

Modulación de la respuesta inflamatoria mediante membranas de colágeno-oligouretano-sílice

P. U. Muñoz-González^{1*}, B. Mendoza-Novelo², J. Delgado², L. E. Castellano²

¹Estudiante Maestría en Ciencias Aplicadas, DCI, Universidad de Guanajuato, León, Guanajuato, México

²Docente Investigador, DCI, Universidad de Guanajuato, León, Guanajuato, México

* ulimunoznr@gmail.com

Resumen— La transición de una respuesta proinflamatoria (M1) a una antiinflamatoria (M2) de macrófagos, así como su control, puede ser inducida mediante el uso de moléculas depositadas en matrices e hidrogeles. En este trabajo se presentan resultados que indican la polarización de macrófagos hacia M2 cuando las células son cultivadas sobre membranas constituidas de colágeno tipo I y entrecruzadas con oligouretanos trifuncionalizados acoplados con sílice. La secreción de TGF- β 1 al medio de cultivo por macrófagos murinos de la línea RAW264.7, así como su morfología, corroboran la estimulación de la vía antiinflamatoria M2, teniendo valores con $p \leq 0.05$ de significancia estadística entre los controles y las membranas basadas en colágeno. De igual manera, las propiedades fisicoquímicas del material como su capacidad de absorción de agua, resistencia a la degradación y diámetro de fibra aumentaron por efecto del entrecruzamiento. Consideramos que las propiedades biológicas y fisicoquímicas observadas hacen a nuestros materiales viables para la modulación de la respuesta inflamatoria en estudios *in vivo* y prometedor en el diseño de sistemas para el tratamiento de heridas crónicas, en específico las heridas de pie diabético, esto debido al ambiente altamente inflamatorio que caracteriza a la patología.

Palabras clave—Colágeno, Entrecruzante, Macrófagos, Inflamación.

I. INTRODUCCIÓN

Los macrófagos son células del sistema inmune esenciales en la liberación de mensajeros y mediadores que funcionan como señales para inducir la migración, proliferación o diferenciación de otros tipos celulares [1]. Los macrófagos M0 se polarizan hacia un fenotipo M1 cuando son estimulados con interferón- γ (IFN- γ) y lipopolisacáridos (LPS), y adquieren una actividad proinflamatoria caracterizada por la producción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, por sus siglas en inglés) y la proteína quimo-atrayente de monocitos 1 (MCP-1). En cambio, cuando los macrófagos M0 se activan hacia un fenotipo M2, estimulados con la interleucina 4 (IL-4) y/o 13 y se obtiene una respuesta antiinflamatoria que permite la remodelación del tejido. Este fenotipo se caracteriza por la producción del receptor de manosa tipo C (CD206), la molécula tipo resistina α (Relm- α), entre otras [2]. El objetivo del presente estudio fue explorar (i) el uso de oligouretanos bloqueados sintetizados a partir de glicerol etoxilado, y diisocianato alifático como modulador de la estructura y propiedades de membranas de sílice-colágeno, (ii) la modulación de la respuesta de macrófagos mediante la estimulación con membranas compuestas que exhiben diferencias estructurales y en la respuesta a estímulos.

II. METODOLOGÍA

1) Extracción de colágeno de tendones de cola de rata:

Los tendones de cola de rata de la cepa Wistar se pesaron y desinfectaron en etanol al 70%, posteriormente se trataron con una solución de 0.05 M EDTA, 10% etanol en PBS pH 7.4 y agitados a 10 rpm 1 h. Los tendones se hidrolizaron empleando 0.01 M HCl, mantenidos en agitación constante durante 3-5 días, a 4 °C. Finalmente, los hidrolizados se ajustaron a una concentración de proteína de 4 mg/mL y se almacenaron a 4 °C.

2) *Síntesis del oligouretano trifuncionalizado y formación de los hidrogeles*: La síntesis del oligouretano trifuncionalizado se realizó de acuerdo con lo previamente descrito en Claudio-Rizo *et al.* 2016 [3]. Las soluciones de colágeno se añadieron en conjunto con los entrecruzantes ($10\% \frac{m_{\text{entrecruzante}}}{m_{\text{colágeno}}}$, 4 °C), después se neutralizaron utilizando 1 M NaOH y 10X PBS. Los hidrogeles se moldearon en discos de 6.5 o 15 mm de diámetro (37 °C, 2 d) y posteriormente se secaron a 37 °C durante 2 días. Los códigos para los materiales fabricados son: Col- (colágeno sin entrecruzante), -LDI+Si (colágeno entrecruzado con los oligouretanos funcionalizados derivados de diisocianato de lisina y dopados con sílice).

3) *Caracterización fisicoquímica*: La capacidad de absorción de agua de los materiales se determinó calculando el porcentaje del incremento de peso de los materiales deshidratados. De igual manera se determinó el perfil de resistencia a la degradación incubando los materiales en 0.005 mg mL⁻¹ (14 U) de colagenasa, para lo cual se monitoreó la pérdida de peso durante 2 h. Con el fin de analizar las bandas características del colágeno, se obtuvieron espectros Raman de los materiales (Witec Alpha 300, tiempo de integración 3 s, láser 633 nm, Objetivo 20X). La topografía del material se analizó con un microscopio de fuerza atómica (Witec Alpha 300).

4) *Caracterización biológica*: Los macrófagos RAW264.7 se cultivaron sobre los materiales y en presencia de los lixiviados. Los hidrogeles se incubaron en medio de cultivo RPMI para obtener lixiviados. Después, la viabilidad celular se evaluó por el ensayo *Live&Dead* y la actividad metabólica por el ensayo de MTT. Las citocinas MCP-1 y TGF- β 1 se cuantificaron en los medios de cultivo mediante ensayos de ELISA (*kits de ELISA Ready Set Go!*) (eBioscience). Para los estudios de inmunocitoquímica, los

macrófagos se cultivaron sobre cubreobjetos redondos y posteriormente se evaluó la expresión de los marcadores proteicos iNOS, CD206 y RELM, la detección se realizó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando un microscopio confocal Zeiss (LSM 710, ex/em 594/620 nm).

III. RESULTADOS

A. Capacidad de absorción de agua y resistencia a la degradación.

La capacidad de absorción de agua de los materiales calculó mediante la diferencia de peso de los materiales hinchados y el peso de los materiales secos. Los materiales entrecruzados mostraron una mayor capacidad de absorción de agua en comparación al material sin entrecruzar (Fig. 1a). Los perfiles de absorción de agua muestran que el equilibrio de absorción de agua se alcanzó ligeramente más rápido para el material Col. El aumento en la absorción de agua de los materiales entrecruzados se puede deber a la naturaleza hidrofílica tanto del glicerol etoxilado como de la sílice.

La cinética de degradación del colágeno tipo I por acción de la colagenasa se modificó al ser entrecruzado con los oligouretanos (Fig. 1b). Después de 5 minutos el material sin entrecruzar perdió 60% de su masa, en cambio al material entrecruzado le tomó 20 minutos.

B. Composición química y topografía del material

Los resultados de la espectroscopía Raman para el material de colágeno sin entrecruzar mostró señales de OH y NH en la región de 3200 cm^{-1} . Esta señal aumentó para el caso de los materiales entrecruzados. Las otras bandas características del colágeno se detectaron en la región de 2930 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} (señales para metileno y grupos metilo), amida I en la región $1636\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, vibraciones de los enlaces C-C de la columna vertebral en $820\text{-}940\text{ cm}^{-1}$, y finalmente señales de amida III en $1240\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$. Todas las bandas típicas coinciden con las regiones Raman del colágeno reportadas en la literatura (Fig. 1c) [4]. La topografía del material Col- mostró una rugosidad a tal grado que no se pudo distinguir la presencia de fibras, el caso contrario ocurrió con el material entrecruzado con LDI, ya que se pudo apreciar la definición de las fibras de forma marcada, la cual aparentemente ha sido enmascarada por la presencia de sílice (Fig. 1d).

C. Viabilidad celular y actividad metabólica de macrófagos RAW 264.7

La medición de viabilidad celular se llevó a cabo utilizando el kit *Live & Dead* (Fig. 2a). Los resultados obtenidos demuestran que el material LDI+Si induce un aumento en la proliferación celular, disminuyendo ligeramente la viabilidad celular. La actividad metabólica de los macrófagos cultivados en el material o estimulados con lixiviados se evaluó por el ensayo de MTT. La presencia de

los materiales en el cultivo celular no modificó la actividad metabólica asociada con la oxido reductasa dependiente de NAD(P)H en ninguno de los casos (Fig. 2b).

D. Polarización de macrófagos: Secreción de citocinas.

Para evaluar el efecto de los materiales en la polarización de macrófagos, las células se estimularon con los materiales deshidratados o con lixiviados y se cuantificó la secreción de la quimocina proinflamatoria MCP-1 y la citocina antiinflamatoria TGF- β 1.

Como se esperaba, el control positivo para macrófagos M1 estimulado con LPS mostró una producción significativa de MCP-1. En contraste, los macrófagos cultivados en ambos materiales mostraron una disminución en la producción de esta citocina, siendo mínimamente detectada en el caso de los macrófagos estimulados con los lixiviados (Fig. 2c). Por otro lado, como se esperaba el control positivo para macrófagos M2 estimulados con IL4 aumentó la producción de la citocina antiinflamatoria TGF- β 1 de manera significativa. Estos resultados indican que los materiales estimulan la producción de TGF- β 1 por los macrófagos, sin embargo, la expresión de esta citosina aumenta al estimularlos con los lixiviados.

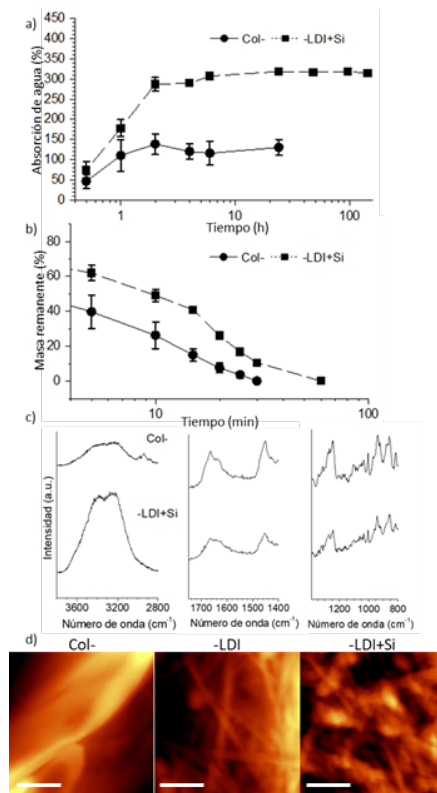


Fig. 1. Efecto del entrecruzante sobre a) la capacidad de absorción de agua, b) la resistencia a la degradación por la colagenasa, c) la composición

química obtenida por espectroscopia Raman y d) la topografía analizada por AFM. Media $n=3 \pm$ D.S., barra de escala=3 μ m.

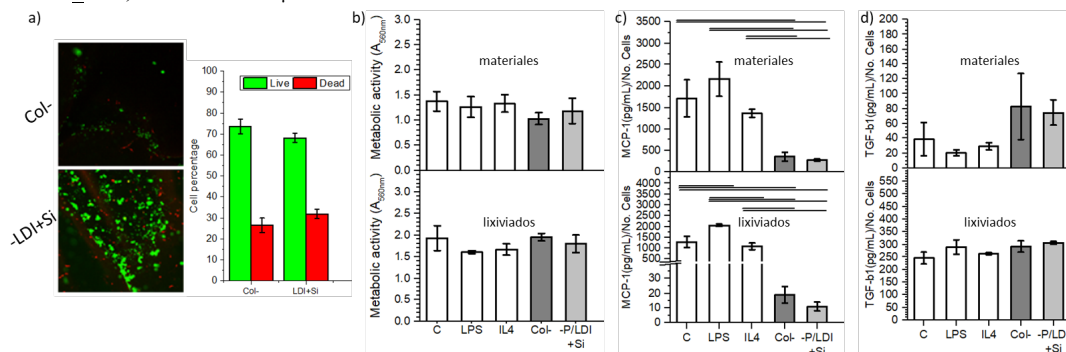


Fig. 2. Efecto de los materiales sobre la estimulación de macrófagos RAW 264.7. a) la viabilidad celular obtenida por *Live & Dead*, b) la actividad metabólica evaluada por el ensayo MTT, c) la secreción de la citocina proinflamatoria MCP-1 y d) la secreción de la citocina antiinflamatoria TGF- β 1. Media $n=3, \pm$ D.S., ANOVA-Tukey $p \leq 0.05$.

E. Polarización de macrófagos: Expresión de los marcadores celulares para M1 y M2

La expresión de ciertas moléculas puede ser utilizado como indicativo de la polarización de macrófagos a fenotipos específicos. La expresión de iNOS, una molécula mediadora proinflamatoria, indica la presencia de macrófagos M1. En contraste, la expresión de la molécula RELM α que participa como activador de la fibrosis en la reparación de heridas, está asociada con la polarización de macrófagos M2. De igual manera, el aumento en la presencia del receptor de manosa (CD206) que está relacionado con la activación del proceso de regeneración de herida, es un marcador de macrófagos M2 [5].

Los macrófagos estimulados con LPS como se esperaba expresaron altos niveles de iNOS, de igual manera los macrófagos estimulados con Col- expresaron este marcador. Por otro lado, los macrófagos estimulados con IL4 como se esperaba expresaron altos niveles de RELM α y CD206. Interesantemente, el material entrecruzado con LDI+Si induce en los macrófagos la expresión de estos marcadores antiinflamatorios. Esto puede brindar un efecto positivo durante la remodelación de tejido (Fig. 3).

IV. DISCUSIÓN

Todas las bandas típicas coinciden con las regiones Raman de colágeno encontradas en la literatura (Fig. 1c). La topografía de los materiales sin entrecruzar muestra una rugosidad a tal grado que fue difícil detectar fibras de colágeno, en cambio en los materiales entrecruzados claramente se observó la red de fibras característica reportada en la literatura [6]. La alta capacidad de absorción de agua por parte de nuestros materiales tal vez se vea influenciada por la naturaleza hidrofílica tanto de los entrecruzados basados en glicerol etoxilado como de la sílice.

Nuestro material mostró tener dos veces más la resistencia a la degradación que la observada en los materiales de colágeno entrecruzados con sulfato de condroitina [7]. Usando oligouretanos tri-funcionalizados y sílice, se obtuvieron biomateriales entrecruzados con propiedades fisicoquímicas mejoradas y a la vez con capacidad de estimular macrófagos.

Dado que se observó una disminución en la producción de MCP-1 por macrófagos que se cultivaron en los materiales o con los lixiviados, podemos sugerir que los materiales tienen el potencial de reducir la respuesta inflamatoria. Por otro lado, el aumento en la producción de TGF- β 1 puede inducir la activación de monocitos circundantes en la herida, y por lo tanto estimularla a cerrar [8].

De acuerdo con los resultados, un efecto sinérgico del entrecruzamiento con oligouretano derivados de glicerol y diisocianato de lisina y de la incorporación sílice en los materiales de colágeno produjo la polarización a M2 de macrófagos RAW 264.7. Esta estimulación inducida por el biomaterial amerita en un futuro ser estudiada en un cultivo primario de macrófagos humanos. Asimismo, como ya se ha mencionado, la presencia del fenotipo M2 es crucial en la regeneración de tejido. Por lo tanto, el material de colágeno entrecruzado con LDI+Si parece promisorio como una alternativa capaz de estimular la producción de moléculas que participan en el proceso de regeneración de herida.

A pesar de que la polarización hacia un fenotipo M1 puede conllevar a una respuesta proinflamatoria, se ha visto recientemente que este fenotipo es capaz de producir un gran número de moléculas que promueven la angiogénesis, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial. Es por esto, por lo que no es recomendable descartar al material Col que ha estimulado una respuesta M1 (resultados no mostrados). Esta consideración toma en cuenta que ciertas complicaciones en heridas cutáneas implican una pobre

vascularización en el tejido circundante a la herida. Una combinación de ellos podría dar lugar a sistemas basados en biomateriales que regulen más de una etapa del proceso de curación de heridas.

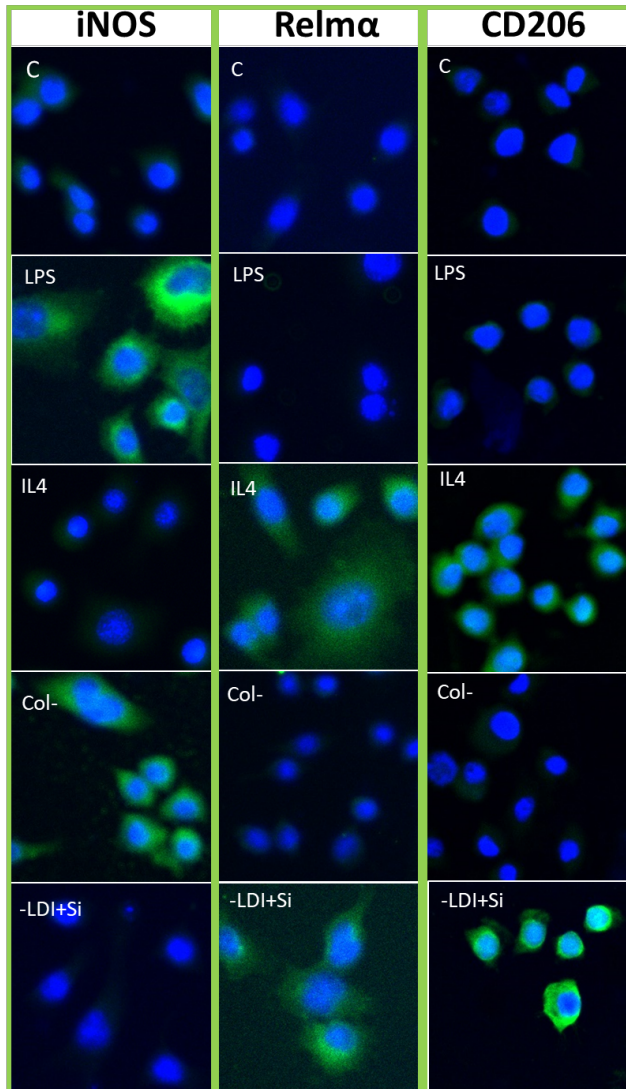


Fig. 3. Expresión del marcador proinflamatorio iNOS y de los marcadores antiinflamatorios RELM α y CD206 por macrófagos estimulados con lixiviados de los distintos materiales.

V. CONCLUSIÓN

En este trabajo se desarrolló un nuevo biomaterial basado en colágeno tipo I, entrecruzante teniendo tres sitios de unión y sílice. Las principales propiedades fisicoquímicas sugieren que el entrecruzante tuvo un buen desempeño: el material mantuvo la estructura básica del colágeno, retrasó el tiempo de degradación, y no afectó la absorción de agua para producir un hidrogel altamente hidratado. Este

biomaterial fue capaz de promover la polarización de los macrófagos murinos hacia el fenotipo M2. La modificación estructural que el entrecruzante trifuncionalizado y la sílice produjo en la red de colágeno y la forma que modificó las propiedades fisicoquímicas y biológicas merecen más estudios dado los presentes resultados. Por lo que los estudios *in vivo* con este nuevo biomaterial están en curso.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a R. Carriles, y M. Flores-Moreno por su colaboración en este trabajo en los estudios de microscopía. Este trabajo fue financiado por el CONACYT a través del proyecto Nos. PN2015/1310 y 237425.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badyak SF. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*. 33(15): 3792-3802, 2012. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.034
- [2] Snider RJ, Lantis J, Kirsner RS, Shah V, Molyneaux M, Carter MJ. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair Regen*. 24(4): 613-629, 2016. DOI: 10.1111/wrr.12444
- [3] Claudio-Rizo JA, Rangel-Argote M, Munoz-Gonzalez PU, Castellano LE, Delgado J, Gonzalez-Garcia G, Mata-Mata JL, Mendoza-Novelo B. Improved properties of composite collagen hydrogels: protected oligourethanes and silica particles as modulators. *J. Mater. Chem. B*. 4(40): 6497-6509, 2016. DOI: 10.1039/C6TB01673A
- [4] Li B, Cao H, Zhao Y, Cheng M, Qin Hm Cheng T, Hu Y, Zhang X, Liu X. In vitro and in vivo responses of macrophages to magnesium-doped titanium. *Sci. Rep*. 7: 42707, 2017. DOI: 10.1038/srep42707
- [5] Choi KM, Kashyap PC, Dutta N, Stoltz GJ, Ordog T, Shea T, Bauer AJ, Linden DR, Szurszewski JH, Gibbons SJ, Farrugia G. CD206-positive M2 macrophages that express heme oxygenase-1 protect against diabetic gastroparesis in mice. *Gastroenterology* 138(7): 2399-2409, 2010. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.02.014
- [6] Nguyen TT, Gobinet C, Feru J, Pasco SB, Manfait M, Piot O. Characterization of Type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Spectrosc. Int*. 27(5-6): 421-427, 2012. DOI: 10.1155/2012/686183
- [7] Pek YS, Spector M, Yannas IV, Gibson LJ. Degradation of a collagen-chondroitin-6-sulfate matrix by collagenase and by chondroitinase. *Biomaterials*, 25(3): 473-482, 2004, DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00541-6
- [8] Pakyari M, Farrokhi A, Maharlooei MK, Ghahary A. Critical Role of Transforming Growth Factor Beta in Different Phases of Wound Healing. *Adv. Wound Care*, 2(5): 215-224, 2013, DOI: 10.1089/wound.2012.0406

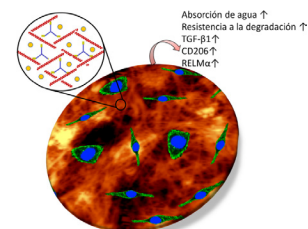


Fig. 4. Resumen de las propiedades mejoradas exhibidas por los materiales de colágeno entrecruzado.