

Síntesis y caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* de hidrogeles de colágeno-hidroxietilcelulosa para ingeniería tisular.

Melanie Guadalupe Franco-Martínez,^a, Jesús Alejandro Claudio-Rizo^{a*}, María Ileana León-Campos^a, Denis Aidee Cabrera-Munguía^a

^aFacultad de Ciencias Químicas, Materiales Avanzados, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. Venustiano Carranza 935, República, Saltillo, Coah. 25280, México.

*jclaudio@uadec.edu.mx

Resumen: El estudio evaluó hidrogeles de colágeno-hidroxietilcelulosa (C HEC) para su aplicación en ingeniería tisular. Los estudios incluyeron pruebas de caracterización mediante espectroscopia infrarroja y microscopia electronica de barrido (SEM); y ensayos de reticulación, actividad metabólica y proliferación. Resultados revelaron una influencia positiva de HEC en la apariencia de los hidrogeles. La estructura exhibió fibras con poros interconectados, beneficiosos para el crecimiento celular. La reticulación fue más efectiva en hidrogeles sin HEC y en el hidrogel que incluye 20 %masa de HEC (C HEC20). La capacidad de hinchamiento aumentó con el contenido de HEC, destacándose C HEC60. El crecimiento celular fue favorecido en hidrogeles con un contenido de 60 %m de HEC. Estos hallazgos sugieren que los hidrogeles de colágeno-HEC tienen potencial en ingeniería tisular.

Introducción.

Un hidrogel es una matriz polimérica reticulada que tiene la capacidad de hincharse en agua para formar una red tridimensional. Esta red tridimensional es una estructura en la que las cadenas de poliméricas se entrelazan y retienen agua u otros líquidos en su interior, lo que le confiere propiedades únicas. Además, presenta versatilidad de formulación gracias a que pueden ser sintetizados a partir de una amplia gama de polímeros tanto naturales como sintéticos, lo cual distingue a los hidrogeles de otros materiales poliméricos [5].

El presente trabajo se enfoca en diseñar hidrogeles de colágeno y HEC. La fácil manipulación y regulación de las características estructurales y propiedades de los hidrogeles a base de colágeno los hace adecuados para diversas aplicaciones en campos como la biomedicina, la medicina regenerativa y la agricultura [2]. Las propiedades fisicoquímicas de un hidrogel, tales como la velocidad de degradación, su capacidad de hinchamiento, reticulación y biocompatibilidad; pueden ser modificadas mediante la adición de diferentes percursoros o agentes gelificantes, tales como la

hidroxietilcelulosa mediante un proceso de formación de redes poliméricas semi-interpenetrantes [1].

La hidroxietilcelulosa es una forma de celulosa derivada que presenta una serie de propiedades beneficiosas, incluyendo biocompatibilidad, capacidad de descomposición natural, ausencia de toxicidad, solubilidad en agua y afinidad por ella. Estas cualidades hacen que HEC tenga un amplio rango de aplicaciones en diversos campos, como la industria biomédica, la fabricación de pinturas, la mejora de la calidad del suelo en la agricultura, procesos de deshidratación de carbón, la producción de cosméticos, la elaboración de absorbentes, el tratamiento de aguas residuales y la fabricación de membranas para geles de electrolitos [4].

En este proyecto se describió la síntesis de hidrogeles de colágeno-HEC con potencial aplicación en ingeniería tisular. La evaluación de las propiedades fisicoquímicas se evaluó mediante espectroscopia Infrarroja por transformada Fourier (FTIR) y microscopia electronica de barrido (SEM). También se determinó el hinchamiento máximo de los

hidrogeles sintetizados, así como su reticulación.

Además, se realizó el ensayo de reticulación usando ninhidrina. Para la evaluación de la biocompatibilidad *in vitro* usando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) así como el ensayo de proliferación con monocitos y fibroblastos.

Parte experimental.

Materiales.

Se sintetizaron hidrogeles semi-IPN a base de colágeno-poliuretano e hidroxietilcelulosa. Se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) en un microscopio TOPCON SM-510 operando a 10 kV. Se examinó la biocompatibilidad *in vitro* mediante ensayos con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Sky Thermo Scientific [3]. e evaluó la proliferación de células de fibroblastos y monocitos, las observaciones se realizaron utilizando un microscopio VELAB VE146YT.

Resultados y discusión.

Estudio de la estructura química por espectroscopia infrarroja

El proceso de polimerización químico por el cual fueron formados los hidrogeles se estudió por espectroscopia infrarroja, con la finalidad de relacionar los cambios estructurales de los componentes de los hidrogeles. En la figura 1, se presentan los espectros para cada tipo de formulación. Todos los espectros presentan las bandas de vibración de los enlaces -OH y -NH alrededor de 3600 cm^{-1} , -CH a 2700 cm^{-1} , carbonilo de urea relacionado con el proceso de reticulación de las cadenas de colágeno a 1720 cm^{-1} , carbonilo de amida I y amida II a 1630 y 1500 cm^{-1} , respectivamente, vibración en el plano del enlace C-N a 1450 cm^{-1} , -CH en el plano a 1240 cm^{-1} , enlaces glucosídicos -C-O-C a 1100 cm^{-1} y vibración de C-H asociado con prolina e hidroxiprolina a 880 cm^{-1} .

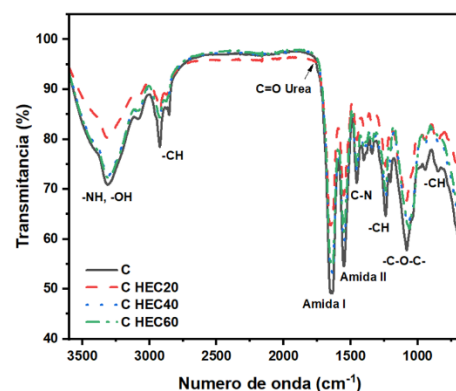


Figura 1. Espectros infrarrojos de los hidrogeles

El incremento en el contenido de HEC en la estructura del hidrogel se asocia con una disminución en la intensidad de las bandas de los enlaces -CH en el plano, los cuales están relacionados con una estructura doble helicoidal típica del colágeno, indicando que las cadenas lineales de HEC se ocluyen entre las fibras de colágeno, generando un sistema semi-IPN caracterizado por una morfología fibrilar con gránulos de HEC dispersos en la matriz fibrilar. No hay evidencias de formación de enlaces de reticulación química entre las cadenas de colágeno con las de HEC, lo cual es indicio de que las cadenas poliméricas interaccionan entre sí por interacciones de corto alcance como lo son puentes de hidrogeno mayoritariamente.

Microestructura de los hidrogeles

La morfología de los hidrogeles fue inspeccionada usando microscopia electrónica de barrido (SEM). Las micrografías se presentan en la figura 2. Todos los hidrogeles son caracterizados por una matriz fibrilar con porosidad interconectada, lo cual es típico para el arreglo molecular del colágeno. El polisacárido HEC es apreciado como gránulos ocluidos en esta matriz fibrilar. Al incrementar el contenido de HEC se aprecia un incremento en las regiones granulares y una afectación en la porosidad interconectada de la matriz fibrilar. Este tipo de morfología simulan un andamio que podría biomimetizar a la matriz extracelular permitiendo desarrollar las funciones biológicas básicas de las células que en ellos interactúan.

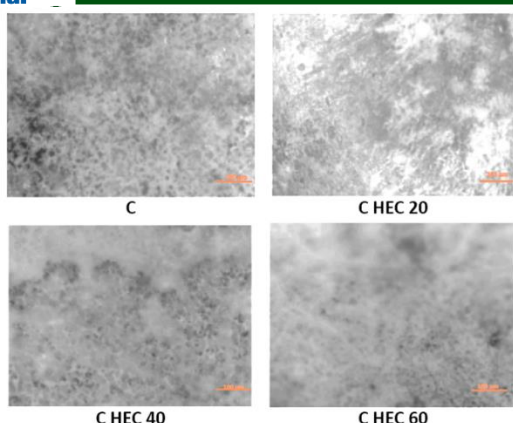


Figura 2. Microestructura de los hidrogeles para aplicaciones de ingeniería tisular

Determinación del grado de reticulación de los hidrogeles

El efecto que tiene el contenido de HEC en la reticulación del hidrogel fue evaluado mediante el ensayo de ninhidrina. En este ensayo se determinan los grupos amino primarios del colágeno que no están reticulados fisicoquímicamente para determinar de manera indirecta el grado de entrecruzamiento del hidrogel. En la figura 3 se presentan los resultados en este sentido.

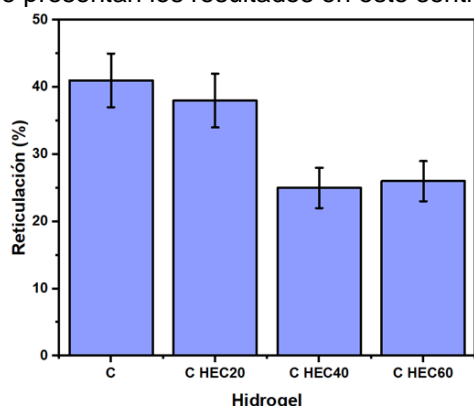


Figura 3. Índices de reticulación de los hidrogeles de colágeno-hidroxieltilcelulosa

El incremento en el contenido de HEC tiende a disminuir la reticulación de las cadenas de colágeno con el agente reticulante; los gránulos de HEC generan zonas de repulsión molecular y estérica que evitan el entrecruzamiento de las cadenas de colágeno. Un contenido del 20 %m de HEC no afecta drásticamente la reticulación de la matriz. La disminución en la reticulación del

hidrogel afecta propiedades como el hinchamiento, degradación y biocompatibilidad. La disminución de las bandas de vibración relacionadas con la estructura helicoidal del colágeno, inspeccionadas por espectroscopia infrarroja se relacionan con la pérdida de reticulación al incrementar el contenido de HEC.

Capacidad de hinchamiento de los hidrogeles

Un hidrogel es una matriz polimérica reticulada que tiene la capacidad de absorber miles de veces su masa seca en agua. Este ensayo tiene como objetivo medir la cantidad de agua que cada matriz en estado hidrogel puede contener en su estructura química. En la figura 4 se presentan los resultados. El incremento en contenido de HEC promueve mayor absorción de agua en la estructura del hidrogel, indicando una relación directa en el grado de hinchamiento con respecto al contenido de este polisacárido.

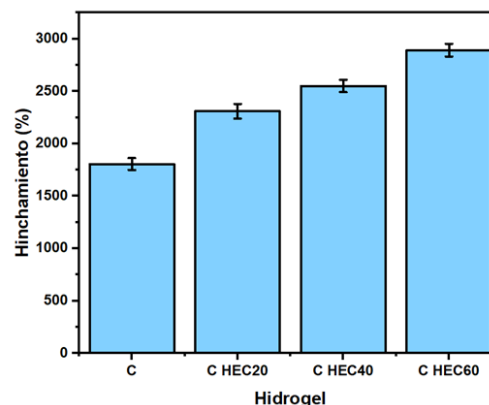


Figura 4. Hinchamiento máximo de los hidrogeles semi-IPN

Valores de hinchamiento de 2780 % para el hidrogel C HEC 60 es registrado, indicando un comportamiento de superhinchamiento. Esta mejora en el hinchamiento se relaciona con la alta presencia de enlaces -OH en la estructura de HEC propiciando la captación de moléculas de agua por puentes de hidrogeno, por otra parte, el incremento en el tamaño granular ocasionado al incrementar el contenido de HEC promueve un mayor volumen de poro en el andamio semi-IPN también propiciando una mayor captura de

moléculas de agua al interior de la matriz polimérica.

Actividad metabólica de monocitos y fibroblastos en los hidrogeles

El metabolismo de células de monocitos y fibroblastos creciendo sobre los hidrogeles bajo evaluación fue determinado mediante ensayos de reducción de sales de tetrazolio (MTT). Las células con una activación metabólica relacionada con la composición química del medio presentaran mayor capacidad para reducir estas sales. Los resultados se presentan en la figura 5.

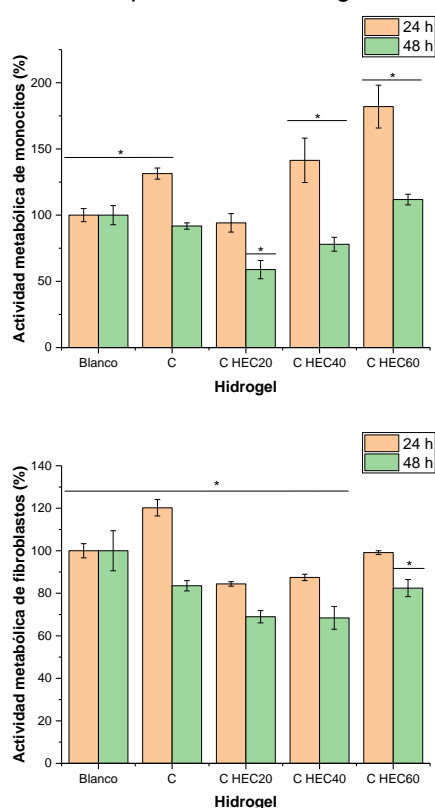


Figura 5. Ensayos MTT para células animales creciendo en los hidrogeles de C HEC

A las 24h de incubación, los monocitos sobre el hidrogel la composición de 60 %m muestran una superestimulación, sin embargo, las células se adaptan a su composición y disminuyen su actividad metabólica tras las 48 h de incubación. Los hidrogeles con concentraciones más bajas de HEC también presentan incrementos moderados, aunque menores.

Para el caso de los fibroblastos no se observa un incremento significativo en la actividad metabólica, sin embargo, de entre las composiciones la que se mantiene mas cercana al control es el hidrogel de 60 %m. Estos resultados indican que no hay efectos citotóxicos que disminuyan significativamente la actividad metabólica de los monocitos o fibroblastos cuando están en contacto con estos nuevos materiales. La biomimetización de la morfología de estos hidrogeles con la matriz extracelular asegura una estimulación de la actividad metabólica celular, especialmente en monocitos, lo cual puede ser aprovechado para aplicaciones en la regeneración tisular o biomedicina.

Proliferación de monocitos y fibroblastos en los hidrogeles

La proliferación celular es el crecimiento celular y es un proceso requerido para la formación de un tejido específico. El monitoreo de la proliferación de monocitos y fibroblastos fue evaluado mediante microscopia epifluorescente usando rodamina-B para los fibroblastos y fluoresceína para los monocitos como agente de tinción de membrana activas. Las micrografías de la proliferación de las células en contacto con los hidrogeles de colágeno-hidroxietilcelulosa se muestran en la figura 6.

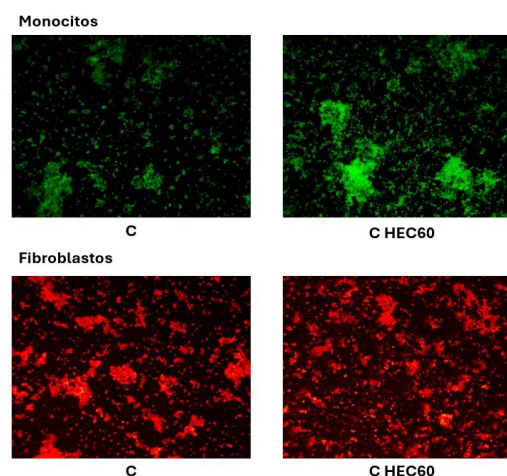


Figura 6. Ensayo de proliferación de células animales creciendo sobre los hidrogeles.

Los resultados indican que la composición de los hidrogeles permite la proliferación de células de monocitos y fibroblastos. Esto es apreciado como poblaciones densas de

celulas rojas y verdes dispersas en la superficie de los hidrogeles. No hay evidencia de que las superficies bajo estudio presenten limitación de esta función biológica. El contenido de 60% m de HEC promueve un mayor efecto proliferativo.

Conclusiones.

El incremento en el contenido de HEC mejoró la apariencia y manejabilidad de los hidrogeles, permitiéndoles adquirir la forma del molde. La HEC también influyó en la capacidad de hinchamiento, destacándose C HEC60 con un 2780%. Los hidrogeles C HEC60 favorecieron especialmente la actividad metabólica de células de monocitos. Además, los hidrogeles con un contenido del 60% m de HEC promovieron la proliferación celular, sugiriendo su utilidad en aplicaciones relacionadas con la ingeniería tisular.

Referencias.

1. Alía, E. (2007) Hidroxietilcelulosa: alternativa para lograr hidrogeles estables frente a principios activos ácidos. Formulación magistral recursos tecnológicos, Farmacia Espacio de Salud, 21(11): 56-58
2. Claudio-Rizo, J. J., Becerra-Rodríguez, J. J., Cano-Salazar, L. F.,

& Flores-Guía, T. E. (2019). Recent Advances in the Synthesis and Applications of Collagen Based Hydrogels: A Review. Mediterranean Journal of Basic and Applied Sciences (MJBAS), 3(2): 54-98.

3. Mendoza, J. J., Franco-Martínez, M. G., Claudio-Rizo, J. A., Cabrera-Munguia, D. A. "Zn-based Metal-Organic Frameworks (MOFs) Incorporated into Collagen-Polysaccharide-based Composite Hydrogels for Their Use in Wound Healing". Asian Journal of Basic Science & Research. Vol. 5, No. 1, p. 41-54. 2023
4. Noreen, A., Zia, M. K. (2020). A review on grafting of hydroxyethylcellulose for versatile applications, International Journal of Biological Macromolecules, 150: 289-303
5. Overstreet D J, Dutta D, Stabenfeldt S E, Vernon B L. (2012). Injectable hydrogels. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 50(13): 881-903.