

03-017

USE OF GENIPIN TO CROSSLINK COLLAGEN AND CHITOSAN-BASED BIOMATERIALS

*Perez-Puyana, Víctor ⁽¹⁾; Alonso-González, María ⁽¹⁾; Rubio-Valle, José Fernando ⁽¹⁾;
Guerrero, Antonio ⁽¹⁾; Romero, Alberto ⁽¹⁾*

⁽¹⁾ Universidad de Sevilla

The application of tissue engineering represents a breakthrough in the fields of cell therapy and regenerative medicine, being one of the advances in biomedicine with greatest impact on the health sector. It is based on the manufacture of biomaterials (called scaffolds) in which cell growth and proliferation takes place. In this sense, the main objective of this work was to evaluate the influence of genipin (crosslinking agent) on the properties of scaffolds based on combinations of collagen and chitosan. For this reason, the different systems developed were characterized mechanically and microstructurally to compare their properties. The results obtained show that scaffolding properties depend largely on the concentration of biopolymer used and the concentrations of the crosslinking agent. According to the results, the best mechanical properties were obtained for hybrid systems with high concentrations of biopolymers (2% weight). Moreover, the addition of a small amount of genipin as a crosslinking agent improved the systems with low concentrations of biopolymers (1% weight), showing greater improvement in the mechanical properties, especially in its critical strain.

Keywords: collagen; chitosan; genipin; biomaterials; tissue engineering

USO DE GENIPINA PARA ENTRECROZAR BIOMATERIALES BASADOS EN COLÁGENO Y QUITOSANO

La aplicación de la ingeniería de tejidos representa un gran avance en los campos de la terapia celular y la medicina regenerativa, siendo uno de los avances en biomedicina con mayor impacto en el sector de la salud. Se basa en la fabricación de biomateriales (denominados andamios) en los que tiene lugar el crecimiento y proliferación celular. En este sentido, el objetivo principal de este trabajo consistió en la evaluación de la influencia de genipina (agente de entrecruzamiento) sobre las propiedades de los andamios basados en combinaciones de colágeno y quitosano. Para ello, a los diferentes sistemas elaborados se les realizó una caracterización mecánica y microestructural para comparar sus propiedades. Los resultados obtenidos muestran que las propiedades de los andamios dependen en gran medida de la concentración de biopolímero utilizada y de las concentraciones del agente de reticulación. Según los resultados, se obtuvieron las mejores propiedades mecánicas para sistemas híbridos con altas concentraciones de biopolímeros (2% en peso). Además, la adición de una pequeña cantidad de genipina como agente de entrecruzamiento mejoró los sistemas de baja concentración de biopolímeros (1% en peso), observándose esta mejora sobre todo en sus propiedades mecánicas y, en especial, en su deformación crítica.

Palabras clave: colágeno; quitosano; genipina; biomateriales; ingeniería de tejidos

Correspondencia: Víctor Manuel Pérez Puyana vperez11@us.es



©2020 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

Hoy en día la medicina se enfrenta a los problemas que consisten en la pérdida de los tejidos y los fallos orgánicos implican enormes costes para los sistemas sanitarios. Estos problemas han impulsado el crecimiento de interés de la comunidad científica en el campo de la Ingeniería de Tejidos. Este es un campo interdisciplinar que precisa fundamentalmente de: tecnología de células cultivadas, 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 (Arias et al., 2018).

Las estructuras 3D o andamios son soportes que se introducen en los tejidos dañados para promover el crecimiento y propagación in situ de las células residentes sanas circundantes o bien de células madre y factores de crecimiento que puedan implantarse en este tejido o estar incorporados en el biomaterial con la finalidad de acelerar el crecimiento (Chocholata et al., 2019). Actualmente se llevan a cabo diferentes investigaciones científicas para obtener andamios multifuncionales que tengan biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades físicas y mecánicas compatibles y promuevan el crecimiento celular.

Las propiedades que pueden tener estos materiales están estrechamente ligadas con su estructura interna, porosidad, interconectividad y distribución del tamaño de los poros que pueden ser controladas según la forma de procesado y de las materias primas usadas, tanto en el tipo como en su proporción. Entre las materias primas destacan tanto polímeros sintéticos como biopolímeros, así como aditivos o agentes de entrecruzamiento que varían las propiedades físicas y mecánicas del andamio de forma distinta. La noción principal sobre que material usar para la fabricación de dicha matriz consiste en la relación biológica que existe entre la función, estructura y propiedades del andamio. En este sentido destacan los biopolímeros siendo los más adecuados las proteínas (fibrinógeno, fibronectina, colágeno, etc.) y los polisacáridos (almidón, glucosa, quitosano, etc.). Entre ellos, destacan el colágeno y el quitosano que proporcionan mejores estructuras del andamio y adhesión celular (Van Vlierberghe et al., 2011).

El colágeno forma parte de la matriz extracelular y es un material atractivo para la aplicación en este campo debido a que es fácil de modificar y procesar, biodegradable, biocompatible, no es antigénico y presenta buenas propiedades mecánicas como es la ductilidad. La principal fuente de la extracción de colágeno es de los residuos de especies bovinas y de la piel, huesos y cartílagos de cerdo. Según el origen y la forma de procesado, el colágeno puede tener diferentes propiedades destacando la biocompatibilidad, que permiten la proliferación celular y no interfieren con el comportamiento celular (Ortiz et al., 2016). Existen al menos 16 tipos de colágeno, siendo el colágeno tipo I el más abundante. Este tipo de colágeno se presenta en fibrillas estriadas de 20 a 100 nm de diámetro, agrupándose formando fibras mayores. Sus subunidades mayores están constituidas por cadenas α de dos tipos, que difieren ligeramente en su composición aminoacídica y en su secuencia, siendo su función principal la de resistencia al estiramiento (Lee et al., 2001).

El quitosano se obtiene industrialmente por desacetilación extensiva de la quitina. Es un polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa y constituye un importante recurso renovable. Está compuesta por dos tipos de unidades estructurales distribuidas de manera aleatoria a lo largo de la cadena. En su forma cristalina normalmente es insoluble en disoluciones acuosas neutras, aunque en disoluciones ácidas diluidas es

posible su solución (Mármol et al., 2012). Ha sido ampliamente demostrado su biocompatibilidad y biodegradabilidad pues promueve la adhesión celular y reabsorbe mediante procesos de hidrólisis a través de la acción de enzimas presentes en los fluidos fisiológicos. No obstante, el quitosano como un biopolímero no es bioactiva y posee pocas propiedades mecánicas lo que hace que para la fabricación de los andamios se suele combinarse con otros materiales como son el colágeno o gelatina, entre otros.

La ventaja que presentan los biopolímeros es principalmente la biocompatibilidad que hace que el material no presente efectos adversos después de su implante ni tras su biodegradación (Williams, 2009). Sin embargo, tienen una desventaja de que presentan propiedades mecánicas muy pobres en comparación con los sintéticos. Para mejorarlas actualmente se hacen estudios sobre el proceso del entrecruzamiento (físico y químico, incluso enzimático) con agentes de entrecruzamiento (glutaraldehído, genipina, ácido cítrico, glucosa, etc.). Sin embargo, los estudios han demostrado que el entrecruzamiento físico no cubre los requerimientos mecánicos, el enzimático requiere condiciones muy determinadas de trabajo y que el entrecruzamiento químico, realizado principalmente con derivados de aldehídos, presenta la desventaja de la citotoxicidad de los agentes usados en muchas ocasiones (Arias et al., 2004; Silva et al., 2004). Por eso se han buscado alternativas que sean más biocompatibles como son la genipina o el ácido cítrico. Entre estos, la genipina es un agente glicosídico que posee diferentes actividades biológicas, biodegradable con baja citotoxicidad y tiene muchos efectos medicinales como antiinflamatorio, anticancerígeno o antibactericida.

Por tanto, la hipótesis de partida de este trabajo consiste en la capacidad de la genipina para inducir cambios en la microestructura de andamios biopoliméricos que, a su vez, produzca cambios en las propiedades mecánicas de dichas estructuras. De esta forma, se pueden controlar las propiedades de los andamios elaborados mediante el proceso de secado por liofilización.

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el desarrollo de andamios producidos con colágeno (C) y quitosano (Q), evaluando la influencia de la incorporación de un agente de entrecruzamiento como la genipina (GE) en las propiedades mecánicas y morfológicas de los andamios. Por lo tanto, se prepararon sistemas con un 1% de concentración total de biopolímero (colágeno, quitosano o mezclas de colágeno/quitosano) con la adición de genipina en una concentración definida (0,05%).

Para conseguir este objetivo global, se plantearon dos objetivos específicos:

- Evaluar las propiedades mecánicas y morfológicas de los andamios producidos con y sin genipina para las diferentes combinaciones planteadas.
- Comparar los diferentes sistemas procesados y seleccionar los más adecuados de acuerdo con la evaluación previa de sus propiedades.

3. Metodología

3.1 Materiales

Para este estudio, se utilizó colágeno suministrado por la compañía Essentia Protein Solutions S.A. (Dinamarca). La ficha del producto indica que se trata de un colágeno tipo I procedente de cerdo con un contenido proteico ligeramente superior al 90%. El resto de su composición consiste principalmente en humedad y un pequeño porcentaje de lípidos. Además, el polisacárido elegido para el estudio fue quitosano de bajo peso molecular ($M_w = 130,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) proporcionado por Sigma-Aldrich S.A. (Alemania). Genipina (GE) se utilizó como agente de entrecruzamiento (pureza superior al 98%, extraída de la planta *Gardenia jasminoides*). Dicho agente de entrecruzamiento ha sido suministrado por la compañía Guangxi Shanyun Biochemical Science and Technology Co. (China).

3.2 Preparación de andamios

Los andamios se prepararon con diferentes proporciones de colágeno/quitosano (C/Q) a diferentes concentraciones de polímero total. Además, se añadió genipina a una concentración definida (0,05% en peso) para evaluar su influencia en las propiedades de los andamios. El método utilizado para la preparación de estos andamios fue el método de liofilización descrito en estudios anteriores (Perez-Puyana et al., 2016), que consta de tres etapas: preparación de disoluciones de biopolímeros, congelación y liofilización de dichas disoluciones.

3.2.1 Preparación de disoluciones biopoliméricas

En primer lugar, se prepararon soluciones con diferentes proporciones de C/Q (10/0, 5/5 y 0/10) usando ácido acético 0,05 M (pH 3,2) como disolvente. Todas estas disoluciones se prepararon a dos concentraciones diferentes de biopolímeros (1 % p/v de material, que son las concentraciones óptimas con respecto a las propiedades de los andamios C/Q). Luego, la fase no soluble se separó tras centrifugación a una velocidad de 12.000xg durante 10 min a una temperatura de 4 °C.

3.2.2 Congelación y liofilización

Una vez que se prepararon las disoluciones, se congelaron a una temperatura de -40 °C durante 2 h, para luego sublimar el disolvente mediante liofilización en un liofilizador LyoQuest (Telstar, Japón) durante 24 h (<15 Pa, -80 °C). Estas condiciones fueron seleccionadas en base a estudios previos (Perez-Puyana et al., 2019).

3.2.3 Etapa adicional de entrecruzamiento

Se realizó una reticulación química usando genipina (GE). La genipina es una sustancia natural que entrecruza espontáneamente el quitosano, la gelatina o el colágeno y presenta un nivel de citotoxicidad mucho más bajo que el glutaraldehído (Yoo et al., 2011). De acuerdo con Dimida y colaboradores (2017), la concentración óptima de genipina se encuentra entre 3 y 5% en peso de la concentración total de biopolímeros. Así, los andamios elaborados de colágeno/quitosano con una concentración definida de genipina incorporada

(5% en peso) fueron preparados para evaluar la influencia de esta sustancia natural en las propiedades de los andamios producidos.

3.2.4 Sistemas estudiados

Todos los sistemas elaborados (tanto aquellos elaborados con genipina como aquellos utilizados como control) aparecen resumidos en la siguiente tabla (Tabla 1):

Tabla 1: Sistemas estudiados junto con la referencia utilizada

Sistema	Referencia
Colágeno 1%	C/Q 10/0
Colágeno/Quitosano 1%	C/Q 5/5
Quitosano 1%	C/Q 0/10
Colágeno 1% + Genipina (0,05%)	C/Q 10/0 + GE
Colágeno/Quitosano 1% + Genipina (0,05%)	C/Q 5/5 + GE
Quitosano 1% + Genipina (0,05%)	C/Q 0/10 + GE

3.3 Caracterización de andamios

3.3.1 Evaluación reológica

La caracterización reológica de los andamios se realizó mediante las mismas pruebas descritas en estudios anteriores (Perez-Puyana et al., 2016). Brevemente, se realizaron barridos de deformación ($5 \cdot 10^{-4}$ a 2,5%, a 1 Hz y 25 °C) y de frecuencia (0,02 a 20 Hz, a una deformación específica para cada sistema dentro del rango viscoelástico lineal y 25 °C) utilizando un equipo de deformación dinámico RSA3 (TA Instruments, EE. UU.). Se evaluaron tanto el módulo elástico como el viscoso (E' y E'' , respectivamente). Además, el módulo elástico y la tangente de pérdidas (E''/E') a una frecuencia constante de 1 Hz (E'_1 y $\tan \delta_1$, respectivamente) se seleccionaron como parámetros para realizar una comparación adecuada entre los sistemas.

3.3.2 Evaluación morfológica

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microestructura de los andamios se observó a través de imágenes SEM usando un XL 30 (Philips XL Series, Holanda) con un voltaje de aceleración de 15 kV. Previamente, las muestras se recubrieron con paladio/oro para mejorar la calidad de las imágenes.

Porosimetría

Las mediciones de porosimetría se llevaron a cabo utilizando un equipo de porosimetría Pore Master 60 GT (Quantachrome Instruments, EE. UU.). Esta técnica permite determinar el tamaño medio de poro, así como su distribución en el material. El rango de poro evaluado fue entre 1 y 1000 μm .

3.4 Análisis estadístico

Para cada ensayo se realizaron al menos tres mediciones de cada muestra. El análisis estadístico se realizó comparando los valores medios (t de Student) y se realizó un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0,05$) utilizando el paquete estadístico SPSS 18. Además, se incluyeron las desviaciones estándar de algunos parámetros seleccionados.

4. Resultados y discusión

4.1 Influencia de la genipina sobre andamios biopoliméricos

En primer lugar, se realizó una evaluación inicial de las propiedades de andamios biopoliméricos sin contener genipina (control). En la tabla que se muestra a continuación (Tabla 2), aparecen resumidos los valores de E'_1 , $\tan \delta_1$ y deformación crítica para las distintas combinaciones estudiadas:

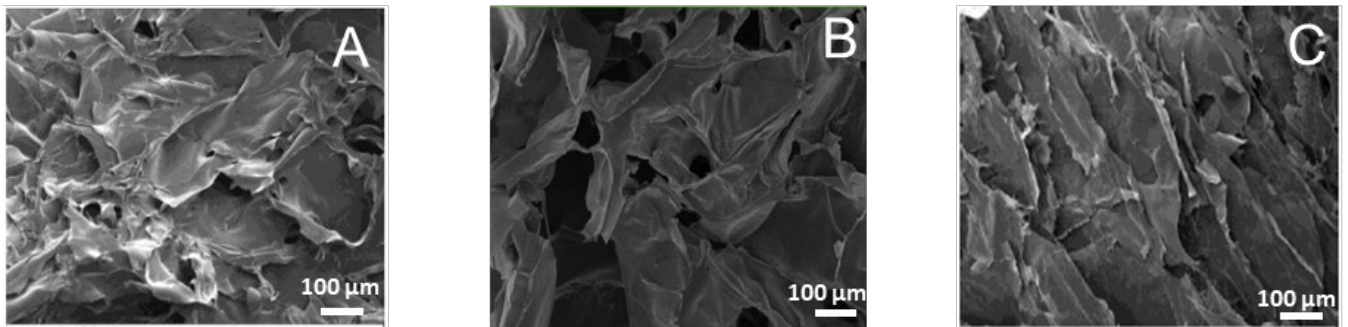
Tabla 2: E'_1 , $\tan \delta_1$ y deformación crítica para las distintas combinaciones colágeno/quitosano estudiadas (C/Q 10/0, C/Q 5/5, C/Q 0/10). Se han añadido letras para indicar las diferencias significativas entre los sistemas ($p < 0,05$)

Sistema	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$	Deformación crítica (%)
C/Q 10/0	0,13 ^a	0,11 ^A	0,22 ^I
C/Q 5/5	0,14 ^a	0,07 ^B	0,21 ^I
C/Q 0/10	0,18 ^b	0,07 ^B	0,16 ^{II}

La evaluación inicial permitió comprobar cómo el quitosano aumenta el carácter sólido de los andamios, de acuerdo con el aumento observado en el módulo elástico y la disminución de la $\tan \delta$. Sin embargo, los andamios obtenidos con colágeno presentan una mayor deformabilidad al tener una deformación crítica superior.

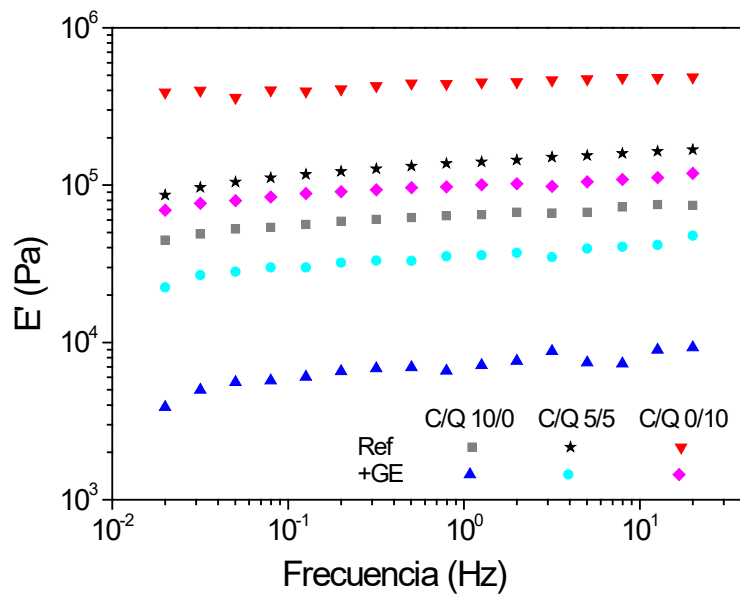
Además de las propiedades mecánicas, la microestructura de dichas estructuras también fue objeto de análisis mediante microscopía electrónica de barrido (Figura 1). Puede verse como los sistemas unitarios (tanto de colágeno como de quitosano) presentan una estructural laminar. Sin embargo, el sistema binario presenta una microestructura diferente con mayor presencia de poros en ella.

Figura 1: Imágenes microscópicas de andamios obtenidos con diferentes relaciones de colágeno y quitosano: (A) C/Q 10/0, (B) C/Q 5/5 y (C) C/Q 0/10



A continuación, se repitieron dichos sistemas, pero con la adición de un 0,05% de genipina en su formulación inicial, repitiendo la caracterización realizada anteriormente. En primer lugar, se midieron las propiedades mecánicas de los andamios obtenidos, mostrando dichos resultados en la Figura 2:

Figura 2: Barrido de frecuencia de andamios híbridos producidos a partir de sistemas unitarios y binarios al 1% obtenidos con diferentes proporciones de Colágeno/Quitosano (10/0, 5/5 y 0/10) y entrecruzados con genipina (0,05 %)



Además, para poder llevar a cabo una mejor comparación, en la Tabla 3 aparecen resumidos los valores de E'_1 , $\tan \delta_1$ y deformación crítica para las distintas combinaciones estudiadas (con y sin genipina):

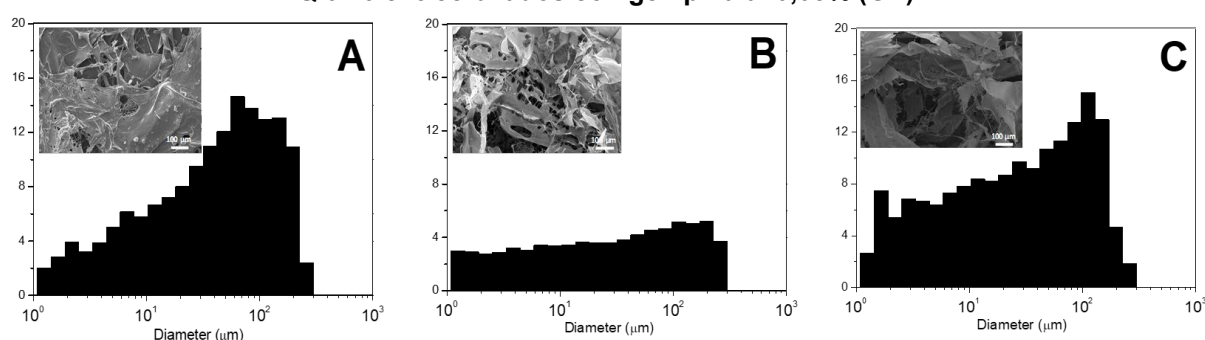
Tabla 3: E'_1 , $\tan \delta_1$ y deformación crítica para las distintas combinaciones colágeno/quitosano estudiadas (C/Q 10/0, C/Q 5/5, C/Q 0/10) con diferentes concentraciones de genipina (0 y 0,05%). Se han añadido letras para indicar las diferencias significativas entre los sistemas ($p < 0,05$)

Sistema	E'_1 (MPa)	$\tan \delta_1$	Deformación crítica (%)
C/Q 10/0	0,13 ^a	0,11 ^A	0,22 ^I
C/Q 10/0 + GE	0,01 ^b	0,09 ^B	0,65 ^{II}
C/Q 5/5	0,19 ^c	0,07 ^B	0,21 ^I
C/Q 5/5 + GE	0,03 ^b	0,11 ^A	0,31 ^{III}
C/Q 0/10	0,18 ^c	0,07 ^B	0,16 ^{IV}
C/Q 0/10 + GE	0,02 ^b	0,07 ^B	0,59 ^{II}

Los barridos de frecuencia mostraron que todos los sistemas mostraron una ligera dependencia de la frecuencia, con una disminución en los valores de los módulos elásticos con la adición de agente de reticulación a la formulación inicial debido, probablemente, a un cambio en la estructura del andamio. Por otra parte, el estudio de la deformación crítica reveló que se obtuvieron andamios con una mayor deformación crítica con la adición de genipina.

Además de la evaluación mecánica, también se analizó la microestructura de los sistemas al 1% con la adición de genipina (0,05%). La Figura 3 muestra las imágenes SEM de los andamios y su distribución de tamaño de poro.

Figura 3: Distribución de tamaño de poro junto con las imágenes microscópicas de andamios obtenidos con diferentes relaciones de colágeno y quitosano: (A) C/Q 10/0, (B) C/Q 5/5 y (C) C/Q 0/10 entrecruzados con genipina al 0,05% (GE).



Como se ve en las imágenes SEM, todos los sistemas tienen una alta porosidad. Específicamente, en el caso del sistema binario C/Q 5/5 + GE, se observa la presencia de poros pequeños y grandes, lo que evidencia la heterogeneidad de la distribución que reafirma la polidispersidad indicada en la Figura 3B. Mientras que en el caso del sistema elaborado con colágeno C/Q 10/0 + GE, se observa el predominio de poros grandes. La presencia de estos poros más grandes contribuye a la disminución de las propiedades mecánicas de este sistema. Finalmente, el sistema obtenido con quitosano C/Q 0/10 + GE

destaca por la presencia de poros pequeños y grandes, como lo indica la distribución bimodal en la Figura 3C.

5. Conclusiones

Como conclusión general, ha sido posible obtener una matriz biopolimérica (andamio) mediante un proceso que consiste en la centrifugación de la disolución, congelación y liofilización con una microestructura y porosidad adecuada para su aplicación en la Ingeniería de Tejidos. Además, los andamios se han obtenido variando las concentraciones de quitosano y colágeno mediante la combinación con genipina.

Un mayor porcentaje de quitosano conduce a andamios más rígidos (módulos elásticos más elevados) y un mayor porcentaje de colágeno a andamios con mayor deformación (mayor deformación crítica). En cualquier caso, hay efectos sinérgicos ya que una proporción 5/5 de colágeno y quitosano (sistema binario C/Q 5/5) conduce a andamios con un alto módulo y una deformación crítica.

Además, la adición de genipina a los andamios con una concentración total del 1%, aunque disminuye el módulo elástico, conduce a una mejora significativa de la deformabilidad lo que permitiría un mejor comportamiento de estos andamios en un bioreactor y obteniendo un comportamiento más parecido al tejido al que se pretende sustituir.

Agradecimientos

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Ref. RTI2018-097100-B-C21). Los autores agradecen su apoyo financiero. Los autores también agradecen a los Servicios de Investigación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) por conceder acceso y asistencia con los servicios de microscopía.

Referencias

- Arias, D. G., Agudelo, A. G., & López, E. C. (2018). Evaluación del crecimiento de fibroblastos humanos en andamios de fibroma de Bombyx mori L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 47-56.
- Arias, G., Rosales, A., Reyes, P. O., & Briones Sánchez, M. del C. (2004). Síntesis de agentes de acoplamiento-entrecruzamiento para PVC a partir de diaminas y cloruro cianúrico. *Revista de La Sociedad Química de México*, 48, 113-117.
- Chocholata, P., Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. *Materials*, 12(4), 568.
- Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., De Benedictis, V., Raucci, M. G., & Demitri, C. (2017). Effects of Genipin Concentration on Cross-Linked Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Structural Characterization and Evidence of Biocompatibility Features. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 1–8.
- Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 1–22.

- Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello-Mazzarri, C., Chandler, C., & Gutierrez, E. (2012). Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 1, 53–58.
- Ortiz, S., Lee, J., Figueroa, B., & Mena, B. (2016). An experimental note on the deformation and breakup of viscoelastic droplets rising in non-Newtonian fluids. *Rheologica Acta*, 55, 879-887.
- Perez-Puyana, V., Romero, A., & Guerrero, A. (2016). Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(A), 1462–1468.
- Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019). Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying. *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 47671.
- Silva, C. J. S. M., Sousa, F., Gübitz, G., & Cavaco-Paulo, A. (2004). Chemical Modifications on Proteins Using Glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology*, 42(1), 51–56.
- Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., & Schacht, E. (2011). Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12, 1387–1408.
- Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30, 5897–5909.
- Yoo, J. S., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Choi, S. H. (2011). Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 44(3), 197–207.

Objetivos de Desarrollo Sostenible

El objetivo de Desarrollo Sostenible que se persigue en este trabajo es “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades” (Objetivo 3):

