

Efecto de la aplicación de hidrogeles de colágeno, oligouretano y sílice en la curación de heridas cutáneas

M.C. Lona Ramos¹, B. Mendoza Novelo^{1*}, J.J Delgado García¹
L.E. Castellano Torres¹

¹Departamento de Ingenierías Química, Electrónica y Biomédica, DCI, Universidad de Guanajuato, León, México
bmnovelo@dcu.ugto.mx

Resumen— El tratamiento de heridas cutáneas suele enfocarse en lograr un cierre rápido y una cicatriz funcional y estéticamente satisfactoria. En el presente trabajo se evaluó la capacidad para modular el proceso de curación cutánea e inducir una regeneración, haciendo uso de un hidrogel compuesto de colágeno tipo I entrecruzado con oligouretano y recubierto con partículas de sílice coloidal. Los hidrogeles de colágeno se obtuvieron a partir de tendón de Aquiles bovino (TAB) descelularizado. Estos se entrecruzaron con prepolímero de poliuretano, y a la vez que se cargaron con sílice. Se aplicaron, como resultado de una gelificación *in situ*, sobre la cama de heridas cutáneas en ratas Wistar. Los resultados indicaron que después de 14 días el cierre de herida alcanzó 97.7±3.2% al usar hidrogeles que contienen sílice. Asimismo, se encontró un mayor ordenamiento de fibroblastos, incremento de matriz extracelular (ECM) madura, presencia de anexos cutáneos, neovascularización y una mayor expresión del TFG-β. Mostrando con ello una tendencia a cicatrizar más rápido que el control y el resto de los materiales. En consecuencia, estos hidrogeles podrían ser de gran utilidad en la ingeniería de tejidos suaves, en particular en el control o aceleración de la curación de heridas cutáneas.

Palabras clave— Colágeno, cicatrización, hidrogel, poliuretano, sílice.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un especial interés en el estudio de biomateriales que modulen la respuesta del huésped, después de la implantación, para inducir un proceso regenerativo por encima de una repuesta típica de cicatrización. Los hidrogeles tienen especial interés debido a que su estructura de red tridimensional (3D) tiene la capacidad de retener grandes cantidades de agua, encapsular células o moléculas bioactivas y facilidad para transferir nutrientes [1]. En particular, los materiales a base de colágeno son una alternativa en el diseño de sistemas para favorecer la curación de heridas cutáneas [2]. Esto, en parte debido a que es un biopolímero biocompatible y biodegradable [3]. Sin embargo también es necesario el uso de entrecruzamientos químicos para mejorar su estabilidad estructural y mecánica [4] ya que puede ser degradado en diferentes entornos biológicos. El uso de oligouretanos como entrecruzantes de colágeno en estado gel permite que células como fibroblastos y macrófagos se mantengan

viabiles en cultivos *in vitro* [5]. Por otro lado, la sílice se ha asociado con la capacidad de estimular la polarización de la respuesta de macrófagos de un fenotipo proinflamatorio a uno antiinflamatorio en un cultivo 3D sobre hidrogeles de colágeno-oligouretano [6]. Por lo tanto, en este trabajo se presentan los resultados de un estudio *in vivo* con el fin de evaluar si la cicatrización cutánea puede mejorarse mediante la aplicación de hidrogeles de colágeno tipo I modificados con poliuretano, sintetizado a partir de diisocianato de L-lisina (LDI) y poli(etilén glicol) (PEG), y sílice derivada de tetraetilortosilicato.

II. METODOLOGÍA

1) *Obtención de la solución de colágeno y preparación de los hidrogeles*: El TAB se sometió a un proceso de descelularización mediante su agitación en una solución de Tritón X-100 (0.1%), y tratamiento con nucleasas (DNasa y RNasa) [7]. El contenido residual de ácido desoxirribonucleico (DNA) y de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) se determinó en el TAB descelularizado mediante técnicas espectrofotométricas. A partir del TAB descelularizado, se obtuvo la solución de colágeno como resultado de una extracción ácido-enzimática [7]. La concentración de proteína en la solución se estimó por el método de ácido bicinonínico (BCA), y la presencia del tropocolágeno como la proteína mayoritaria en la solución se validó por electroforesis SDS-PAGE. La formación del hidrogel se indujo al cambiar el pH (de 3 a 7) de la solución por la adición de un búfer de fosfato salino (PBS, 10X), y al vaciar la mezcla sobre la cama de la herida, como se describe en la siguiente sección. En el caso de los hidrogeles modificados, previo a la adición de PBS, se adicionó el entrecruzante y el entrecruzante con sílice, de acuerdo con un método previamente reportado [7]. Tres diferentes hidrogeles fueron comparados: colágeno (Col), colágeno entrecruzado con oligouretano (Col+LDI), y colágeno entrecruzado y con partículas de sílice (Col+LDI/Si).

2) *Proceso quirúrgico*: Las 12 ratas Wistar (de aprox. 400 g.) usadas en este estudio fueron suministradas por el bioterio de la Universidad de Guanajuato campus León. Estas fueron separadas en cuatro grupos que correspondieron con los cuatro lapsos de tiempo estudiados

(1, 2, 6 y 14 días). Los animales se sometieron a anestesia general por inhalación de sevoflurano. Entonces, el pelo en el área de cirugía fue retirado, seguido de una limpieza con yodo povidona (Isodine) y de la aplicación de anestesia vía parenteral de manera local con lidocaína. Cuatro incisiones se realizaron con ayuda de un bisturí de aproximadamente 1 cm² en el dorso de cada rata, seguido de un lavado con solución salina. Finalmente, los tres diferentes hidrogeles se vaciaron sobre la cama de la herida, antes de su completa gelificación, de manera aleatoria. Una de las heridas fue tratada con PBS, como blanco.

3) *Análisis del proceso de curación*: Las heridas fueron fotografiadas a diferentes tiempos para determinar el área de cierre con ayuda del programa “ImagenJ Launcher”. Al final de la evaluación, los cuatro tejidos de cicatrización (los tres hidrogeles y el blanco) se recuperaron para su análisis. En cada uno de ellos se realizaron cortes histológicos y tinciones con H&E, así como la extracción y cuantificación de la proteína total, y la cuantificación del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y del factor de necrosis tumoral (TNF- α), involucrados en el proceso de curación de heridas, por medio de ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).

4) *Análisis estadístico*: El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianzas de una vía (ANOVA). Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación entre las medias de datos. Los resultados se consideraron significativamente diferentes en los valores de *P* inferiores a 0.05 y se presentan como media \pm desviación estándar (D. E.).

III. RESULTADOS

A. Caracterización de la solución de colágeno y formación de los hidrogeles

El proceso de descelularización empleado removió hasta en un 88.42 \pm 4.5% el contenido de DNA en el tejido descelularizado, teniendo un porcentaje final de 1.3 \pm 1.1% en la solución de colágeno (Fig. 1A). El contenido de GAGs disminuyó con la descelularización y con el proceso de extracción de colágeno, sin embargo, se retuvo un 33.3% \pm 10.7% en la solución empleada para la formación de los hidrogeles (Fig. 1B). La concentración de proteína presente en la solución fue de 7.35 \pm 0.5 mg/mL, por lo que la gelificación de los hidrogeles se efectuó en un intervalo de 5 a 7 min. Este tiempo se redujo con la incorporación de alguno de los entrecruzantes empleados. El ensayo de electroforesis mostró las tres bandas características del colágeno tipo I, las que corresponden a las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y a la subunidad β a 128 kDa, 112 kDa y 238 kDa, respectivamente (Fig. 1C).

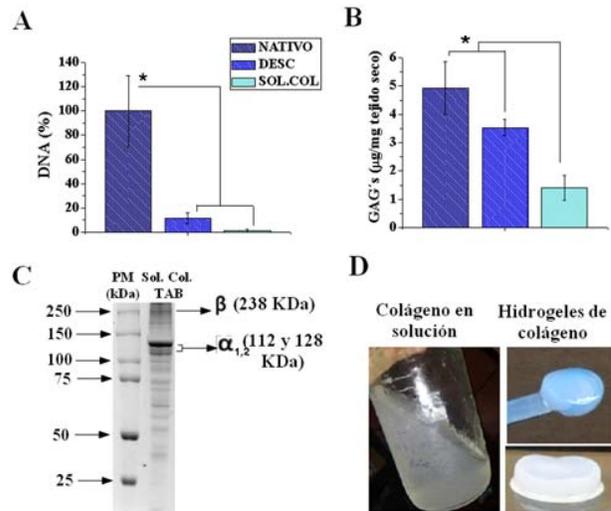


Fig. 1. Caracterización de solución de colágeno y formación de hidrogeles. A) Porcentaje de DNA residual en el tejido descelularizado y en la solución de colágeno. B) Contenido de GAGs en tejidos y solución. Los resultados muestran la media \pm D.E., n=3, *P*<0.05. C) Bandas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β , características del colágeno tipo I presentes en la solución proteica. D) Fotografías de la solución de colágeno y de los hidrogeles formados.

B. Contracción de heridas cutáneas en ratas Wistar

El registro fotográfico del proceso de curación sugiere que el cierre de herida se vio favorecido con la presencia de los hidrogeles de colágeno (Fig. 2). Efecto incrementado al emplear hidrogeles entrecruzados con oligouretano y los modificados con partículas de sílice.

El porcentaje de contracción de herida (CH) (Fig. 3) a los distintos tiempos se calculó con el área de las heridas, empleando la siguiente ecuación:

$$\%CH = ((A_i - A_t) / A_i) \times 100 \quad (1)$$

Donde A_i es el área de la herida a $t=0$ y A_t es el área de herida al tiempo evaluado t .

La CH después de 24 horas aumentó con el empleo de algún hidrogel sobre la cama de la herida. Este incremento fue estadísticamente diferente para Col+LDI/Si respecto del blanco (PBS). Después de 72 horas, Col+LDI/Si presentó el mayor porcentaje de CH con respecto al blanco y al resto de los materiales. A los 6 días, el uso de cualquiera de los materiales aumentó considerablemente el porcentaje de CH (arriba del 50%), registrándose nuevamente el porcentaje más alto para Col+LDI/Si (63.83 \pm 5.36%). El blanco alcanzó un cierre únicamente del 26.81 \pm 13.68% después de los 6 días. En el resto del proceso no se observaron diferencias significativas, sin embargo, siempre se observó una tendencia a acelerar el proceso de cicatrización con el uso de hidrogeles.

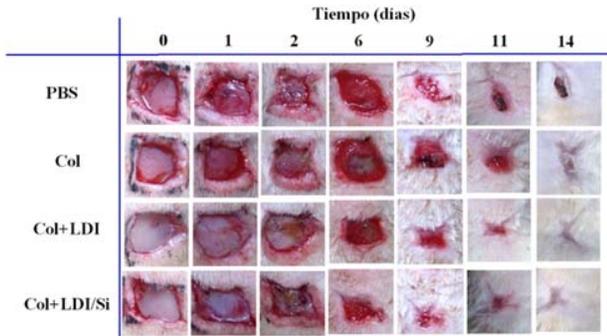


Fig. 2. Fotografías representativas del proceso de curación de heridas cutáneas respecto al tiempo y de acuerdo al material empleado. n=3.

Para el blanco y los materiales Col y Col+LDI, en las primeras 72 horas, se apreció una etapa inflamatoria caracterizada por una baja velocidad de cierre de herida. Entre 6 y 11 días, se apreció la etapa proliferativa, donde la velocidad de contracción de herida se ve incrementada. Por otro lado, para el material Col+LDI/Si no fue posible identificar la etapa inflamatoria, debido a que la velocidad se mantuvo casi constante del inicio y hasta los 11 días. Lo que sugiere que este material promueve el proceso de curación, comparado al resto de materiales y más todavía al blanco.

E. Calidad del tejido cicatricial y presencia de proteínas anti y pro-inflamatorias

La tinción H&E en todas las heridas a los 14 días mostró una completa reepitelización de la epidermis, con presencia de fibroblastos ordenados para formar ECM madura, presencia de vasos sanguíneos y de anexos cutáneos (Fig. 4). Esto implica que la curación de heridas se llevó a cabo de manera exitosa para todos los casos. Sin embargo, al evaluar el proceso de curación a tiempos menores, se observó una clara mejoría en el cierre de herida al emplear los hidrogeles de colágeno y los hidrogeles entrecruzados. Después de 24 horas, en el blanco se observó una gran cantidad de edema, característico de la fase inflamatoria, mientras que, en el Col, el edema disminuyó y las células dieron lugar a su ordenamiento en la superficie para posteriormente llevar a cabo la repitelización. El hidrogel Col+LDI presentó un tejido de granulación ordenado, inicios de angiogénesis, y el Col+LDI/Si mostró la presencia de capilares y organización de tejido de granulación para formar la epidermis. En el blanco y en el material Col, la presencia de vasos sanguíneos se detectó hasta los 6 días, mientras que en Col+LDI y Col+LDI/Si el inicio de la angiogénesis se observó después de 2 días y 1 día, respectivamente. Después de 14 días, en el blanco se apreció el ordenamiento de los fibroblastos, mientras que en Col y Col/LDI, esto se observó después de 6 días. Por su parte, en las heridas tratadas con Col+LDI/Si, después de 6 días se observó la presencia de ECM madura.

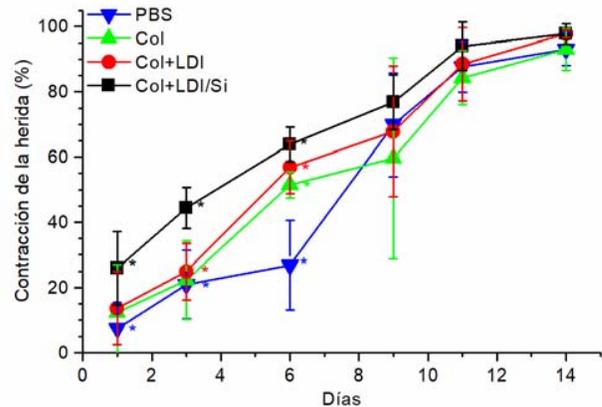


Fig. 3. Porcentajes de contracción de heridas respecto al tiempo y de acuerdo con la formulación usada en los hidrogeles. Los resultados muestran la media \pm D.E., n=3, $P < 0.05$. * denota diferencias significativas.

De acuerdo con la cuantificación de TGF- β en el tejido de cicatrización recuperado después de 14 días, la secreción de esta interleucina fue de $8.18 \pm 3.90\%$, $5.66 \pm 3.26\%$, $5.25 \pm 2.01\%$, $4.41 \pm 1.46\%$ para Col+LDI/Si, Col+LDI, Col, y PBS. La interleucina TNF- α no se detectó para ninguna de las muestras, posiblemente debido a la disminución de la inflamación después de este lapso de tiempo.

IV. DISCUSIÓN

La formación efectiva de los hidrogeles se da como resultado del auto ensamblaje del colágeno bajo condiciones fisiológicas simuladas: pH neutro y temperatura de 37°C [8]. Este proceso es compatible con el entrecruzamiento basado en oligouretanos, i. e., macromoléculas sintetizadas a partir de dioles o trioles de PEG y diisocianatos alifáticos [6]. Previamente, se reportó que esta modificación permite incrementar la resistencia a la degradación y las propiedades mecánicas de los hidrogeles de colágeno [8], a la vez que favorece la incorporación de sílice coloidal y la liberación controlada de fármacos como la dexametasona. Esto permitió moldear el hidrogel de acuerdo a la forma y dimensiones de las heridas, i. e., a través de una gelificación *in situ* en la cama de la herida.

La importancia del andamio de colágeno en la curación de heridas se relaciona con la presencia de motivos (GFOGER) de reconocimiento de receptores que intervienen en la interacción celular a través de integrinas ($\alpha 2$ y $\beta 1$) de unión [9]. Por su parte, la sílice ha mostrado tener un efecto positivo en proliferación de fibroblastos de piel humana de manera *in vitro* [10]. En el presente trabajo se observó un efecto sinérgico sobre la curación de heridas cutáneas, cuando se aplica el material Col+LDI/Si.

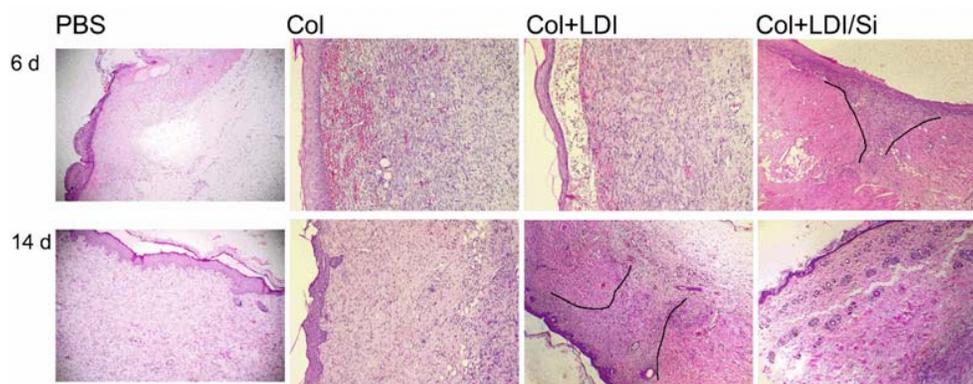


Fig. 4. Micrografías representativas (tensiones H&E) de la curación de heridas cutáneas después de 6 (superior) y 14 (inferior) días de tratamiento con los diferentes hidrogeles. La línea negra resalta el avance de la formación de ECM madura en Col+LDI/Si y Col-LDI, después de 6 y 14 días, respectivamente.

El mayor porcentaje de contracción de herida en un menor tiempo, la reducción del tiempo de la fase inflamatoria, así como la estimulación de una mayor secreción de la proteína antiinflamatoria TGF- β , sugieren que la cicatrización de herida se favorece al aplicar el hidrogel Col+LDI/Si. Estos resultados están de acuerdo con los reportados en otros trabajos donde partículas de sílice de determinado tamaño dispersas en hidrogeles de colágeno aumentan la viabilidad de fibroblastos dérmicos de manera *in vitro* [11]. A partir de estos resultados, se sugiere que este tipo de materiales pueden acelerar la cicatrización de heridas cutáneas, produciendo un tejido funcional en menor tiempo.

V. CONCLUSIÓN

La aplicación de hidrogeles de colágeno modificado en el tratamiento de heridas cutáneas acelera el proceso de curación. Al utilizar el hidrogel Col+LDI/Si, la etapa inflamatoria disminuye, mientras que la angiogénesis, el ordenamiento de fibroblastos, la síntesis de ECM maduro y, en general, el cierre de herida se lleva a cabo en menor tiempo en comparación a la cicatrización de heridas normales. El entrecruzamiento con oligouretanos y la incorporación de partículas de sílice parecen actuar de manera sinérgica en la promoción de un cierre funcional de la herida.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT (proyecto PN2015/1310) por el apoyo financiero para el desarrollo de este proyecto. Asimismo, se agradece al Dr. Mario Murguía Pérez (Hospital Medica Campestre, León Gto.), por su apoyo en el estudio histológico.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Zhu J, Marchant-E R. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*. 8(5): 607-626, 2011. DOI: 10.1586/ERD.11.27
- [2] Vasconcelos A, Cavaco-Paulo A. Wound dressings for a proteolytic-rich environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(2): 445-460, 2011. DOI: 10.1007/S00253-011-3135-4
- [3] Alvarez-Solange S, Helary C, Mebert AM, Wang X, Coradin t., Desimone MF. Antibiotic-loaded silica nanoparticle-collagen composite hydrogels with prolonged antimicrobial activity for wound infection prevention. *Journal of Materials Chemistry B*. 2(29): 4660-4670, 2014. DOI:10.1039/C4TB00327F
- [4] Davidenko N, Schuster C.F., Bax D.V. Raynal N., Farndale R.W., Best S. et. al. Control of crosslinking for collagen-base scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomaterialia*. 25: 2015 131-142. DOI: 10.1016/J.ACTBIO.2015.07.034
- [5] Claudio-Rizo JA, Mendoza-Novelo B, Delgado-García JJ, Castellano-Torres LE, Mata-Mata JL. A new method for the preparation of biomedical hydrogels comprised of extracellular matrix and oligourethanes. *Biomedical Materials*. 11(3): 8585-8595, 2016. DOI: 10.1088/1748-6041/11/3/035016
- [6] Argote-Rangel M, Claudio-Rizo JA, Castellano-Torres LE, Vega-González A, Mata-Mata J, Mendoza-Novelo B. ECM-oligourethane-silica hydrogels as a local drug release system of dexamethasone for stimulating macrophages. *RSC Advances*. 7: 10443-10453. 2017 DOI:10.1039/C6RA25989H
- [7] Claudio-Rizo JA, Rangel-Argote M, Castellano-Torres LE, Delgado-García JJ, Mata-Mata JL, Mendoza-Novelo B. Influence of residual composition on the structure and properties of extracellular matrix derived hydrogels. *Materials Science and Engineering: C* 79(1): 793-801, 2017. DOI:10.1016/J.MSEC.2017.05.118
- [8] Claudio-Rizo JA, Mendoza-Novelo B, Delgado-García JJ, Castellano Torres LE, Mata-Mata JL. A new method for the preparation of biomedical hydrogels comprised of extracellular matrix and oligourethanes. *Biomedical Materials*. 11(3): 2016;11:035016
- [9] Siljander-R P, Hamaia S, Peachey-R A, Slatter-A D, Smethurst-A P, Ouwehand-H W, et.al. Integrin Activation State Determines Selectivity for Novel Recognition Sites in Fibrillar Collagens. *Journal of Biological Chemistry*. 279(46): 47763-47772, 2004. DOI: 10.1074/JBC.M404685200
- [10] Quignard S., Coradin T, Powell J., Jugdaohsingh R. Silica nanoparticles as sources of silicic acid favoring wound healing *in vitro*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.155: 530-537, 2017. DOI:10.1016/J.COLSURFB.2017.04.049
- [11] Quignard S., Helary C., Boissiere M., Fullana., LaGree P., Coradin T., Behaviour of silica nanoparticles in dermis-like cellularized collagen hydrogels. *Biomaterials Science*. 2(4): 484-492, 2014. DOI:10.1039/C3M60214A