

Obtención de piel artificial de bajo costo

Por Helena Pardo, Ricardo Faccio, Mariano Romero, Ignacio Laborda, Luciana Fernández, Magdalena Irazoqui, Selva Cora, Alejandra Szabo y Alvaro W. Mombrú*

En el Centro de Innovación y Desarrollo en Nanotecnología y Materiales (Centro NanoMat) del Polo Tecnológico de la Facultad de Química, en la ciudad de Pando, el grupo formado por los autores de esta nota viene trabajando, desde hace algunos años, en el desarrollo de un material que pueda servir como piel artificial para ser aplicado como alternativa de curación y tratamiento de lesiones dérmicas. (1)

Hace años que, a nivel internacional, se vienen desarrollando materiales de aplicación médica basados en colágeno, un componente mayoritario del tejido conjuntivo (2), como ser una piel artificial desarrollada por el *Massachusetts Institute of Technology* de Estados Unidos (MIT), la que en 1996 fuera aprobada por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su utilización.

Esta piel se hace con colágeno procedente de tendones de animales a los que se les agrega glicosaminoglicano proveniente, en este caso, de cartílagos de tiburón.

A pesar de que la utilización de este tipo de productos ha demostrado ser una de las mejores alternativas de tratamiento para regeneración de piel, permitiendo

mejorar la calidad de vida tanto en lo estético como en lo funcional de los pacientes tratados, el alto costo de los productos disponibles a nivel internacional no hace viable que puedan ser adquiridos en nuestro país para uso general.

Dado que el material desarrollado en el Centro NanoMat utiliza para su fabricación como principal materia prima al colágeno soluble obtenido a partir de tendón bovino, un subproducto de la industria cárnica nacional de muy bajo costo y asequible en grandes cantidades, el costo final es muy inferior al de los comercializados internacionalmente.

Además, Uruguay cuenta con la ventaja estratégica de ser uno de los pocos países que a nivel mundial tienen el estatus de libre de encefalitis espongiiforme bovina (“enfermedad de la vaca loca”), lo que hace que el material sea seguro y de buena calidad.

Este producto es necesario para el tratamiento de las lesiones en la piel por quemaduras. Estas, en Uruguay, se dan fundamentalmente en la población en riesgo social, en especial niños, cuyas viviendas tienen alto peligro de incendio por las características de las mismas y de los sistemas de calefacción que utilizan en los meses de más bajas temperaturas.

También es útil para el tratamiento de las úlceras diabéticas y de las lesiones dérmicas por presión o escaras, un serio problema de difícil solución que afecta al sector más envejecido de la población.



Ricardo Faccio, Magdalena Irazoqui, Ignacio Laborda, Helena Pardo, Mariano Romero, Santiago Vázquez y Álvaro Mombrú en su laboratorio del Polo Tecnológico de Pando.

Objetivos

La investigación que se está llevando adelante en el Centro NanoMat apunta al desarrollo de una matriz extracelular artificial que, al colocarse sobre la herida, sea capaz de brindar las condiciones en las que se dé la revascularización y posterior proliferación celular, en definitiva la reparación del tejido dérmico dañado.

Para que esto último pueda darse, las matrices fueron diseñadas y preparadas de forma que exhiban propiedades físicas y químicas adecuadas, entre las cuales se pueden destacar: biocompatibilidad, ausencia de toxicidad o efectos carcinogénicos, permeabilidad, posibilidad de una relativamente fácil manipulación y flexibilidad, biodegradabilidad y posibilidad de ser esterilizadas.

Colágeno soluble

El primer paso para la preparación del producto final comienza con la obtención del insumo principal, el colágeno soluble. El proceso de extracción ha sido optimizado a escala de laboratorio, teniendo especialmente en cuenta la factibilidad de su escalado a nivel industrial.

La extracción del colágeno de los tendones bovinos se realiza mediante un tratamiento con una solución levemente ácida. La suspensión así obtenida se filtra como forma de eliminar al colágeno insoluble y cualquier otra impureza que pueda encontrarse en forma sólida.

El colágeno soluble adquiere su especial valor a partir de su cuidadosa purificación, por lo cual deben dedicarse importantes esfuerzos en este sentido. Para ello, se le somete a varios ciclos de precipitación mediante el agregado de cloruro de sodio (sal común), y posterior disolución en ácido diluido.

Para completar la purificación, en especial eliminar el contenido salino, se realiza un proceso de diálisis de la solución de colágeno soluble durante varios días a temperatura controlada. Este proceso consiste en colocar la solución a dializar dentro de una bolsa porosa de celulosa, que permite el pasaje a través de ella de moléculas pequeñas y iones, reteniendo en su interior a las proteínas de tamaño mayor que el de sus poros.

Obtenido el colágeno, se hacen análisis del mismo para confirmar que se obtuvo el material con la calidad adecuada. Para determinar la composición proteica y, por lo tanto, la pureza del colágeno obtenido, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida y una espectroscopía Raman, y se realiza un análisis de difracción de rayos X con el objetivo fundamental de analizar la presencia de impurezas no proteicas, y de verificar la eliminación total de la sal empleada en el proceso de purificación.

Reticulado

El siguiente paso en el proceso de obtención de la piel artificial es unir químicamente las cadenas de colágeno



Matriz colagénica obtenida después de la liofilización



Matriz colagénica después del reticulado por agregado de sulfato de condroitina

para formar una red tridimensional, o reticulado; esto se realiza agregando sulfato de condroitina. Nuestro grupo ha innovado en esta técnica utilizando sulfato de condroitina de origen bovino. Este es uno de los procesos que harán posible la obtención de láminas de colágeno de poco espesor pero con propiedades mecánicas y de microporosidad adecuadas.

Posteriormente se elimina el agua de la suspensión por medio de una liofilización, que es un proceso de deshidratación de productos a baja presión (vacío) y bajas temperaturas. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido -normal en procesos de secados- sino la sublimación del hielo, es decir que el agua pasa directamente del estado sólido al gaseoso, manteniendo a la estructura tridimensional intacta.

En el segundo paso del reticulado, con el objetivo de lograr que el producto final presente las propiedades mecánicas adecuadas como para ser manipulable con relativa facilidad, se esparce sobre la matriz obtenida, de colágeno-condroitina, una delgada capa de silicona de grado médico -Silastic-, para lo cual se realiza una mezcla de dicha silicona con su respectivo agente de reticulado en la relación adecuada y se homogeniza. Este

procedimiento se realiza a temperatura ambiente como forma de preservar la calidad del colágeno. De esta forma ambos filmes quedan adheridos y conforman una bicapa de espesor muy delgado.

Debido a que la reticulación primaria de la matriz colagénica descrita anteriormente es insuficiente, ya que en este nivel el film aún presenta una resistencia mecánica bastante baja, la bicapa debe ser reticulada en una segunda instancia. Esto se hace mediante el agregado de una solución de glutaraldehído (que entrecruza las fibras de colágeno formando uniones covalentes entre ellas, lo que incrementa su estabilidad química) en condiciones de poca luminosidad y en cámara de frío.

Posteriormente las membranas se lavan cuidadosamente con agua destilada para remover el exceso de glutaraldehído.

Luego de esta segunda instancia de reticulación la matriz adquiere una leve coloración beige y las propiedades mecánicas mejoran significativamente.

Resultados

En la imagen A en la columna a la derecha se observa una buena adhesión entre la matriz esponjosa y el elastómero Silastic.

En las imágenes B a D se muestran micrografías, obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido a diferentes aumentos ($\times 100$, $\times 400$, $\times 20.000$, $\times 50.000$), de las matrices colagénicas reticuladas usando sulfato de condroitín y glutaraldehído, lo que permite su caracterización morfológica. En ellas se puede apreciar una microporosidad muy homogénea y un diámetro de poro predominantemente de 30-50 μm (3) aunque con presencia de algunas cavidades de mayor tamaño que no superan los 250 μm . Este diámetro de poro es del orden, e incluso un poco mayor, del diámetro de los vasos capilares lo cual permitiría alojarlos con comodidad.

A partir de todo lo anterior se puede decir que la mayoría de los desafíos planteados en la investigación han logrado sortearse y actualmente se está en etapa de optimización fina de los resultados alcanzados.

El desafío final, desde la óptica química, es alcanzar una mayor producción de segmentos reproducibles y homogéneos de piel sintética, es decir, lograr el escalado del proceso global de preparación a nivel de escala productiva.

Corresponde, asimismo, continuar con los estudios médicos (se harán en instancias posteriores) que van más allá del alcance de este grupo de investigación.

En este sentido, cabe mencionar que en el presente se está en proceso de comenzar con la realización de pruebas de esterilización mediante la aplicación de radiación gamma, y con los ensayos de cultivo in vitro, con el fin de caracterizar el funcionamiento del biomaterial y así poder evaluar su performance como tal.

Notas:

1. El trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo financiero de PEDECIBA, Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) de la Universidad de la República (UdelaR), Agencia Nacional de Investigaciones e Innovaciones (ANII) y al Proyecto INNOVA de la Unión Europea-ANII y a la colaboración de las: Lic. Geraldine Rimsky, Q. F. Susana Cáceres y Dra. Iris Miraballes, por las medidas de electroforesis y de dispersión de luz dinámica.

2. El colágeno, componente mayoritario del tejido conjuntivo, es una proteína que puede formar fibras y otras estructuras como redes. El colágeno confiere fuerza tensil a los tendones y a la piel le da resistencia, elasticidad y flexibilidad.

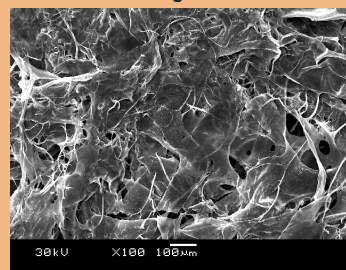
3. μm es el símbolo para representar los micrómetros. Un micrómetro equivale a una millonésima de metro.

* Helena Pardo, Ricardo Faccio, Mariano Romero, Ignacio Laborda, Luciana Fernández, Magdalena Irazoqui, Selva Cora, Alejandra Szabo y Alvaro W. Mombrú son docentes e investigadores de la Facultad de Química, Polo Tecnológico de Pando, Cátedra de Física, Departamento de Experimentación y Teoría de la Estructura de la Materia y sus Aplicaciones (DETEMA), Universidad de la República (UdelaR) y del Centro Interdisciplinario en Nanotecnología y Química y Física de Materiales, Espacio Interdisciplinario, UdelaR.

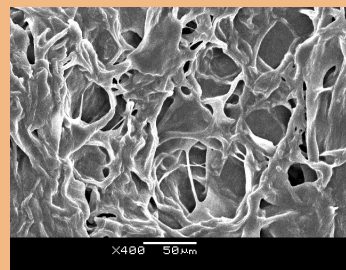


A Se observa que la adhesión de la matriz esponjosa a la película del elastómero Silastic es muy buena.

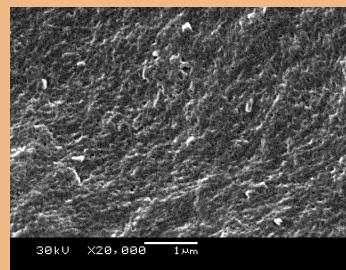
Micrografías



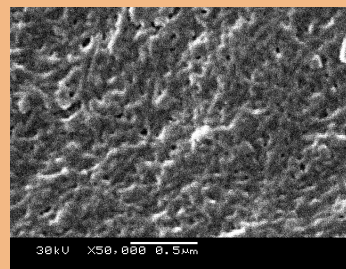
B X 100



C X 400



D X 20.000



E X 50.000