

P4

USO DE BIOPOLÍMEROS PARA LA ELABORACIÓN DE ANDAMIOS CON APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

Perez-Puyana, Víctor. Carreño-Carmona Isabel. Romero García, Alberto. Guerrero Conejo, Antonio.

Tecnología y diseño de Productos Multicomponentes (TEP-229). Departamento de Ingeniería Química. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Sevilla.

RESUMEN

El objetivo de la ingeniería tisular es reparar órganos y/o tejidos dañados. Se basa en tres pilares importantes: células, factores de crecimiento y andamios. Los andamios son matrices porosas que sirven de plataforma de anclaje para la adhesión de las células y ofrecen el ambiente idóneo para la liberación de células y sus moléculas iniciadoras y con ello su crecimiento. Además, el andamio debe mantener su integridad hasta que el tejido formado tenga suficiente integridad mecánica para sostenerse. Entre el material usado para el desarrollo de andamios destacan los biopolímeros: una proteína como el colágeno y un polisacárido como el quitosano, que aportan enorme biocompatibilidad. Uno de los retos en estos andamios es proporcionar las adecuadas propiedades mecánicas durante su utilización. Para ello, se lleva a cabo un proceso de entrecruzamiento, es decir, la unión de cadenas biopoliméricas entre sí. Estas uniones pueden realizarse mediante diferentes vías de entrecruzamiento: físicas, químicas y enzimáticas.

Palabras clave: *andamios, entrecruzamiento, biopolímeros, ingeniería tisular, propiedades mecánicas.*

ABSTRACT

The goal of tissue engineering is to repair damaged tissues. It is based on three important factors: cells, growth factors and scaffolds. The scaffolds are porous matrices which serve as platform for cell adhesion and offer the ideal environment for the release of cells and their primers and so, their growth. In addition, the scaffold must keep their integrity until the tissue formed has enough mechanical integrity. Among the possible material used for the development of scaffolds, biopolymers can be highlighted the biopolymers: a protein such as collagen and a polysaccharide such as chitosan, which provide enormous biocompatibility. One of the challenges in these scaffolds is to provide the appropriate mechanical properties during their use. To achieve it, an additional crosslinking process is carried out, so, the bond of different biopolymer chains. These bonds can be produced by different ways: physical, chemical and enzymatic pathways.

Keywords: *scaffolds, crosslinking, biopolymers, tissue engineering, mechanical properties.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La ingeniería tisular tiene como objetivo desarrollar tejidos biológicos. Es un campo interdisciplinario que aplica los principios y métodos de la bioingeniería, la ciencia de los materiales, la química y la medicina con el fin de desarrollar tejidos biológicos que restablecerán, mantendrán y mejorarán las funciones tisulares después del daño debido a una enfermedad o accidente por procesos traumáticos (Lin et al,2015). Los principios generales de la ingeniería de tejidos involucran la combinación de células vivas con un soporte natural / sintético o andamio para construir una matriz tridimensional que sea funcional, estructural y mecánicamente igual o mejor que el tejido que se reemplazará. En general, la ingeniería de tejidos se puede subdividir en tres pilares principales: inyección o trasplante de células aisladas, suministro de biomoléculas inductoras de tejido (por ejemplo, factores de crecimiento), y andamios tridimensionales (3D) (Jana et al, 2014). Se ha avanzado mucho en el campo de la ingeniería de tejidos, pero se necesita más trabajo para reemplazar órganos y tejidos. La fuente celular óptima, el diseño de andamios y biorreactores in vitro, así como el uso y desarrollo de tecnología de microfabricación para crear tejidos y órganos vascularizados están siendo investigados actualmente. La búsqueda de una célula madre multipotente o pluripotente adecuada en ingeniería tisular es un concepto emergente. Ciertamente, muchas áreas de investigación con células madre y sus aplicaciones clínicas potenciales

están asociadas con controversias; por lo tanto, es importante abordar claramente los problemas éticos, legales y sociales (Kim et al, 2005).

El andamio ideal para ingeniería tisular debe tener propiedades específicas durante todo el tiempo de su operación. En este sentido, deben proporcionar un soporte mecánico biocompatible, que no induzca una respuesta tisular adversa y que pueda soportar temporalmente la carga mecánica del tejido que se va a agregar. También debe tener una tasa de degradación apropiada, equivalente a la del proceso de regeneración tisular, y una porosidad interconectada con una distribución de tamaño de poro adecuada para promover la invasión celular y tisular, el tráfico de metabolitos y un área superficial específica alta para el anclaje celular (Van Vlierberghe et al, 2011). Por supuesto, debe promover el reconocimiento biológico, de una manera que apoye y promueva la adhesión celular, la migración, la proliferación y la diferenciación. Deben poseer estabilidad física a lo largo del tiempo en que están en contacto con el organismo. Estos requisitos de estabilidad deben mantenerse durante la esterilización o el almacenamiento y su implantación.

Los andamios se pueden desarrollar usando polímeros naturales o sintéticos. Hoy en día, los polímeros naturales (o biopolímeros) son ampliamente utilizados para la regeneración de órganos y tejidos ya que facilitan la adhesión y diferenciación de las células (Pich et al, 2012). Debido a su amplio uso, los biopolímeros se consideran una excelente subcategoría para el desarrollo de estas estructuras. Los biopolímeros pueden ser polinucleótidos (tales como los ácidos nucleicos ADN y ARN), polipéptidos (es decir, proteínas) o polisacáridos. Estos materiales poliméricos consisten en cadenas largas hechas de unidades repetitivas, unidas covalentemente, tales como nucleótidos, aminoácidos o monosacáridos.

Las materias primas en este estudio han sido colágeno y quitosano, ambas biopolímeros. Como estas materias primas tienen origen biológico no aportan mucha resistencia mecánica por lo que una posible solución es el uso de algún proceso de reticulación. Existen varios tipos tales como reticulación física (a través de luz ultravioleta o tratamiento deshidrotérmico) (Jana et al, 2014), reticulación física (aldehídos, carboimidias, etc.) (Bae et al, 2013) o reticulación enzimática (por ejemplo, con transglutaminasa) (Teixeira et al, 2012).

METODOLOGÍA

Materiales

La materia prima utilizado ha sido colágeno de origen porcino (proteína) (CG) y quitosano (polisacárido) (CH). El disolvente usado es ácido acético 0,05M. Como agentes reticulantes que actúan sobre el colágeno se han usado glutaraldehído (GA) y enzima comercial transglutaminasa (Tgasa).

Procesado de andamios

La obtención de estas matrices biopoliméricas (andamios) ha sido mediante el proceso de separación de fases, que consiste en la congelación (-40°C) de una disolución previamente preparada seguida de un proceso de liofilización durante 24 h (-80°C, <15Pa). La mayoría de andamios se han elaborado con el mismo protocolo excepto en el caso de añadir trasglutaminasa como agente reticulante que este procesado sufre una ligera modificación debido a que esta enzima tiene unas condiciones óptimas de actuación (50°C y agitación). Se han procesado andamios siguiendo una formulación colágeno-quitosano 50-50 (1% en peso). El esquema del proceso llevado a cabo puede verse en la Figura 1.



Figura 23: Esquema del procesado de andamios llevado a cabo con los distintos métodos de entrecruzamiento

Caracterización de andamios

- Ensayos Reológicos: Para ello, se han realizado ensayos de compresión dinámica para el estudio de las propiedades mecánicas de los andamios con un reómetro RSA3 (TA Instruments, USA). Se han llevado a cabo barridos de deformación (0.002-2%) para determinar el rango viscoelástico lineal y obtener así la deformación crítica de los andamios. A continuación, se han realizado barridos de frecuencia (0.02-20Hz) a una deformación específica para cada sistema dentro del intervalo lineal previamente obtenido.

- Porosidad (ϵ): La porosidad de los andamios se ha calculado a partir de la siguiente ecuación (Al-Munajjed et al, 2008):

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

siendo ρ_s la densidad del andamio (obtenida pesando por triplicado andamios de los diferentes sistemas y calculando su volumen) y ρ_m la densidad de la materia prima (colágeno y quitosano en función a su relación).

- Porosimetría de Mercurio: Se caracteriza el tamaño, densidad de poros e incluso su interconectividad mediante la aplicación de mercurio a baja presión en un porosímetro Pore Master 60 GT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 2 muestra la morfología de los andamios procesados con cada uno de los tres métodos de entrecruzamiento utilizados (físico, químico y enzimático).

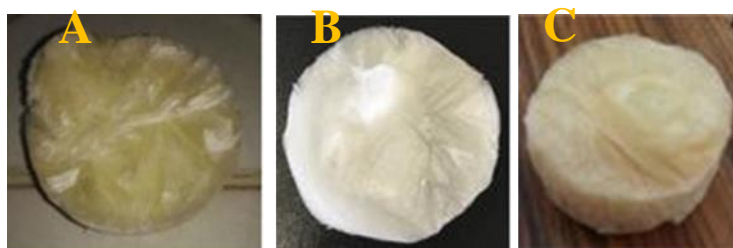


Figura 2: Imágenes macroscópicas de los andamios elaborados por diferentes métodos de entrecruzamiento.

Todos estos andamios tienen la misma formulación colágeno-quitosano 50-50, diferenciándose en la vía de reticulación usada: (A) reticulación física, (B) reticulación enzimática y, por último, (C) reticulación química.

Tabla 8: Porcentaje de porosidad y tamaño medio de poro de andamios por diversas vías de reticulación: física, química y enzimática.

Experimento	Porosidad (%)	Tamaño medio de poro (μm)
Reticulación Física	99,3 \pm 0,1	87,1
Reticulación Química	98,9 \pm 0,1	45,0
Reticulación Enzimática	99,4 \pm 0,1	38,6

Los datos obtenidos sobre la porosidad de los distintos sistemas elaborados se recogen en la tabla 1. El porcentaje de porosidad se mantiene ligeramente estable pero el tamaño de poro medio varía bastante según la vía de reticulación, siendo de mayor tamaño los poros producidos en la reticulación térmica. Este tamaño estará muy vinculado al tipo de célula que se quiera cultivar y sus factores de crecimiento.

Otra de las propiedades a tener en cuenta en los andamios son sus propiedades mecánicas que se observan en la Figura 3. En esta figura se observa el carácter elastomérico de los andamios sintetizados. Todos ellos presentan un comportamiento elástico por encontrarse E' por encima que E'' , teniendo la mayor constante de elasticidad el sistema con reticulación física y la menor el sistema con reticulación química.

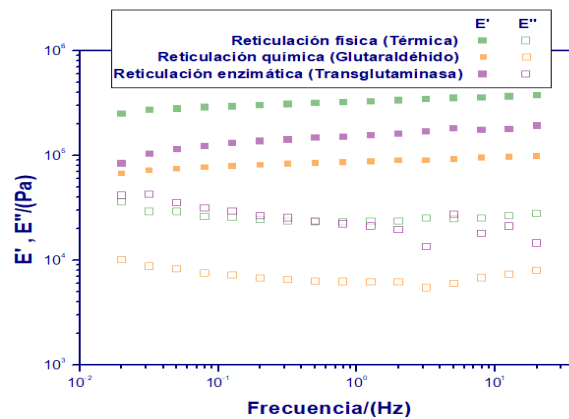


Figura 3: Evolución del módulo elástico (E') y viscoso (E'') de los andamios (1% en peso, relación 50:50 de CG:CH) obtenidos con diferentes métodos de entrecruzamiento: Físico, Químico y Enzimático.

En la Figura 4 se presenta la deformación crítica de cada uno de los sistemas. Este parámetro resulta interesante, ya que es la máxima deformación que podría experimentar sin llegar a romperse. En el momento de cultivar las células en estos soportes este parámetro es crucial. El andamio junto con el cultivo de células y sus factores de crecimiento se introducirán en un biorreactor, en el que se produce una cierta deformación sobre los andamios y, por este motivo, los andamios deben presentar cierta resistencia mecánica y alta deformación crítica. Como puede observarse, el sistema con mayor deformación crítica es el producido con un entrecruzamiento enzimático, duplicando el valor de deformación crítica si lo comparamos con el caso de reticulación física.

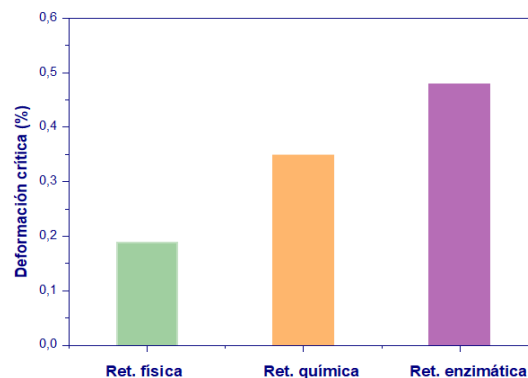


Figura 4: Deformación Crítica de los andamios estudiados (1% en peso, relación 50:50 de CG:CH) procesados con diferentes métodos de entrecruzamientos: Reticulación (Ret.) Física, Química y Enzimática.

CONCLUSIONES

Tras este estudio se demuestra la posibilidad de desarrollar andamios con 1% de colágeno (CG) y quitosano (CH) (relación CG:CH de 50:50), con adecuadas propiedades mecánicas y morfológicas.

La adición de agentes de reticulación (entrecruzamiento) químico o enzimático confiere a los andamios un mayor carácter elastomérico, como refleja el incremento en la deformación crítica. Aunque este incremento conduce a una moderada reducción en el módulo elástico y tamaño de poro medio, el incremento de la deformación puede que sea beneficioso en el uso del biorreactor donde una deformación dinámica se aplica durante el cultivo de las células.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte del proyecto financiado por el “Ministerio de Economía y Competitividad” del Gobierno Español (Ref. CTQ2015-71164-P, MINECO/FEDER, UE). Los autores agradecen a la Universidad de Sevilla la beca predoctoral de Víctor M. Pérez Puyana dentro del V Plan Propio de Investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lin, D., Yang, K., Liu, Y., Yuan, Y., Liu, C. (2015). A poly(glycerol sebacate)-coated mesoporous bioactive glass scaffold with adjustable mechanical strength, degradation rate, controlled-release and cell behavior for bone tissue engineering. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 131, 1-11.
2. Jana, S., Tefft, J., Spoon, B., Simari, R. (2014). Scaffolds for tissue engineering of cardiac valves. *Acta Biomaterialia*, 10, 2877-2893.
3. Kim, K., Evans, G. (2005). The Future of Stem Cells. *Topics in Tissue Engineering*. 2, Capítulo 11.
4. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. (2011). Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromol.*, 12(5), 1387-1408.
5. Pich, A., Richtering, W. 2012. Polymer Nanogels and Microgels. *Polymer Science*, 6, 309-350.
6. Bae, H., Wang, L., Kurisawa M. (2013). Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *Journal of Materials Chemistry B*, 40, 5371-5388.
7. Teixeira, L., Feijen, J., Van Blitterswijk, C., Dijkstra, P., Karperien, M. (2012). Enzyme-catalyzed crosslinkable hydrogels: Emerging strategies for tissue engineering. *Biomaterials*, 33, 1281-1290.
8. Al-Munajjed, AA., Hien, M., Kujat R., Gleeson, JP., Hammer, J. (2008). Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19, 2859–2864.