

2. Biomateriales en medicina regenerativa: del diseño a la aplicación.

R. Martínez-Borrajo¹, P. Díaz-Rodríguez^{1,2}, V. Santos-Rosales¹, C. López-Iglesias¹, A. Iglesias Mejuto¹, J.L. Gómez-Amoza¹, C.A. García-González¹, M. Landin¹

¹Grupo I+D Farma (GI-1645), Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, España

²Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de La Laguna, Campus Anchieta, La Laguna, España.

La ingeniería de tejidos requiere del uso de biomateriales con requisitos específicos respecto a su estructura, composición, propiedades mecánicas y esterilidad. Además de su función como soporte mecánico para el desarrollo celular, estos materiales pueden tener prestaciones avanzadas a través de su carga con moléculas terapéuticas. El desarrollo de nuevos métodos capaces de asegurar la esterilidad de los biomateriales manteniendo su estabilidad supone un gran avance para el campo de la ingeniería de tejidos. Del mismo modo, el desarrollo de biomateriales nanométricos para la liberación selectiva de fármacos tiene un elevado potencial en la regeneración de tejidos musculoesqueléticos.

1. Introducción

1.1. Relevancia del empleo de biomateriales para la regeneración del tejido óseo y cartílago.

La ingeniería de tejidos combina células, andamios y moléculas terapéuticas, constituyendo una alternativa prometedora para el tratamiento de diversas patologías. Los andamios celulares están formados por biomateriales específicamente diseñados para simular las propiedades fisicoquímicas de la matriz extracelular (ECM), formada principalmente por proteínas, proteoglicanos, glucosaminoglucanos, glucoproteínas y componentes inorgánicos como la hidroxiapatita (Bosman y Stamenkovic, 2008). La ECM, que varía en función del tejido, supone su base estructural, y por tanto es necesario que los andamios sean capaces de simular sus características específicas (Yamaguchi y Silva, 2019, Dong et al., 2019, Ghosh et al., 2019).

El uso de biomateriales para aplicación musculoesquelética se basa en la selección y modificación de materiales con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas y biológicas (Pina et al., 2019, Ghosh et al., 2019). Se han desarrollado diferentes tipos de biomateriales para su empleo en medicina regenerativa entre los que se incluyen polímeros naturales o sintéticos, cerámicas y metales (Pina et al., 2019).

Los *polímeros naturales* (colágeno, gelatina, alginato, quitosano...) son ampliamente utilizados en ingeniería de tejidos ya que son altamente biocompatibles y presentan una buena interacción material-célula. Sin embargo, este tipo de materiales poseen propiedades mecánicas deficientes que se pueden mejorar mediante su combinación con materiales sintéticos, dando lugar a biomateriales híbridos (Pina et al., 2019, Panayi y Orgill, 2018, Malafaya et al., 2007). Los *polímeros sintéticos* se caracterizan por tener mejores propiedades mecánicas, que pueden ser moduladas por las condiciones de síntesis, peso molecular y composición química. En este grupo se incluyen polímeros ampliamente utilizados en ingeniería de tejidos como el ácido poliláctico (PLA), la poli(ϵ -caprolactona) (PCL), el ácido poliglicólico (PGA) o el copolímero de ambos (poli (ácido láctico-co-ácido glicólico); PLGA) (Pina et al., 2019, Ghosh et al., 2019). Los polímeros pueden utilizarse para generar diversas estructuras como mallas, esponjas, fibras, esferas y espumas que permiten la encapsulación y/o adhesión celular y la difusión de nutrientes.

Dentro de los materiales inorgánicos se incluyen las *cerámicas* y los *metales*. Las cerámicas son ampliamente utilizadas en regeneración ósea debido a su composición química, similar a la

del componente inorgánico de la matriz ósea (Pina et al., 2019, Ghosh et al., 2019, Abdulghani y Mitchell, 2019). Los metales presentan excelentes propiedades mecánicas, capaces de soportar altas cargas sin sufrir deformaciones. El acero inoxidable y las aleaciones de titanio son los más empleados como implantes y prótesis ortopédicas o dentales (Ghosh et al., 2019, Alvarez y Nakajima, 2009).

1.2. Retos actuales y aplicaciones de los biomateriales en el campo de la medicina regenerativa.

Para su aplicación clínica, además de sus excelentes propiedades mecánicas, los biomateriales deben presentar una estructura porosa que permita el transporte de oxígeno y nutrientes a las células, y una degradabilidad controlada que asegure la permanencia de la estructura hasta la regeneración completa del tejido dañado. A la dificultad que entraña la optimización de todas estas propiedades que condicionan su funcionalidad, se une otro aspecto indispensable para que estos biomateriales sean de aplicación en clínica, que es la esterilidad. Es necesario diseñar métodos que permitan obtener biomateriales con una arquitectura y composición óptimas asegurando la esterilidad y permitiendo recrear las condiciones de la ECM (Qasim et al., 2019, Pina et al., 2019, Soria et al., 2009). Existen diversos métodos de esterilización como el tratamiento con óxido de etileno, ozono, radiación gamma o calor húmedo (Ribeiro et al., 2019) Sin embargo, éstos pueden alterar la estructura del andamio o producir la degradación de alguno de sus componentes, por lo que resulta necesario establecer nuevos procedimientos seguros, capaces de garantizar la estabilidad de los biomateriales.

Las diferentes estrategias terapéuticas en medicina regenerativa deben ser diseñadas para restablecer la homeostasis tisular, controlar los procesos patológicos instaurados y promover la regeneración de los tejidos dañados. Con estos objetivos, la incorporación de moléculas terapéuticas en el seno de los biomateriales presenta buenas perspectivas ya que posibilitan la obtención de sistemas con prestaciones avanzadas, capaces de asegurar la correcta regeneración del tejido, al tiempo que promueven una respuesta terapéutica adecuada (Díaz-Rodríguez et al. 2011, Díaz-Rodríguez y Landin, 2015). El empleo de sistemas nano/microparticulados cargados con material genético o diferentes moléculas terapéuticas, también presenta buenas perspectivas en el ámbito de la ingeniería de tejidos musculoesqueléticos. Los biomateriales de tamaño nanométrico permiten la administración local y liberación controlada de fármacos, así como la vehiculización selectiva de las moléculas terapéuticas a las células de interés. Se trata por tanto de herramientas con elevado potencial en terapia regenerativa (Torres et al., 2019).

Con estos antecedentes, a continuación, se describen dos casos de estudio desarrollados en el marco del proyecto IBEROS. Por una parte, el uso de metodologías novedosas para producir biomateriales de estructura y propiedades adecuadas con el requerimiento de esterilidad, y por otra, el desarrollo de sistemas nanoparticulados cargados con un fármaco anti-inflamatorio de aplicación en el tratamiento de la osteoartritis.

2. Utilización de la tecnología de CO₂ supercrítico para el procesado, funcionalización y esterilización de biomateriales.

Durante el diseño de biomateriales, se ha de prestar especial atención a su procesabilidad en términos de composición y morfología. La posibilidad de procesar biomateriales de porosidad controlada que contengan componentes termosensibles, como los factores de crecimiento, se ve frenada en ocasiones por el empleo de tecnologías que utilizan altas temperaturas y/o disolventes orgánicos que reducen significativamente las propiedades bioactivas de estos componentes (Salerno et al., 2017). En el caso particular de biomateriales porosos nanoestructurados, la esterilización del material es otro aspecto crítico a considerar ya que las técnicas convencionales de esterilización descritas en el apartado anterior presentan limitaciones para este tipo de materiales en términos de capacidad de penetración y/o degradación físicoquímica de los componentes (Ribeiro et al., 2019, Dai et al., 2016).

La tecnología del CO₂ supercrítico emerge como una atractiva plataforma de soluciones para el procesado de biomateriales. La moderada temperatura crítica del CO₂ (31,10°C), junto con su habitual inocuidad y capacidad de actuar bajo diferentes roles (plastificante, disolvente, agente extractor, agente esterilizante...), abre nuevas perspectivas de procesabilidad de biomateriales multicomponente nanoestructurados (García-González et al., 2015).

Andamios poliméricos porosos pueden ser procesados en ausencia de disolventes mediante espumado con CO₂ supercrítico. El CO₂ actúa como soluto de la mezcla polimérica plastificándola y reduciendo su temperatura de fusión o de transición vítrea. Durante la posterior eliminación del CO₂ por despresurización, la matriz polimérica experimenta eventos de formación y crecimiento de poros, seguida de una vitrificación del material para dar lugar a un sólido poroso. Además, el efecto plastificante del CO₂ hace posible fundir biopolímeros a temperaturas muy inferiores (15-25°C) a las de condiciones normales. De este modo, se consigue el procesado de biomateriales a baja temperatura, que de otro modo pueden sufrir degradación física, química y biológica. A modo de ejemplo, andamios poliméricos de PCL

fueron procesados por espumado con CO₂ supercrítico a temperaturas de 40°C conteniendo vancomicina para ser usados como biomaterial para regeneración ósea en situaciones de particular riesgo de infecciones (García-González et al., 2018). El andamio cargado obtenido muestra una atractiva combinación de propiedades morfológicas (porosidad, tamaño de poro e interconectividad adecuada para penetración y colonización celular), biológicas (osteodiferenciación, integración tisular) y perfiles de cesión prolongados durante varias semanas (Fig. 2.1. a,b), particularmente interesantes para aquellos casos clínicos de intervenciones quirúrgicas con riesgo de infección (por ejemplo, sustitución de implante tras infecciones severas con *S. aureus*).

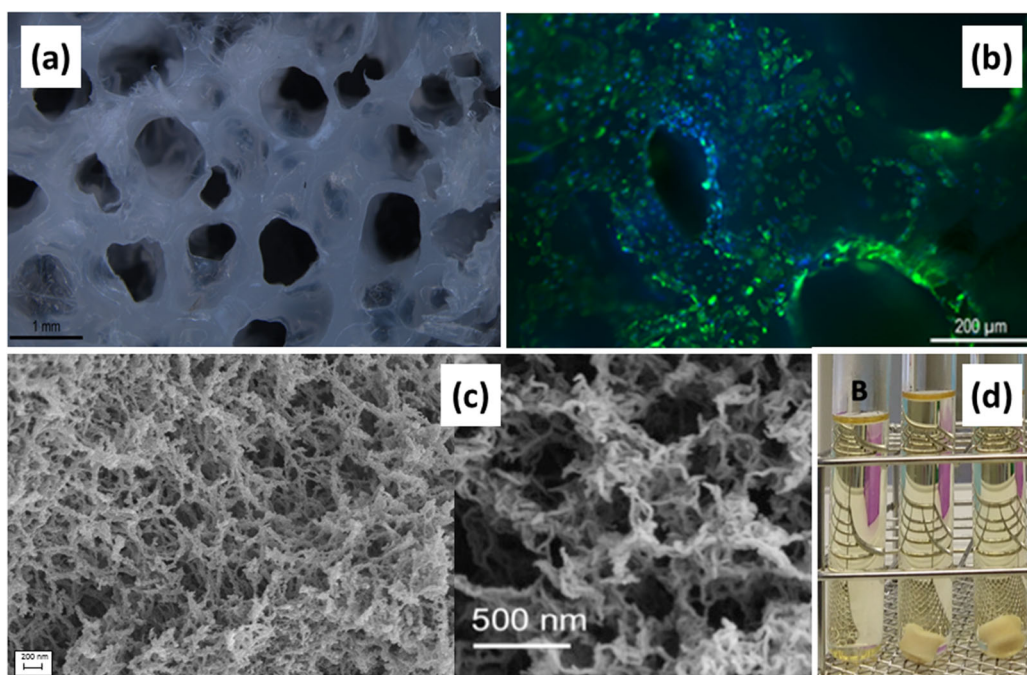


FIGURA. 2.1. Procesado de biomateriales con tecnología de CO₂ supercrítico: (a) andamios porosos medicados para regeneración ósea con alta porosidad (Reproducida con permiso de García-González et al., 2018); (b) alta integración tisular (CAM tests) (Reproducida con permiso de García-González et al., 2018); (c) aerogeles de polisacárido (almidón –izquierda- y quitosano –derecha-) en forma de partículas o monolíticas con elevada mesoporosidad (Reproducidas con permiso de López Iglesias et al., 2019 y Santos-Rosales et al. 2019); (d) con posibilidad de esterilización en medio de CO₂ supercrítico (Reproducida con permiso de Santos-Rosales et al., 2019)

La tecnología supercrítica permite el procesamiento de biomateriales mesoporosos en forma de aerogeles. Estos materiales presentan porosidades totales en el rango de 95-99%, con estructuras similares a la ECM, lo que resulta de gran interés en aplicaciones biomédicas (Fig. 2.1.c) (Santos-Rosales et al., 2019). Concretamente, la mesoporosidad de estos

biomateriales puede favorecer la adhesión celular en ingeniería tisular. La reciente capacidad de conferir macroporosidad a estos materiales intrínsecamente mesoporosos abre nuevas posibilidades a estos materiales como andamios para medicina regenerativa (Santos-Rosales et al., 2019). Además, su alta porosidad y capacidad de carga de agentes bioactivos puede permitir una correcta gestión del fluido (exudado) en el entorno de una herida crónica y el tratamiento local con antibióticos (López Iglesias et al., 2019).

La tecnología supercrítica viene a resolver también la problemática asociada a las técnicas convencionales de esterilización. Estudios recientes muestran que la esterilización con CO₂ supercrítico con aditivación (a concentraciones de ppm) se presenta como una alternativa viable y de alta eficacia para la esterilización de materiales de nanoestructura compleja, en los que los agentes esterilizantes presentan dificultades de penetración o en aquellos en los que por su composición (polisacáridos, proteínas, poliésteres, etc.) son susceptibles de degradación. En estos casos la esterilización con CO₂ supercrítico da lugar a inactivación bacteriana (Fig. 2.1.d) incluso con esporas altamente resistentes (*B. atrophaeus*, *B. stearothermophilus*, *B. pumilus*) y sin variaciones significativas en las propiedades texturales y mecánicas del material (Santos-Rosales et al., 2019).

3. Desarrollo de formulaciones intra-articulares para el tratamiento de la Osteoartritis.

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular degenerativa crónica (He et al. 2017) caracterizada por la inflamación sinovial, la degradación de la ECM y la posterior pérdida de cartílago hialino (Kang y Im, 2014). Con una prevalencia mundial estimada de 250 millones de pacientes, afecta a la población de mediana edad y ancianos (Richards et al., 2016). El tratamiento actual es sintomático y busca la ralentización de la progresión de la enfermedad, pero en estados avanzados es necesario el reemplazo articular (Glyn-Jones et al., 2015). La OA se caracteriza por un error en el proceso de regeneración del cartílago dañado por cambios mecánicos y químicos en la articulación (Bijlsma et al., 2011). En la OA los condrocitos y macrófagos sinoviales se activan en respuesta al daño articular, produciendo proteínas de respuesta inflamatoria y enzimas que degradan la ECM. Ello establece una inflamación sinovial crónica y el desarrollo de la sintomatología característica de la patología (Glyn-Jones et al., 2015). La administración de fármacos mediante inyección intra-articular permite minimizar los efectos sistémicos y maximizar los efectos locales siendo de gran interés para el tratamiento de patologías articulares como la OA (He et al., 2017).

Con el fin de inducir procesos regenerativos y cambios inmunomoduladores en la homeostasis articular de los pacientes con OA, se propone emplear inyecciones de biomateriales nanoparticulados cargados con un nuevo anti-inflamatorio (β -lapachona) para su vectorización a macrófagos sinoviales.

3.1. Preparación y caracterización de las formulaciones obtenidas

Se prepararon transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) conteniendo el fármaco de interés (β -lapachona). Como componentes lipídicos se emplearon Transcutol HP y Compritol® 888 ATO y como surfactantes se seleccionaron el polisorbato 80 (Tween® 80) y Epikuron® 145 V, basado en resultados experimentales previos. Se empleó el método de homogeneización en caliente de alta cizalla para la obtención de los sistemas, incorporando el fármaco en la fase lipídica y siguiendo el protocolo desarrollado por Rouco y colaboradores (Rouco et al., 2018). Se prepararon formulaciones cargadas con fármaco y blancas para evaluar el efecto de la presencia de β -lapachona en las propiedades de los NLC.

Se determinaron los tamaños de partícula de las dispersiones de NLC, las cargas superficiales (ZP) y los índices de polidispersión (PdI) mediante un Zetasizer Nano-ZS. Tras la purificación por diálisis de los NLC se evaluó la eficiencia de encapsulación del fármaco. Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de fármaco mediante espectrofotometría a 280 nm tras la ruptura de los sistemas. La superficie de las NLC se funcionalizó con manosa para incrementar su captación por macrófagos gracias a la presencia de receptores de manosa en su membrana. Para ello, en la fase lipídica se añadió estearilamina y las NLC fueron incubadas con una disolución de D-(+)-manosa.

La respuesta celular a los sistemas obtenidos se evaluó empleando macrófagos humanos derivados de la línea celular THP-1. Se evaluó la internalización celular de las formulaciones marcando los sistemas con el fluoróforo cumarina-6. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS mediante un ANOVA de una vía. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p < 0,05$.

3.2. Potencial de los sistemas obtenidos para su vehiculización a macrófagos

Los sistemas obtenidos mostraron un tamaño inferior a 100 nm tal y como se muestra en la Tabla 2.1, tanto en las nanopartículas sin fármaco como en las cargadas con β -lapachona. En cuanto al potencial zeta, los NLC muestran valores negativos y el valor de PdI es bajo. Los

NLC desarrollados mostraron una eficacia de encapsulación del $4,42 \pm 0,70\%$.

La correcta funcionalización de los NLC con manosa se puso de manifiesto por el cambio de potencial zeta hacia valores altamente positivos tanto en las que no incluyen fármaco ($32,63 \pm 5,93$ mV) como en las cargadas con la β -lapachona ($24,05 \pm 6,36$ mV).

TABLA 2.1. Características de las formulaciones blancas y cargadas.

NLC	Tamaño (nm)		ZP (mV)		Pdl	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Blancas	85,37	33,39	-18,12	6,56	0,28	0,02
Cargadas	89,15	42,85	-14,4	7,85	0,25	0,02

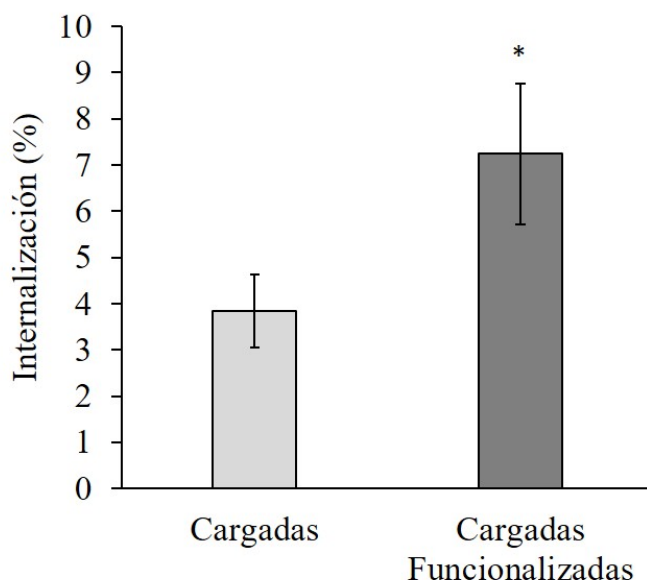


FIGURA. 2.2. Porcentaje de internalización celular en macrófagos (* $p < 0,05$).

La funcionalización de NLC con manosa incrementó significativamente su internalización por macrófagos (Fig. 2.2). Estos biomateriales nanométricos conteniendo el fármaco de interés fueron capaces de ser internalizados por las células y suponen por tanto una prometedora estrategia para la modulación de la homeostasis en procesos patológicos como la OA.

Agradecimientos

Agradecer la financiación de la Unión Europea, proyecto 0245_IBEROS_1_E del programa Interreg V-A España-Portugal (POCTEP 2015), la Xunta de Galicia [ED431F 2016/010 &

ED431C 2016/008], MCIUN [RTI2018-094131-A-I00], la Agrupación Estratégica de Materiales [AeMAT-BIOMEDCO2, ED431E 2018/08], la Agencia Estatal de Investigación [AEI] y los fondos FEDER. C.A.G.-G. agradece al MINECO por la financiación a través del Programa Ramón y Cajal [RYC2014-15239]. V. S.-R. agradece la bolsa predoctoral concedida por la Xunta de Galicia (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria) [ED481A-2018/014]. Trabajo realizado en el marco de la Acción COST CA18125 “Advanced Engineering and Research of aeroGels for Environment and Life Sciences” (AERoGELS) y financiada por la Comisión Europea a través del Programa Horizon2020.

Referencias bibliográficas

Abdulghani S. y Mitchell G.R. (2019) Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*, 9(11):750.

Alvarez K. y Nakajima H. (2009) Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials*, 2(3):790-832.

Bijlsma J.W.J. et al. (2011) Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*, 377(9783): 2115-2126.

Bosman F.T. y Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *The Journal of Pathology*, 200(4): 423-428.

Dai Z. et al. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*, 7: 1–13.

Dong R. et al. (2020) Conductive biomaterials for muscle tissue engineering. *Biomaterials*, 229: 119584.

Diaz-Rodríguez P. et al. (2011) Bio-inspired porous SiC ceramics loaded with vancomycin for preventing MRSA infections. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 22: 339–347.

Diaz-Rodríguez P. y Landin M. (2015) Controlled release of indomethacin from alginate–poloxamer–silicon carbide composites decrease in-vitro inflammation. *International Journal of Pharmaceutics* 480: 92–100.

García-González C.A. et al. (2015) Processing of Materials for Regenerative Medicine Using Supercritical Fluid Technology. *Bioconjugate Chemistry*, 26(7): 1159-1171.

García-González C.A. et al. (2018) Antimicrobial Properties and Osteogenicity of Vancomycin-Loaded Synthetic Scaffolds Obtained by Supercritical Foaming. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2018, 10, 3349–3360.

Glyn-Jones S. et al. (2015) Osteoarthritis. *Lancet*, 386(9991): 376-387.

He Z. et al. (2017) An overview of hydrogel-based intra-articular drug delivery for the treatment of osteoarthritis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 154: 33-39.

Kang ML y Im GI (2014) Drug delivery systems for intra-articular treatment of osteoarthritis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(2): 269-282

López-Iglesias C. et al. (2019) Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydrate Polymers*, 204: 223-231.

Malafaya P.B. et al. (2007) Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4): 207-233.

Panayi A.C. y Orgill D.P. (2019) Current Use of Biological Scaffolds in Plastic Surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 143(1): 209-220.

Pina S. et al. (2019) Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. *Materials*, 1824: 3-42.

Qasim M. et al. (2019). Bioengineering strategies for bone and cartilage tissue regeneration using growth factors and stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. In press. doi: 10.1002/jbm.a.36817.

Ribeiro et al. (2019) A new era for sterilization based on supercritical CO₂ technology. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 1-30.

Richards M.M. et al. (2016) Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: from anti-inflammatories to products of regenerative medicine. *The Physician and Sportsmedicine*, 44(2): 101-108.

Rouco H. et al. (2018) Delimiting the knowledge space and the design space of nanostructured lipid carriers through Artificial Intelligence tools. *International Journal of Pharmaceutics*, 553(1-2): 522-530.

Salerno A. et al. (2017) Synthetic scaffolds with full pore interconnectivity for bone regeneration prepared by supercritical foaming using advanced biofunctional plasticizers. *Biofabrication*, 9(3): 035002.

Santos-Rosales V. et al. (2019) Sterile and Dual-Porous Aerogels Scaffolds Obtained through a Multistep Supercritical CO₂-Based Approach. *Molecules*, 24(5): E871.

Torres F.G. et al. (2019) Natural Polysaccharide Nanomaterials: An Overview of Their Immunological Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20):5092.

Yamaguchi S. y Silva S. (2019) PRP and BMAC for Musculoskeletal Conditions via Biomaterial Carriers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21): 5328.