



MEMORIA DE EJECUCION DEL PROYECTO

REGENERACIÓN TISULAR CON SISTEMAS POLIMÉRICOS POROSOS

“REPOL”

FUNDACIÓN DOMINGO MARTINEZ

**DEPARTAMENTO DE BIOMATERIALES
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS, CSIC
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOPATOLOGÍA EXPERIMENTAL,
HOSPITAL PROVINCIAL DE ÁVILA**

OCTUBRE 2009



INDICE

- **Introducción**
- **Objetivos**
- **Resultados y Discusión**
- **Relación de Actividades desarrolladas y acciones conseguidas**
- **Agradecimientos**

INTRODUCCIÓN

Dice un viejo aforismo de la medicina que “Las enfermedades empiezan por el principio” y que “sólo se diagnostica lo que se sabe”, porque si no sabes lo suficiente, podrás extraer información de lo que almacenas en la caja de tus conocimientos y puede que no hayas metido lo que buscas, así que elegirás con tu mejor voluntad, algo parecido o incompleto cuando no equivocado sin olvidar que nuestro trabajo se realiza sobre seres humanos.

El campo de estudio de los biomateriales se caracteriza por su multidisciplinaridad. Diversos especialistas, de distintas ramas de las ciencias experimentales y aplicadas, trabajan conjuntamente hacia el objetivo final de la colocación de ***un material extraño en un organismo vivo, buscando que esta agresión sea la menor posible e implique un resultado positivo para su calidad de vida.***

A nadie se le escapa que las posibilidades de situar un material extraño en un organismo vivo, son casi innumerables; por este hecho, se van a producir mecanismos de reconocimiento y en ocasiones, respuestas defensivas de diferentes grados, desde inadvertidas y leves, a muy graves, sea cual sea su lugar de aplicación: interna o externa. A todo ello hay que sumar el proceso reparador, dinámico, variado y variable, dependiente de la agresión quirúrgica cuando la haya (al fin y al cabo un traumatismo), que se va a englobar dentro del proceso evolutivo de la respuesta al implante que en una buena parte son de carácter individual. Los resultados entre los que se encuentra sobre todo, el logro del objetivo terapéutico, paliativo o estético propuesto, constituirán la biocompatibilidad real y definitiva.

El organismo está preparado para reconocer, reaccionar y defenderse de manera automática e inmediata o aguda, frente a todo material extraño, no sólo de los procedentes del exterior, ajenos, sino de los propios cuando se sitúan en donde no deben estar. Como ocurre con la queratina, lípidos, coloide tiroideo, contenido de los conductos galactóforos de la mama, espermatozoides, gases intestinales, pigmentos biliares, ácido úrico, etc. Curiosamente, en un contexto general, hay muy pocas diferencias morfológicas entre las respuestas frente a ambos grupos. En todos los casos se presenta una reacción celular y tisular denominada de “cuerpo extraño” como forma particular de un proceso de defensa que se denomina inflamación.

El conjunto de reacciones que se producen como mecanismo de defensa ante la agresión local de un organismo vivo, vascularizado, es lo que conocemos como inflamación. Este proceso defensivo interrelaciona muy íntimamente con los mecanismos del sistema inmune y ambos preceden a otro grupo de fenómenos cuyo objetivo final será la reparación.

La inflamación o la respuesta local a la agresión, no es por lo tanto un fenómeno fisiopatológico independiente, sino un proceso asociado a otros mecanismos. Está constituida por fenómenos bioquímicos y vasculares con traducción morfológica muchas veces específicas y su fin es: Eliminar el agente, diluirlo, fagocitarlo, aislarlo o inmovilizarlo y reparar los tejidos que hubieren sido afectados.

De todo lo anterior se desprende que:

- Solo hay inflamación en los organismos vivos.
- Los organismos que no disponen de un sistema vascular, podrán tener sus propios mecanismos de defensa, pero nunca será el inflamatorio. Como ocurre en los unicelulares o invertebrados sin sistema circulatorio y esto es extrapolable a los cultivos celulares: **Donde no hay vasos, no hay inflamación.**
- Con las debidas distancias pero dentro del mismo criterio se pueden entender las respuestas particulares que presentan frente a diversas agresiones, especialmente las traumáticas y su reparación, algunas estructuras como el cristalino, meniscos rotulianos y parte del hueso escafoides del carpo en donde el componente vascular propio e integrado en su estructura es inexistente o insuficiente.
- Los fenómenos morfológicos y en general el proceso inflamatorio, se inicia, “coordina” y realiza en el lugar en donde están los vasos, es decir en el tejido conjuntivo y es aquí a donde debe llegar la información de la existencia de una agresión y aquí será la respuesta.

El grado o tipo, cantidad, cualidad, temporalidad y resultado final de la respuesta inflamatoria depende no sólo del agente agresor, sino también del tejido afectado y del estado fisio-patológico del huésped y no hay que olvidar que salvo en las motivaciones estéticas, los biomateriales se utilizan para solucionar problemas de patología, es decir se implantan en un territorio local o general enfermo. Tampoco hay que desconocer que los conceptos de agudo, subagudo y crónico pueden tener poco o nada que ver con tiempos concretos Nadie puede establecer con un criterio temporal los límites exactos entre ellos. Los criterios son exclusivamente histopatológicos, derivados de la observación de los componentes celulares e histológicos presentes en ese momento y es más, muchas inflamaciones crónicas lo son desde el momento en que manifiestan los primeros síntomas de inicio y otras desde antes de eso.

El diseño, desarrollo y demás procesos dependientes de la investigación en el campo de los biomateriales, acaba con la interacción entre organismo y material con efectos locales y generales, por ello, la aplicación final de los mismos, implica toda una serie previa de fases experimentales en distintos laboratorios, que van desde la elección del material y su diseño hasta pruebas biológicas o de biocompatibilidad *in vitro* e *in vivo* en las que la mayor parte de los resultados objetivos se obtienen por la observación de sus cambios estructurales con técnicas de observación microscópica. En consecuencia, se requiere de la realización de estudios citológicos, citogenéticos, histológicos, inmunológicos e histopatológicos que aportarán datos objetivos sobre qué está sucediendo por debajo de lo que puede demostrar, y muchas veces imaginar, la observación macroscópica. Los estudios microscópicos, unidos al resto de observaciones, no sólo aportan información concreta y objetiva sino que también justifican o explican qué está pasando, cómo evoluciona, qué caminos pueden tomar y en muchos casos por qué ocurren.

El proceso de investigación, se inicia con el planteamiento de un problema clínico y desde aquí, surge una sucesión encadenada de preguntas a resolver:

- Tenemos un problema clínico y/o estético.
- ¿El problema es solucionable con un material?
- ¿Qué material?
- ¿Cómo responden las células como unidades aisladas?: respuesta *in vitro* (Figs. 1 y 2).
- ¿Cómo responden los tejidos y el organismo?: Respuesta *in vivo* (Fig. 3).
- ¿Cómo ha de ser definitivamente el dispositivo o implante?: Diseño y nuevas pruebas (Fig. 4).

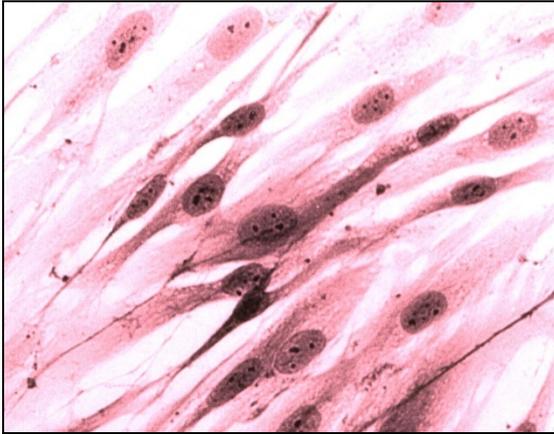


Fig. 1. Cultivo de fibroblastos humanos embrionarios (FC), microscopía óptica.

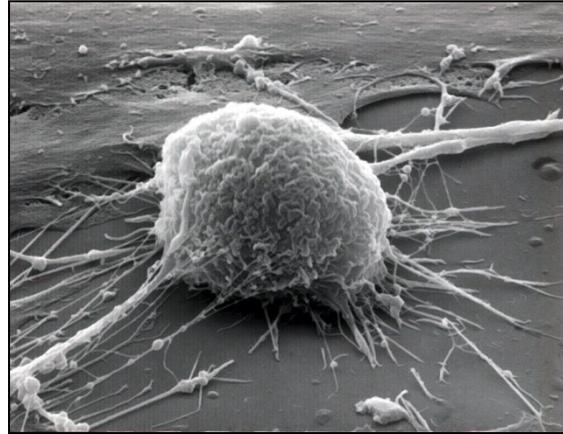


Fig. 2. Cultivo de fibroblastos humanos embrionarios (FC), microscopía electrónica de barrido (SEM).

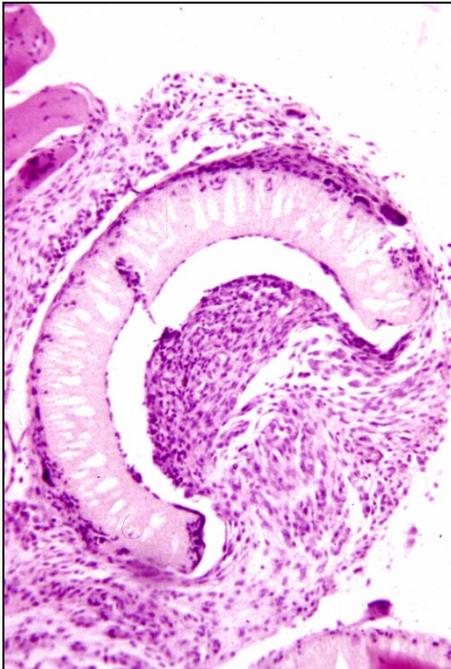


Fig. 3. Respuesta experimental a un material polimérico. Microscopía óptica a bajo aumento.



Fig. 4. Prótesis sustitutiva de la cadena de huesecillos del oído. Microscopía electrónica de barrido.

Los avances producidos en los últimos años sobre el control de los procesos de división y crecimiento celular utilizando líneas muy variadas que van desde células madre adultas, hasta las más diferenciadas, fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, endoteliales, nerviosas, etc., ha estimulado el desarrollo de un atractivo y nuevo campo de actividad que constituye el reto del futuro desarrollo de aplicaciones en los procesos de regeneración de tejidos y órganos, como se indica esquemáticamente en la Figura 5. La nueva disciplina, conocida como Ingeniería de Tejidos tiene como objeto aprovechar los conocimientos de la Bioingeniería, la Biología, y la Ciencia de Materiales, para conseguir controlar procesos de regeneración en medios de cultivo apropiados, a partir de una pequeña biopsia de un paciente, para después conseguir suficiente cantidad de tejido en un tiempo razonable que pueda ser implantado en el organismo defectuoso, o bien activar la regeneración “in situ” mediante el aporte de los factores de crecimiento específicos. Las perspectivas de esta nueva actividad son enormes tanto desde un punto de vista básico, académico, como desde el punto de vista socioeconómico, y a ella se está dedicando un gran esfuerzo desde las instituciones más representativas. Su desarrollo está basado en dos conceptos diferentes pero complementarios:

El primero de ellos considera el proceso de regeneración de tejidos a partir de cultivos celulares específicos “in vitro”, utilizando un soporte (normalmente un sistema polimérico o cerámico poroso y biodegradable) y su posterior implantación en el organismo. El segundo está basado en la aplicación de un sistema soporte que contiene los factores de crecimiento necesarios para conseguir estimular un proceso de regeneración tisular “in situ”, y para ello utiliza un sistema polimérico biodegradable o reabsorbible en forma de matriz blanda o de naturaleza de hidrogel, o bien un sistema fluido y autoendurecible de naturaleza cerámica, polimérica o “composites”, capaces de ofrecer un perfil de liberación adecuado de los factores de crecimiento y compuestos bioactivos necesarios para activar el proceso de regeneración tisular.

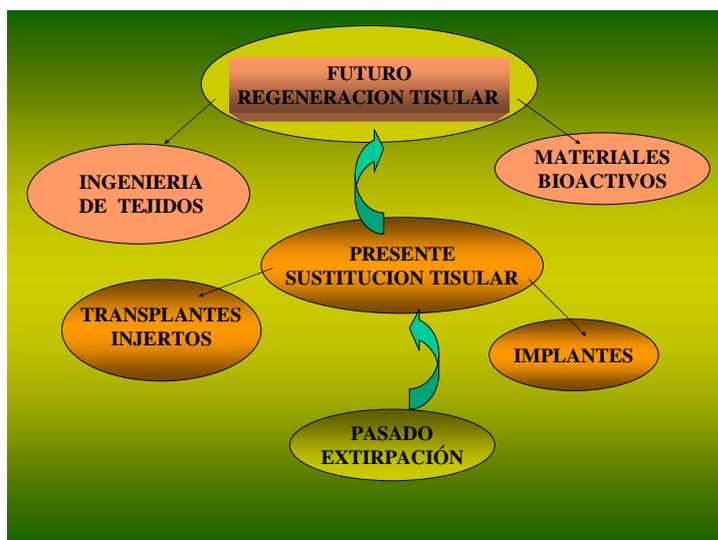


Figura 5 - Evolución del tratamiento de afecciones en el Organismo Humano.

En cualquiera de los dos planteamientos es necesario considerar que el aporte de biomateriales proporciona una base o matriz adecuada para conseguir restaurar la estructura, la biofuncionalidad, la actividad metabólica y el comportamiento bioquímico, así como las características biomecánicas del mismo.

La aplicación de tecnologías limpias y seguras, como es la que ofrece la utilización de anhídrido carbónico bajo presión y temperatura moderadas, en condiciones supercríticas, como un gas de fácil manejo y control, ofrece una oportunidad de gran interés desde un punto de vista no solo básico sino de desarrollo, para conseguir materiales, productos y sistemas que pueden ofrecer excelentes alternativas para el desarrollo de los modernos conceptos de dosificación controlada y dirigida de medicamentos, y de preparación de sistemas porosos para regeneración de tejidos humanos, clave principal en la Medicina Regenerativa.

OBJETIVOS PROPUESTOS

- **Síntesis de polímeros y copolímeros con estructura química controlada, biocompatibles y reabsorbibles, utilizando CO₂ supercrítico como medio de reacción.**
- **Preparación de soportes poliméricos porosos con dimensiones y distribución de poros (macro-micro-nano) controlada, utilizando CO₂ supercrítico como porógeno.**
- **Aplicación y evaluación de los sistemas porosos preparados, como soportes reabsorbibles o parcialmente reabsorbibles en procesos biológicos de adhesión y proliferación celular. Para ello se tratará de analizar el efecto del tamaño y distribución de poros en los procesos de proliferación.**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Trabajar con anhídrido carbónico como fluido supercrítico exige disponer de la tecnología adecuada para poder mantener el sistema a una temperatura por encima de la crítica (31°C) y una presión que permita alcanzar las condiciones de fluido supercrítico del CO₂, y que corresponde a una presión de trabajo superior a 74 Bares. El diagrama de fases de la figura 6 muestra las características de distribución de fases para el anhídrido carbónico. Además de considerar al CO₂ como un fluido limpio y reciclable, sus propiedades físicas son muy interesantes, puesto que se puede considerar como un medio muy poco polar, con una constante dieléctrica muy baja o nula, y en el que se hacen compatibles mucho compuestos y moléculas apolares, no polares o de polaridad muy baja, una situación diametralmente opuesta a las características del agua.

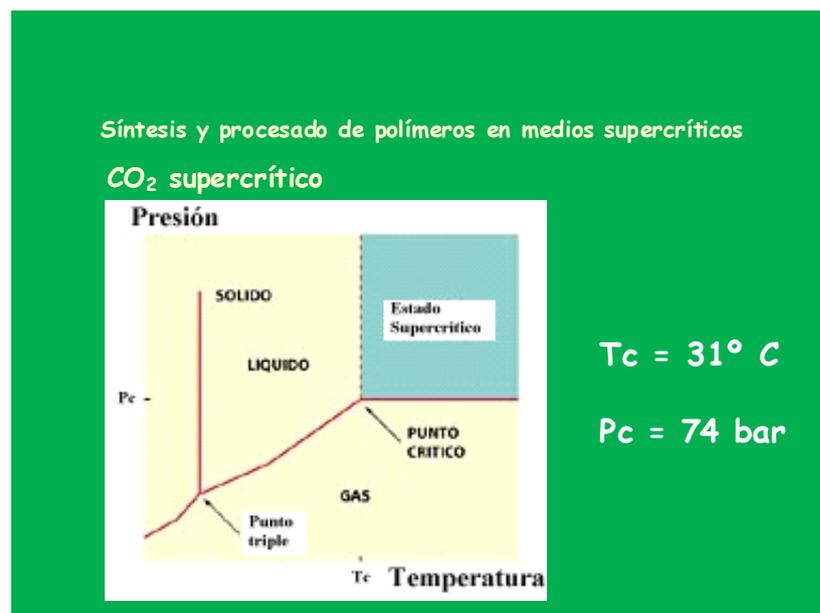


Figura 6 - Diagrama de fases de CO₂ como fluido supercrítico

Para poder desarrollar el proyecto, enmarcado en líneas de investigación planteadas por el Departamento de Biomateriales, en estrecha colaboración con la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología experimental, establecida como Unidad Asociada al CSIC en el Hospital Provincial de Ávila, fue necesario adquirir y completar una serie de elementos y componentes fundamentales para la aplicación de la técnica de fluidos supercríticos a nuestros procesos de polimerización y de preparación de sistemas poliméricos porosos que nos permitieran obtener de forma sencilla, limpia y reproducible los sistemas poliméricos que se perseguían en los objetivos.

La financiación recibida de la Fundación Domingo Martínez ha contribuido de forma eficaz a hacer posible este objetivo, y gracias a ella y a otros proyectos conseguidos en estos últimos años, hemos tenido la posibilidad de construir un equipo completo adaptado a la polimerización de monómeros seleccionados en condiciones supercríticas, utilizando anhídrido carbónico como medio de reacción.

Los equipos que cumplen los requisitos necesarios en un laboratorio en condiciones supercríticas deben de ofrecer suficiente y garantizada seguridad para poder trabajar a alta presión y con temperatura y agitación controladas. Gracias a que desarrollamos actividades en un proyecto europeo centrado en la aplicación de condiciones supercríticas para conseguir nuevos sistemas de liberación controlada de medicamentos, entre otros objetivos, nos ha sido posible contar con la financiación suficiente para poder construir el equipo que necesitábamos para desarrollar de forma adecuada el proyecto. Lógicamente para ello fue necesario dedicar un primer periodo al montaje del equipo y comprobar que todos sus componentes funcionaban adecuadamente, y el equipo ofrecía una adecuada garantía para poder continuar con nuestro trabajo y conseguir los objetivos propuestos en el proyecto.

Se adjuntan unas fotografías del montaje final del equipo que se consiguió a mediados del año 2007.

Equipo completo alojado en una cabina de seguridad

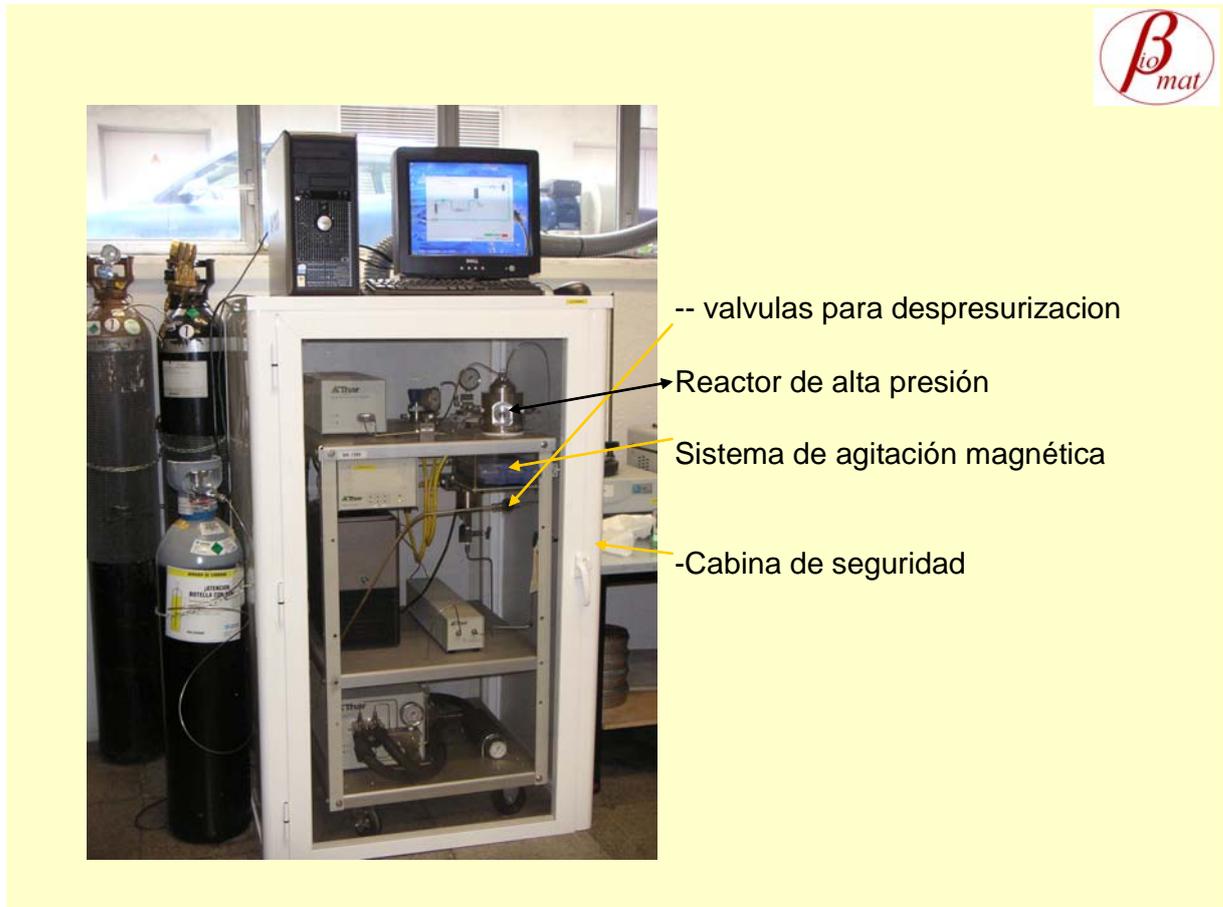


Figura 7 : Montaje del equipo de CO₂ supercrítico en una cabina de seguridad

El equipo que se presenta en la fotografía de la figura 7 ha sido montado en nuestro laboratorio del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, y consta de una bomba de alta presión para conseguir las condiciones supercríticas del CO₂, sistema anti-retorno y válvulas de presurización y despresurización para conseguir el equilibrio, así como elementos de calefacción y control de temperatura para poder trabajar en condiciones supercríticas.

En la Figura 8 se muestra el detalle de la geometría del reactor de acero inoxidable adaptado al circuito de alta presión y que permite trabajar a temperatura controlada y bajo agitación magnética, que se ha conseguido instalando un agitador en contacto con la parte inferior del reactor. Esta solución ha resultado mucho más adecuada que la instalación de un agitador de varilla, que nos ha dado muchos problemas de estanqueidad cuando hemos trabajado en condiciones supercríticas.



Figura 8 : Reactor de alta presión y capacidad de 100 mL. Sistema de agitación acoplado a través de inducción magnética.

Todo el equipo está controlado automáticamente mediante un programa asistido por ordenador que permite mantener y registrar las condiciones de presión y temperatura en las que está trabando durante cualquier tipo de proceso que se realice, lo que permite comprobar en todo momento que las condiciones de presión y temperatura del proceso se han mantenido. Este fue uno de los aspectos que nos preocupó inicialmente, puesto que si no disponemos de este sistema de regulación y control, difícilmente podríamos garantizar que se mantienen las condiciones de fluido supercrítico durante cualquier proceso de polimerización, de impregnación, o de espumación que se pretende desarrollar. Afortunadamente comprobados que el programa de trabajo asistido por ordenador funcionaba de forma correcta, y permitía registrar todas las variables del proceso sin necesidad de estar permanentemente comprobando la estanqueidad y el control de temperatura. Lógicamente la incorporación de todo este sistema de control no fue inmediato, y suponía una inversión bastante considerable, ya que además del programa fue necesario instalar los correspondientes sensores de presión y temperatura, que ofrecieran la exactitud en la medida de esos parámetros.

Considerando las características físico-químicas del CO₂ supercrítico, observamos que los procesos de polimerización que podríamos plantearnos dependían de la solubilidad de los correspondientes monómeros y polímeros en el seno de CO₂. Un repaso a la abundante bibliografía sobre el tema nos puso de manifiesto que deberíamos de tener éxito seleccionando monómeros poco polares, ya que la referencia de utilización de sistemas monoméricos y poliméricos de polaridad muy baja era la constante que normalmente encontrábamos en los trabajos de polimerización que se habían publicado en los últimos años. Como muestra el esquema de la Figura 9, los polímeros derivados de siliconas (dimetilsiloxanos) o de derivados monoméricos acrílicos altamente fluorados eran los referentes más habituales en procesos de polimerización.

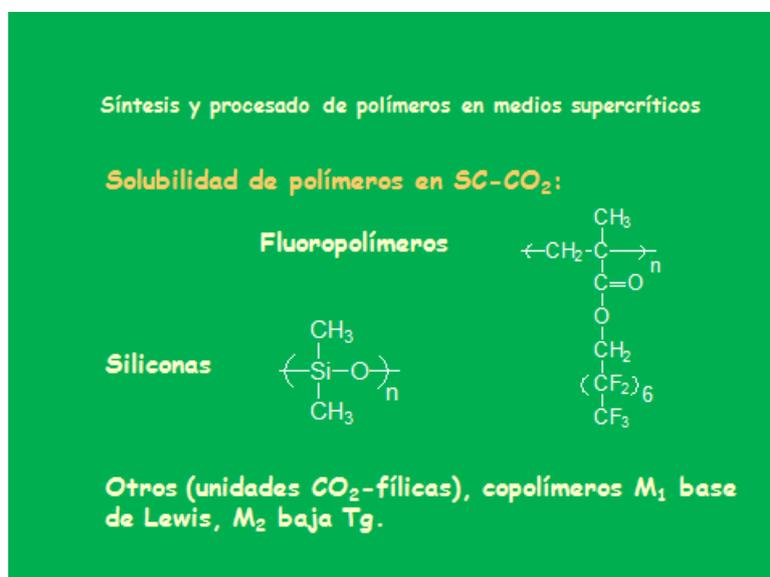


Figura 9 : Sistemas poliméricos modelo más frecuentes en procesos de polimerización con fluidos supercríticos.

De acuerdo con los objetivos que nos habíamos propuesto en el proyecto, consideramos que podríamos preparar sistemas poliméricos basados en monómeros muy bien conocidos por su aplicación en el campo de Biomateriales, así como en el campo de dosificación y liberación dirigida de medicamentos. También consideramos que no era absolutamente necesario seleccionar sistemas poliméricos que fueran total o parcialmente solubles en CO₂ supercrítico, aunque si era necesario considerar que los monómeros precursores deberían de ser solubles en las condiciones supercríticas. Para ello, existen posibilidades basadas en la utilización de agentes compatibilizantes, y considerando la finalidad del proyecto, elegimos como sistemas uno comercialmente

disponible basado en compuestos de una familia de moléculas fluoradas denominada comercialmente zonyl, y otro sintetizado por nosotros en el laboratorio con características anfifílicas muy interesantes, como derivado acrílico de un oligo polietilen glicol, el metacrilato de Triton X 100. En la Figura 10 se ofrecen detalles de sistemas microparticulados o sistemas porosos tridimensionales preparados mediante este procedimiento.



Figura 10: Sistemas nanoparticulados y sistemas porosos preparados por polimerización de metacrilato de metilo en condiciones de CO₂ supercrítico.

A la vista de esos resultados pudimos tener claro que la tecnología limpia utilizando CO₂ como medio de reacción en condiciones supercríticas nos brindaba incluso más posibilidades de las que nosotros esperábamos en un principio, ya que pudimos comprobar que no solo es posible llevar a cabo reacciones de polimerización en condiciones homogéneas, sino que el anhídrido carbónico suponía un excelente medio para conseguir sistemas poliméricos en forma de dispersiones micro o nano particuladas, o incluso como habíamos planteado en un principio sistemas espumados con poros de tamaño controlado en la escala de micro o nanométrica, y de forma limpia

y reproducible, ya que el medio formado fundamentalmente por anhídrido carbónico se podía eliminar por volatilización en el momento de la etapa de despresurización. Este fue un resultado muy relevante que nos permitió desarrollar sistemas con propiedades muy interesantes, y que pudimos interactuar con grupos de prestigio internacional a través de nuestras actividades de cooperación en el marco de un proyecto europeo, SURFACET, concedido y financiado por la Comunidad Europea, en el que precisamente la Dra. Concepción Domingo, componente de nuestro equipo investigador era la coordinadora internacional.

En ese proyecto también incluimos la participación de una empresa farmacéutica española que mostró un gran interés gracias a la colaboración que existía previamente con nuestro grupo de investigación. Inicialmente esta compañía LABORATORIOS URIACH con sede en Barcelona, no tenía experiencia previa en la aplicación de fluidos supercríticos en sus procesos de diseño y preparación de nuevos fármacos, pero pudimos convencerles de forma práctica y gracias a los equipos desarrollados mediante la financiación recibida en este proyecto, de las ventajas que podía ofrecer la tecnología de fluidos supercríticos en los planteamientos de diseño y preparación de nuevos medicamentos o de metodologías limpias para la preparación de algunos sistemas que ya tenían desarrollados. La actividad desde ese momento ha sido intensa y varios trabajos se han desarrollado con el medicamento más relevante del grupo, el TRIFLUSAL. Un derivado de la aspirina, propiedad de la firma URIACH, que hemos utilizado para preparar sistemas de liberación controlada y dirigida, así como para la preparación de una nueva familia de polímeros con actividad antitrombogénica que finalmente y en cooperación con otra nueva compañía española con actividad en el sector de dispositivos biomédicos, hemos desarrollado una nueva línea de gran interés en el campo de diseño y aplicación de “stents” coronarios recubiertos con polímeros bioactivos que suponen una contribución de relevancia internacional en el desarrollo de este tipo de dispositivos que ya están en el mercado internacional con marca CE y aplicándose en la clínica con éxito.

Un aspecto de gran interés en la fase inicial de desarrollo del proyecto una vez que disponíamos del equipo en condiciones de garantía de procesado y reproducibilidad de los procesos, era conocer como el medio de reacción constituido fundamentalmente por CO₂, los monómeros que seleccionábamos en cada experimento y los iniciadores correspondientes, o en su caso los agentes de suspensión, podía influir en los parámetros moleculares de los polímeros que se sintetizaron. Con ese objetivo preparamos una serie

de polímeros derivados acrílicos del metacrilato de metilo y medimos los pesos moleculares que se obtenían variando las condiciones de reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
Polimerización de MMA

PESOS MOLECULARES (GPC)

Muestra	$M_w \cdot 10^{-3}$	$M_n \cdot 10^{-3}$	M_w/M_n
PMMA-PDMS	18.9	13.9	1.36
PMMA-PDMS R. tubular	14.0	11.4	1.23
PMMA-Zonyl	13.3	11.2	1.19
PMMA-Zonyl R. tubular	14.4	9.0	1.61
PMMA-MT	37.7	26.7	1.40

Figura 11: Características moleculares de polímeros derivados de metacrilato de metilo preparados en CO₂ supercrítico a una presión de 120 Bares y 50°C, utilizando tres agentes de suspensión diferentes: poli(dimetilsiloxano) PDMS, Zonyl y metacrilato de tritón X-100.

La tabla recogida en la Figura 11 recoge los pesos moleculares promedio en número M_n y promedio en peso M_w , así como los índices de polidispersidad M_w/M_n de los sistemas preparados en condiciones supercríticas. Todas las determinaciones se realizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños SEC. El resultado más interesante fue comprobar que el anhídrido carbónico en las condiciones de reacción aplicadas no actúa como un medio totalmente inerte, dando lugar a pesos moleculares en principio bastante más bajos de lo que se debería de esperar en comparación con el mismo sistema polimerizado en un disolvente clásico, como tolueno, o dioxano, pero lo más interesante fue comprobar que los índices de polidispersidad fueron bastante más pequeños que los obtenidos tradicionalmente. Este es un resultado muy interesante desde un punto de vista aplicado, ya que normalmente las reacciones de polimerización

por vía radical en disolventes orgánicos con reducida transferencia de cadena, dan pesos moleculares bastante más elevados pero índices de polidispersidad superiores a 2,5, cuando a la vista de los resultados recogidos en la tabla los índices de polidispersidad son próximos a 1. Esto indica que los polímeros obtenidos por esta técnica son muy homogéneos desde un punto de vista molecular. Lógicamente este resultado ha de relacionarse con el efecto del CO₂ supercrítico en la cinética de polimerización del metacrilato de metilo, y sobre todo a que la reacción se realiza de forma precipitante, es decir, se comienza con una disolución homogénea del metacrilato de metilo en CO₂, pero a medida que la reacción progresa y se forma el polímero, se va produciendo la formación de micro o nanopartículas con polímeros de longitud de cadena bastante controlada, dando lugar a distribuciones mucho mas homogéneas de las que se podrían esperar mediante polimerización en disolventes orgánicos, o en sistemas en suspensión o emulsión en medio acuoso.

Otro aspecto interesante que se comprobó trabajando en condiciones supercríticas, fue la facilidad y eficacia de esta técnica para poder extraer los restos de monómero residual que puedan quedar retenido en el polímero después de la despresurización. Para ello sometimos a una extracción con CO₂ supercrítico a los polimetacrilatos preparados en el reactor, pudiendo comprobar la eficacia del procedimiento para eliminar el monómero residual.

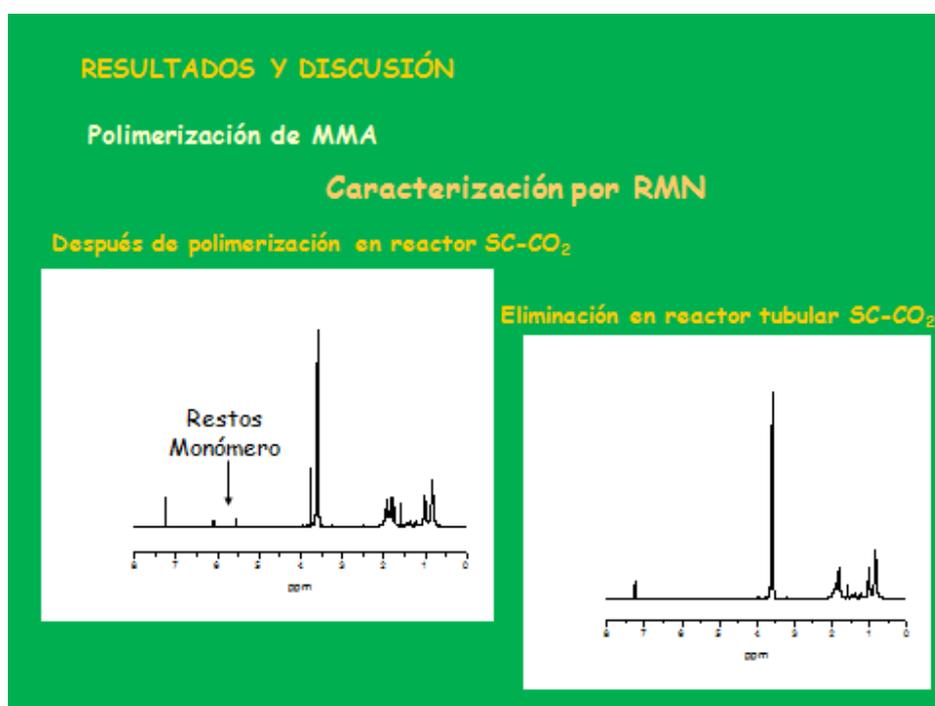


Figura 12: Espectros RMN de polímeros purificados con CO₂ supercrítico

La figura 12 muestra dos espectros de Resonancia Magnética Nuclear de un polimetacrilato preparado en condiciones supercríticas, y después de haber sido tratado con el CO₂ como medio de extracción del monómero residual. El polímero tratado sigue mostrando una morfología de micropartículas pero el monómero residual se extrae con facilidad gracias a la permeabilidad del sistema polimérico al CO₂ en condiciones supercríticas. Ya se ha indicado anteriormente que el anhídrido carbónico en condiciones de fluido supercrítico no es un buen disolvente del polimetacrilato de metilo, pero por su condición de fluido supercrítico hincha con relativa facilidad el polímero y difunde de forma eficaz, ofreciendo unas posibilidades de extracción de componentes de bajo peso molecular muy eficaz, como así lo demuestran los espectros de RMN reproducidos en la Figura 12.

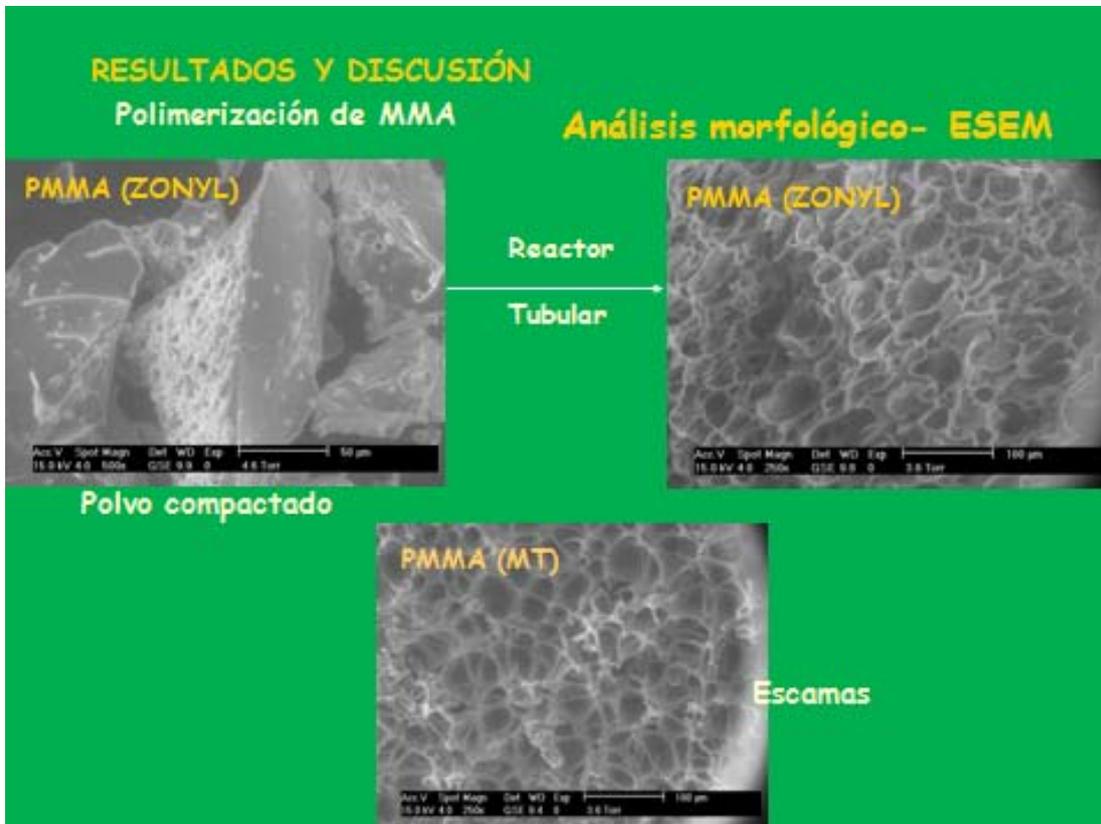


Figura 13: Morfología de sistemas poliméricos preparados por polimerización en condiciones supercríticas. Presión 120 bares, T^a 50 °C.

La Figura 13 de una idea de las posibilidades de obtención de diferentes morfologías para un mismo sistema polimérico, polimetacrilato de metilo, preparado con diferentes agentes de estabilización o suspensión. Así, cuando se utiliza pequeñas proporciones de zonyl como agente estabilizante, se forman partículas porosas características, bastante

diferentes a los sistemas que se obtienen cuando se aplica el metacrilato de triton como agente de estabilización de las micro/nanopartículas. Las micrografías reproducidas en la figura 13 han sido obtenidas por medio de microscopia electrónica de barrido ambiental ESEM. En todos los casos se obtienen sistemas porosos, con una distribución de poros interconectados y un tamaño de poros aceptable para nuestros objetivos principales en el presente proyecto, comprobando que es posible controlar tanto el tamaño de poro como su interconexión y distribución mediante la aplicación de las condiciones de reacción apropiadas y la adición de pequeñas concentraciones de agentes de suspensión que no resultan perjudiciales para los cultivos celulares que se comentarán posteriormente.

Una vez comprobada la eficacia del proceso de polimerización en condiciones supercríticas consideramos interesante conocer la influencia que podría tener el carácter hidrofílico de monómeros en los procesos de polimerización, y para ello seleccionamos tres monómeros de diferente estructura y polaridad. Todos ellos fueron monómeros acrílicos con estructura química bien definida, utilizando el metacrilato de metilo como monómero poco polar que ya conocíamos su comportamiento en el fluido supercrítico, el metacrilato de 2-hidroxietilo HEMA, monómero ampliamente utilizado para la preparación de sistemas poliméricos ampliamente utilizados en el sector biomédico, y el metacrilato de 2-etilpirrolidona EPM, un sistema que hemos desarrollado recientemente en nuestro laboratorio y que da lugar a polímeros hidrofílicos con propiedades termosensibles muy interesantes en diversas aplicaciones biomédicas y como sistemas de vectorización de compuestos bioactivos. En la Figura 14 se muestra la estructura química de todos ellos, así como las condiciones de polimerización aplicada en todos los casos.

Es lógico considerar que el comportamiento de estos monómeros con diferente carácter hidrofílico y polaridad va a ser bastante diferente en condiciones de CO₂ supercrítico, pero considerábamos necesario conocer el efecto de su polaridad, así como la influencia de los agentes de estabilización o agentes de suspensión en los procesos de polimerización y en la morfología de los polímeros preparados en esas condiciones. En principio el medio de reacción constituido por los monómeros, los agentes de suspensión y el fluido supercrítico, aparentemente era homogéneo, pero necesitábamos comprobar cuál sería el efecto en la morfología y características de los sistemas poliméricos formados en los procesos de polimerización.

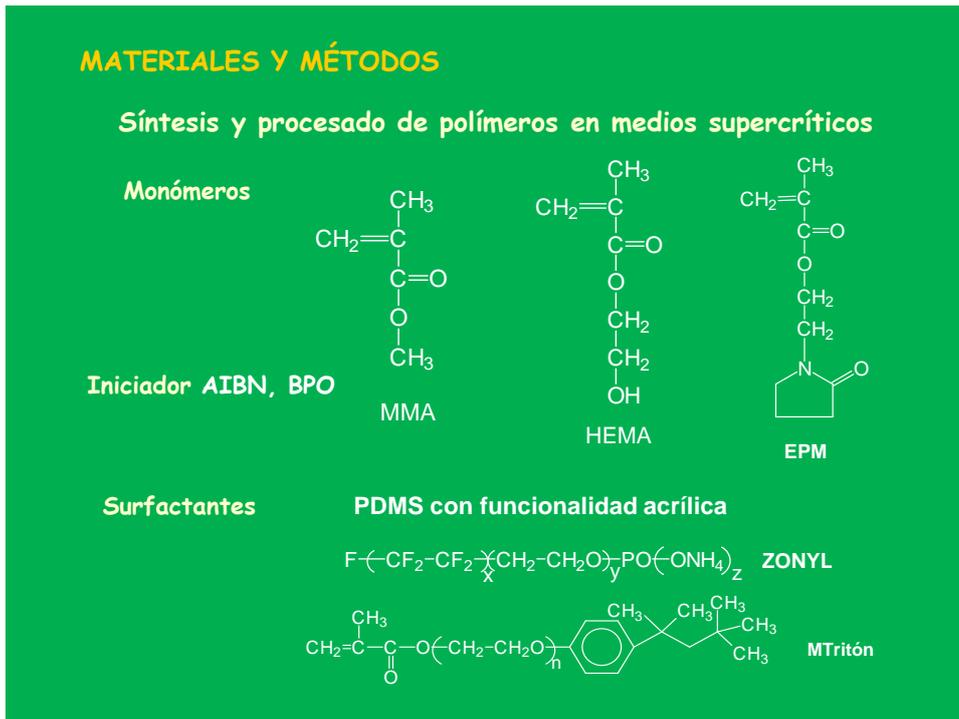


Figura 14: Estructura molecular de monómeros acrílicos de diferente polaridad, utilizados para la preparación de polímeros acrílicos en fluido supercrítico.

Como era de esperar, la influencia de la polaridad de monómeros en los procesos de polimerización y en la estructura y morfología de los polímeros preparados en condiciones supercrítica era bastante notable. A título de ejemplo en la Figura 15 se muestran imágenes de micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido ambiental ESEM de sistemas poliméricos de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) PHEMA y de poli(metacrilato de 2-etilpirrolidona) PEPM, preparados en las mismas condiciones de presión y temperatura en condiciones supercríticas y CO₂ como medio de reacción.

En todos los casos se obtienen micropartículas porosas, pero su morfología es bastante diferente dependiendo de la estructura del monómero y del agente de suspensión utilizado en el proceso de polimerización. Así, el PHEMA tiende a dar partículas que forman aglomerados con buenas propiedades de cohesión, lo que puede ser muy interesante para aplicaciones en Ingeniería Tisular, ya que este sistema aunque no es soluble en agua, es bastante hidrofílico y se hincha con facilidad en medios acuosos dando lugar a matrices soporte con bastante integridad y buenas propiedades elásticas en medio hidratado, lo que de alguna manera mimetiza al comportamiento de la matriz

extracelular, lo que brinda la posibilidad de su aplicación como soporte o andamiaje en procesos de regeneración tisular.

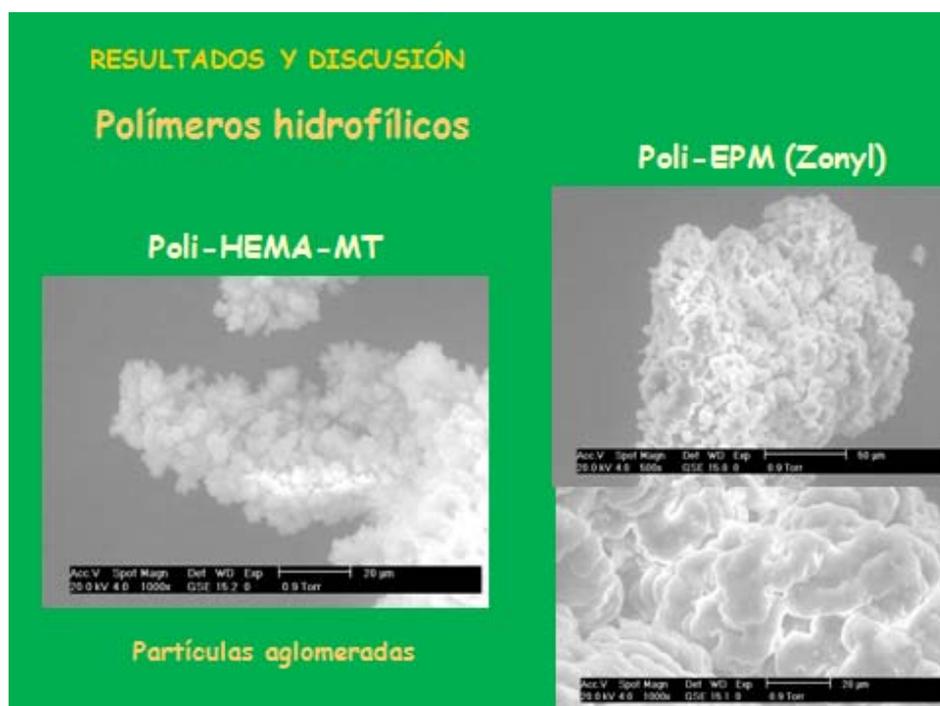


Figura 15: Morfología de micropartículas de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) poli-HEMA y de poli(metacrilato de 2-etilpirrolidona) poli-EPM en condiciones supercríticas utilizando CO₂ como medio de reacción a una presión de 150 Bares y temperatura de 60°C. metacrilato de triton MT o zonyl fueron utilizados como agentes estabilizantes de la suspensión de las micropartículas formadas durante el proceso de polimerización.

Un aspecto interesante de estos procesos de polimerización, es que las partículas aglomeradas que se obtienen en el medio de reacción, pueden ser manipuladas y utilizadas con buena integridad en medios hidratados, y que se mantiene la estructura y morfología porosa cuando se ponen en contacto con el medio hidratado. Se observa que el agua difunde a través de la matriz, pero no se produce la desintegración, conservándose la estructura microporosa que permite la difusión tanto de células como de nutrientes, de tal forma que constituye un medio biomimético con la matriz extracelular.

La preparación de soportes poliméricos porosos para su aplicación como andamiajes para cultivos celulares de aplicación en Ingeniería de Tejidos se abordó teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos previamente y que se han recogido en la sección

previa de esta memoria. Aplicamos el criterio de seleccionar sistemas poliméricos cuya biocompatibilidad y aplicabilidad en el ámbito de Biomateriales esté bien comprobado y justificado en otras aplicaciones, o en aplicaciones relacionadas con este trabajo. Por ello, consideramos que sistemas parcialmente biodegradables a base de poli(metacrilato de metilo) PMMA, y poli(ácido láctico) PLA, debería de proporcionarnos sistemas con suficiente garantía en su aplicación como matrices porosas para proliferación celular y regeneración tisular.

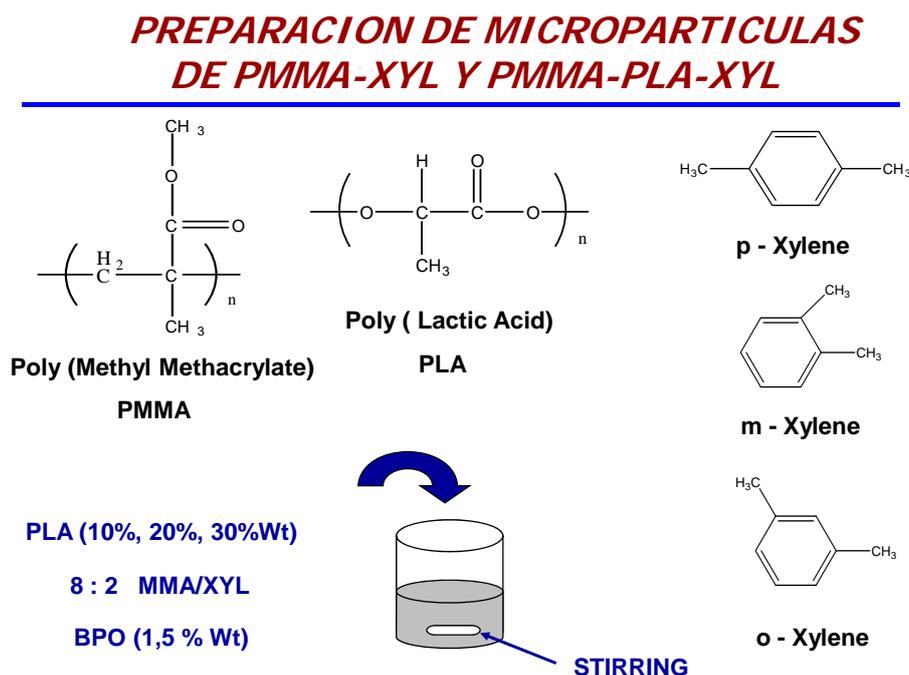


Figura 16: Esquema de componentes para la preparación de matrices poliméricas porosas a base de poli(metacrilato de metilo) PMMA y poli(ácido láctico) PLA

La Figura 16 muestra esquemáticamente la estructura y composición de los sistemas utilizados para la preparación de soportes poliméricos porosos mediante tecnología de CO₂ supercrítico. La idea que se desarrolló estaba basada en la preparación de sistemas compuestos de ambos polímeros, a los que se les agregaba una determinada cantidad de xileno (20%) que se extraería posteriormente mediante aplicación de fluido supercrítico de CO₂. El sistema inicialmente se preparaba por polimerización en suspensión, para obtener perlas que después se comprimían y el cilindro moldeado se sometería a extracción con CO₂ supercrítico como se muestra en la Figura 17.

El procedimiento utilizado supone una técnica muy sencilla y económica para la preparación de matrices porosas parcialmente biodegradables que pueden tener un gran interés en los procesos de regeneración en el sistema óseo o cartilaginoso.

Procedimiento de preración de matrices porosas



Figura 17: Procedimiento de preparación de matrices porosas poliméricas.

Las pastillas preparadas por compresión de las micropartículas que contienen PMMA y PLA así como un porcentaje apropiado de xileno, se introducen en un pequeño molde de TEFLON preparado en nuestro taller de diseño de dispositivos especiales, y el conjunto se introduce en el reactor de acero inoxidable habilitado para el tratamiento en condiciones supercríticas. La aplicación del fluido supercrítico a 260 bares y 60°C proporciona matrices porosas que conservan aproximadamente las dimensiones originales, pero con una porosidad controlada por la extracción del xileno que contenía originalmente las pastillas de polímeros tratadas. El procedimiento supone una aproximación muy sencilla a una metodología de preparación de sistemas soportes con gran precisión y garantía de pureza ya que el tratamiento con el fluido supercrítico proporciona el mejor medio para extracción de todos los componentes de bajo peso molecular que pudieran estar presentes en la formulación. Este aspecto se comprobó mediante el análisis de los sistemas por Resonancia Magnética Nuclear de la forma ya mostrada en la Figura 12.

Un aspecto importante que necesitamos analizar fue el tiempo necesario de tratamiento para conseguir los sistemas porosos soporte de forma reproducible y con la máxima garantía de pureza. Por ello planteamos el análisis de sistemas soportes preparados con la misma composición y las condiciones de presión y temperatura, durante tiempos de

tratamiento variables. La Figura 18 muestra diferentes micrografías de los sistemas preparados con tiempos de tratamiento entre 2 y 24 horas. Solo se muestran algunas imágenes aunque fueron analizadas muestras tratadas durante 2, 4, 8, 16 y 24 horas.

***Influencia del tiempo de tratamiento
en la porosidad de las matrices poliméricas***

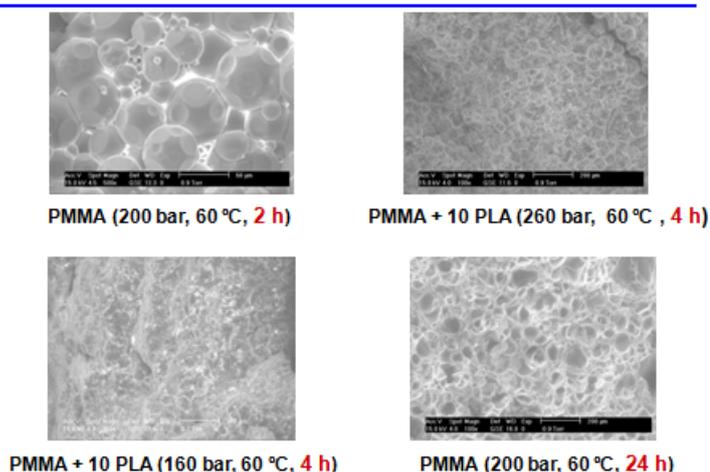


Figura 18: Matrices porosas de PMMA y PLA preparadas en las mismas condiciones supercríticas (160 bares y 60°C) durante tiempos de tratamiento variable.

Como se aprecia en las micrografías de la Figura 18, en todos los casos se obtienen estructuras porosas, con un tamaño de poros que depende del tiempo de tratamiento, y de la composición del sistema. Es necesario considerar que el PLA es un componente biodegradable que contribuirá en el tiempo a la formación de poros interconectados, de gran interés en los procesos de proliferación celular y regeneración tisular.

La Figura 19 muestra microfotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido ambiental ESEM, de soportes poliméricos de PMMA y PLA preparados con diferentes composiciones de ambos componentes, después de haber comprobado que un tiempo de tratamiento de 24 horas era el más adecuado para conseguir de forma reproducible los soportes con una pureza garantizada. Como se puede observar en la Figura 19, la porosidad depende bastante de la composición, pero como se ha indicado anteriormente, la presencia de PLA supone tener un componente biodegradable que con el tiempo desaparecerá de la matriz, creando espacios donde puede ir alojada la matriz extracelular que se forme en los procesos de integración tisular y proliferación celular. Este es un aspecto que se comentará posteriormente al analizar los resultados biológicos obtenidos con estos sistemas.

Es importante señalar que la metodología aplicada en la preparación de los dispositivos que se presentan en esta memoria, en forma de discos de dimensiones adecuadas para realizar un estudio de integración tisular y proliferación celular, supone una aproximación muy reproducible y de garantía gracias a la aplicación del fluido supercrítico como agente de formación de poros y eliminación de componente volátiles de bajo peso molecular, que se arrastran fácilmente por el CO₂ en condiciones supercríticas.

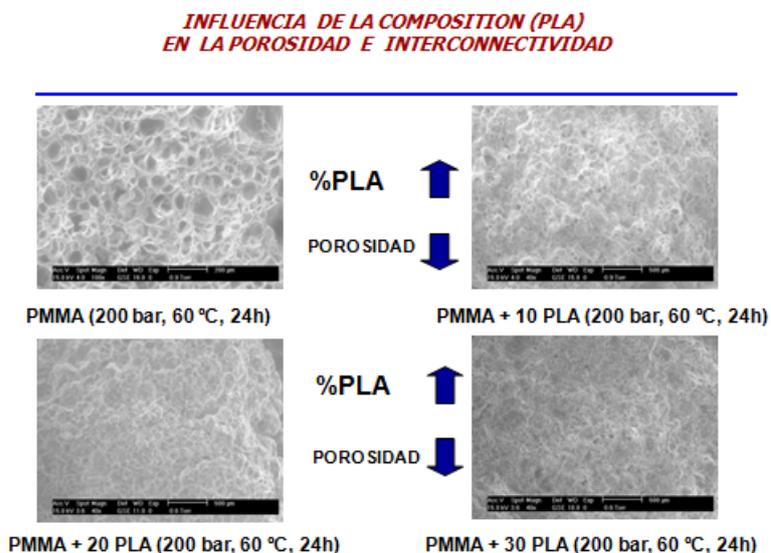


Figura 19: Influencia de la composición de sistemas poliméricos PMMA y PLA en la formación de soportes porosos.

Para todas las composiciones estudiadas se obtienen soportes porosos con poros interconectados con dimensiones adecuadas para su aplicación en procesos de proliferación celular y regeneración tisular. Aparentemente, la porosidad y el tamaño de poros es menor para los sistemas más ricos en el polímero biodegradable PLA, lo que se puede atribuir a la diferente solubilidad y capacidad de hinchamiento en CO₂ supercrítico de los dos polímeros PMMA y PLA. No obstante se debe tener en cuenta que el componente biodegradable PLA, contribuye a la formación de poros después de un proceso biodegradativo en condiciones fisiológicas, y con ello a la integración tisular a medio plazo.

Estos sistemas fueron seleccionados para realizar el estudio del comportamiento biológico que estaba previsto en el proyecto, aplicando el modelo de crecimiento celular y el análisis de proliferación celular establecido en protocolos aceptados por la comunidad europea para tales efectos.

Para hacer posible el desarrollo de esta etapa del proyecto, fundamental desde el punto de vista de comprobar la eficacia y posibilidades de aplicación de los soportes descritos en procesos de proliferación celular e integración tisular, fue necesario contar con el laboratorio que teníamos en la Unidad Asociada de Investigación Clínica y Biopatología Experimental, establecida en el Hospital Provincial de Ávila en el año 2000, como así se mencionaba en el proyecto que presentamos a la Fundación, incluyendo a continuación una copia del compromiso adquirido:

“Evaluación biológica de los sistemas porosos, utilizados como soportes tridimensionales de adhesión y proliferación celular. El equipo solicitante dispone de toda la compleja infraestructura necesaria para realizar estas labores, que en definitiva suponen la aplicación final de todo el proyecto. La Unidad Asociada establecida ya en el año 2000 en el Hospital Provincial de Ávila, cuenta con el personal especializado y las técnicas necesarias para realizar un completo estudio del comportamiento celular en soportes muy diversos, y por lo tanto se dispone de la infraestructura adecuada y de la asistencia de excelentes profesionales para realizar esta tarea que sin duda será fundamental. La financiación del proyecto será de gran utilidad en este sentido, ya que cualquier desarrollo de actividades en este campo requiere una inversión económica importante, como consecuencia de elevado precio de líneas celulares y medios de cultivo, así como de las técnicas específicas de marcadores y de evaluación de la viabilidad y actividad celular.

Por otra parte, es conveniente señalar que la financiación del proyecto contribuirá al desarrollo de las actividades que se realizan en la Unidad Asociada, que al estar establecida en el Hospital Provincial de Ávila, supone un importante apoyo al mantenimiento de una Institución establecida en la Comunidad de Castilla y León, y muy probablemente la única dedicada a Investigación Científica en la ciudad y provincia de Ávila.”

El retraso en la ejecución del proyecto se ha debido fundamentalmente a que no ha sido posible realizar la etapa de estudio y análisis biológico de los sistemas soporte preparados en condiciones supercríticas porque durante más de dos años se ha estado remodelando y modernizando el Hospital Provincial de Ávila, para adaptarlo a las necesidades de asistencia clínica y hospitalaria actuales, pero afortunadamente se ha considerado por parte del órgano directivo del Hospital, y por las autoridades sanitarias

de la Junta de Castilla y León SACYL, que la existencia de la Unidad Asociada de Biopatología Experimental era un componente excepcional y de gran importancia en una ciudad Castellana en donde la presencia de instalaciones dedicadas a investigación científica es nula. Por ello, en la programación de la remodelación del Hospital se tuvo siempre en cuenta la dotación de superficie e infraestructura para facilitar el desarrollo de las actividades que se vienen realizando en la Unidad asociada al CSIC desde el año 2000. Como toda obra de remodelación ello ha supuesto un retraso en la realización de los trabajos de investigación que en ella se desarrollan, y en donde se incluyen los previstos en el proyecto.

Es necesario reconocer que gracias a la financiación recibida de la Fundación Domingo Martínez, ha sido posible completar y desarrollar técnicas de marcaje y análisis de proliferación de líneas celulares bien definidas y seleccionadas para realizar de forma aceptable esta última etapa del proyecto.



Nuevas instalaciones de la Unidad Asociada al CSIC de Biopatología Experimental inauguradas a principios del presente año 2009, y en donde se han instalado modernas técnicas de cultivos celulares para el estudio de la biocompatibilidad de Biomateriales, así como para el desarrollo de proyectos basados en cultivos celulares, proliferación celular y desarrollo de sistemas para Regeneración Tisular.

Ha sido una iniciativa de los órganos de gobierno del Hospital y de las autoridades sanitarias de la Junta de Castilla y León SACYL, que apuestan de forma decidida por mantener el único órgano de Investigación Científica en la Ciudad de Ávila.



Estas fotografías muestran técnicas de microscopía óptica y equipos para controlar los parámetros de cultivos celulares con líneas de células específicas, que se desarrollan en las nuevas instalaciones de la Unidad asociada. El mantenimiento de la actividad en un laboratorio de cultivos es bastante elevado desde un punto de vista económico, pero afortunadamente la financiación recibida de la Fundación Domingo Martínez ha permitido complementar otros recursos conseguidos a través de proyectos competitivos nacionales e internacionales, así como contratos con empresas del sector farmacéutico y biomédico, y con ello definitivamente conseguir unas instalaciones aceptables para poder desarrollar las actividades necesarias para desarrollar los proyectos financiados sobre regeneración tisular dirigida y estimulada con soportes poliméricos bioactivos. La adquisición de técnicas específicas así como de reactivos de elevado costo, y las líneas celulares utilizadas no ha sido sencillo, pero de ninguna forma hemos querido desaprovechar las facilidades que hemos encontrado en la Junta de Castilla y León para

el desarrollo y puesta al día del laboratorio de cultivos que actualmente tenemos disponible en las nuevas instalaciones de la Unidad Asociada en el Hospital Provincial. Reconocemos el tremendo esfuerzo realizado y pretendemos no defraudar en la confianza que ha puesto en nuestro equipo de investigación, para lo que acciones como la que hemos disfrutado de la Fundación Domingo Martínez ha supuesto una ayuda muy eficaz, en un lugar y en un momento donde verdaderamente era necesario.



Las fotografías incluidas corresponden a detalle de algunas técnicas adquiridas después de la remodelación de la Unidad Asociada e instaladas en sus dependencias, que permiten preparar cortes histológicos de tejidos con precisión en la escala micrométrica, así como un contador de fluorescencia que permite analizar con precisión el estado de las células en procesos de proliferación de cultivos en soportes porosos, y que hemos aplicado en la realización del proyecto. Parte de los fondos recibidos de la Fundación han sido dedicados a la adquisición de esta técnica, muy necesaria para valorar la eficacia de soportes bioactivos en procesos regenerativos celulares.

Con respecto al desarrollo del proyecto, los sistemas de matrices porosas preparados con los polímeros PMMA y PLA que se ha descrito anteriormente se han evaluado desde el punto de vista de crecimiento celular según un protocolo bien establecido por la normativa vigente en ese campo.

En concreto, se seleccionó una línea de fibroblastos humanos, utilizando Fibroblastos humanos de piel (FBH, P7).

Las células se depositan (siembran) sobre la superficie de los soportes seleccionados en pocillos habilitados de bandejas de cultivo de Termanox, utilizadas habitualmente en este tipo de procedimientos. Se determinó mediante ensayos previos que una densidad celular apropiada era de 8×10^4 células/ml., y el tiempo de incubación inicialmente planteado fue de 24 h.

Transcurrido este tiempo las células se fijaron con una disolución al 2,5% de glutaraldehído en agua destilada durante 2 horas a T^a ambiente. Posteriormente se secaron las muestras fijadas y se procedió a su metalizado para su observación por microscopía electrónica de barrido SEM.

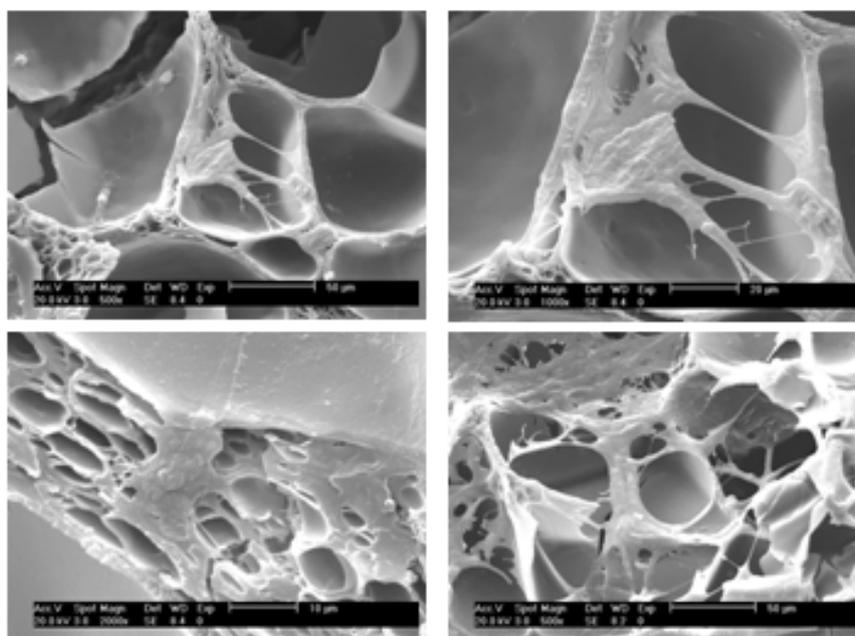


Figura 20: Micrográficas de SEM correspondientes a matrices de PMMA sembradas con fibroblastos humanos después de 1 día de incubación.

En la Figura 20 se observa la capacidad que presentan los soportes porosos de PMMA para fijar las células utilizadas en el estudio biológico realizado. Se observa con claridad cómo los fibroblastos emiten filopodios para poder adherirse a las paredes porosas de la matriz preparada siguiendo la metodología descrita anteriormente.

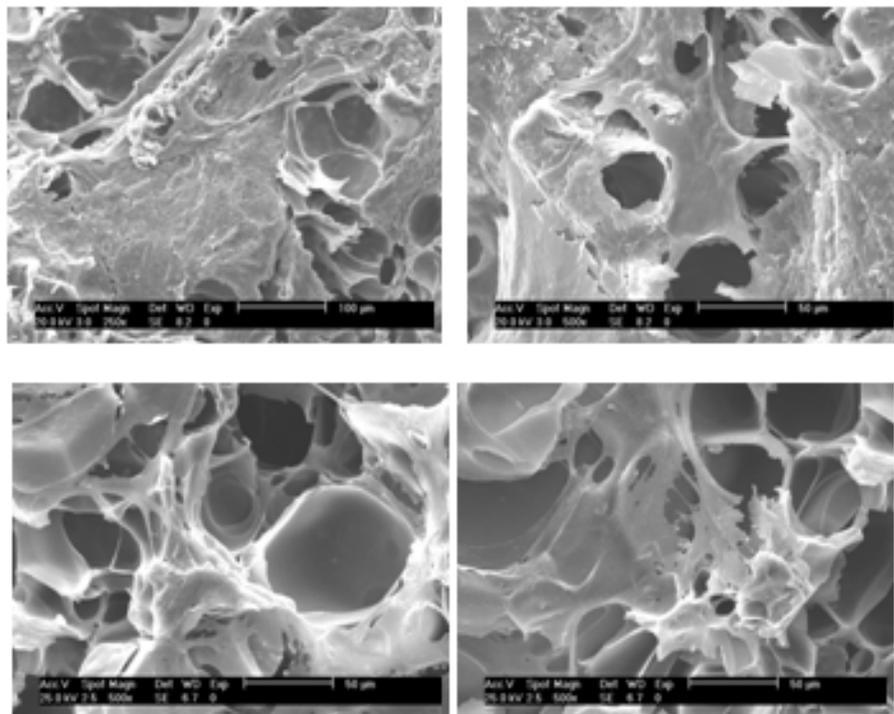


Figura 21: Microfotografías de Microscopía Electrónica de Barrido de matrices de PMMA y PLA(10%) incubadas con fibroblastos humanos durante 24 horas.

La Figura 21 muestra imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de muestras porosas sembradas con Fibroblastos humanos después de 24 horas de incubación. Es de destacar por un lado la identificación de las fases correspondientes al polímero biodegradable, así como la proliferación de fibroblastos humanos que emiten filopodios adhiriéndose y proliferando de forma bastante notable en las paredes de los huecos que presenta la matriz soporte. Es de destacar que la presencia del polímero biodegradable contribuye de forma notable

a activar el proceso de proliferativo celular, poniendo de manifiesto que la presencia de este componente PLA, favorece el proceso de multiplicación celular de forma bastante clara.

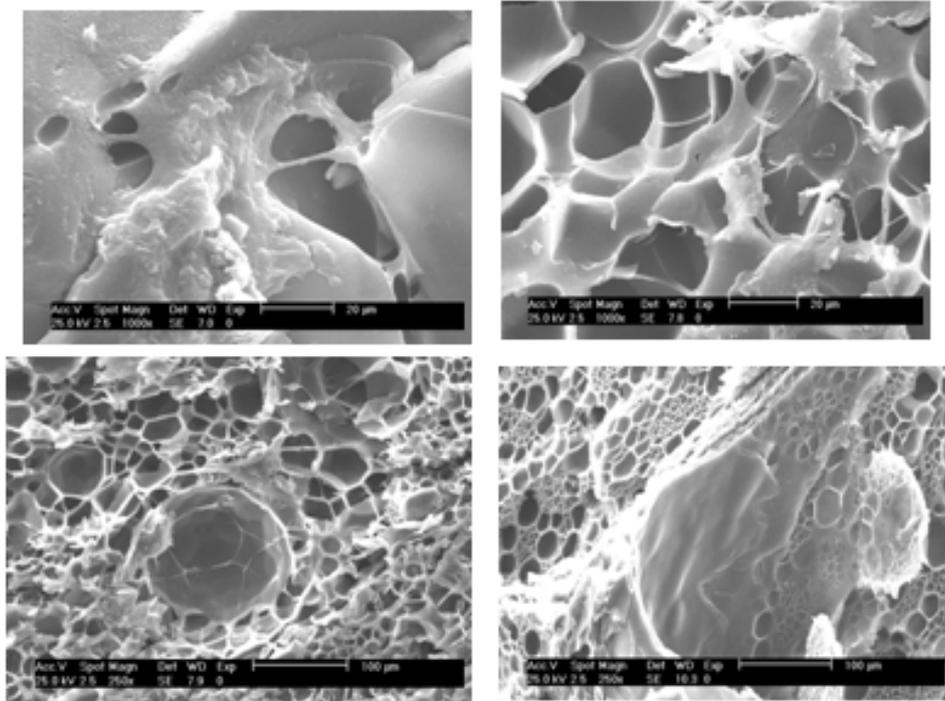


Figura 22: Micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de soportes de 70% PMMA y 30% de PLA, sembrados con fibroblastos humanos después de 24 horas de incubación.

La figura 22 muestra imágenes a diferentes aumentos de microscopía electrónica de barrido obtenidas con soportes poliméricos que contienen 70% de PMMA y 30% de PLA, y que han sido incubados con fibroblastos humanos durante un periodo de 24 horas. Las imágenes obtenidas a diferentes aumentos ponen de manifiesto la excelente respuesta de estos soportes ante la proliferación celular, en un periodo tan incipiente como el seleccionado en este estudio. La formación de una capa celular que se deposita y adhiere sobre la pared porosa del soporte polimérico queda patente sobre todo en las micrografías obtenidas a mayores aumentos, en las que la barra de tamaño indica 20 Omicras (fotografías en la zona superior de la figura 22. Este comportamiento no ha sido observado en sistemas preparados con menores contenidos en PLA, lo que indica

claramente la influencia de este componente polimérico biodegradable en el comportamiento celular de las matrices porosas utilizadas en este estudio.

Desde el punto de vista estructural, es necesario considerar que el PLA no es compatible con el PMMA, y que los sistemas preparados presentan microfases de PLA dispersas en una matriz de PMMA. La resolución de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido no permite identificar las microfases de PLA embebidas en las paredes de los poros de la matriz, pero parece claro que el crecimiento de fibroblastos se produce preferentemente en aquellas zonas donde se concentran los microdominios de PLA, lo que explica que cuanto mayor es el contenido en este polímero se favorecen los procesos de adhesión y proliferación de fibroblastos.

Actualmente estamos realizando el estudio paralelo con otras líneas celulares de interés en procesos regenerativos, como son osteoblastos, células endoteliales, y células madre adultas procedentes de médula ósea o de tejido adiposo humano. Esto significa que el proyecto no finaliza, sino que abre amplias posibilidades de desarrollo de la tecnología aplicada al campo de Medicina Regenerativa.

En definitiva se puede concluir del estudio realizado que la preparación de soportes poliméricos porosos utilizando CO₂ como medio limpio y reproducible para la confección de estructuras porosas de tamaño y porosidad controlada, resulta muy apropiada y constituye un medio seguro, eficaz y de coste aceptable en comparación con otras vías de preparación de ese tipo de soportes. Los resultados obtenidos ofrecen excelentes posibilidades para desarrollar nuevos procesos de preparación de soportes porosos, ya sea a base de la combinación de polímeros, o la utilización de materiales compuestos, con excelentes expectativas en el apasionante campo de la regeneración tisular estimulada y dirigida.

Finalmente tener presente que la realización del proyecto ha sido posible gracias a la participación activa de un equipo investigador multidisciplinar que constituye el actual Departamento de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC, y la estrecha cooperación con la Unidad Asociada en Biopatología Experimental, del Hospital Provincial de Ávila.

BIBLIOGRAFÍA

- W.M. Saltzman, W.L. Olbricht. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov.* 2002 Mar;1(3):177-86. Review.
- R.P. Lanza, R. Langer, and Vacanti (Eds). *Principles in tissue engineering*, J. 2nd Ed. Academic Press, California, USA, 2000.
- E. Mathiowitz (Editor), *Encyclopaedia of Controlled Drug delivery*, Wiley Interscience, New York, 1999.
- T. Okano (Editor), *Biorelated Polymer and Gels*, Academic Press, San Diego, 1998.
- J. San Román, A. Gallardo, B. Vázquez, A. López-Bravo. “Ingeniería de Tejidos”: contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular. *Anales de Química*, 96, 5-19, 2000.
- J. San Román, A. Gallardo, B. Levenfeld. Polymeric Drugs: Biomaterials for Therapeutical and Surgical Applications. *Advanced Materials*, 7, 203-208, 1995.
- K. U. Lewandrowski, D.L. Wise, D.J. Trantolo, J. D. Gresser, M.J. Yaszemski, D.E. Altobelli. “Tissue Engineering and Biodegradable Equivalents. Scientific and Clinical Applications”. Marcel Dekker Inc., New Cork 2002. ISBN: 0-8247-0755-9
- M.J. Yaszemski, D.J. Trantolo, K.U. Lewandrowski, V. Hasirci, D.E. Altobelli, D.L. Wise. “Tossue Engineering and Novel Delivery Systems”. Marcel Dekker Inc. New Cork 2004. ISBN 0-8247-4786-0
- R.L. Reis , J. San Román. “Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine” CRC Press, Boca Raton, USA 2005. ISBN: 0-8493-1936-0
- B. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons. “Biomaterials Science, An Introduction to Materials in Medicine” Second Edition. Elsevier Acad. Press. San Diego, California, 2004. ISBN: 0-12-582463-7
- R. Sastre, S.de Aza, J. San Roman. “Biomateriales”. Faenza Editrice Iberica S.L. Faenza, Italia 2004. ISBN: 84-87683-26-6
- N. González, C. Elvira, J. San Román, Novel dual-stimuli responsive polymers derived from ethyl pyrrolydine, *Macromolecules*, 38, 9298-9303, 2005.
- C. Elvira, A. Fanovich, M. Fernández, J. Fraile, J. San Román, C. Domingo, Evaluation of drug delivery characteristics of microspheres of PMMA/PCL-cholesterol

obtained by supercritical-CO₂ impregnation and by dissolution-evaporation techniques, *J. Controlled Rel.*, 99, 231-240, 2004.

-C. Domingo, A. Vega, A. Fanovich, C. Elvira, P. Subra, Behaviour of polymer-based pharmaceutical compounds with supercritical CO₂ and CO₂ + cosolvent: solubility measurements and process assessment, *J. Appl. Polym. Sci.*, 90, 3652-3659, 2003.

- A. Vega-González, C. Domingo, C. Elvira, P. Subra, Precipitation of PMMA/PCL blends using supercritical carbon dioxide, *J. Appl. Polym. Sci.*, 91, 2422-2426, 2004.

- A.I.Cooper. Porous Materials and Supercritical Fluids. *Adv. Mater.* 15, 1049-1059, 2003.

- A.I. Cooper, A.B. Holmes. Synthesis of molded monolithic porous polymers using supercritical carbon dioxide as porogenic solvent. *Adv. Mater.* 11, 1270-1274 , 1999

- C.D.Wood and A.I.Cooper. Síntesis of Macroporous Polymer Beads by Suspension Polymerization using Supercritical Carbon Dioxide as a pressure adjustable porogen. *Macromolecules* 34, 5-8, 2001.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS Y ACCIONES CONSEGUIDAS

El proyecto ha coincidido de forma solapada en el tiempo con un proyecto europeo financiado por la Comunidad Europea y coordinado por la Dra. Concepción Domingo, miembro del equipo investigador. En ese proyecto europeo conocido como SURFACET se dedicaba bastante atención a la aplicación de tecnologías de CO₂ supercrítico al diseño y preparación de sistemas de liberación controlada y dirigida de compuestos bioactivos y medicamentos. En ese proyecto también se implicó a la empresa farmacéutica española LABORATORIOS URIACH, y el desarrollo del proyecto financiado por la Fundación Domingo Martínez ha propiciado la excelente colaboración tanto con los grupos académicos de investigación como con la empresa Uriach, para la que estudiamos la posibilidad de impregnación de matrices poliméricas con TRIFLUSAL, un medicamento propiedad de URIACH que hemos utilizado para diseñar nuevos sistemas de aplicación y liberación controlada con buenas perspectivas, de tal manera que llegamos a desarrollar una patente sobre la preparación de polímeros portadores de TRIFLUSAL, que transferimos a la empresa y que finalmente ha sido aplicada para el desarrollo de polímeros que se aplican como recubrimientos antitrombogénicos en una nueva de “Stents” coronarios desarrollados por otra empresa española IBERHOSPITEX en colaboración con URIACH. El resultado ha sido que dos nuevos modelos de “Stents” ya poseen marca CE y se están aplicando en la clínica con muy buena respuesta en muchos casos de infarto coronario.

La empresa URIACH que inicialmente no tenía gran interés en el desarrollo y aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos, como consecuencia de su participación en proyectos cooperativos, y familiarizada ahora con la tecnología de CO₂ supercrítico, está interesada en seguir en contacto para futuros desarrollos. Esto se plasmó en la solicitud de un nuevo proyecto a la CE, SUPROPHAR que fue seleccionado en la primera fase a finales del pasado año 2008, pero que finalmente no se financiarón por falta de recursos por parte de la comisión de financiación de la CE.

En relación con otros proyectos, merece destacar la incorporación del grupo al programa Ingenio 2010, en su modalidad de Centros de Investigación Biomédica en Red CIBER, dedicado a biomateriales y nanomedicina, en el que el grupo está participando de forma activa desde su creación a finales de 2007, y en el que el desarrollo de tecnologías de fluidos supercríticos ha sido un componente importante con buenos resultados relacionados con los descritos en esta memoria. La incorporación al programa CIBER fue resultado de una selección de grupos de excelencia en el área de Biomateriales, realizada por una comisión de expertos internacional.

Es importante resaltar la incidencia del proyecto en la remodelación de la Unidad Asociada al CSIC de Investigación Clínica y Biopatología experimental establecida en el Hospital Provincial de Ávila. Aunque la Unidad Asociada fue creada en el año 2000, durante los dos últimos años se ha efectuado una importante reforma en el Hospital Provincial de Ávila, y en todo momento se ha considerado tanto por el órgano de gobierno del Hospital, como por los responsables sanitarios en la Junta de Castilla y León, no sólo la conservación de la Unidad Asociada, sino su ampliación, dotándola de una buena infraestructura en cuanto a dependencias del nuevo edificio que se ha construido adosado al antiguo hospital. Han demostrado ser conscientes de que la Unidad Asociada es el único órgano o dependencia dedicada a Investigación Científica de calidad en Ávila, y así lo han manifestado los responsables sanitarios con la dotación en infraestructura. La implicación del proyecto de la Fundación Domingo Martínez ha sido de gran importancia ya que nos ha permitido financiar parcialmente la adquisición de técnicas de ensayos celulares que no estaban disponibles antes de contar con este proyecto.

Desde el punto de vista de proyección social, no hemos descansado y en perfecta cooperación CSIC-Hospital Provincial de Ávila hemos organizado jornadas científicas desarrolladas en el mismo Hospital Provincial de Ávila que han tenido eco informativo a nivel local, a nivel nacional y a nivel internacional, manifestándose en los medios de comunicación la organización de las siguientes actividades:

- VI Jornadas sobre Biomateriales y el entorno celular
Hospital Provincial de Ávila. 25 de Enero de 2008
- VII Jornadas sobre Biomateriales y el entorno celular.
Hospital Provincial de Ávila. 25 de Marzo de 2009

- Practical Course on Polymers and Drug Delivery
Program INVENTS of the EU.
Institute of Polymers CSIC and Hospital Provincial de Avila
18 – 28 June , 2009.

Respecto a las contribuciones y publicaciones que ha desarrollado el grupo en relación con el proyecto financiado por la Fundación Domingo Martínez cabe destacar los siguientes aspectos:

TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES

New stimuli-responsive polymers derived from morpholine and pyrrolydine

Diego Velasco, Carlos Elvira, Julio San Román
J.Materials Sci. Materials in Medicine 19, 1453 – 1458 (2008)

Spectroscopic and Chromatographic Characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation Technologies.

A.Argemi, A.López-Periago, C.Domingo, J.Saurina
J.Pharma. and Biomed. Analysis, 46, 456 – 462 (2008)

Supercritical CO₂ processing of polymers for the production of materials with Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery.

A.M.López-Perigao, A. Vega, P.Subra, A.Argemi, J.Saurina, C.A.García, C.Domingo
J.Materials Sciesce. 19, 1453 – 1458 (2008).

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

AUTORES: J. San Román, J.Magalhaes, O. Martinez, F.Blanco

TITULO: Biomimetic approach to extracellular matrix by porous hybrid, natural and synthetic sensitive polymers.(Conferencia invitada)

CONGRESO: 13th Symposium “Electron Microscopy in Materials Science. Layered Nanostructures: Polymers with improved properties. Witenberg (Alemania) 12-13 Mayo, 2009

AUTORES: D.Velasco, C.Elvira, J.San Román

TITULO: Porous Polymeric Scaffolds incorporating ibuprofen prepared in supercritical CO₂ for Tissue Engineering of Bone and Cartilage.

CONGRESO: TERMIS-EU 2008 Meeting , 22-26 June , 2008, Oporto, Portugal

AUTORES: J.San Román, D.velasco, C.Elvira

TITULO: Preparation in supercritical CO₂ or polymer porous scaffolds incorporating bioactive molecules. (Comunicación Poster)

CONGRESO: 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, 28 Mayo – 1 Junio, 2008

AUTORES: J.Magalhaes, R.A.Sousa, J.San Roman, R.L.Reis, R.Sastre

TITULO: Thermo-sensitive scaffolds for Tissue Engineering based on resorbable and bioactive polymeric systems. (Comunicación Poster)

CONGRESO: 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, 28 Mayo – 1 Junio, 2008

AUTORES: J. San Román

TITULO: Nanoparticles for the release of therapeutic molecules (Conferencia invitada)

CONGRESO: 5th Marie Curie Cutting Edge InVENTS Conference on Síntesis and applications of self-assembling materials at nano-scale . 14 – 18 April ,2008. Funchal. Madeira, Portugal.

TESIS DOCTORALES

Título: Análisis de la biocompatibilidad “*in vitro*” sobre sistemas de hidrogeles de naturaleza acrílica, sensibles a estímulos.

Doctorando: Javier Jiménez Arribas

Facultad de Ciencias

Universidad de Salamanca

Salamanca, Enero de 2008.

Esta Tesis doctoral se realizó en la Unidad Asociada del Hospital Provincial de Ávila, analizando parte de los sistemas porosos preparados utilizando CO₂ supercrítico. Supuso una comprobación experimental de las posibilidades que ofrece esta tecnología limpia para la preparación de sistemas porosos biocompatibles.

En la actualidad se está realizando otra Tesis doctoral a cargo de Diego Velasco, becario contratado por el CSIC que desarrolla su trabajo en sistemas poliméricos termosensibles preparados en condiciones supercríticas. El trabajo se desarrolla en colaboración con el Centro Nacional de Bioingeniería de Irlanda en la ciudad de Galway.

AGRADECIMIENTOS

En este punto queremos reconocer en primer lugar que la financiación otorgada por la Fundación Domingo Martínez ha sido fundamental para poder completar por un lado la instalación de un equipo para poder trabajar en condiciones supercríticas, tanto en procesos de polimerización, como de impregnación o de extracción, así como poder preparar sistemas porosos que han sido ampliamente analizados en esta memoria.

En segundo lugar reconocer el efecto muy positivo que ha tenido el proyecto en dotar de la infraestructura necesaria a la Unidad Asociada al CSIC en el Hospital Provincial de Ávila, para poder disponer de unas instalaciones avanzadas para el estudio de la Biocompatibilidad de Biomateriales, así como para poder desarrollar trabajos de excelencia en el campo de Ingeniería Tisular y medicina Regenerativa.

Todo ello es posible gracias al carácter multidisciplinar del Departamento de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, y a la excelente cooperación con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila, que ha hecho posible el establecimiento y el desarrollo de la Unidad Asociada, verdadero referente a nivel nacional e internacional.

Nuestro reconocimiento a las autoridades sanitarias de la Junta de Castilla y León, por apoyar y aumentar la dotación en infraestructura de la Unidad Asociada en el Hospital Provincial de Ávila.

Y finalmente pedir disculpas a la Fundación Domingo Martínez en la demora que ha sufrido la realización del proyecto, que se ha debido fundamentalmente a las obras de remodelación del Hospital Provincial de Ávila, que han coincidido con el desarrollo del proyecto durante los dos últimos años, y que ha supuesto una limitación importante a la hora de realizar toda la experimentación con cultivos celulares programada en sus instalaciones. Afortunadamente el resultado ha sido muy positivo como se puede observar en esta memoria, al llegar a disponer de instalaciones de moderno diseño, muy adecuadas para poder continuar con una labor intensa y dirigida a desarrollar investigación en un área prioritaria en los planes de Investigación y desarrollo no solo en España sino en toda la Unión Europea.