

COLÁGENO RECOMBINANTE COMO ANDAMIOS Y SU APLICACIÓN EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

RECOMBINANT COLLAGEN AS SCAFFOLDS AND ITS APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

Diana Laura Pérez-Osornio¹, Jorge Antonio Amador-Balderas²

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biotecnología

² Correo electrónico: diiana1908@gmail.com

³ Correo electrónico: jorge.amador.bal@hotmail.com

Resumen

La ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario y multidisciplinario de la medicina terapéutica quirúrgica enfocado en la fabricación de sustitutos para restaurar la función de tejidos y órganos. Para satisfacer sus necesidades se han ocupado biomateriales para cumplir con funciones específicas, como macromoléculas naturales para formar la matriz extracelular. Un ejemplo de este tipo de biomateriales es el colágeno, la proteína globular más abundante en animales para formar andamios. Una de las principales limitaciones del uso de colágeno natural es el riesgo de que acarree consigo agentes que produzcan enfermedades. Para resolver esta problemática, se ha recurrido a la tecnología recombinante, la cual ha demostrado que el colágeno recombinante es un biomaterial biocompatible inmunogénico con baja toxicidad, por ello se ha utilizado en la ingeniería de tejidos para la reparación de estos como huesos, tendones, piel, córnea, tejido nervioso y otros. Sin duda, esta proteína es un material prometedor y con aplicaciones diversas que, en conjunto con otras técnicas, podría revolucionar las tecnologías de la medicina regenerativa.

Palabras clave: Colágeno, Andamios, Ingeniería de Tejidos, Proteínas Recombinantes

Abstract

Tissue engineering is an interdisciplinary and multidisciplinary field of surgical therapeutic medicine focused on the manufacture of substitutes to restore the function of tissues and organs.

To meet these needs, biomaterials have been used to fulfill specific functions, such as natural macromolecules to form the extracellular matrix. An example of this type of biomaterials is collagen, the most abundant globular protein in animals to form scaffolds. One of the main limitations of the use of natural collagen is the risk of it to carry agents that trigger certain diseases. To solve this problem, recombinant technology has been used because it has shown that recombinant collagen is an immunogenic biocompatible biomaterial with low toxicity, so it has been used in tissue engineering to repair tissues such as bones, tendons, skin, cornea, nervous tissue, and others. Undoubtedly, this protein is a promising material with several applications that, together with other techniques, may revolutionize the technologies of regenerative medicine.

Keywords: Collagen, scaffolding, tissue engineering, recombinant proteins

Introducción

La ingeniería de tejidos se define como el campo interdisciplinario y multidisciplinario de la medicina terapéutica quirúrgica que se enfoca en la fabricación de sustitutos para restaurar la función de tejidos u órganos dañados, ocupando tres elementos básicos: células, moléculas señal y andamios (Farajollahi *et al.*, 2012). El objetivo principal de esta tecnología es reconstruir tejidos vivos para reemplazar daños o pérdidas de algún tejido u órgano, con la esperanza de mantener, restaurar o mejorar su función total o parcial (Dong y Yonggang, 2016).

Esta tecnología utiliza andamios como herramientas para proporcionar una matriz temporal extracelular sintética para las células regenerativas, lo cual ayuda a la unión extracelular, proliferación y diferenciación del tejido nuevo. Por ello, la composición química y estructura es lo más importante para los biomateriales utilizados (Ma, 2008).

Para satisfacer las necesidades de esta tecnología se han ocupado y explotado biomateriales que cumplen con funciones específicas, como las macromoléculas naturales que forman la matriz extracelular. Entre ellas, las proteínas fibrosas han recibido mucha atención debido a la versatilidad en su estructura y complejidad que permiten numerosas interacciones con las células que las rodean, inmunogenicidad baja y toxicidad mínima o ausente (Werkmeister y Ramshaw, 2012).

Un ejemplo de estas proteínas es la familia del colágeno. El colágeno es el mayor elemento estructural de todos los tejidos conectivos que no sólo provee soporte a la matriz extracelular, sino también tiene una gran variedad de funciones definidas por dominios proteicos adicionales (Gelse *et al.*, 2003). Es decir, el colágeno tiene una actividad importante para mantener la integridad biológica y estructural de la matriz

extracelular y proporcionar soporte físico a los tejidos.

El colágeno es una opción atractiva para la ingeniería de tejidos debido a que es fácil de modificar y procesar, es abundante, biodegradable, biocompatible, dúctil y no es antigénico (Gomes *et al.*, 2012). En los últimos años, se han producido diversas innovaciones en biomateriales basados en colágeno, desde matrices de colágeno inyectables hasta andamios de regeneración ósea.

Sin embargo, las proteínas naturales dentro de la ingeniería de tejidos tienen ciertas limitaciones respecto a la disponibilidad de la fuente y su estabilidad o la transmisión de organismos infecciosos (Farajollahi *et al.*, 2012). Para superar estas limitaciones se han explorado las tecnologías de ADN recombinante que permiten la síntesis de proteínas que son más baratas de producir y más fáciles de purificar, libres de patógenos y a las que se les pueden agregar funciones adicionales mediante la adición de otros dominios bioactivos, ofreciendo posibilidades prácticamente ilimitadas para la ingeniería de tejidos que incluso pueden abarcar la regeneración del tejido en sí (Gomes *et al.*, 2012).

Un ejemplo de las tecnologías que se han implementado es la recombinación de

proteínas fibrilares de la matriz extracelular, específicamente los colágenos tipo I y II; usados para la creación de andamios debido a su compatibilidad (Paredes *et al.*, 2017).

En este artículo se revisarán y analizarán las características sobre la familia del colágeno y sus aplicaciones dentro del campo de la ingeniería de tejidos tanto en su versión natural como en sus versiones recombinadas. Se presentará una breve introducción de la molécula de colágeno, seguida de una explicación técnica que cubre los métodos de producción de andamios de colágeno. Finalmente, se discutirán los avances recientes desarrollados en el campo de los biomateriales en ingeniería de tejidos basados en colágeno.

Colágeno como biomaterial

En la primera conferencia del “Consenso de la Sociedad Europea de Biomateriales” (ESB, por sus siglas en inglés) realizada en 1976, se definió al biomaterial como un material no viable utilizado en un dispositivo médico, destinado a interactuar con los sistemas biológicos; no obstante, la definición cambió de la siguiente manera “*material destinado a interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo.*” (O’Brien, 2011).

Ahora bien, los biomateriales a base de colágeno pueden provenir de dos técnicas: (1) matriz descelularizada de colágeno, la cual conserva la estructura original del tejido y la matriz extracelular (MEC), y (2) purificación y polimerización del colágeno para formar andamios. Estas técnicas pueden conducir a la producción de una MEC y son procesos físicos, químicos y enzimáticos. Sin embargo, por sí mismos ninguno puede producir una MEC completamente libre de desechos celulares, pues para ello se necesita de la combinación de las técnicas (Gilbert *et al.*, 2006).

Con el paso del tiempo, los biomateriales han pasado de interactuar con el cuerpo a influir en procesos biológicos cotidianos para alcanzar el objetivo de la regeneración tisular. Entre estos biomateriales encontramos tres grupos que se usan para la fabricación de andamios en la ingeniería de tejidos: cerámicas, polímeros sintéticos y polímeros naturales.

Las cerámicas son compuestos no metálicos con estructura cristalina generalmente con un alto nivel de rigidez que se usan comúnmente en la ingeniería de tejidos óseos, pero son materiales frágiles que tienen un índice de degradación lento, así que pueden persistir durante meses (Murphy *et al.*, 2013).

A su vez, los polímeros naturales usados comúnmente para la ingeniería de tejidos contienen colágeno, glucosaminoglucano, quitosano, ácido hialurónico, fibrina y elastina, aislados directamente de la MEC. Su adhesión y actividad celular posterior está mediada por interacciones integrina-ligando entre las células y su MEC circundante. Los polímeros naturales presentan una superficie más nativa en comparación con los sintéticos, son biocompatibles y degradables con productos de degradación no tóxicos (Murphy *et al.*, 2013).

Existe un enfoque en el uso de materiales biológicos como biomateriales de andamios. Los materiales biológicos como el colágeno o los proteoglicanos se han usado en la producción de andamios en la ingeniería de tejidos. A diferencia de los andamios con base en polímeros sintéticos, los que se basan en polímeros naturales son biológicamente activos y promueven una adhesión y un crecimiento celular adecuados. Además, son biodegradables y permiten que las células hospedadoras produzcan su propia matriz extracelular y reemplacen el andamio degradado. Sin embargo, la fabricación de andamios a partir de materiales biológicos con estructuras homogéneas y reproducibles representan un desafío para la investigación actual (Cen *et al.*, 2008).

Aunque los andamios han demostrado ser prometedores, en alguna fase, cada uno no se encuentra de manera natural en el cuerpo y tienen problemas asociados con la biocompatibilidad o la biodegradabilidad. Un enfoque más típico es el uso de andamios a base de colágeno que se ha estudiado a nivel recombinante para resolver dichos desafíos.

Para comprender esto, es necesario definir la proteína recombinante como aquella que se produce o sintetiza a partir del ADN recombinante, es decir, tomando un gen determinado que tiene información para codificar una proteína. Se introduce una célula de un organismo distinto del inicial o

natural (Paredes *et al.*, 2017). Esta puede servir como fuente inestimable porque es segura y reproducible para la fabricación de andamios.

Una de las proteínas recombinantes más usadas en la ingeniería de tejidos es el colágeno, debido a que es una de las proteínas más abundantes en la naturaleza y se encuentra en mayor o menor proporción en todos los animales. El colágeno animal más abundante se asocia con fibrillas periódicas reticuladas, que proporcionan las propiedades mecánicas de los tejidos y biomateriales (An *et al.*, 2014).

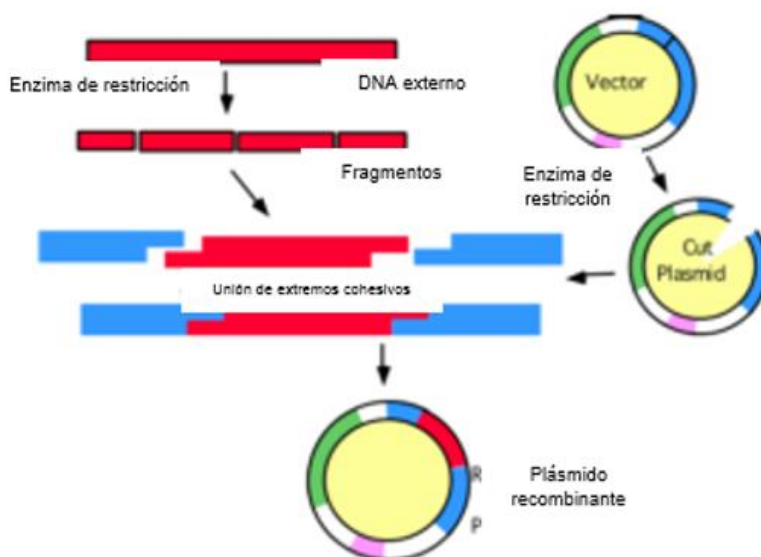


Figura 1. Figura representativa de la formación de una proteína recombinante. Figura modificada de Sethi, 2013.

La matriz extracelular brinda soporte físico a los tejidos que ocupan el espacio

intercelular y no sólo actúa como un andamio nativo para organizar las células dentro de los

tejidos conectivos, sino también como una sustancia dinámica, móvil y flexible que define el comportamiento celular y la función tisular.

Para la mayoría de los tejidos conectivos blandos y duros (hueso, cartílago, tendón, córnea, vasos sanguíneos y piel), las fibrillas de colágeno y sus redes funcionan como MEC, ya que desempeñan un papel dominante en la preservación de la integridad biológica y estructural de la misma y son dinámicas, sometiéndose a remodelación constante para funciones fisiológicas apropiadas (Cen *et al.*, 2008). Hasta la fecha se han identificado 28 tipos de colágeno; los tipos I, II, III y V son los principales que componen la parte esencial del colágeno en hueso, cartílago, tendón, piel y músculo.

Las fibrillas de colágeno son la principal fuente de resistencia a la tracción de los tejidos óseos. Las propiedades mecánicas del hueso se pueden ajustar variando la orientación de la fibrilla que puede resultar del grado de reticulación del colágeno. Las fibrillas de colágeno, junto con 10% de glucosaminoglucanos (GAG), contribuyen a la viscoelasticidad y función compresiva del

cartílago articular. Además, las fibrillas de colágeno son esenciales en el tendón para mantener sus propiedades mecánicas y transmitir fuerza en el movimiento (Cen *et al.*, 2008).

Debido a la diversidad de usos del colágeno, las investigaciones se han centrado en desarrollar biomateriales para imitar la arquitectura fibrilar que pudiesen funcionar como andamiaje celular en sustitución de la MEC nativa basada en colágeno.

Desafíos de los biomateriales

Uno de los desafíos principales en la creación y producción de un biomaterial es la compatibilidad que pueda tener con el organismo. En el caso de las proteínas recombinantes, esto se ha experimentado con estudios de toxicidad, inmunogenicidad y biodegradación. Por consiguiente, la biocompatibilidad del colágeno obtenido por métodos recombinantes está comprobada ampliamente y se sabe que permite la proliferación celular y que no interfiere con el comportamiento celular. Sin embargo, hay ventajas y desventajas en los métodos tradicionales y recombinantes de obtención que se resumen en la Tabla 1.

Colágeno obtenido de fuentes tradicionales		Colágeno obtenido por métodos recombinantes	
Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Baja toxicidad (relativa a otros materiales)	Posible transmisión de enfermedades animales	Baja toxicidad (relativa a otros materiales)	Altos costos
Degradación natural por metaloproteinasas	Reacciones alérgicas	Degradación natural por metaloproteinasas	Bajos rendimientos
Fácil de entrecruzar	Contaminación con patógenos	Fácil de entrecruzar	Sistemas de expresión complejos
	Reacción Inmune	Su estructura es la misma que la del colágeno humano nativo	
	Variación lote a lote		

Tabla 1. Comparación entre el colágeno obtenido por métodos tradicionales y recombinantes. Tabla modificada de Paredes *et al.*, 2017.

El término biocompatible se refiere a la capacidad de un armazón para soportar el crecimiento celular y la regeneración tisular *in vivo*, sin provocar una respuesta inflamatoria o inmunogénica que puede inducir su rechazo (Murphy *et al.*, 2013). La elección del material y estructura del material influyen en la biocompatibilidad y degradabilidad.

Se han llevado a cabo experimentos con colágeno debido a que es uno de los principales constituyentes de la MEC natural y estos han sido exitosos en piel, vejiga y vías respiratorias. Sin embargo, para superar las limitaciones asociadas con los polímeros naturales, los avances en diseño y fabricación de andamios han conducido a un cambio de paradigma hacia el desarrollo de andamios biomiméticos.

En los experimentos, se espera que haya formación de neotipos junto con degradación progresiva del andamio, mientras que la ingeniería del colágeno durante la formación del tejido es el objetivo intrínseco que se espera lograr. No obstante, esto depende de la aceptación del implante artificial por parte de los tejidos circundantes y de las respuestas celulares provocadas, así como de las propiedades biomecánicas, estructurales y de degradación de los biomateriales (Cen *et al.*, 2008).

Propiedades biofísicas, bioquímicas y biológicas del colágeno

Las proteínas fibrosas, como el colágeno, se caracterizan por tener secuencias altamente repetitivas de aminoácidos que dan como resultado estructuras secundarias casi homogéneas, permitiendo la formación de su

estructura de fibra que le proporciona sus funciones principales de soporte (Wang *et al.*, 2006).

El colágeno es la proteína más abundante en los animales y en su mayoría se compone de tres cadenas polipeptídicas que adquieren una conformación de hélice levógira que se encuentra tan empaquetada que cada tercer residuo debe ser una glicina (Shoulders *et al.*, 2009). Este dominio de triple hélice es la característica común que

comparten las 28 proteínas de esta familia, llegando a abarcar de 10 a 96% de la estructura total (Ricard, 2011).

Cada tipo de colágeno tiene una composición diferente en sus cadenas (denominadas α) y en su estructura cuaternaria, de manera que algunos colágenos se encuentran por homotrímeros (tres cadenas α iguales) o heterotrímeros (dos cadenas α iguales y una diferente o tres cadenas α diferentes) (Tabla 2).

Tipo	Composición molecular	Tejido(s) donde se encuentra
Colágenos que forman fibrillas		
I	$[\alpha 1(\text{I})]_2 \alpha 2(\text{I})$	Huesos, dermis, tendones, ligamentos, córnea
II	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	Cartílago, humor vítreo, núcleo pulposo
III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Piel, fibras reticulares de tejidos como pulmones e hígado
V	$\alpha 1(\text{V}) \alpha 2(\text{V}) \alpha 3(\text{V})$	Pulmones, córnea, huesos, membranas fetales
XI	$\alpha 1(\text{XI}) \alpha 2(\text{XI}) \alpha 3(\text{XI})$	Cartílago, humor vítreo
Colágenos de membranas basales		
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV}), \alpha 1-\alpha 6$	Membranas basales
Colágeno microfibrilar		
VI	$\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$	Dermis, cartílago, placenta, pulmones, discos intervertebrales
Fibrillas de anclaje		
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	Piel, mucosa oral, cuello uterino, uniones dermis-epidermis
Colágenos formadores de redes hexagonales		
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2 \alpha 2(\text{VIII})$	Células endoteliales, membrana de Descemet
X	$[\alpha 3(\text{X})]_3$	Cartílago hipertrófico
Colágenos FACIT		
IX	$\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$	Cartílago, humor vítreo, córnea
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	Pericondrio, ligamentos, tendones
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	Dermis, tendones, placenta, pulmones, hígado
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	Rabdomiosarcoma
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	Epitelio corneal, piel embrionaria, cartílago esternal, tendones

XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	Pared de vasos sanguíneos
Colágenos transmembranales		
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	Epidermis, folículo piloso, endomisio, intestino, condrocitos, pulmones, hígado
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	Uniones dermis-epidermis
Multiplexinas		
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	Fibroblastos, células del músculo liso, riñones, páncreas
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	Fibroblastos, queratinocitos, amnios
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	Pulmones, hígado

Tabla 2. Composición molecular y distribución en tejidos de diferentes tipos de colágeno. Tabla modificada de Gelse *et al.*, 2003.

La Tabla 2 muestra la amplia distribución de la familia de los colágenos, así como su clasificación de acuerdo con las estructuras supramoleculares que forman (esquematizadas en la Figura 2), algunas de las cuales se describen a continuación.

- **Colágenos formadores de fibrillas.**

Esta subfamilia está integrada por los colágenos tipo I, II, III, V y XI. Las fibrillas se forman en la matriz extracelular y su función es proveer rigidez, resistencia a la tracción y rigidez torsional, especialmente el colágeno tipo I (Gelse *et al.*, 2003).

- **Colágenos asociados a fibrillas.** Los colágenos asociados a fibrillas con triples hélices interrumpidas (FACIT, por sus siglas en inglés) se caracterizan, como su nombre indica, por dominios de triple hélice interrumpidos por dominios cortos no

helicoidales (Gelse *et al.*, 2003). Esta familia está integrada por el colágeno IX, que se asocia a fibrillas de colágeno II; y los colágenos tipo XII y XIV, que se asocian a fibrillas de colágeno I (Ricard-Blum, 2011). Las funciones de estos tipos de colágenos aún no están del todo definidas (Gelse *et al.*, 2003).

- **Colágeno microfibrilar.** El único tipo de colágeno presente en esta subfamilia es el colágeno tipo VI, compuesto por un heterotrímero con dominios de triple hélice cortos y dominios globulares en las zonas N y C terminales (Gelse *et al.*, 2003). Este tipo de colágeno forma filamentos que se agregan para dar lugar a una red de microfibrillas ubicada en la matriz extracelular de todos los tejidos conectivos, excepto el óseo (Gelse *et al.*, 2003).

- **Colágenos formadores de redes hexagonales.** Estos son de cadena corta y están integrados por los colágenos tipo VIII y X. Sus funciones no han sido determinadas por completo, aunque se cree que el primero se encuentra en la membrana de Descemet en la córnea y el segundo está relacionado con procesos de osificación endocondral (Gelse *et al.*, 2003).
- **Colágeno de membranas basales.** Esta subfamilia solo está integrada por el colágeno tipo IV que es el componente estructural más

importante de las membranas basales, pues es el responsable de integrar sus componentes en un agregado supramolecular estable (Gelse *et al.*, 2003).

De los tipos de colágenos descritos anteriormente, el más abundante es el fibrilar, el cual desempeña un papel estructural al contribuir con las propiedades mecánicas de tejidos como la resistencia a la tracción de la piel y los ligamentos, mientras que otros tipos de colágenos (menos abundantes) son esenciales para mantener la integridad de los tejidos (Ricard, 2011).

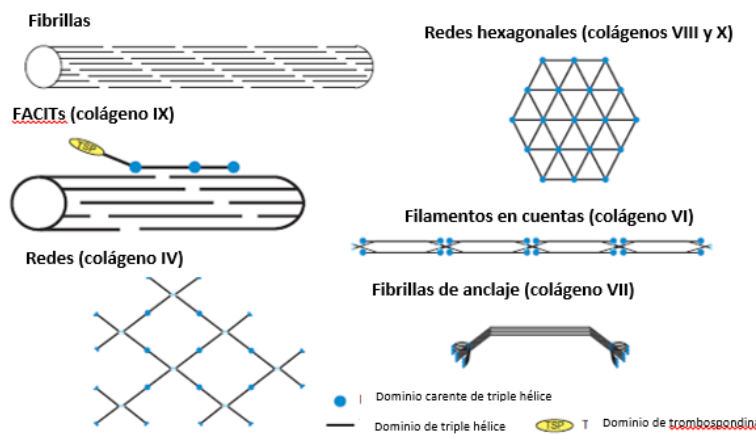


Figura 2. Ejemplos de las estructuras supramoleculares formadas por distintos tipos de colágenos. Figura modificada de Ricard, 2011.

Los colágenos obtienen estas funciones al formar parte de la matriz extracelular y ser ligando de una gran cantidad de proteínas como diferentes tipos

de integrinas, receptores diméricos de discoidina DDR1 y DDR2, glicoproteínas asociadas a inmunoglobulinas y plaquetas, Endo180 y otras (Ricard, 2011). Por

consiguiente, es una familia ampliamente reconocida por las células del organismo y bastante conveniente para utilizarse como biomaterial.

Extracción y purificación del colágeno

Los colágenos producidos en animales suelen ser económicos puesto que son muy reproducibles, pero existen dificultades para la preparación estándar de los colágenos, así que esto representa limitaciones importantes para su producción. Asimismo, existen posibles efectos secundarios y riesgos alérgicos de los productos provenientes de esta proteína.

El *colágeno soluble* en agua simboliza un pequeño porcentaje del total de la producción. La propiedad de solubilidad del colágeno depende del tejido y la edad del donante. Los disolventes utilizados para extraer colágeno son solución salina neutra o ácido acético diluido. En cambio, los álcalis fuertes o enzimas son alternativas para el *colágeno insoluble*, pues con este se pueden separar enlaces cruzados (Dong *et al.*, 2016).

Las secuencias nativas de colágeno son resistentes a la digestión por enzimas como tripsina y quimotripsina. La digestión enzimática en el proceso de purificación asegura que el producto final esté libre de contaminantes, lo cual es importante para el

control de calidad. La expresión recombinante de proteínas en *Escherichia coli* es un proceso con excelente escalabilidad (An *et al.*, 2014).

Es probable que el costo global del recurso para producir este material de colágeno bacteriano altamente ajustable sea menor que el colágeno recombinante obtenido de células mamíferas o incluso de sistemas transgénicos.

El colágeno se puede obtener por procesos químicos como la hidrólisis química y la hidrólisis enzimática (Zavareze *et al.*, 2009). La hidrólisis química es común en la industria, pero los procesos biológicos que usan la adición de enzimas son más prometedores para una mejor funcionalidad, además de que generan menos residuos y pueden reducir el tiempo de procesamiento, pero son costosos. Para extraer el colágeno es preciso eliminar enlaces cruzados intramoleculares e intermoleculares covalentes, que implican residuos de lisina, sacáridos y enlaces con ésteres. Antes de extraer colágeno se puede hacer un pretratamiento para excluir sustancias no colágenas y lograr mayores rendimientos (Schmidt *et al.*, 2016).

Origen y variabilidad del colágeno

El colágeno puede provenir de casi todos los animales vivos debido a que es una de las

proteínas más abundantes, pero las fuentes comunes para su aplicación en la ingeniería de proteínas provienen de piel y tendones de bovinos, piel de cerdo y ratones, entre otros. Diversos estudios coinciden que el colágeno purificado se puede aislar del tejido nervioso periférico humano o de la placenta humana. Recientemente, el colágeno de pescado ha generado gran atención, ya que puede extraerse y purificarse a partir de pieles y huesos de pescado desperdiciado (Dong *et al.*, 2016).

No obstante, las fuentes comunes de colágeno para aplicaciones en ingeniería de tejidos incluyen piel y tendones de bovinos, piel de cerdo y cola de rata, entre otros. Incluso hay empresas que se dedican a industrializar colágeno recombinante que suele ser menos inmunogénico que las fuentes animales y cuya característica principal es una composición idéntica para diferentes lotes de producción y parecen ser el futuro de los andamios de colágeno (Dong *et al.*, 2016).

Recombinación de colágeno y su expresión

Una de las principales limitaciones del uso de colágeno natural como biomaterial (como el extraído de tejidos animales) es el riesgo de acarrear consigo agentes que produzcan enfermedades. Para resolver esta

problemática, se recurre a la tecnología recombinante con la cual se puede alcanzar una producción de colágeno en masa en sistemas de expresión en células huésped como levaduras, bacterias, células de insectos o mamíferos y animales y plantas transgénicas (Dong y Yonggang, 2016). En términos generales, el mecanismo de obtención de una proteína recombinante se realiza siguiendo los siguientes pasos: (1) el gen codificador para la proteína deseada se aísla de una célula humana, (2) se inserta en un vector (usualmente un plásmido bacteriano) para ser clonado y (3) este es transferido a una célula huésped que tenga una tasa alta de crecimiento (como se mencionó antes, puede ser una levadura, una célula animal, bacterias y otras). Una vez dentro de la célula, esta sintetiza la proteína contenida en el gen que se le insertó y finalmente se extrae y purifica (Sethi, 2013).

Algunos ejemplos de las células huésped utilizadas como sistemas de expresión de colágeno son *E. coli* y *Bacillus brevis* como sistemas de expresión procariotas; *P. pastoris*; *Saccharomyces cerevisiae*; CHO (células de ovario de hámster chino); COS (células tipo fibroblasto derivadas de riñón de mono); HEK293 (células de riñón de embrión humano); y HT1080 (células de fibrosarcoma de tejido

conectivo humano) como sistemas de expresión eucariotas (Paredes, 2017).

Es necesario agregar una proteína adicional al sistema recombinante: la enzima prolil-4-hidroxilasa (P4H), la cual es un elemento esencial para el plegamiento de las cadenas polipeptídicas del colágeno para formar las triples hélices y cuya actividad natural es deficiente o nula en muchas de las células huésped actualmente utilizadas (Dong y Yonggang, 2016).

A pesar de ello, incluso con la adición de estos genes puede haber complicaciones para generar moléculas estables de colágeno, ya que la actividad de P4H depende de factores como las condiciones de expresión, la concentración de los cofactores, el tiempo de inducción y otros (An *et al.*, 2014). Esto demuestra que aún hay desafíos que superar cuando se abordan los temas del uso de proteínas recombinantes (en ingeniería de tejidos o cualquier otro campo de aplicación) y de su disponibilidad para reducir costos.

Para desarrollar el tema de la expresión del colágeno recombinante, a continuación se describen algunas de las características de los sistemas utilizados para este propósito.

Colágeno bacteriano

Los procesos de extracción a partir de animales tienen ventajas y desventajas; no

obstante, sobresale una tecnología que está revolucionando la manera de extraer y obtener proteínas recombinantes por medio de bacterias.

El colágeno obtenido por métodos recombinantes tiene ventajas como la disponibilidad y la calidad controlada del producto, la ausencia de contaminantes de animales, la potencialidad de producir los tres tipos de colágeno y la posibilidad de seleccionar dominios específicos de expresión. Los sistemas de expresión de colágeno pueden ser células procariotas o eucariotas (Puerto *et al.*, 2017).

Sistemas de expresión de colágeno recombinante en células procariotas

Aunque la bacteria más utilizada para expresar colágeno es *Escherichia coli*, hay algunas dificultades en el sistema de expresión, específicamente para colágenos provenientes de mamíferos debido a que conllevan a la formación de cuerpos de inclusión no deseados en las bacterias o la producción de su versión desnaturalizada (An *et al.*, 2014).

El rendimiento promedio de *E. coli* es de 0.2 a 0.3 g/L de colágeno purificado en cultivo de matraces con agitación tradicional y hasta 9.5 g/L en un lote alimentado de alta densidad. El costo global de los recursos para producir este material es ajustable y puede ser

menor que el colágeno recombinante obtenido de células eucariotas e incluso de sistemas transgénicos (An *et al.*, 2014).

La Figura 3 ejemplifica el método para fabricar materiales para el colágeno bacteriano recombinante Scl2. Esta figura también muestra que se produce colágeno bioactivo con manipulación de genes, producción y purificación de alto rendimiento

(An *et al.*, 2014). Las condiciones y la manipulación pueden desencadenar el autoensamblaje de Scl2 y los materiales fabricados pueden cumplir el objetivo de diseñar y desarrollar MEC artificiales. Esta ejemplificación y, en general, el colágeno recombinante bacteriano tienen ventajas como su capacidad de ajuste y escalabilidad altas y complejidad y costo bajos.

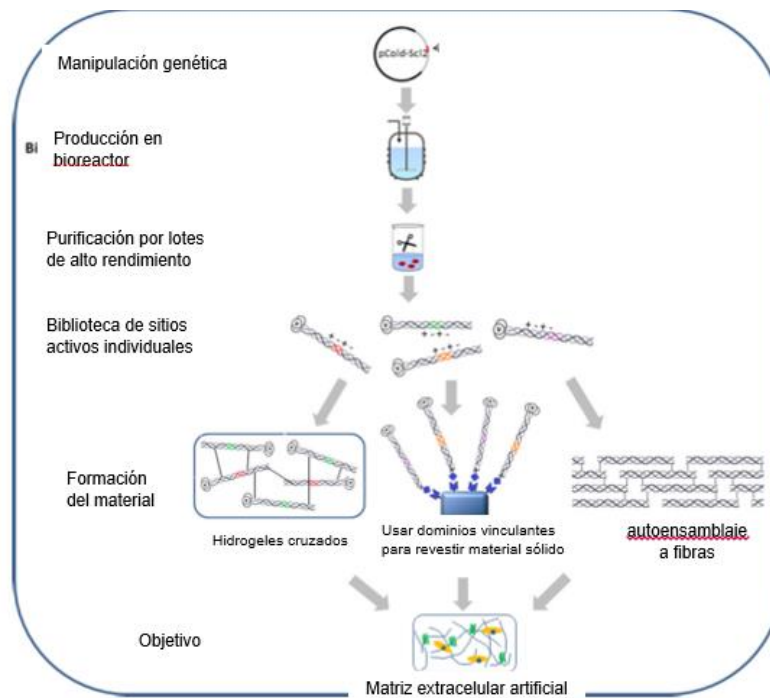


Figura 3. Diagrama esquemático del método de producción de colágeno bacteriano recombinante y estrategias de fabricación de materiales. Figura modificada de An *et al.*, 2014.

Uso de animales y plantas transgénicas

El nombre que recibe un sistema de expresión de colágeno en una planta de tabaco es rhCOL1. Este sistema contiene enzimas P4H

y LH3, las cuales son esenciales para la maduración del colágeno, la formación de la triple hélice y el ensamblaje en fibrillas estables (Shoseyov *et al.*, 2014).

El colágeno extraído de rhCOL1 es sumamente parecido al colágeno humano y está formado por estructuras tridimensionales más aptas para su uso en la ingeniería de tejidos que aquellas formadas por colágeno obtenido por métodos tradicionales, además de que están libres de cualquier contaminante o agente transmisor de enfermedades. Las cantidades de proteínas obtenidas a través de este sistema son altas en comparación con los métodos tradicionales (Shoseyov *et al.*, 2014).

Se realizó un análisis de funcionalidad de andamios de rhCOL1 y se encontró que la biocompatibilidad resultante fue mayor que con un andamio de colágeno obtenido por métodos tradicionales, ya que hubo una mayor proliferación celular. El experimento se llevó a cabo simulando un sustituto de piel y, al utilizar rhCOL1, se produjo una mayor diferenciación celular en la epidermis, lo cual se puede interpretar como un proceso de cicatrización más rápido (Shoseyov *et al.*, 2014).

Otro ejemplo es el sistema de expresión de colágeno tipo I en cebada, utilizando tres promotores: ubiquitina de maíz, glutenina y α -amilasa. Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron bajos (Paredes *et al.*, 2017). También se han ocupado sistemas en plantas que carecen de P4H, produciendo colágeno en ausencia de

hidroxiprolina. Aunque esta proteína es fundamental para la formación de la triple hélice, los colágenos obtenidos por este método pueden tener aplicaciones en ingeniería de tejidos como andamios selectivos, ya que tienen adherencia más débil a ciertas células, como las plaquetas (Paredes *et al.*, 2017).

En el caso de los animales transgénicos, las últimas tecnologías han hecho posible la producción de diversas proteínas recombinantes en leche, sangre, clara de huevo, semen, orina y glándulas de seda, usando especies como cabras, cerdos, conejos, ratones y vacas para este propósito. Hasta la fecha, existen pocas publicaciones acerca de la producción de colágeno en animales transgénicos. Uno de estos escasos ejemplos es la producción de colágeno humano en leche de ratón que tuvo como resultado una proteína inestable (atribuible a una baja actividad de P4H) y, aun con la introducción de los genes que expresan P4H, se obtuvieron colágenos de menor tamaño y estabilidad (Paredes *et al.*, 2017).

Aplicaciones en la ingeniería de tejidos (Colágenos recombinantes para andamios en ingeniería de tejidos)

Para que la técnica de la ingeniería de tejidos sea exitosa, es necesario que el material que

compone al andamio tenga las siguientes características: propiedades de biocompatibilidad, promoción de actividades celulares como la adhesión, biodegradabilidad a un ritmo correspondiente al crecimiento del tejido, una estructura tridimensional porosa con espacios microscópicos interconectados que permitan el crecimiento del tejido, propiedades mecánicas favorables y un proceso de fabricación altamente reproducible y adaptable para diferentes formas y tamaños (Wan *et al.*, 2007).

El colágeno cumple con todas estas características al formar parte, de manera natural, de la matriz extracelular y su forma recombinante presenta mayores ventajas al tener funciones adicionales mediante la adición de otros dominios o moléculas bioactivas, como la producción de péptidos antimicrobianos o la combinación de las funciones estructurales de proteínas diferentes (Farajollahi *et al.*, 2012).

El colágeno recombinante tiene diversas aplicaciones, como la formación de andamios útiles en la reparación ósea (en forma de esponja) o como base para la ingeniería de epitelios en piel, cartílago y ligamento periodontal en forma de membrana, película o gel (Paredes *et al.*, 2017).

Asimismo, las formas recombinadas de colágeno tipo I y III han sido utilizadas para la fabricación de un sustituto de córnea en seres humanos de manera que se pueda atender la problemática de la escasez de donantes de alta calidad de este tejido, obteniéndose resultados favorables como toxicidad nula, biocompatibilidad, reacciones adversas inflamatorias o inmunitarias nulas, proliferación y estratificación celular, regeneración nerviosa, entre otros (Merrett *et al.*, 2008).

En el tratamiento de lesiones del sistema nervioso, es posible incorporar técnicas de ingeniería de tejidos. Se ha demostrado que un andamio de colágeno es un método efectivo para mejorar la regeneración axonal, además de que sirve como un sistema de guía para los nervios en regeneración, permitiendo una recuperación funcional (Dong y Yonggang, 2016).

En el campo de la regeneración periodontal, el rhBMP-2 (que contiene colágeno) fue probado como implante y se reportaron resultados como la formación fisiológica ósea normal, la oseointegración y una funcionalidad de vida larga (Sethi, 2013).

Otro ejemplo es el andamio híbrido compuesto por colágeno tipo I y fosfato tricálcico β , probado en células fibroblásticas humanas, donde se observó que las células

mantuvieron un desarrollo favorable, conservaron su morfología, tuvieron baja citotoxicidad y conservaron un porcentaje de células viables mayor a 95% (Oprita *et al.*, 2006).

Como el colágeno tipo I es uno de los componentes mayoritarios de los tejidos óseos, se han realizado diversos estudios ocupando esta proteína como andamio para estimular la reparación de los huesos. Los resultados han sido favorables, ya que en numerosas ocasiones se ha demostrado que este tipo de andamio favorece la regeneración del tejido óseo (Dong y Yonggang, 2016). Se han obtenido resultados similares con andamios compuestos de colágeno tipo II para lesiones de cartílago, favoreciendo una regeneración más rápida (Dong y Yonggang, 2016).

Otra área de aplicación es la reparación de ligamentos y tendones, los cuales tienen una capacidad limitada de autoregeneración, pero los andamios de colágeno pueden proporcionar una estrategia efectiva para acelerar este proceso (Dong y Yonggang, 2016).

Finalmente, hay ejemplos del uso de andamios de colágeno tipo IV para la formación de vasos sanguíneos artificiales, llegando a desarrollar un endotelio funcional, y del uso de andamios de colágeno tipo I para

la regeneración de la piel, donde se ha observado una alta citocompatibilidad y un aumento de la proliferación celular (Dong y Yonggang, 2016).

Conclusiones

Se ha comprobado que los andamios de colágeno recombinante son de gran importancia para las nuevas técnicas regenerativas de tejidos por sus características de biocompatibilidad y baja inmunogenicidad. Como resultado, el colágeno suele ser la proteína más usada como biomaterial, no solo en la ingeniería de tejidos, sino también en otros campos del área de la salud como la cicatrización de heridas corneales.

La mayoría de las investigaciones actuales apuntan a la optimización de biomateriales a base de colágeno para aplicaciones médicas al mejorar la resistencia mecánica, la biodegradabilidad y las características de administración.

Aunque ha habido grandes avances en el desarrollo y el uso de estas técnicas recombinantes, se requieren aún de muchos estudios y experimentación para explotar las capacidades de una de estas herramientas biomédicas para sintetizar nuevos tipos de colágenos y mejorar su rendimiento, debido a que un andamio de colágeno efectivo para un

tejido específico puede tener resultados deficientes en otro tejido u órgano.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al Dr. Enrique González Vergara por sus enseñanzas que

sirvieron de guía para la redacción de este artículo. Asimismo, agradecemos a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por los recursos brindados para obtener la información presentada en este trabajo.

Referencias

- An, B., Kaplan, D. L. y Brodsky, B. (2014). Engineered recombinant bacterial collagen as an alternative collagen-based biomaterial for tissue engineering. *Frontiers in Chemistry*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00040>
- Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W. y Cao, Y. (2008). Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. *Pediatric Research*. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31816c5bc3>
- Dong, C. y Lv, Y. (2016). Application of collagen scaffold in tissue engineering: Recent advances and new perspectives. *Polymers*. <https://doi.org/10.3390/polym8020042>
- Farajollahi, M. M., Hamzehlou, S., Mehdipour, A. y Samadikuchaksaraei, A. (2012). Recombinant proteins: Hopes for tissue engineering. *BioImpacts*. 2 (3). <https://doi.org/10.5681/bi.2012.010>
- Gelse, K., Pöschl, E. y Aigner, T. (2003). Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (12), 1531-1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>
- Gilbert, T., Sellaro, T., Badylak, S. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. Vol 27 (19). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
- Gomes, S., Leonor, I., Mano, J., Reis, R. y Kaplan, D. (2012). Natural and Genetically Engineered Proteins for Tissue Engineering. *Progress in Polymer Science*. 37 (1) <https://10.1016/j.progpolymsci.2011.07.003>
- Ma, P. (2008). Biomimetic materials for Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60 (2). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.041>
- Merret, K., Fagerholm, P., McLaughlin, C., Dravida, S., Lagali, N., Shinozaki, N., Watsky, M., Munger, R., Kato, Y., Li, F., Marmo, C. y Griffith M. (2008). Tissue-Engineered

Recombinant Human Collagen-Based Corneal Substitutes for Implantation: Performance of Type I versus Type III Collagen. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 49 (9). <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1348>

Murphy, C., O'Brien, F., Little, D. y Schindeler, A. (2013). Cell-Scaffold Interactions in the Bone Tissue Engineering Triad. *European Cells and Materials*. 26. <https://doi.org/10.22203/eCM.v026a09>

O'Brien, F. (2011). Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. Vol. 14 (3)

Oprita, E., Moldovan, L., Craciunescu, O., Buzgariu, W., Tardei, C. y Zarnescu, O. (2006). A bioactive collagen- β tricalcium phosphate scaffold for tissue engineering. *Central European Journal of Biology*. 1 (1). <https://doi.org/10.2478/s11535-006-0005-7>

Paredes, A., Camacho, T., Vallejo, A. y Esquivel, H. (2017). Colágenos Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*. 38 (1). <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.7>

Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 (1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

Schmidt, M., Dornelles, R., Mello, R., Kubota, E., Mazutti, M., Kempka, A. y Demiate, I. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*. 23 (3).

Sethi, N. (2013). Applications of recombinant protein therapeutic agents in periodontics contributors. *International Journal of Medicine and Medical Sciences Review*. 5 (9). <https://doi.org/10.5897/IJMMS2013.0902> ISSN

Shoseyov, O., Posen, Y. y Grynspan, F. (2014). Human collagen produced in plants. *Bioengineered*. 5 (1). <https://doi.org/10.4161/bioe.26002>

Shoulders, M. y Raines, R. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*. 78. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

Wan-Ju, L., Shanti, R. y Tuan, R. (2006) Electrospinning Technology of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Tissue, Cell and Organ Engineering*. 9.

Wang, X., Kim, H. J., Wong, C., Vepari, C., Matsumoto, A. y Kaplan, D. (2016). Fibrous proteins and tissue engineering. *Materials Today*. 9 (12).

Werkmeister, J. y Ramshaw, J. (2012). Recombinant protein scaffolds for tissue engineering.
Biomedical materials. 7(1). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/1/012002>