolos)

Para la fabricación de los andamios constituidos de matrices biopoliméricas (colágeno y/o quitosano) se han utilizado tres protocolos diferentes. En todos los casos, basándonos en estudios previos se ha utilizado un 1% en peso de biopolímero, utilizando diferentes proporciones de colágeno y quitosano tal y como se recoge en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composiciones de los andamios en relación a los porcentajes utilizados de colágeno (C) y quitosano (CH) así como su referencia.

Composición	Referencia
100% C y 0% CH	100C-0CH
75% C y 25% CH	75C-25CH
50% C y 50% CH	50C-50CH
25% C y 75% CH	25C-75CH
0% C y 100% CH	0C-100CH

En la Figura 1 aparece el esquema de preparación de andamios siguiendo el procedimiento tradicional (protocolo 1). Con objeto de llevar a cabo comparaciones entre los diferentes protocolos, la secuencia de pasos que tienen en común se realiza con las mismas condiciones de operación.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del protocolo 1.

El protocolo 2 difiere con respecto al primero es que después de la centrifugación y antes de la congelación, se le aplica un tratamiento térmico. Es decir, la secuencia de pasos es la siguiente: en primer lugar, se prepara la disolución, se centrifuga, se realiza el tratamiento térmico seguidamente se congela y por último se liofiliza con el objetivo de eliminar el disolvente. El tratamiento térmico se basa en usar un baño térmico con agua destilada a unos 50 °C durante 2 horas con agitación. El hecho de que se use 50 °C y no más temperatura es para evitar la desnaturalización del colágeno.

El protocolo 3 es similar al protocolo 2 salvo con la diferencia de que se alternan los pasos de la centrifugación y del tratamiento térmico. El motivo de que se realice el tratamiento térmico antes que la centrifugación es para favorecer la solubilización completa del quitosano. Por consiguiente, la secuencia de pasos es la siguiente: disolución, tratamiento térmico, centrifugación, congelación y liofilización. Como en los casos anteriores las etapas tienen las mismas condiciones de operación.

## Caracterización de los andamios

En primer lugar, se realizó la caracterización mecánica de los andamios mediante un analizador dinámico-mecánico (DMA), modelo RSA3 (TA Instruments, USA) en modo de compresión, con un sensor de superficie circular (plato-plato) de 15 mm de diámetro. Se realizaron, en primer lugar, barridos de deformación entre 0,002 y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz para determinar el intervalo viscoelástico lineal. A continuación, se llevaron a cabo barridos de frecuencia desde 0,02 a 2 Hz y a una deformación dentro del intervalo viscoelástico lineal antes estudiado. Así, se comparó el módulo elástico y la tangente de pérdidas a 1 Hz ( $E'_1$  y  $\tan(\delta_1)$ , respectivamente) para realizar una adecuada comparación de los sistemas.

A continuación, se determinó la distribución de la porosidad en función del tamaño aparente mediante un porosímetro de mercurio a baja presión (Pore Master 60 GT) y el tamaño de poro mediante un modelo analítico. Este modelo proporciona un valor aproximado de la porosidad del soporte, pero no aporta ningún dato sobre tamaño o distribución de poros. La porosidad ( $\epsilon$ ) de los andamios se ha determinado a partir de la siguiente ecuación:

$$\epsilon(\%) = \left(1 - \frac{\rho_s}{\rho_m}\right) \cdot 100$$

Siendo  $\rho_s$  la densidad del andamio (obtenida pesando por triplicado andamios de los diferentes sistemas y calculando su volumen aprovechando que se han fabricado piezas geométricas) y  $\rho_m$  la densidad de la materia prima (colágeno y quitosano en función a su relación).

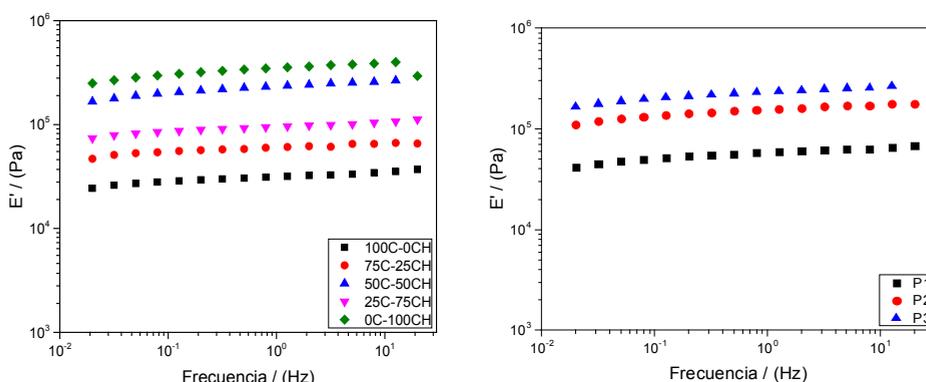
Por último, se observó la estructura y disposición de las fibras mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) para ello se utilizó el equipo Zeiss AURIGA. Los andamios al no ser conductores hay que realizarle un tratamiento de “sputtering” que no es más que recubrirlos generalmente con una capa muy fina de oro, lo que les otorga propiedades conductoras. Sin embargo, antes de llevar a cabo el “sputtering”, los andamios son tratados con vapor de osmio al 1% durante 8 horas. Este tratamiento previo permite la fijación del andamio para facilitar su medida.

### *Análisis estadístico*

Se ha realizado un estudio estadístico sobre todos y cada uno de los parámetros seleccionados. Para este estudio se ha llevado a cabo un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), utilizando tres replicados de cada medida de forma independiente. Seguidamente se han calculado una serie de parámetros estadísticos, entre ellos la media y la desviación estándar. Además, se ha realizado un test de comparación de medias para evaluar si hay o no diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer paso para caracterizar el andamio mecánicamente es realizar un barrido de deformación para elegir un valor de deformación dentro de la región viscoelástica lineal (LVE) y hacer el barrido de frecuencia con ese valor y así asegurar que la estructura permanece prácticamente inalterable durante el ensayo. Los valores de la deformación crítica obtenidos a partir de los barridos de deformación se muestran en la Tabla 2.



**Figura 2.** Evolución del módulo elástico ( $E'$ ) con la frecuencia para los andamios obtenidos a: (A) distintas proporciones en la composición de colágeno y quitosano, usando el protocolo 3 y (B) los andamios de la muestra 50C-50CH para los distintos tipos de protocolos.

La Figura 2 muestran la evolución del módulo elástico ( $E'$ ) en función de la frecuencia para las diferentes proporciones de colágeno (C) y quitosano (CH) así como para el sistema 50C-50CH para los diferentes protocolos. En la Figura 2A se observa, independientemente del sistema, que existe poca variación del módulo elástico con la frecuencia evidenciando valores muy estables que corresponden a un comportamiento tipo gel. Además, se observa cómo influye la composición y el porcentaje utilizado de colágeno y quitosano en las propiedades con mayores valores de  $E'$  cuanto mayor es el porcentaje de quitosano, salvo para el caso 50C-50CH. En la Figura 2B se compara los diferentes métodos de fabricación, se observa como el protocolo 3 conduce a módulos elásticos mayores que el protocolo 2; mientras que en el protocolo 1 evidencia menores valores.

Con objeto de comparar los diferentes comportamientos de los sistemas en función de las composiciones y de los protocolos en la Tabla 2 se muestran los valores de deformación crítica ( $\gamma_c$ ), de tangente de pérdidas (para ver indirectamente la repercusión de la componente viscosa) y el módulo de elástico a la frecuencia de 1 Hz ( $\tan(\delta)_1$ , respectivamente) así como los valores de porosidad.

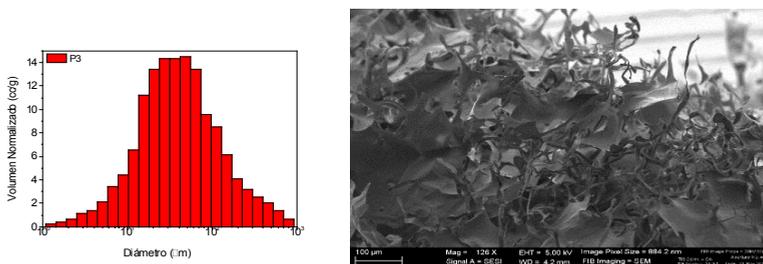
**Tabla 2.** Valores de la deformación crítica ( $\gamma_c$ ),  $\tan(\delta)$  a 1 Hz ( $\tan(\delta)_1$ ), el módulo elástico a 1 Hz ( $E'_1$ ) y porosidad para los sistemas elaborados con los distintos protocolos (P1, P2 y P3) y las distintas proporciones de colágeno (C) y quitosano (CH). Letras diferentes indican que hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

	Composición	$\gamma_c$	$\tan(\delta)_1$	$E'_1$ (MPa)	Porosidad (%)
<b>P1</b>	100C-0CH	0,19 <sup>a</sup>	0,085 <sup>b</sup>	14,34 <sup>a</sup>	99,15 <sup>a</sup>
	75C-25CH	0,33 <sup>b</sup>	0,058 <sup>a</sup>	35,54 <sup>c</sup>	99,05 <sup>a</sup>
	50C-50CH	0,46 <sup>c</sup>	0,065 <sup>a</sup>	55,79 <sup>d</sup>	98,90 <sup>b</sup>
	25C-75CH	0,37 <sup>b</sup>	0,061 <sup>a</sup>	37,50 <sup>c</sup>	99,10 <sup>a</sup>
	0C-100CH	0,31 <sup>b</sup>	0,095 <sup>c</sup>	67,94 <sup>d</sup>	98,70 <sup>b</sup>
<b>P2</b>	100C-0CH	0,25 <sup>a</sup>	0,094 <sup>c</sup>	25,50 <sup>b</sup>	98,27 <sup>c</sup>
	75C-25CH	0,38 <sup>b</sup>	0,057 <sup>a</sup>	62,02 <sup>d</sup>	98,12 <sup>c</sup>
	50C-50CH	0,58 <sup>d</sup>	0,085 <sup>b</sup>	72,00 <sup>e</sup>	97,96 <sup>d</sup>
	25C-75CH	0,41 <sup>c</sup>	0,074 <sup>b</sup>	59,54 <sup>d</sup>	98,03 <sup>d</sup>
	0C-100CH	0,42 <sup>c</sup>	0,065 <sup>a</sup>	80,53 <sup>f</sup>	97,62 <sup>e</sup>
<b>P3</b>	100C-0CH	0,37 <sup>b</sup>	0,107 <sup>c</sup>	26,52 <sup>b</sup>	98,05 <sup>d</sup>
	75C-25CH	0,42 <sup>c</sup>	0,076 <sup>b</sup>	75,01 <sup>e</sup>	98,25 <sup>c</sup>
	50C-50CH	0,68 <sup>e</sup>	0,065 <sup>a</sup>	87,52 <sup>f</sup>	97,13 <sup>f</sup>
	25C-75CH	0,39 <sup>c</sup>	0,057 <sup>a</sup>	64,12 <sup>d</sup>	97,77 <sup>e</sup>
	0C-100CH	0,44 <sup>c</sup>	0,076 <sup>b</sup>	95,11 <sup>h</sup>	97,61 <sup>e</sup>

En líneas generales se puede afirmar que a medida que se aumenta el porcentaje de quitosano aumenta el módulo elástico, el cual está íntimamente ligado a las propiedades mecánicas. Sin embargo, se produce una sinergia en las composiciones de 50% de quitosano y 50% de colágeno (50C-50CH). Esta sinergia se evidencia ya que, aunque no

llega a los niveles del sistema 0C-100CH sí presenta valores superiores a por ejemplo el 25C-75CH, con mayor porcentaje de quitosano. Además, también cabe resaltar que los valores de la deformación crítica son mayores en la proporción 50C-50CH y que en todos los sistemas elaborados la porosidad es superior al 97%. Por consiguiente, el protocolo 3 y la muestra de 50C-50CH será nuestra muestra de referencia ya que nos conduce a obtener mejores propiedades mecánicas en nuestros andamios.

A continuación, se observa las distribuciones del tamaño medio de poro de los andamios usando el protocolo 3 para la muestra de referencia 50C-50CH usando el Pore Master 60 GT; obtenemos un tamaño de poro medio de 51,2  $\mu\text{m}$ . Mediante SEM usando el equipo Zeiss AURIGA observamos la interconectividad de poros, la estructura y disposición de las fibras que poseen las muestras de referencia.



**Figura 3.** Figura 3A: Distribución del tamaño de poros para la muestra de referencia (50C-50CH) usando el protocolo 3. Figura 3B: Imagen de SEM de la muestra de referencia (50C-50CH) para el protocolo 3 usando el equipo Zeiss AURIGA.

## CONCLUSIONES

Como conclusión general, es evidente que se ha logrado una matriz proteica porosa (andamio o scaffold), con diferentes propiedades mecánicas en función de la proporción de colágeno (C) y quitosano (CH). Varios de ellos son prometedores para su uso como andamio para Ingeniería de tejidos. Concretamente, en función de los resultados obtenidos para los tres protocolos, se puede concluir que:

I. En general, un mayor porcentaje de quitosano conduce a andamios con mayores módulos elásticos. Se ha detectado un efecto sinérgico para el sistema 50C-50CH sobre las propiedades mecánicas, más específicamente este sistema muestra una mejora aparente en el módulo de almacenamiento, los valores de tamaño de poro y sobre todo en la deformación crítica, obteniéndose valores incluso superiores a los andamios fabricados únicamente con quitosano.

II. Las propiedades mecánicas se ven afectadas por el método de fabricación con el que se lleve a cabo la realización del andamio. Se puede afirmar que aplicar un

tratamiento térmico (protocolos 2 y 3) se produce un aumento considerable de las propiedades mecánicas, posiblemente debido a cierta mejora de la solubilidad y, sobre todo a la estructuración de cadenas proteicas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto recibido por parte del ministerio de economía, industria y competitividad (Ref: CTQ2015-71164P, MINECO/FEDER, UE). Los autores también agradecen a la Universidad de Sevilla por la beca predoctoral del V Plan Propio (VPPI-US) de Víctor M. Pérez Puyana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Skalak, R. y Fox, C.F., (1988). Tissue Engineering. *Proceedings for a Workshop held at Granlibakken*. California, USA.
- [2] Machluf, M. y Atala, A. (1998). Tissue engineering; emerging concepts. *Graft*, 1, pp. 1-8.
- [3] Collins, M.N. y Birkinshaw, C. (2013). Hyaluronic acid-based scaffolds for Tissue Engineering A review. *Carbohydrate polymers*, 92, pp. 1262-1279.
- [4] Hunkeler D., Cherrington A., Prokop A., y Rajotte R. (2001). Bioartificial Organs III. Tissue sourcing, immunoisolation and clinical trials. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 944.
- [5] Perez Puyana, V., Romero, A., y Guerrero, A. (2016). Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104A, pp. 1462–1468.