



Universidad
de La Laguna

Escuela de Doctorado
y Estudios de Posgrado

TÍTULO DE LA TESIS DOCTORAL

Hidrogeles bioactivos para la regeneración ósea en osteoporosis

AUTOR/A

Elisabet

Segredo

Morales

DIRECTOR/A

Araceli Rita

Delgado

Hernández

CODIRECTOR/A

Carmen María

Évora

García

DEPARTAMENTO O INSTITUTO UNIVERSITARIO

FECHA DE LECTURA

21/05/19

Tesis Doctoral:

Hidrogel bioactivos para la regeneración ósea en osteoporosis

Elisabet Segredo Morales

Departamento de Ingeniería Química
y Tecnología Farmacéutica

Universidad de La Laguna
2019



Universidad
de La Laguna

Tesis Doctoral:

Hidrogeles bioactivos para la regeneración ósea en osteoporosis

Elisabet Segredo Morales

Departamento de Ingeniería Química
y Tecnología Farmacéutica

Universidad de La Laguna
2019



Universidad
de La Laguna



Universidad de La Laguna

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

**HIDROGELES BIOACTIVOS PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA EN
OSTEOPOROSIS**

Directora: Araceli Delgado Hernández

Codirectora: Carmen Évora García.

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Salud.

Autora: Elisabet Segredo Morales.

Abril 2019

Araceli Delgado Hernández y Carmen Évora García Profesora Titular y Catedrática, respectivamente del área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica,

Certifican:

1. Que D^a **Elisabet Segredo Morales**, Licenciada en Ingeniería Química ha realizado este trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **Hidrogeles para la regeneración ósea en osteoporosis**.
2. Que una vez revisada la memoria de Tesis Doctoral y, previo informe favorable de la Comisión Académica del Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud, expresan su conformidad para que sea defendida ante el Tribunal correspondiente designado al efecto, ya que la misma reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en San Cristóbal de La Laguna, a 10 de abril de 2019.

Dra. Araceli Delgado Hernández

Dra. Carmen Évora García

Directora

Codirectora

Esta tesis doctoral ha sido financiada por el proyecto de investigación “Sistemas inyectables para regeneración ósea en osteoporosis” (MAT2014-55657-R) del Ministerio de Economía y Competitividad.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso”

-Louis Pasteur

Agradecimientos.

Quisiera agradecer a todo el departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica por formar parte de mi aprendizaje a lo largo de todos estos años.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directoras, Dra. Araceli Delgado y a la Dra. Carmen Évora (May), el haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis, por confiar en mi desde el primer momento, por tratarme como parte de la familia, apoyarme y escucharme en todo momento y por haber sumergido a una ingeniera en el mundo de lo "bio". Viéndolas trabajar, no te queda más remedio que enamorarte de la investigación.

Al Dr. Ricardo Reyes por prestarme su despacho al principio y por su ayuda incondicional siempre, sin ti esto no hubiera sido posible. Al Dr. Edgar Pérez por involucrarse en la línea desde el primer momento.

A la Dra. Teresa Acosta, por aguantarme, esperarme y por comprender mis prisas. Gracias por poner a mi disposición tu laboratorio y por seguir adelante con mis cabezonerías. A Ana Salas por su ayuda y por haberse convertido en un genio con el manejo del citómetro.

A M^ª Rosa Arnau, por su ayuda, consejos, paciencia y enseñanzas en ese mundo de la experimentación con animales que era nuevo para mí. Eres un ejemplo a seguir.

A Carmen Álvarez, Ángel Concheiro y especialmente a Manuel Martín Pastor por su ayuda con los coeficientes de difusión y los espectros d RMN que forman parte de esta tesis.

A Margarita de la Rosa, por estar dispuesta a ayudar siempre, por tus palabras de ánimo y por contagiarnos con esa alegría que te caracteriza.

A la Dra. Luisa Vera, por ser mi jefa durante el desarrollo de mi corta investigación en aguas, gracias por la ayuda siempre.

A Iván Vera, por ser el mejor jefe que he tenido primero, y por convertirte en un amigo después, gracias por estar ahí.

A Juan Luis González del Servicio de Microscopía Electrónica, por tener la paciencia necesaria para sacar las mejores fotos de hidrogeles y microesferas que he visto en mi vida y al Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, por poner a nuestra

disposición el equipamiento necesario para llevar a cabo esta tesis. A todos los que hoy son mis compañeros, gracias por los ánimos durante el tramo final, especialmente a Idaira, Diana y Jose.

A todos los que han pasado por el laboratorio de Tecnología Farmacéutica y que han contribuido a que esta tesis se haya realizado, a María y a Carlos por enseñarme a dar los primeros pasos en los ensayos in vivo, a Francesco, Javi, Inés, Sofía, Laura y Giancarlo por los buenos ratos en el laboratorio. También a mi segundo laboratorio, el laboratorio de aguas del departamento, a Rai, Óliver, Nacho y Laura, gracias por los cafés y las conversaciones.

A Patri, por su ayuda incondicional, por sus largas horas de escucha, por los consejos, por hacerme más ameno el laboratorio en aquellas ocasiones en las que lo veía todo negro.

A Vanesa, Fátima y Alba, por sacarme de mis mundos de microesferas, ratas y viscosidades, por alegrarse de cada logro y por entender mis ausencias.

A Laura y Óliver, como siempre, gracias por estar ahí a pesar de la distancia a veces, a pesar del tiempo otras, por entenderme como soy, por ser pilares fundamentales de mi vida.

A mi familia, a mi madre y a mi padre por inculcarme la importancia de luchar por lo que uno quiere, a mi hermano por aguantarme y enseñarme que no siempre hay que darle tanta importancia a las cosas y a mi abuela por su fortaleza incansable que no deja de sorprenderme.

A ti Dr. Enrique González, por elegirme, por querer formar parte de mi vida, por ser una persona excepcional, por quererme y cuidarme tanto, por tu ayuda incondicional desde el inicio de esta tesis. Porque sin ti esto no hubiera sido posible, ni experimental ni personalmente. Eres y serás parte fundamental de esto. Por hacerme creer que los imposibles de hoy serán los posibles de mañana, GRACIAS.

A todo aquel que se haya sentido parte de esta tesis y que no he mencionado, gracias.

Mil gracias.

GLOSARIO DE SIGLAS.

A: Alginato

AdT: Tejido adiposo

ALP: Fosfatasa alcalina

BMP: Proteína morfogenética ósea

BSA: Álbamina de suero bovino

BV: Volumen de hueso

CD: Ciclodextrina

CEIBA: Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal

CMO: Contenido mineral óseo

CMC: Concentración micelar crítica

CMT: Temperatura micelar crítica

CT: Tejido conectivo

CS: Quitosano

DCM: Diclorometano

DEX: Dexametasona

Dkk1: Proteína 1 relacionada con Dickkopf

DMEM: Dulbecco's Minimal Essential Medium

DMO: Densidad mineral ósea

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOSY: Espectroscopía de orden difusional

D_p^{app} : Coeficiente de difusión aparente del soluto

D_p : Coeficiente de difusión real del soluto

D_w : Coeficiente de difusión del agua

DS: Lugar del defecto

ECM: Matriz extracelular

EDX: Espectroscopía de Energía dispersiva de rayos X

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

FDA: Food an Drug Administration

FBS: Suero bovino fetal

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico

f_w : fracción de agua intercambiable

G' : Módulo elástico o de carga

G'' : Módulo viscoso o de pérdida

GF: Factor de crecimiento

HAp: Hidroxiapatita

IB: Hueso inmaduro

IGF: Factor de crecimiento insulínico

MC: Medio completo

MD: Medio de diferenciación

MB: Hueso maduro

MeOH: Metanol

MSCs: células mesenquimales

NB: Nuevo hueso

P: Pluronic F-127

p : Intervalo de confianza

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEG: Polietilenglicol

PEO: óxido de etileno

PPO: óxido de polipropileno

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PLA: Ácido poliláctico

PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento

PRP: Plasma rico en plaquetas

PVA: Alcohol de polivinilo

OP: Osteoporótico/a/os/as

OPG: Osteoprotegerina

RANKL: Ligando del receptor del factor nuclear kappa-B

RMN: Resonancia magnética nuclear

ROI: Región de interés

SD: Desviación estándar

SEM: Microscopía electrónica de barrido

T: Tetronic 1307

TBS: Tampón Tris salino

TGF: Factor de crecimiento transformante

TV: Volumen total

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

β -TCP: Fosfato β -tricálcico

ρ_{app} : Densidad aparente

ρ_{true} : Densidad real

Índice:

Capítulo 1. Antecedentes y estado actual de los sistemas aplicados en regeneración ósea. Influencia de la osteoporosis.	1
1. Regeneración de defectos críticos.	3
2. Sistemas de liberación de BMP-2 en modelos no osteoporóticos...5	5
3. Alteraciones en osteoporosis.	13
4. Sistemas de liberación de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en modelos osteoporóticos.....	17
5. Hidrogeles como scaffolds-sistemas de liberación.	23
6. Bibliografía.....	26
Justificación y objetivos.	41
Capítulo 2. Elaboración y caracterización de geles supramoleculares de polipseudorrotaxanos. Aplicación a un defecto óseo crítico en ratas osteoporóticas.	45
1. Introducción.....	47
2. Procedimiento experimental.	49
2.1. Materiales.	49
2.2. Preparación de los geles.	50
2.3. Preparación de las microesferas.	51
2.4. Caracterización de los hidrogeles. Experimentos de RMN.	52
2.4.1. Espectro 1D 1H por RMN (1D 1H)	52
2.4.2. Espectro 1D Water-Logsy.	53
2.4.3. Experimento Water-Diffusion-Exchanged DOSY (WDE-DOSY).....	53
2.4.4. Espectro DOSY.	59
2.4.5. Experimentos DOSY-H ₂ O.	59
2.5. Caracterización de las microesferas.....	60
2.6. Caracterización <i>in vitro</i> del sistema completo.....	61
2.6.1. Liberación de sustancias activas y uniformidad de dosis.	61

2.6.2. Estudio de las propiedades reológicas.	62
2.6.3. Estructura interna y porosidad.	63
2.6.4. Sembrado y cultivo de células mesenquimales de médula ósea de ratas.	64
2.7. Caracterización <i>in vivo</i> del sistema completo.....	66
2.7.1. Modelo animal.	66
2.7.2. Liberación <i>in vivo</i>	68
2.7.3. Evaluación histológica e histomorfométrica.	69
2.7.4. Análisis estadístico.	72
3. Resultados.....	72
3.1. Caracterización del hidrogel.	72
3.1.1. Estudio de difusión y solvatación de los solutos por RMN-DOSY.	73
3.1.2. Características de las microesferas.	85
3.1.3. Viabilidad celular.	86
3.2. Caracterización <i>in vitro</i> del sistema completo.....	88
3.2.1. Liberación <i>in vitro</i> de sustancias activas y uniformidad de dosis. ...	88
3.2.2. Propiedades reológicas.	89
3.2.3. Estructura interna y porosidad.	92
3.3. Caracterización <i>in vivo</i> del sistema completo.	93
3.3.1. Liberación <i>in vivo</i> de la BMP-2.	93
3.3.2. Análisis histológico, histomorfométrico e inmunohistoquímico. ..	94
4. Discusión.	103
5. Bibliografía.	114

Capítulo 3. Regeneración ósea en osteoporosis mediante liberación de de BMP-2 y PRGF desde un hidrogel compuesto por Tetronic®-

Alginato.	121
1. Introducción.....	123
2. Procedimiento experimental.	126
2.1. Materiales.	126

2.2. Preparación y caracterización del PRGF.....	126
2.3. Preparación de las microesferas.....	127
2.4. Preparación de los hidrogeles.....	127
2.5. Caracterización <i>in vitro</i> del sistema completo.....	128
2.6. Caracterización <i>in vivo</i> del sistema completo.....	130
2.6.1. Modelo animal.....	130
2.6.2. Ensayo de liberación <i>in vivo</i> de la BMP-2.....	131
2.6.3. Histología e histomorfometría.....	132
3. Resultados.....	132
3.1. Caracterización del hidrogel.....	132
3.1.1. Caracterización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF).	132
3.1.2. Características de las microesferas.....	132
3.2. Caracterización <i>in vitro</i> del sistema completo.....	133
3.2.1. Estructura interna y porosidad.....	133
3.2.2. Propiedades reológicas.....	134
3.2.3. Liberación <i>in vitro</i> de sustancias activas y uniformidad de dosis.....	136
3.3. Caracterización <i>in vivo</i> del sistema completo.....	137
3.3.1. Liberación <i>in vivo</i> de la BMP-2.....	137
3.3.2. Análisis histológico, histomorfométrico e inmunohistoquímico.....	138
4. Discusión.....	147
5. Bibliografía.....	151
Discusión general.....	155
Bibliografía.....	164
Conclusiones.....	165
Anexo.....	169

Capítulo 1.

Antecedentes y estado actual de los sistemas aplicados en regeneración ósea.

Influencia de la osteoporosis

1. Regeneración de defectos críticos.

Las lesiones óseas habituales son generalmente regeneradas por el propio organismo a través de una cascada compleja de sucesos biológicos. Estos eventos son controlados por numerosos factores bioactivos, entre los que se incluyen sustancias, en su mayoría, de naturaleza proteica, tipo citoquinas y factores de crecimiento, que actúan como moléculas de señalización, envían señales a los sitios dañados, incitando la migración de células progenitoras y células inflamatorias para desencadenar el proceso de curación. Sin embargo, en algunas lesiones comúnmente relacionadas con la práctica de deporte, accidentes de trabajo, accidentes de tráfico y enfermedades como tumores o infecciones (Moran et al., 2006; Li et al., 2010; Dimitriou et al., 2011), se produce tal pérdida de masa ósea que no puede ser auto-reparada, dando lugar a lo que se denomina defecto crítico (Fayaz et al., 2011). En estos casos se recurre a la utilización de injertos para paliar la pérdida de hueso en el defecto (Laurencin et al., 2006), una técnica que presenta varias desventajas (Pape et al., 2010; Guerado et al., 2011; Yuste et al., 2012), siendo la principal, la limitada disponibilidad y el alto riesgo que supone el hecho de extraer hueso de un paciente (dolor para el donante y morbilidad) (Blokhuis et al., 2011; Tuchman et al., 2016). El uso de aloinjertos -injertos procedentes de cadáveres- puede considerarse como una alternativa, pero el riesgo de rechazo por parte del paciente es muy alto (Blokhuis et al., 2011; Zimmermann y Moghaddam, 2011; Shibuya y Jupiter, 2015), por lo que se hace necesaria la búsqueda o el desarrollo de nuevos sistemas que sean más eficientes para inducir la reparación del tejido óseo.

Una opción es la ingeniería de tejidos, que consiste en la utilización de scaffolds, andamios o sistemas activados con sustancias osteoactivas para estimular la adhesión, proliferación y diferenciación celular, y, en definitiva, promover la regeneración.

De acuerdo con Lee et al. (2011) y la experiencia previa del grupo de investigación en el que se engloba esta tesis (de la Riva et al., 2009, 2010; Rodríguez-Évora et al., 2013, 2014; Del Rosario et al., 2015a, 2015b), el control de la liberación de los factores bioactivos para imitar el perfil de liberación fisiológico y su localización en el defecto tras la implantación de estas matrices, es crucial para alcanzar efectos regeneradores apreciables. Los factores de crecimiento, confinados en sistemas biodegradables, pueden ser liberados en el lugar del defecto y, si se controla la cinética de liberación adecuadamente, se puede aumentar el tiempo de permanencia de concentraciones terapéuticas de las sustancias activas en el defecto. Tanto el proceso de migración celular como el de proliferación y el de diferenciación, son típicamente dependientes de la presencia específica de factores de crecimiento. El desarrollo de un biomaterial que controle la liberación de los mismos puede ser crucial para el control biológico del proceso. Estas estrategias se basan en la fabricación, mediante diferentes métodos, de andamios 3D que actúen como la matriz extracelular (ECM). Además, estas matrices 3D deben actuar permitiendo la infiltración celular, así como su proliferación y diferenciación y, además, deben degradarse a una velocidad tal que permitan que el nuevo tejido vaya ocupando todo el defecto (Rodríguez-Évora et al., 2013). La principal función de los scaffolds para la regeneración ósea es servir de guía para la correcta formación de hueso en el defecto. Idealmente un andamio debe cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizado para esta función, entre ellos, debe poseer propiedades mecánicas similares a las del tejido a reparar, además de ser biocompatible y biodegradable, o bien tener una tasa de osteointegración adecuada para que se produzca la regeneración. Los factores de crecimiento más directamente implicados en los procesos de regeneración ósea son: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento insulínico (IGFs) y los factores de crecimiento transformadores (TGFs) que actúan reclutando, facilitando la proliferación y estimulando la diferenciación de las células osteoprogenitoras. Para imitar la cascada de sucesos que

tienen lugar en el proceso de formación de hueso se requiere la combinación de scaffolds, sustancias activas y células (Janicki y Schmidmaier, 2011; Mehta et al., 2012; Vo et al., 2012). El nuevo tejido regenerado se forma a partir de células y sustancias de procedencia tanto sistémica, como local de los tejidos adyacentes.

Las BMPs son las proteínas que han demostrado tener una mayor efectividad en la regeneración y la curación de fracturas óseas (Devescovi et al., 2008). Estas proteínas se expresan durante todo el proceso de reparación debido a que están implicadas desde el inicio, en el reclutamiento celular y en la proliferación de las células mesenquimales procedentes de médula ósea (MSCs), hasta el final en su diferenciación a osteoblastos (Dimitriou y Giannoudis, 2005; Devescovi et al., 2008; Dimitriou et al., 2011). Existen más de 15 proteínas clasificadas como BMPs pero no todas presentan la misma capacidad osteoinductora (Cheng et al., 2003), la más destacada es la BMP-2 que junto con la BMP-7 son las únicas que están aprobadas para la práctica clínica actual por la Food and Drug Administration (FDA) y la European Medicines Agency (EMA).

2. Sistemas de liberación de BMP-2 en modelos no osteoporóticos.

La BMP-2 se encuentra en el mercado (InductOs®) para ser aplicada, embebida en una esponja de colágeno, en ciertos defectos óseos. Su uso está únicamente indicado para tratar la fusión intersomática lumbar de un único nivel como sustituto del injerto de hueso autógeno en adultos con discopatía degenerativa. Además, InductOs® también está indicado en el tratamiento de fracturas agudas de tibia en adultos, como adyuvante al tratamiento estándar consistente en la reducción de la fractura abierta y la fijación de clavos intramedulares no fresados (EMA, 2018b). Este uso restrictivo de la BMP-2 es fundamentalmente debido al riesgo de efectos indeseables graves, que podrían ser atribuidos a altas dosis y a la no optimización de la liberación de la proteína. Por ello, se ha dedicado un

gran esfuerzo en las últimas décadas a la búsqueda de alternativas para mejorar la formulación de la proteína y permitir un uso más extendido. Se han diseñado, elaborado y se ha evaluado la eficacia en diferentes modelos animales de una gran variedad de sistemas conteniendo dosis muy dispares de la proteína (Tablas 1 y 2). Sin embargo, son pocos los trabajos dirigidos a la optimización de la cinética de liberación de la BMP-2 *in vivo* para mejorar su eficacia osteogénica. De hecho, en base a los ensayos de liberación *in vitro*, los resultados obtenidos por unos y otros autores son controvertidos. Algunos apoyan que una liberación prolongada sin efecto burst o muy suave mejora la eficacia osteogénica *in vivo* (Jeon et al., 2008). Por el contrario, otros autores sugieren que se requiere una liberación rápida inicial, seguida de una más sostenida para estimular la formación de hueso (Li et al., 2009; Brown et al., 2011).

El problema en la mayoría de los casos es que se estudia *in vitro* la cinética de liberación de la BMP-2 y, tal y como se recoge en la Tabla 2, estos ensayos no reflejan la liberación *in vivo* de la proteína. En general, la liberación *in vivo* es mucho más rápida que *in vitro* (Li et al., 2003; Kempen et al., 2009; Rodríguez-Évora et al., 2013), probablemente porque son muchos los determinantes fisiológicos que pueden afectar a la cinética de liberación de las sustancias activas. Tanto el flujo de sangre como las reacciones inflamatorias y la actividad celular pueden, no sólo acelerar la liberación de la BMP-2 *per se*, sino también modificar la degradación del sistema y, consecuentemente, la cinética de liberación de la proteína. Los resultados previos, obtenidos por el grupo de investigación, demuestran que el control de la concentración de BMP-2 y del tiempo de permanencia del sistema en el lugar del defecto son esenciales para obtener una regeneración ósea significativa (Rodríguez-Évora et al., 2013; 2014). El tiempo de residencia óptimo de la BMP-2 en el defecto para que esta ejerza un efecto óptimo depende, en parte, de la composición y estructura del scaffold 3D. En este sentido, hay que destacar el papel de la velocidad de degradación del scaffold, una degradación excesivamente lenta, salvo que la porosidad sea muy elevada, probablemente impida la entrada de células y retrase la

formación de hueso. Además, nuestros resultados previos en defectos críticos en calvaria de ratas parecen indicar que la velocidad de cesión de la BMP-2 desde scaffolds sólidos, debe ser más lenta que la que se requiere cuando se utilizan scaffolds que abandonan el defecto más rápido, tipo hidrogeles. De hecho, los resultados obtenidos por nuestro grupo ponen de manifiesto que la tasa de reparación inducida por BMP-2 formulada en un andamio sólido moderadamente poroso, es menor cuando ésta se libera en aproximadamente una semana que cuando su liberación se prolonga durante un periodo de 3-6 semanas (Rodríguez-Évora et al., 2013). Por el contrario, cuando la misma dosis de BMP-2, formulada en un hidrogel, se libera en 1-2 semanas debido al aclaramiento del mismo desde el defecto, los resultados observados fueron similares o incluso mejores que con los scaffolds sólidos (Rodríguez-Évora et al., 2014; del Rosario et al., 2015b).

Por tanto, lo que parece claro es que los scaffolds deben ir dejando espacio para el nuevo tejido y, a la vez, deben servir de soporte para la liberación de sustancias activas durante el tiempo necesario para que se inicie el proceso de reparación ósea. En consecuencia, hay que alcanzar un equilibrio entre la velocidad de degradación del scaffold, la velocidad de liberación de las sustancias activas y la velocidad de formación de nuevo tejido.

A pesar de los esfuerzos realizados en investigación, aún hoy en día la reparación de defectos óseos críticos supone un reto, y la situación es más compleja en ciertas patologías como la osteoporosis. Sin embargo, se ha prestado muy poca atención a los requerimientos adicionales para la regeneración de defectos óseos complicados en pacientes osteoporóticos (OP).

Tabla 1. Sistemas de liberación biodegradables/osteointegrables conteniendo BMP-2 ensayados in vitro para el estudio de la cinética de liberación e in vivo para la regeneración ósea en defectos críticos.

Sistema de liberación	Perfil de liberación in vitro de la BMP-2	Tipo de defecto crítico/ Dosis de BMP-2	Regeneración ósea	Referencia
BMP en hidrogel (H) inyectable de poli(fosfazeno) nanocomplejo vs BMP en disolución (D).	No burst, 50% en 3 sem y aprox. 100% en 7 a vel. cte.	Calvaria de ratón (5 mm Ø) / 5 y 10 µg.	A 8 sem, BV 3,8 mm ³ con 10 µg en D. En H con 5 µg, 17,5 mm ³ y 33 mm ³ con 10 µg.	Seo et al., 2017
H-termosensible de mPEG-PLGA vs hueso autólogo.	No burst. ≅40% liberado en 4 sem (FE) a vel. cte.	Fémur de Conejos (10 mm) / 5, 10 y 20 µg.	Tras 12 sem, reparación total con 20 µg de BMP y con autoinjerto.	Peng et al., 2016
H de fibrinógeno PEGilado.	≅ 6% en 1 d y el 7% a FE (10 d).	Calvaria de ratón (5 mm Ø) / 1 µg.	Tras 6 sem BV un 39% > blanco.	Ben-David et al., 2013
H de Achi- metacrilato de glicidilo con 3 vel. de degradación.	75% (degradación lenta)-100% (intermedia y rápida) en ≅ 5 d.	Calvaria de ratas (5 mm Ø) / 5 µg BMP.	Tras 6 sem, BV similar (6,5-7,5 mm ³) y > el blanco (1, 3-2 mm ³).	Patterson et al., 2010
BMP en H de PEG-seda con y sin partículas (PLA o PLGA).	No burst. 25%, 22,5% y 19,5% en 16 d a vel. cte., desde H solo o con PLGA y PLA.	Calvaria de rata (8mm Ø) / 2,5 µg.	Mayor regeneración (32,5%) con partículas de PLA, tras 8 sem.	Ma et al., 2016
H de alginato- RGD (A-RGD) vs EC. Cubierta de nanofibras PCL.	El ≅3% y 15 % en 1 d desde A-RGD y EC, respectivamente. Total 20-25% en 2 sem.	Fémur de ratas (8 mm) / 30 µg.	A las 8 y las 12 sem, BV mayor con alginato.	Krishnan et al., 2017
EC con y sin nanofibras (NF) de péptidos.	EC: 1d (20%) y FE (23 d) 26% EC-NF: 7% en 1d; 37% a FE.	Paladar de ratas (7x2,5x1 mm3) / 12 µg.	72% con EC y 88% con EC-NF.	Mostafa et al., 2015
H o scaffold de queratina (HQ o SQ) vs EC.	1 d: 6% EC, 12% HQ y SQ, 5d: 7% EC y 16% HQ, 7d: SQ 32%.	Mandíbula de rata (5 mm Ø) / 5 µg.	100% HQ, SQ y EC vs 40-75% blancos. EC más hueso ectópico.	Kowalczewski et al., 2014
S de queratosa (SQR) vs EC comercial (Infuse®).	SQR: burst 61%, 4 sem (FE) 80% y EC: 36% y 75%.	Fémur de rata (8 mm) / 50 µg.	A 8 y 16 sem respuesta similar. SQR < tejido adiposo que EC.	Guzman et al., 2013
BMP en micropartículas de PLGA en SC-HAP.	No burst, 12% en 4 sem.	Calvaria de ratas (7mm Ø) / 6,6 µg.	Tras 8 sem, 4,4 mm ² de área reparada vs 1,9 mm ² blanco.	Quinlan et al., 2015a

Tabla 1 (cont.). *Sistemas de liberación biodegradables/osteointegrables conteniendo BMP-2 ensayados in vitro para el estudio de la cinética de liberación e in vivo para la regeneración ósea en defectos críticos.*

Sistema de liberación	Perfil de liberación in vitro de la BMP-2	Tipo de defecto crítico/ Dosis de BMP-2	Regeneración ósea	Referencia
Colágeno-condroitin sulfato recubierto con isotetrato de acetato de PLLA-sacarosa.	En 3 d se libera el \approx 12% y a 2 sem (FE) 50%.	Fémur de rata (3,2 mm \varnothing) / 1 y 2 μ g.	Tras 3 sem respuesta > blanco y no tratado, sin diferencias entre dosis.	Keskin et al., 2005
Heparina-péptido anfifílico-NF gel en EC (HepPA-NF- EC).	Heparina reduce cesión \approx 34% vs 84% sin Hep en 5 días (FE).	Fémur de rata(5mm) / 1 μ g.	BMP en HepPA-NF-EC> respuesta 20,3 mm ³ vs 8,2 mm ³ con EC.	Lee et al., 2013
C-HAp(Healos [®]) con cubierta con H de PEG.	2% en 10 d (FE).	Calvaria de ratón joven y viejo (3,5 mm \varnothing) / 2 μ g.	BV 4 sem, 4,6 (viejos) -5mm ³ (jóvenes) vs 0,8 mm ³ blanco.	Charles et al., 2015
BMP en SC con y sin cubierta de apatita (Ap).	Sin Ap 98% en 1. Con Ap 1 ^{er} día 32% y >90% en 13 d.	Calvaria de ratón (4 mm \varnothing) / 1 μ g BMP.	Tras 8 sem, volumen y área reparada: Con Ap 88% y 92% vs 35% y 23% sin Ap.	Yang et al., 2011
BMP- InductOs [®] (EC [®]) vs matriz de fibrina (MF).	No burst, 12 d 30% ambos. 14 d (FE): 15% (EC [®]) y 75% (MF).	Fémur de rata (4mm) / 72 μ g (EC [®]) y 10 μ g (MF).	Reparado en 8 sem, 27 mm ³ (EC [®]), 32 mm ³ (MF) vs 14mm ³ blancos.	Schützenberger et al., 2012
Gelatina/nano HAp/fibrina-BMP.	Vel. cte: 1,5% en 1d, 50% en 15 d y el 100% tras 40 d.	Radio de conejos (15 mm) /10 μ g.	En 12 sem, DMO con BMP 0,238 \approx hueso normal, blanco 0,176 g/cm ² o sin tratar.	Liu et al., 2009
Gel de fibrina (GF) con y sin partículas PLGA-nanoHAp.	Sin partículas: 15% en 1 d y 60% en 2 sem, no más liberación. Con partículas 9% 1 día, 40% en 4 sem y 50% en 8 sem (FE).	Calvaria de rata (8mm \varnothing) /5 μ g BMP.	Reparación a 8 sem 92% con partículas; 72% sin partículas y blancos, 19%.	Kim et al., 2008
BMP en sellador de fibrina vs BMP en D.	40% en 1 d, 70% en 3d y 95% en 10d.	Tibia de conejos (10 mm) /100 μ g.	Tras 8 sem, BV/TV fue blancos (27%), 36% en D y sellador 48%.	Li et al., 2016
PCL sellado con fibrina- BMP, matriz tipo panel.	Perfil de liberación trifásico, picos a 2h, 7 y 16 d.	Cúbito de conejo (15 mm) /75 μ g.	Tras 8 sem BV/TV 53% vs 18% blanco y 20%, sin tratar.	Bae et al., 2011

Tabla 1 (cont.). Sistemas de liberación biodegradables/osteointegrables conteniendo BMP-2 ensayados *in vitro* para el estudio de la cinética de liberación e *in vivo* para la regeneración ósea en defectos críticos.

Sistema de liberación	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de la BMP-2	Tipo de defecto crítico / Dosis de BMP-2	Regeneración ósea	Referencia
BMP-heparina-PLGA nanopartículas (NP) en GF vs BMP en GF.	GF-NP: 1d, 5% y 23% en 15 d GF: 58% en 9d.	Calvaria de rata (8mm \emptyset) / 4 μ g.	Tras 4 sem, GF-NP >GF>blancos.	Chung et al., 2007
BMP-matriz de CS con y sin HAP ms.	Sin HAP: 20% (1 d), 80% (30 d) Con HAP <5% (1 d y 75% en 45 d).	Radio de conejo (20 mm) / 5 μ g.	A 12 y 16 sem, puntuación: HAP 10 y 12 vs sin HAP 8 y 9, respectivamente.	Yao et al., 2015
H fotoentrecruzado con BMP en D o en NP-CS.	NP-CS: 30% (1d), 50%, 1sem (FE) en D 35%, 1d y 89% a FE.	Radio de rata (18 mm) / 50 μ g.	Tras 12 sem, NP-CS reparación completa con hueso \approx normal.	Cao et al., 2014b
Micropartículas de gelatina en scaffold poroso de PPF.	19,7% en 1 d y 40% a FE (4 sem).	Calvaria de rata (8mm \emptyset) / 0,63; 1,25 y 2,5 μ g.	Tras 12 sem, regeneración dosis dependiente, 37,4%, 19,4% y dosis baja igual que blanco.	Young et al., 2009
España de gelatina con y sin BMP- NP-CS 2-N,6-O-sulfato vs BMP en D	NP: 15% en 1 d y 78% a 3 sem (FE). D: 45% (1 d), 95% a FE.	Radio de conejo (18 mm) / 50 μ g	4, 8 y 12 sem, vascularización y osteogénesis BMP-NP> BMP-D.	Cao et al., 2014a
S de Poli(LA-co-CL)con BMP: adsorbido(Ad), covalente (Co) o en PLGAms.	Co no se libera. Ad y ms picos de cesión a 40 d.	Mandíbula de rata (5 mm \emptyset) / 1 μ g.	Tras 4 sem BV/TV 10-13% (Ad y ms) y <5% con Co.	Suliman et al., 2015
BMP libre o PLGA-ms en scaffolds PU vs SC.	PU: 36% (1d) y 58% (4d) PLGA-ms: 3%(1d) y 22% a 21 d (FE). SC: 100% en 2 d.	Fémur de rata (6mm) / 2 μ g.	BV tras 4 y 8 sem, similares \approx 30 mm3 con SC, \approx 45 mm3 con PU y > PU-ms que \approx blancos.	Brown et al., 2011
Colágeno tipo I vitrificado.	6% en 1d y 15% a FE (15 d).	Calvaria de ratón (4 mm \emptyset) / 0,19 o 0,78 μ g.	Tras 4 sem: 14,5% con 0,19 μ g, 40,2% con 0,78 μ g > blanco.	Zhao et al., 2009
Scaffold de PLGA/PEG.	20% en 1 d y 70% tras 3 sem.	Calvaria de ratón (5 mm \emptyset) / 1 μ g.	Tras 6 sem, 55% de BV vs 31% con scaffold blanco.	Rahman et al., 2014

Tabla 1 (cont.). Sistemas de liberación biodegradables/osteointegrables conteniendo BMP-2 ensayados in vitro para el estudio de la cinética de liberación e in vivo para la regeneración ósea en defectos críticos.

Sistema de liberación	Perfil de liberación in vitro de la BMP-2	Tipo de defecto crítico/ Dosis de BMP-2	Regeneración ósea	Referencia
Scaffolds de PU con BMP libre y en ms de PLGA-L o PLGA-S.	36%, 25% y 3% tras 1 d y a FE (21 d): 78%, 68% y 22% desde PU, ms-PLGA-L y ms-PLGA-S respectivamente.	Fémur de rata (3mm \emptyset x 5mm / 2 μ g	BV/TV tras 4 sem: blancos 32%, BMP en PU 52% > 40% en ms.	Li et al., 2009
5 μ g BMP-2 en Scaffold de PCLF/HAP/PVA.	1 d \approx 1,4 μ g, 5 d \approx 1, 8 μ g y \approx 2 μ g en 10 d. No más cesión en 3 sem (FE).	Calvaria de conejo (15 mm \emptyset) / 50 μ g	Tras 6 sem BV y DMO de 65 mm ³ y 110 mg/cm ³ > blanco (25 mm ³ y 75 mg/cm ³).	Kim et al., 2012
Electrohilado de PEO- (PCL / PEG-BMP), con \neq porosidad.	Baja porosidad 5% (4 h) y 67% (2 sem) y alta, 15% y 72%. No más liberación a FE (27 d).	Calvaria de rata (5 mm \emptyset) / 0,135 μ g.	Regeneración tras 8 sem: \approx 40% blancos, fibras de alta 55% y 80% baja porosidad.	Srouji et al., 2011
BMP en scaffolds porosos de cristobalita.	27% en 1 d, 77% en 7 d y 82% a FE (28 d).	Fémur de conejo (8 mm) / 30 μ g.	Tras 3 meses, BMP en scaffolds > blanco (evaluación cualitativa).	Nandi et al., 2015
PLGA-Cilindro con capa polielectrolito (poly-L-lysine y Achii) y distinto grado de entrecruzado BMP adsorbida.	La BMP se libera sólo el 1 ^{er} día independientemente del grado de entrecruzamiento.	Fémur de rata (6mm) / \approx 1,3; 7, 15 y 29 μ g.	Tras 8 sem, dosis 1,3 μ g \approx blancos. Resto > blanco, no efecto de dosis	Bouyer et al., 2016
Scaffold de fibroina porosa de seda.	1 sem un 75%. No más cesión a FE (4 sem).	Calvaria de ratón (4 mm \emptyset) / 2,4 \pm 0,14 μ g.	Tras 5 sem: más regeneración que el blanco.	Karageorgiou et al., 2006

A: alginato; Achii: ácido hialurónico; Ad: adsorbido; Ap: apatita; BV: volumen de hueso; C: colágeno; CMO: contenido mineral óseo; Co: covalente; CS: quitosano; cte: constante; D: disolución; DMO: densidad mineral ósea; EC: esponja de colágeno; FE: final del ensayo; GF: gel de fibrina; H: hidrogel; HAP: hidroxiapatita; HepPA: heparina-peptido anfifílico; HQ: hidrogel de queratina; MF: matriz de fibrina; ms: microesferas; NP: nanopartículas; PCL: policaprolactona; PCLF: fumarato de policaprolactona; PEO: óxido de polietileno; PLA: ácido poliláctico; PLGA: ácido poliláctico-co-glicólico; PLLA: poliácido-L-láctico; poli(LA-co-CL): poli(L-láctico)-co-(ϵ -caprolactona); PPF: fumarato de polipropileno; PU: poliuretano; PVA: alcohol polivinílico; S: scaffold; SC: scaffold de colágeno; SQ: scaffold de queratina; SQR: scaffold de queratosa; TV: volumen total; vel.: velocidad. **Nota:** solo se han incluido trabajos en los cuales se administran las dosis de BMP indicadas en ensayos in vivo

Tabla 2. Resumen de los sistemas biodegradables/osteointegrables ensayados *in vivo* para la liberación y la regeneración en un defecto óseo crítico.

Sistema de liberación	Perfil de liberación de la BMP-2 <i>in vitro</i>	Perfil de liberación de la BMP-2 <i>in vivo</i>	Defecto crítico / Dosis de BMP-2	Regeneración	Referencia
Fosfato bifásico de calcio (FBC) vs FBC-EC.	Nd	Perfil similar: no burst y 95% en 5 sem.	Atrofia de la espina lumbar de conejo / 6,3 mg.	Similar: tras 5 sem 100% de fusión.	Louis-Ugbo et al., 2002
Pasta inyectable de FBC vs EC.	6% en 2 d sin más liberación a FE (3 sem).	FBC y EC: 40%-45% (1 d) y 95% en 3 sem.	Cúbito de conejo (0,5-1 mm) / 100 µg.	Tras 4 sem, FBC ≡ EC 62-63% vs blancos ≡23%.	Li et al., 2003
Varilla de PLGA-ms y fumarato polipropileno (PPF) cubierta por HG.	3,3% en 1 d y 10% a FE (32 d).	9,5% en 3d, 75% en 2 sem y 90% en 6 sem.	Fémur de rata (5 mm) / 6,6 ± 0,5 µg.	BV tras 8 sem 52 mm ³ vs 29 mm ³ con blancos.	Kempen et al., 2009
H de Tetronic 908 (T) y Tetronic-α-CD (T-CD).		60%- 70% en 1d y 100% en 7 d desde T y T-CD.	Calvaria de rata (8 mm Ø) / 3 y 6 µg.	Tras 8 sem, T-6µg, 35% T-CD, 3-6 µg≡70%.	del Rosario et al., 2015b
Malla de fibra de PCL-A-RGD vs EC.	Nd	Exponencial con t _{1/2} de liberación de 3,19 d (malla) y EC de 1,87 d.	Fémur de rata (8 mm) 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 y 5,0 µg en PCL-A-RGD y en EC 0,1 y 1,0 µg.	Relación BV-dosis lineal hasta 1 µg. Tras 4, 8 y 12 sem, 1 µg en malla > EC. Con 0,1 µg no diferencias.	Boerckel et al., 2011
Sistema concéntrico con anillo de β-TCP y núcleo de BMP-PLGams en SPU vs BMP en D.	20% 1 d, 50% en 2 sem y a vel. cte. 70% en 8 sem (FE).	En D, 100% < 3d. En ms: 25% (1d), 60% (1sem), 100% en 6 sem.	Calvaria de rata (8 mm Ø) / 1,6 y 6,5 µg.	No respuesta en D. Tras 8 y 12 sem, con 1,6 µg: 11% y 19%, con 6,5 µg 31% y 60%, respectivamente.	Rodríguez-Évora et al., 2013
BMP en D o PLGams en H de poloxamina (Tetronic® 908 y 1307).		T908 ≡ T1307. En D 100% en 1 sem. En ms: 35% (1 d) > 95% en 2 sem.	Calvaria de rata (8 mm Ø) / 6,5 µg	Tras 12 sem T908 ≡ T1307. En D: 40%. En ms 80-90%.	Rodríguez-Évora et al., 2014
S poroso de β-TCP y comprimido central de BMP en PLGams.	Nd	30% en 1 d y > 95% a las 3 sem.	Calvaria de rata (8 mm Ø) / 6 µg	Tras 12 sem, 70% vs 15% blancos.	Del Rosario et al., 2015a

A: alginato; β-TCP: fosfato tricálcico β; BV: volumen de hueso; CD: α-ciclodextrina; cte: constante; D: disolución; EC: esponja de colágeno; FBC: fosfato bifásico de calcio; FE: final del ensayo; HG: hidrogel de gelatina; ms: microesferas; PCL: policaprolactona; PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico); PPF: fumarato de polipropileno; S: scaffold; SPU: poliuretano segmentado; TV: volumen total; vel: velocidad.

3. Alteraciones en osteoporosis.

La osteoporosis es uno de los mayores problemas de salud de la población mundial. Es una enfermedad compleja, clínicamente dividida en dos tipos, osteoporosis primaria y osteoporosis secundaria (Iseme et al., 2017), según su causa. La osteoporosis primaria, a su vez, puede ser postmenopáusica o senil (Riggs et al., 1982). La osteoporosis postmenopáusica es el resultado de la disminución de los niveles de estrógenos asociados a la menopausia, mientras que la osteoporosis senil está asociada a la edad. La osteoporosis secundaria engloba una serie de desórdenes óseos relacionados con ciertas condiciones clínicas o tratamientos con algunos fármacos, como ocurre en pacientes sometidos a terapia prolongada con glucocorticoides.

La población afectada es numerosa, por lo que supone una elevada carga financiera en los sistemas de salud. Este grupo de población está expuesto a un elevado riesgo de fracturas, morbilidad y mortalidad asociado a su patología. De hecho, se prevé que con el paso de los años aumente considerablemente la incidencia de fracturas relacionadas con la osteoporosis. Por ejemplo, el número estimado de fracturas de cadera a nivel mundial aumentará de 1,7 millones en 1990 a 6,3 millones en 2050, y, aproximadamente, 1 de cada 2 mujeres y 1 de cada 4 hombres sufrirán alguna fractura relacionada con la osteoporosis después de los 50 años (Brewer et al., 2011).

La osteoporosis es un síndrome caracterizado por la pérdida de masa ósea y el deterioro de la microarquitectura del hueso, lo que provoca su fragilidad y lo hace más propenso a fracturarse. Está provocada por un desequilibrio metabólico entre la formación y la resorción de tejido óseo. Este metabolismo junto con la mecano-sensibilidad del hueso está regulado en parte por los estrógenos, y la falta de éstos en mujeres

postmenopáusicas, hace que el riesgo de pérdida de masa ósea se incremente en este grupo de la población (Jakob et al., 2013).

El proceso dinámico de la remodelación ósea está apoyado estrechamente en el balance entre las acciones de las células destructoras de tejido óseo (osteoclastos) y las células formadoras (osteoblastos y osteocitos). El crecimiento y mantenimiento del hueso depende del equilibrio existente entre las acciones gobernadas por los osteoblastos y osteoclastos. En la remodelación ósea los osteoblastos rellenan las cavidades óseas con una matriz orgánica llamada osteoide, y la mineralización del osteoide proporciona fuerza y rigidez al tejido. Finalmente, los osteoblastos se convierten en células de revestimiento óseo en la superficie del nuevo hueso formado y mueren por apoptosis o se transforman en osteocitos (Figura 1).

Estas actividades están emparejadas, es decir, la cantidad de hueso formado por los osteoblastos es igual y compensa la cantidad de hueso reabsorbido por los osteoclastos. Fisiológicamente los osteoclastos crean pequeños poros en el tejido óseo, éstos se rellenan con nuevo hueso formado por los osteoblastos. Sin embargo, la descompensación de este proceso puede conducir a perforaciones trabeculares, deterioro de la microarquitectura trabecular y a un incremento de la fragilidad ósea.

En la regulación de la formación y resorción ósea hay numerosas moléculas sistémicas implicadas, tales como hormonas esteroideas, parathormona, vitamina D y sus metabolitos, y calcitocina. Además, también intervienen proteínas secretadas localmente, como son los factores estimulantes de colonias (mCSF), la osteoprotegerina (OPG), la esclerostina, el ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa-B (RANKL), y varios factores de crecimiento, que constituyen las rutas de señalización que controlan la remodelación. Las rutas de señalización son críticas en la regulación de la pérdida de volumen óseo, la falta de acoplamiento entre las acciones de los moduladores implicados en cada una de ellas puede acarrear la alteración del balance

osteoclastos-osteoblastos y desembocar en osteoporosis (Jakob et al., 2013; Íñiguez-Ariza y Clarke, 2015; Asafo-Adjei et al., 2016).

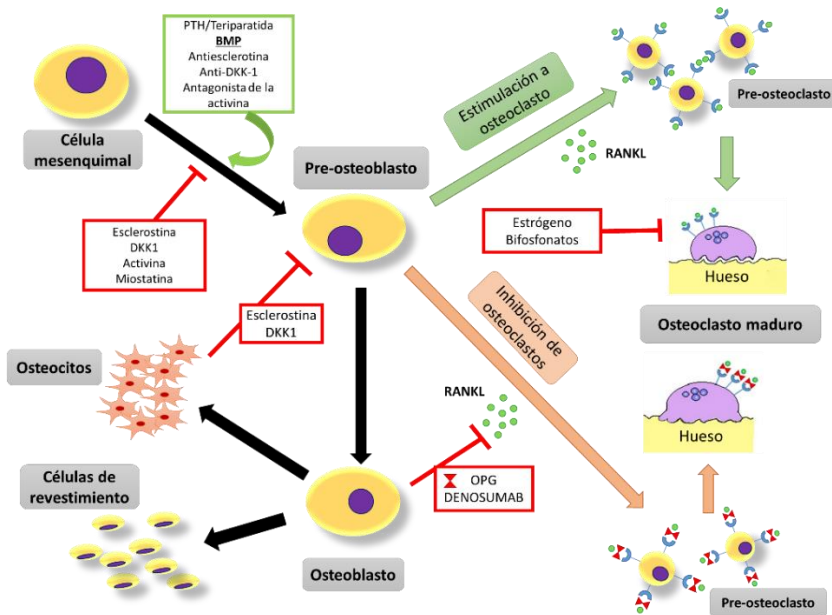


Figura 1. Esquema simplificado de las rutas de señalización implicadas en el proceso de remodelación ósea indicando receptores de algunos agentes terapéuticos. La señalización de la parathormona (PTH) y de las proteínas morfogenéticas (BMP) conduce a la diferenciación a osteoblastos. Por el contrario, la proteína Dickkopf-1 (DKK1) y la esclerostina son inhibidores de la vía de señalización Wnt. Por otra parte, la remodelación se inicia cuando el ligando del receptor del factor nuclear kappa-β (RANKL) se une a su receptor. Esta unión se inhibe fisiológicamente mediante la osteoprotegerina (OPG) y terapéuticamente por el anticuerpo denosumab. Los estrógenos reducen la producción de RANKL de los osteoblastos.

Aunque, obviamente los osteoclastos y osteoblastos resultan adecuados para la intervención farmacológica (Harsløf y Langdahl, 2016), la mayoría de las terapias para la osteoporosis se centran en inhibir la resorción y sólo unas pocas en inducir la formación de hueso. Los tratamientos anti-resortivos consisten mayoritariamente en administración de bifosfonatos, ranelato de estroncio, calcitocina, moduladores de los receptores selectivos de estrógenos (SERM) o terapia hormonal sustitutiva. En los

últimos años se ha introducido un anticuerpo monoclonal, el denosumab, que tiene gran afinidad por el RANKL impidiendo su unión con su receptor (RANK), que es el proceso que inicia la producción de osteoclastos. Sin embargo, el tratamiento prolongado con estos medicamentos anti-resortivos está relacionado con la aparición de serios efectos secundarios, como necrosis mandibular o hipocalcemia (Whitaker et al., 2012).

Por otro lado, el avance en la comprensión de la fisiología del hueso y de los mecanismos involucrados en el desarrollo de la osteoporosis, ha estimulado la búsqueda de nuevas terapias centradas, principalmente, en las vías de señalización que estimulan la función de los osteoblastos. Actualmente el único fármaco anabólico disponible es la parathormona, y en concreto la teriparatida (PTH1-34) (forma truncada de la hormona), aunque recientemente la FDA y la EMA han limitado su uso a un periodo máximo de 24 meses, debido al riesgo de aparición de osteosarcoma que ha sido detectado en modelos animales (Vahle et al., 2004) Otro agente similar es la abaloparatida (Cosman et al., 2017; Martin y Seeman, 2017) que fue rechazado por la EMA en marzo de 2018 para su uso en humanos (EMA, 2018a) por riesgo de toxicidad cardíaca.

Otras dianas en las que se trabaja son la esclerotina y la proteína Dickkopf-1 (Dkk-1), buscando anticuerpos efectivos para conseguir una doble acción sobre los procesos de formación y resorción. El romosozumab, es un anticuerpo anti-esclerotina que prometía buenos resultados, sin embargo, la FDA ha suspendido temporalmente su aprobación debido a la elevada incidencia de eventos cardiovasculares detectados en ensayos clínicos (fase III) (Mullard, 2017). La EMA aceptó su solicitud de autorización, aunque seguía pendiente en marzo de 2018 (El País, 2018). Por su lado, el Dkk-1 es un regulador negativo de la homeostasis ósea que se encuentra elevado en mujeres OP. La manipulación de esta función podría tener gran repercusión en la terapia anti-osteoporosis, puesto que se ha demostrado que la reducción progresiva de la Dkk-1 aumenta la masa ósea trabecular y cortical en ratones y primates (Tian et al., 2015).

A pesar de que el aumento de la actividad anabólica parece una buena opción para la recuperación del hueso osteoporótico, hay que tener en cuenta que, al igual que con los tratamientos anti-resortivos, en los que el incremento de la densidad mineral ósea por reducción de la actividad de los osteoclastos, lleva consigo un descenso de la formación por parte de los osteoblastos, los agentes anabólicos estimulan a estos últimos y, como consecuencia, se incrementa la actividad de los osteoclastos, limitando su efecto. Una opción podría ser la combinación de sustancias anti-resortivas con terapias anabólicas. En este sentido, se ha demostrado por primera vez un efecto aditivo en la densidad ósea por la combinación de teriparatida y denosumab. Sin embargo, la eficacia anti-fractura no ha sido verificada aún (Harsløf y Langdahl, 2016).

4. Sistemas de liberación de proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) en modelos osteoporóticos.

El análisis de un amplio número de fracturas OP tanto en humanos como en animales permite concluir que la osteoporosis está asociada a un retraso en la consolidación de fracturas (Namkung-Matthai et al., 2001; Xu et al., 2003; Nikolaou et al., 2009). Los modelos animales muestran un retraso en la formación del callo y de la osificación endocondral (Giannoudis et al., 2007; Hao et al., 2007). En general, los huesos OP presentan una menor capacidad para su auto-reparación (Nikolaou et al., 2009). La curación de fracturas OP presenta un patrón más complejo que en hueso sano, con formación de un tejido débil con poca cantidad tanto de hueso esponjoso como cortical, y pobres propiedades mecánicas, lo que dificulta la estabilidad de una fijación osteosintética (Giannoudis et al., 2006, Li et al., 2010).

La reparación ósea se inicia con el reclutamiento-migración, proliferación y diferenciación de MSC al lugar del defecto en respuesta a distintas moléculas de señalización. Sin embargo, las MSCs de pacientes osteoporóticos (MSCs-OP) no parece que respondan adecuadamente a

estas señales. De hecho, presentan una capacidad proliferativa reducida (Tsiridis et al., 2007), producen una matriz deficiente en colágeno tipo I (Prall et al., 2013) y tienen tendencia a diferenciarse a adipocitos en lugar de a osteoblastos, consecuentemente, las MSCs-OP tienen disminuida su capacidad osteogénica (Rodríguez et al., 2000; 2004; Prall et al., 2013).

Centrándonos en las BMPs, se ha detectado una reducción significativa de la respuesta a la estimulación de la BMP-2 o BMP-7 en MSCs humanas en pacientes OP (hMSCs-OP) (Haasters et al., 2013). En las hMSCs-OP parece que se producen fallos en la fosforilación de algunas proteínas en respuesta a la BMP-2 y disminuyen los niveles de expresión basal de ciertos genes (Song et al., 2009). Sin embargo, otros estudios han demostrado que las hMSCs de pacientes sanos y las hMSCs-OP responden bien a la diferenciación osteogénica en respuesta a la BMP-2 (Prall et al., 2013).

En el caso de la osteoporosis post-menopáusicas, la deficiencia de estrógenos retrasa la curación de la fractura y dificulta la biomecánica del callo formado, pero la terapia hormonal sustitutiva puede paliar estos efectos (Cortet, 2011; Oliver et al., 2013). Esto pone en evidencia el papel de los estrógenos; el 17β -estradiol mejora la formación de hueso induciendo la apoptosis de osteoclastos y ejerciendo un efecto anti-apoptosis en los osteoblastos (Kousteni et al., 2001; Krum et al., 2008). Este estrógeno, además, induce la transcripción de la fosfatasa alcalina y estimula la expresión de la BMP-2 regulando la diferenciación a osteoblastos (Krum, 2011).

Por otro lado, los glucocorticoides son conocidos por inducir la osteoporosis principalmente por la supresión de la osteogénesis en osteoblastos (Cortet, 2011). La dexametasona suprime ambas vías, la de BMP y la Wnt, aumentando la expresión de sus antagonistas (Hayashi et al., 2009).

Todos estos descubrimientos junto con el decrecimiento de la expresión de las BMPs en la osteoporosis hacen de la BMP-2 una citoquina

prometedora para el tratamiento de las fracturas OP (Van Lieshout y Alt, 2016).

A pesar del gran esfuerzo que se ha realizado para el desarrollo de sistemas útiles para la regeneración ósea (Tablas 1 y 2), de acuerdo con la literatura revisada, poca atención se ha prestado a los requisitos específicos en osteoporosis. Teniendo en cuenta que en la osteoporosis el proceso de auto-reparación ósea está retrasado, consecuencia de la alteración de varias de las vías implicadas en el proceso de formación, la regeneración ósea en pacientes OP sigue siendo hoy en día un gran reto.

El primer estudio en que se utilizó BMP-2 para defectos óseos en hueso OP data de 2005, y consistió en la evaluación del recubrimiento de implantes de hidroxiapatita-titanio con BMP-2 ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) colocados en tibia de ovejas de edad avanzada con signos de osteoporosis. Los resultados, después de 20 semanas, demostraron que la BMP-2 facilita la osteointegración y mejora las propiedades mecánicas del hueso formado (Sachse et al., 2005). De forma similar, en un modelo de defecto en tibia de ratas ovariectomizadas, se observó que la osteointegración de un implante de Ti_6AlV_4 mejora significativamente cuando su superficie se recubre con BMP-2 ($2 \text{ ng}/\text{mm}^2$). Por el contrario, el recubrimiento con VEGF ($2 \text{ ng}/\text{mm}^2$) no modificó los parámetros utilizados para evaluar la integración. Los autores atribuyen este hecho, entre otros factores, a la baja concentración alcanzada en el defecto (Wölfe et al., 2014). De igual manera, el recubrimiento de un implante de Ti_6AlV_4 con una multicapa de quitosano/gelatina conteniendo BMP-2 (234 ng/rod) y calcitonina (226 ng/rod), estimula la formación de nuevo hueso, mejorando la reparación y la estabilidad en un modelo de fémur de conejos OP (Huang et al., 2016).

En cuanto a estudios con BMP-2 o BMP-7 incluidas en scaffolds o sistemas de liberación para la regeneración de un defecto en osteoporosis, son muy pocos los artículos que hemos encontrado en esta revisión bibliográfica. Citaremos en primer lugar un trabajo dirigido a la evaluación del efecto reparador de BMP-2, en un intervalo de dosis de 0 a 24 μg , incorporada en un scaffold de poliláctico-poliglicólico/gelatina tipo

esponja, implantado en un defecto subperióstico en hueso palatino de poblaciones de ratas macho jóvenes y viejas. Los perfiles de dosis-respuesta fueron diferentes: la población joven responde en campana, mientras que la respuesta de las ratas viejas fue lineal hasta alcanzar un máximo, que se mantuvo independientemente del aumento de dosis. La máxima respuesta en la población joven fue siempre superior al máximo observado en las ratas viejas y, por ello, los autores concluyen que la BMP-2 es menos efectiva en ratas mayores (Yamaji et al., 2007).

En otro estudio se demostró que la respuesta regenerativa en un defecto crítico realizado en tibias de ratas, tratado con BMP-2 incorporada en una esponja de colágeno, fue mayor en ratas no ovariectomizadas que en ovariectomizadas, pero, en ambos casos, superior al grupo control (Sarban et al., 2009), confirmando resultados anteriores (Yamaji et al., 2007). También se han propuesto scaffolds inyectables consistentes en un cemento de fosfato de calcio (CPC) cargado con BMP-2 libre (BMP-2/CPC) o con BMP-2 adsorbida en microesferas de gelatina (BMP-2/GM/CPC), para regenerar un defecto crítico en vértebras de cabras ovariectomizadas. Ambos sistemas inducen formación de hueso y rellenan el defecto en mayor porcentaje que el grupo control. En el grupo tratado con BMP-2/GM/CPC se rellena el defecto con un hueso de mejor calidad y su mineralización, aunque es igual al final del experimento, es más rápida. Según los autores, y de acuerdo con la cinética de liberación la BMP-2, estos resultados son debidos a una liberación más rápida durante las primeras semanas desde el sistema BMP-2/GM/CPC, y plantean que una retención excesiva en el BMP-2/CPC podría haber afectado a la estabilidad de la proteína, siendo ésta la causa de la menor respuesta observada (Li et al., 2010).

Posteriormente se estudió el efecto de la combinación de BMP-2 y FGF-2 (factor de crecimiento de fibroblastos-2) en la regeneración de un defecto en calvaria de ratones de avanzada edad. Estos autores sugieren que la combinación de bajas dosis de FGF-2 con BMP-2 permite reducir las dosis de BMP-2 y optimizar la respuesta. Sin embargo, aunque se realizó el

ensayo de liberación *in vitro* de estos factores de crecimiento, los autores no establecen una relación con la respuesta observada (Charles et al., 2015).

Park et al. (2013) estudiaron el efecto de 90 μg de proteína morfogenética ósea recombinante humana-2 (rhBMP-2) administrada en un gel de colágeno, poniendo en evidencia que la rhBMP-2 favorece la fusión espinal en las fases tempranas del proceso en ratas ovariectomizadas, utilizando una dosis sorprendentemente alta. De hecho, otros autores observan resultados similares con 1 μg de BMP-2 en una esponja de colágeno (Ghodastra et al., 2016), sin diferencias entre los grupos no-OP (control) y los ovariectomizados. Por el contrario, la formación de hueso observada en un defecto de 5 mm en peroné de ratas fue menor en los grupos OP que en los no-OP tras la implantación de 10 μg de rhBMP-2 en un hidrogel. Probablemente la rhBMP-2 fue menos efectiva en este caso porque se aplicó en una situación más crítica, utilizando un modelo de osteoporosis combinado de ovariectomía y administración crónica de dexametasona (Lee et al., 2013).

En lo relativo a la BMP-7, los resultados también son muy variables, la artrodesis mejoró en ratas no ovariectomizadas, utilizando dosis de 10 y 30 μg en una esponja de colágeno para tratar un defecto modelo de fusión espinal, pero no se observó respuesta alguna en las ovariectomizadas (Moazzaz et al., 2005). Por el contrario, en otro estudio, la administración de BMP-7 (370 μg) fue eficaz en un defecto vertebral de 8 mm en ovejas OP (Phillips et al., 2006). Estos autores estudiaron diferentes formulaciones de microesferas para el control de la liberación de la BMP-7, el sistema más efectivo resultó ser las microesferas de PLGA con la liberación *in vitro* más lenta, 2% de la dosis de proteína, durante las 2 semanas que mantuvieron el ensayo. Recientemente, en un estudio en el que se utiliza BMP-7 y la combinación de BMP-7 con zolendronato en una pasta de colágeno para tratar un modelo de osteotomía femoral abierta en ratas OP y no-OP, se observó un 100% de unión en el grupo OP frente al 70% en el grupo control (Mathavan et al., 2017). Los autores

indican que las características del nuevo hueso son similares en ambos grupos, lo que hace que, al contrario que lo observado anteriormente (Moazzaz et al., 2005), concluyan que la osteoporosis no supone una gran dificultad para la regeneración ósea, y que la falta de estrógenos provoca una hipersensibilidad a la BMP-7. Sin embargo, la combinación de BMP-2 y zolendronato aplicada a un defecto en cráneo de ratas fue, a tiempos cortos, menos eficaz que la BMP-2 sola, aunque pasado el tiempo los resultados se fueron igualando (Lee et al., 2015).

También se han explorado estrategias genéticas alternativas para mantener el suministro continuo de proteínas bioactivas. Por ejemplo, la inyección de cDNA-BMP-2 en un vector vírico en una osteotomía en tibia de ovejas OP indujo la formación ósea en las primeras fases del proceso, coincidiendo con la liberación de BMP-2, que se extendió durante 5 semanas. La limitación de este estudio es que el defecto no es crítico y al cabo de 8-10 semanas la regeneración pudo ser espontánea (Egermann et al., 2006).

En otro estudio (Tang et al., 2008) realizado con MSCs óseas autólogas de médula ósea (BMSCs) y con MSCs óseas autólogas transfectadas para BMP-2, sembradas en un scaffold de hidroxiapatita de coral macroporoso, aplicado en un defecto crítico en la mandíbula de ratas OP, las células transfectadas expresan BMP-2 al menos durante 4 semanas e inducen la formación de hueso maduro rellenando el defecto. Además, los autores recalcan que la BMP-2 impide la tendencia de las BMSCs a diferenciarse a adipocitos, hecho que se observó en el grupo con BMSCs no transfectadas. En esta misma línea, se estudió una combinación de adenovirus para PDGF-b (adPDGF-b) y BMP-7 (adBMP-7) en andamios mesoporosos de biovidrio/fibrina de seda implantado en un defecto crítico en fémur de ratas OP, y el efecto sinérgico fue claro al cabo de 4 semanas.

5. Hidrogeles como scaffolds-sistemas de liberación.

En la fabricación de scaffolds para ingeniería de tejidos se han utilizado materiales y estructuras muy diversas: espumas de poliuretano (Rodríguez-Évora et al., 2013), implantes elaborados por lixiviación de partículas (Cao y Kuboyama, 2010), soportes fabricados por separación de fases inducidas por cambios térmicos o bien por mineralización *in situ* de hidroxiapatita en polímeros (Sun et al., 2011), espumas de vidrio de fosfato cálcico (Sanzana et al., 2014), etc. Sea cual sea el material utilizado, las estructuras tridimensionales deben ser lo suficientemente porosas para facilitar la invasión celular y la revascularización del tejido, sin llegar a comprometer sus propiedades estructurales.

En este sentido los hidrogeles podrían ser de gran utilidad, por su extraordinaria capacidad para absorber agua y diferentes fluidos, su capacidad de adaptarse a la forma del defecto y su inyectabilidad (Puppi et al, 2010). Además, los hidrogeles termosensibles son particularmente interesantes debido a que pueden ser aplicados como sistemas líquidos que gelifican *in situ*, ocupando toda la superficie del defecto. Son fluidos a una determinada temperatura, lo que les permite ser inyectados en un tejido, órgano o cavidad a reparar, de forma mínimamente invasiva antes de su gelificación (Ruel-Gariépy y Leroux, 2004; Ward y Georgiou, 2011). Esto, sin duda, presenta una clara ventaja en regeneración ósea, ya que no requieren cirugía para administrarlos y, en el caso de defectos críticos, que necesitan de una intervención quirúrgica, se asegura una distribución uniforme en el defecto y su acceso a los bordes del mismo, que, generalmente, es el punto por el que se inicia la formación de nuevo tejido. Además, si el sistema hidrogel gelifica a una temperatura próxima a la corporal, se conseguirá que permanezca en el sitio del defecto una vez es inyectado. Este tipo de hidrogeles son útiles como sistemas de liberación controlada de fármacos (Buwalda et al., 2014) y, junto con su elevada porosidad, los hace candidatos óptimos para actuar de scaffolds o andamios en regeneración tisular.

Como resumen de todo lo mencionado anteriormente se desprende que, para el reclutamiento, proliferación y diferenciación celular se necesitan estructuras de soporte, como andamios/scaffolds, para guiar la formación de tejido y factores de crecimiento que, en el caso de la regeneración ósea, probablemente son proteínas osteogénicas tipo BMP-2. Sin embargo, la dosis, el tiempo y la tasa de liberación son esenciales para la adecuada formación del tejido. Para producir tejido óseo, correctamente estructurado en el sitio del defecto, el scaffold ideal debe liberar secuencialmente los factores de crecimiento a una cierta velocidad que imite el proceso fisiológico. Muchos autores han estudiado la liberación *in vitro* de BMP-2 en diferentes formulaciones, sin embargo, no se ha prestado suficiente atención a la liberación *in vivo*, ni a las concentraciones terapéuticas en el defecto para lograr la reparación ósea en animales sanos, y menos aún, en animales OP. De acuerdo con las alteraciones que tienen lugar durante la osteoporosis, el diseño de los scaffolds y la liberación de BMP-2 debe estar acorde a las condiciones específicas. Todo lo aprendido del enorme número de trabajos dedicados a la optimización de scaffolds, incluyendo la optimización de la cinética de liberación de los factores de crecimiento y la mejora de la regeneración de los defectos óseos en población sana, debe ser utilizado como inspiración para el diseño de nuevos sistemas que mejoren la reparación en pacientes OP.

Por último, de esta revisión bibliográfica se desprende que se requieren más estudios para establecer una dosis efectiva y segura de BMP-2, para fijar tanto la velocidad de liberación óptima, como las características ideales de los scaffolds que consigan mejorar los resultados de regeneración ósea tanto en pacientes sanos, como OP. En nuestra experiencia, en un defecto sin carga en animales, la liberación de BMP debe mantenerse durante al menos dos semanas *in vivo*. En el caso de la osteoporosis, los datos de la literatura indican que se produce un retraso en el proceso de regeneración, por lo que el tiempo de permanencia de la BMP en el defecto debería ser más largo. Por lo general, los ensayos de liberación se realizan *in vitro*, sin embargo, la liberación *in vivo* es más rápida.

Por esto, los primeros deben diseñarse de tal manera que simulen el *in vivo* o, al menos, intentar establecer una correlación *in vivo-in vitro*. Con respecto al diseño del scaffold, la velocidad de degradación del sistema debe coincidir con la velocidad de regeneración del tejido. Una degradación muy rápida deja a las células sin guía para la regeneración tisular, mientras que, si esta es demasiado lenta, se dificultaría la formación de nuevo tejido.

En conclusión, a pesar de los avances en la regeneración ósea, hay todavía un largo camino en esta materia, particularmente en la optimización de sistemas para la regeneración de defectos en población osteoporótica.

6. Bibliografía.

- Asafo-Adjei T., Chen A., Najarzadeh A., Puleo D. Advances in Controlled Drug Delivery for Treatment of Osteoporosis, *Curr. Osteoporos. Rep.* 14 (2016) 226-238.
- Bae J., Song H., Kim H., Lim H., Park J., Liu Y., Teoh S.H. Discontinuous release of bone morphogenetic protein-2 loaded within interconnected pores of honeycomb-like polycaprolactone scaffold promotes bone healing in a large bone defect of rabbit ulna, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 2389-2397.
- Ben-David D., Srouji S., Shapira-Schweitzer K., Kosover O., Ivanir E., Kuhn G., Müller R., Seliktar D., Livne E. Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix, *Biomaterials.* 34 (2013) 2902-2910.
- Boerckel J.D., Kolambkar Y.M., Dupont K.M., Uhrig B.A., Phelps E.A., Stevens H.Y., García A.J., Guldberg R.E. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration, *Biomaterials.* 32 (2011) 5241-5251.
- Bouyer M., Guillot R., Lavaud J., Plettinx C., Olivier C., Curry V., Boutonnat J., Coll J.L., Peyrin F., Jossierand V., Bettega G., Picart C. Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration, *Biomaterials.* 104 (2016) 168-181.
- Blokhuis T.J., Arts J.J.C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths, *Injury.* 42 (2011) S26-S29.
- Brewer L., Williams D., Moore A. Current and future treatment options in osteoporosis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 67 (2011) 321-331.
- Brown K.V., Li B., Guda T., Perrien D.S., Guelcher S.A., Wenke J.C. Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 1735-1746.

- Buwalda S. J., M. Boere K. W., Dijkstra P. J., Feijen J., Vermonden T., Hennink W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials, *J. Control. Release.* 190 (2014) 254-273.
- Cao H., Kuboyama N. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering, *Bone.* 46 (2010) 386-395.
- Cao L., Wang J., Hou J., Xing W., Liu C. Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N,6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2, *Biomaterials.* 35 (2014a) 684-698.
- Cao L., Werkmeister J. A., Wang J., Glattauer V., McLean K.M., Liu C. Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles, *Biomaterials.* 35 (2014b) 2730-2742.
- Charles L.F., Woodman J.L., Ueno D., Gronowicz G., Hurley M.M., Kuhn L.T. Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice, *Experimental gerontology.* 64 (2015) 62-69.
- Cheng H., Jiang W., Phillips F. M., Haydon R. C., Peng Y., Zhou L., Luu H. H., An N., Breyer B., Vanichakarn P., Szatkowski J. P., Park J. Y., He T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs), *J. Bone Jt. Surg. Am.* 85 (2003) 1544-1552.
- Chung Y., Ahn K., Jeon S., Lee J., Lee S., Tae G. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex, *J. Control. Release.* 121 (2007) 91-99.
- Cortet B. Bone repair in osteoporotic bone: postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis, *Osteoporos Int.* 22 (2011) 2007-2010.
- Cosman F., Hattersley G., Hu M., Williams G.C., Fitzpatrick L.A., Black D.M. Effects of abaloparatide-SC on fractures and bone mineral density in subgroups of postmenopausal women with osteoporosis and varying baseline risk factors, *J. Bone Mineral Res.* 32 (2017) 17-23.
- de Guzman R.C., Saul J.M., Ellenburg M.D., Merrill M.R., Coan H.B., Smith T.L., Van Dyke M.E. Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds, *Biomaterials.* 34 (2013) 1644-1656.

- de la Riva B., Sánchez E., Hernández A., Reyes R., Tamimi F., López-Cabarcos E. F., Delgado A., Évora C. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration, *J. Control. Release.* 143 (2010) 45-52.
- de la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Schulz-Siegmund M., Pec M.K., Delgado A., Évora C. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.* 73 (2009) 50-58.
- del Rosario C., Rodríguez-Évora M., Reyes R., Delgado A., Évora C. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats, *Biomed. Mat.* 10 (2015a) 045008.
- del Rosario C., Rodríguez-Évora M., Reyes R., Simões S., Concheiro A., Évora C., Alvarez-Lorenzo C., Delgado A. Bone critical defect repair with poloxamine–cyclodextrin supramolecular gels, *Int. J. Pharm.* 495 (2015b) 463-473.
- Devescovi V., Leonardi E., Ciapetti G., Cenni E. Growth factors in bone repair, *La Chirurgia degli Organi di Movimento.* 92 (2008) 161-168.
- Dimitriou R., Giannoudis P.V. Discovery and development of BMPs, *Injury.* 36(Suppl. 1) (2005) 28-33.
- Dimitriou R., Jones E., McGonagle D., Giannoudis P.V. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 9 (2011) 66.
- EMA, 2018a: Agencia Europea de Medicamentos: (http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2018/03/news_detail_002925.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1) (23/03/2018).
- EMA, 2018b: Agencia Europea de Medicamentos: (<https://www.ema.europa.eu/medicines/human/EPAR/inductos>) (19/09/2018).
- El País, 2018: (https://cincodias.elpais.com/cincodias/2018/03/14/companias/1521049064_231610.html) (15/03/2018).

- Egermann M., Baltzer A. W., Adamaszek S., Evans C., Robbins P., Schneider E., Lill C. A. Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep. *Human Gene Therapy*. 17 (2006) 507-517.
- Fayaz H., Giannoudis P., Vrahas M., Smith R., Moran C., Pape H., Krettek C., Jupiter J. The role of stem cells in fracture healing and nonunion, *Int. Orthopaedics (SICOT)*. 35 (2011) 1587-1597.
- Ghodasra J. H., Nickoli M. S., Hashmi S. Z., Nelson J. T., Mendoza M., Nicolas J. D., Bellary S. S., Sonn K., Ashtekar A., Park C. J., Babu J., Yun C., Ghosh A., Kannan A., Stock S. R., Hsu W. K., Hsu E. L. Ovariectomy-induced OP does not impact fusion rates in a recombinant human Bone morphogenetic protein-2–dependent rat posterolateral arthrodesis model, *Global Spine*. 6 (2016) 60–68.
- Giannoudis P. V., Schneider E. Principles of fixation of osteoporotic fractures, *J. Bone Jt. Surg. Br.* 88 (2006) 1272-1278.
- Giannoudis P., Tzioupis C., Almalki T., Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective, *Injury*. 38 (2007) S90-S99.
- Guerado E., Fuerstenberg C.H. What bone graft substitutes should we use in post-traumatic spinal fusion? *Injury*. 42 (2011) S64-S71.
- Haasters F., Prall W.C., Westphal I., Böcker W., Padula D., Mutschler W., Docheva D., Schieker M. Overexpression of dnIKK in mesenchymal stem cells leads to increased migration and decreased invasion upon TNF α stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436 (2013) 265-70.
- Hao Y. J., Zhang G., Wang Y.S., Qin L., Hung W.Y., Leung K., Pei F.X. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats, *Bone*. 41 (2007) 631-638.
- Harsløf T., Langdahl B.L. New horizons in osteoporosis therapies, *Current Opinion in Pharmacology*. 28 (2016) 38-42.
- Hayashi K., Yamaguchi T., Yano S., Kanazawa I., Yamauchi M., Yamamoto M., Sugimoto T. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH:

Potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 261-266.

- Huang L., Luo Z., Hu Y., Shen X., Li M., Li L., Zhang Y., Yang W., Liu P., Cai K. Enhancement of local bone remodeling in OP rabbits by biomimic multilayered structures on Ti6Al4V implants. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 104A (2016) 1437–1451.
- Iñiguez-Ariza N.M., Clarke B.L. Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis, *Maturitas.* 82 (2015) 245-255.
- Iseme R. A., Mcevoy M., Kelly B., Agnew L., Walker F. R., Attia J. Is osteoporosis an autoimmune mediated disorder? *Bone Rep.* 7 (2017) 121-131.
- Jakob F., Ebert R., Ignatius A., Matsushita T., Watanabe Y., Groll J., Walles H. Bone tissue engineering in osteoporosis, *Maturitas.* 75 (2013) 118-124.
- Janicki P., Schmidmaier G., What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury.* 42 (2011) S77-S81.
- Jeon O., Song S.J., Yang H.S., Bhang S., Kang S., Sung M.A., Lee J. H., Kim B. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008) 774-780.
- Karageorgiou V., Tomkins M., Fajardo R., Meinel L., Snyder B., Wade K., Chen J., Vunjak-Novakovic G., Kaplan D. L. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 78A (2006) 324-334.
- Kempen D. H. R., Lu L., Heijink A., Hefferan T.E., Creemers L. B., Maran A., Maran A., Yaszemski M.J., Dhert W.J. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration, *Biomaterials.* 30 (2009) 2816-2825.
- Keskin D.S., Tezcaner A., Korkusuz P., Korkusuz F., Hasirci V. Collagen–chondroitin sulfate-based PLLA–SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair, *Biomaterials.* 26 (2005) 4023-4034.

- Kim S., Gwak S., Kim B. Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2, *Journal of Biomedical Mat. Res. Part A.* 87A (2008) 245-253.
- Kim J., Sharma A., Runge B., Waters H., Doll B., McBride S., Alvarez P., Dadsetan M., Yaszemski M. J., Hollinger J. O. Osteoblast growth and bone-healing response to three-dimensional poly(ϵ -caprolactone fumarate) scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2012) 404-413.
- Kousteni S., Bellido T., Plotkin L., O'Brien C.A., Bodenner D.L., Han L., Han K., Digregorio G.B., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S., Roberson P.K., Weinstein R.S., Jilka R.L., Manolagas S.C. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity, *Cell.* 104 (2001) 719-730.
- Kowalczewski C.J., Tombyln S., Wasnick D.C., Hughes M.R., Ellenburg M.D., Callahan M.F., Smith T. L., Van Dyke M. E., Burnett L. R., Saul J. M. Reduction of ectopic bone growth in critically-sized rat mandible defects by delivery of rhBMP-2 from kerateine biomaterials, *Biomaterials.* 35 (2014) 3220-3228.
- Krishnan L., Priddy L.B., Esancy C., Klosterhoff B.S., Stevens H.Y., Tran L., Guldberg R. E. Delivery vehicle effects on bone regeneration and heterotopic ossification induced by high dose BMP-2, *Acta Biomaterialia.* 49 (2017) 101-112.
- Krum S. A. Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone, *J. Cellular Biochem.* 112 (2011) 401-408.
- Krum S. A., Miranda-Carboni G.A., Hauschka P.V., Carroll J.S., Lane T.F., Freedman L.P., Leonard P., Brown M. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival, *EMBO J.* 27 (2008) 535-545.
- Laurencin C., Khan Y., El-Amin S. Bone graft substitutes, *Expert Rev. Med. Devices.* 3 (2006) 49-57.
- Lee J. H., Baek H., Mee Lee K., Zheng G. B., Shin S. J., Jin Y. Z. The inhibitory effect of zoledronate on early-stage osteoinduction by

recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an OP model, *Growth Factors*. 3 (2015) 220-228.

- Lee S. S., Huang B. J., Kaltz S. R., Sur S., Newcomb C. J., Stock S. R., Shah R. N., Stupp S. I. Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds, *Biomaterials*. 34 (2013) 452-459.
- Lee K., Silva E.A., Mooney D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *J. R. Soc. Interface*. 8 (2011) 153-170.
- Li R.H., Li X. J., Bouxsein M. L., Blake C. A., D'Augusta D., Kim H., Wozney J. M., Seeherman H. J. rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (α -BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model, *J. Orthopaedic Res*. 21 (2003) 997-1004.
- Li Y., Li R., Hu J., Song D., Jiang X., Zhu S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 suspended in fibrin glue enhances bone formation during distraction osteogenesis in rabbits. *Arch. Med. Sci*. 12 (2016) 494-501.
- Li M., Liu X., Liu X., Ge B. Calcium Phosphate Cement with BMP-2-loaded Gelatin Microspheres Enhances Bone Healing in Osteoporosis: A Pilot Study, *Clin. Orthop. Relat. Res*. 468 (2010) 1978-1985.
- Li B., Yoshii T., Hafeman A. E., Nyman J. S., Wenke J. C., Guelcher S. A. The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora, *Biomaterials*. 30 (2009) 6768-6779.
- Liu Y., Lu Y., Tian X., Cui G., Zhao Y., Yang Q., Yu S., Xing G., Zhang B. Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model, *Biomaterials*. 30 (2009) 6276-6285.
- Louis-Ugbo J., Kim H., Boden S. D., Mayr M. T. Retention of (125)I-labeled recombinant human bone morphogenetic protein-2 by biphasic calcium phosphate or a composite sponge in a rabbit posterolateral spine arthrodesis model, *J. Orthop. Res*. 20 (2002) 1050-1059.

- Ma D., An G., Liang M., Liu Y., Zhang B., Wang Y. A composited PEG-silk hydrogel combining with polymeric particles delivering rhBMP-2 for bone regeneration, *Materials Science & Engineering C*. 65 (2016) 221-31.
- Martin T. J., Seeman E. Abaloparatide is an anabolic, but does it spare resorption? *J. Bone Mineral Res.* 32 (2017) 11-16.
- Mathavan N., Tägil M., Isaksson H. Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model, *Osteoporos. Int.* 28 (2017) 697-707.
- Mehta M., Schmidt-Bleek K., Duda G. N., Mooney D. J. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1257-1276.
- Moazzaz P., Gupta M. C., Gilotra M. M., Gilotra M. N., Maitra S., Theerajunyaporn T., Chen J. L., Reddi A. H., Martin R. B. Estrogen-dependent actions of bone morphogenetic protein-7 on spine fusion in rats, *Spine*. 30 (2005) 1706-1711.
- Moran S. L., Shin A. Y., Bishop A. T. The use of massive bone allograft with intramedullary free fibular flap for limb salvage in a pediatric and adolescent population, *Plastic and reconstructive surgery*. 118 (2006) 413-419.
- Mostafa N. Z., Talwar R., Shahin M., Unsworth L. D., Major P. W., Doschak M.R. Cleft palate reconstruction using collagen and nanofiber scaffold incorporating bone morphogenetic protein in rats. *Tissue Engineering Part A*. 21(1-2) (2015) 85-95.
- Mullard A., FDA rejects first-in-class osteoporosis drug, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 16 (9) (2017) 593.
- Namkung-Matthai H., Appleyard R., Jansen J., Hao Lin J., Maastricht S., Swain M., Mason R. S., Murrell G. A., Diwan A. D., Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model, *Bone*. 28 (2001) 80-86.

- Nandi S. K., Kundu B., Mahato A., Thakur N. L., Joardar S. N., Mandal B. B. In vitro and in vivo evaluation of the marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial, *Integr. Biol. (Camb)*. 7 (2015) 250-262.
- Nikolaou V. S., Efstathopoulos N., Kontakis G., Kanakaris N. K., Giannoudis P. V. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time, *Injury*. 40 (2009) 663-668.
- Oliver R., Yu Y., Yee G., Low A., Diwan A., Walsh W. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats, *Osteoporos. Int*. 24 (2013) 2581-2589.
- Pape H., Evans A., Kobbe P. Autologous Bone Graft: Properties and Techniques, *Journal of Orthopaedic Trauma*. 24 (2010) S36-S40.
- Park S. B., Park S. H., Kim N. H., Chung C. K. BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy OP model. *Spine J*. 13 (2013) 1273-1280.
- Patterson J., Siew R., Herring S. W., Lin A.S.P., Guldberg R., Stayton P. S. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration, *Biomaterials*. 31 (2010) 6772-6781.
- Peng K., Hsieh M., Lin C. T., Chen C., Lee M. S., Huang Y., Chang P. Treatment of critically sized femoral defects with recombinant BMP-2 delivered by a modified mPEG-PLGA biodegradable thermosensitive hydrogel, *BioMedCentral Musculoskeletal Disorders*. 17 (2016) 286-315.
- Phillips F. M., Turner A. S., Seim H. B., MacLeay J., Toth C. A., Pierce A. R., Wheeler D. L. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model, *The Spine Journal*. 6 (2006) 500-506.
- Prall W.C., Haasters F., Heggebö J., Polzer H., Schwarz C., Gassner C., Grote S., Anz D., Jäger M., Mutschler W., Schieker M. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation, *Biochemical and biophysical research communications*. 440 (2013) 617-622.

- Puppi D., Chiellini F., Piras A. M., Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science*. 35 (2010) 403-440.
- Quinlan E., López-Noriega A., Thompson E., Kelly H. M., Cryan S.A., O'Brien F. J. Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering, *J Control. Release*. 198 (2015a) 71-79.
- Quinlan E., Thompson E.M., Matsiko A., O'Brien F.J., López-Noriega A. Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen-hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration, *J. Control. Release*. 207 (2015b) 112-119.
- Rahman C. V., Ben-David D., Dhillon A., Kuhn G., Gould T. W. A., Müller R., Rose F. R., Shakesheff K. M., Livne E. Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model, *J. Tissue Eng. Regen. Med*. 8 (2014) 59-66.
- Riggs L., Wahner H. W., Seeman E., Offord K. P., Dunn W. L., Mazess R. B., Johnson K. A., Melton III L. J., Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes, *J. Clin. Invest*. 70(4) (1982) 716-723.
- Rodríguez J. P., Montecinos L., Ríos S., Reyes P., Martínez J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation, *Journal of cellular biochemistry*. 79 (2000) 557-565.
- Rodríguez J. P., Ríos S., Fernández M., Santibañez J. F. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women, *Journal of cellular biochemistry*. 92 (2004) 745-754.
- Rodríguez-Évora M., Delgado A., Reyes R., Hernández-Daranas A., Soriano I., San Román J., Évora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA-βTCP concentric

system in a critical size defect in rats, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 49 (2013) 873-884.

- Rodríguez-Évora M., Reyes R., Álvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Delgado A., Évora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system, *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 10 (2014) 1-11.
- Ruel-Gariépy E., Leroux J. C. In situ-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58 (2004) 409-426.
- Sachse, A., Wagner O., Wagner A., Keller M., Wetzel W., Layher F., Venbrocks R. A., Hortschansky P., Pietraszczyk M., Wiederanders B., Hempel H. J., Bossert J., Horn J., Schmuck K., Mollenhauer J. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep, *Bone*. 37 (2005) 699-710.
- Sanzana E. S., Navarro M., Ginebra M. P., Planell J. A., Ojeda A. C., Montecinos H. A. Role of porosity and pore architecture in the in vivo bone regeneration capacity of biodegradable glass scaffold, *J. Biomed. Mater. Res. A*. 102 (2014) 1767-1773
- Sarban S., Senkoylu A., Isikan U.E., Korkusuz P., Korkusuz F. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats?: A preliminary study, *Clinical orthopaedics and related research*. 467 (2009) 3113-3120.
- Schützenberger S., Schultz A., Hausner T., Hopf R., Zanoni G., Morton T., Kropik K., Griensven M., Redl H. The optimal carrier for BMP-2: a comparison of collagen versus fibrin matrix, *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 132 (2012) 1363-1370.
- Seo B., Koh J., Song S. Tuning physical properties and BMP-2 release rates of injectable hydrogel systems for an optimal bone regeneration effect, *Biomaterials*. 122 (2017) 91-104.
- Shibuya N., Jupiter D.C. Bone graft substitute: allograft and xenograft, *Clinics in podiatric medicine and surgery*. 32 (2015) 21-34.

- Song B., Estrada K.D., Lyons K.M. Smad signaling in skeletal development and regeneration, *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 20 (2009) 379-88.
- Srouji S., Ben-David D., Lotan R., Livne E., Avrahami R., Zussman E. Slow-release human recombinant bone morphogenetic protein-2 embedded within electrospun scaffolds for regeneration of bone defect: in vitro and in vivo evaluation, *Tissue Eng. Part A*. 17 (2011) 269-277.
- Suliman S., Xing Z., Wu X., Xue Y., Pedersen T.O., Sun Y., Døskeland A.P., Nickel J., Waag T., Lygre H., Finne-Wistrand A., Steinmüller-Nethl D., Krueger A., Mustafa K. Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo, *J. Control. Release*. 197 (2015) 148-57.
- Sun F., Zhou H., Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration, *Acta Biomater*. 7 (2011) 3813-3828.
- Tang Y., Tang W., Lin Y., Long J., Wang H., Liu L., Tian W. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats, *Cell Biology International*. 32 (2008) 1150-1157.
- Tian J., Xu X., Shen L., Yang Y., Shuai B., Zhu X., Li C., Chen M., Lv L. Association of Serum Dkk-1 Levels with β -catenin in Patients with Postmenopausal Osteoporosis, *J Huazhong Univ Sci Technol*. 35 (2015) 212-218.
- Tsiridis E., Upadhyay N., Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules?, *Injury*. 38 (2007) S11-S25.
- Tuchman A., Brodke D.S., Youssef J.A., Meisel H., Dettori J.R., Park J., Yoon S. T., Wang J.C. Iliac crest bone graft versus local autograft or allograft for lumbar spinal fusion: A systematic review, *Global Spine Journal*. 6 (2016) 592-606.
- Vahle J. L., Long G. G., Sandusky G., Westmore M., Ma Y. L., Sato M. Bone neoplasms in F344 rats given teriparatide [rhPTH(1-34)] are

dependent on duration of treatment and dose, *Toxicol. Pathol.* 32(4) (2004) 426-38.

- Van Lieshout E.M.M., Alt V. Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence? *Injury.* 47(Suppl. 1) (2016) 43-46.
- Vo T. N., Kasper F.K., Mikos A.G. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration, *Advanced Drug Delivery Reviews.* 64 (2012) 1292-1309.
- Ward A., Georgiou T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications, *Polymers* 3 (2011) 1215-1242.
- Whitaker M., Guo J., Kehoe T., Benson G. Bisphosphonates for osteoporosis--where do we go from here? *N. Engl. J. Med.* 366(22) (2012) 2048-2051.
- Wölfle J. V., Fiedler J., Dürselen L., Reichert J., Scharnweber D., Förster A., Schwenzer B., Reichel H., Ignatius A., Brenner R. E. Improved anchorage of Ti6Al4V orthopaedic bone implants through oligonucleotide mediated immobilization of BMP-2 in osteoporotic rats, *PLoS One.* 9(1) (2014) e86151.
- Xu S., Yu R., Zhao G., Wang J. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi, Chinese Medical Association.* 6(3) (2003) 160-166.
- Yamaji K., Kawanami M., Matsumoto A., Odajima T., Nishitani Y., Iwasaka K., Yoshimitsu, K., Yoshiyama M. Effects of Dose of Recombinant Human BMP-2 on Bone Formation at Palatal Sites in Young and Old Rats, *Dental Materials Journal.* 26 (2007) 481-486.
- Yang H.S., La W., Bhang S.H., Lee T., Lee M., Kim B. Apatite-coated collagen scaffold for bone morphogenetic protein-2 delivery, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 2153-2164.
- Yao A., Li X., Xiong L., Zeng J., Xu J., Wang D. Hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite as a sustained delivery vehicle for rhBMP-2 in the treatment of bone defects, *J. Mater. Sci: Mater. Med.* 26 (2015) 1-12.

- Young S., Patel Z.S., Kretlow J.D., Murphy M.B., Mountziaris P.M., Baggett L.S., Ueda H., Tabata Y., Jansen J. A., Wong M., Mikos A.G. Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model, *Tissue Eng. Part A*. 15 (2009) 2347-2362
- Yuste J., Alfonso M., Bustos C., Quintana J., Rubio M., Villas C., del Pozo J. Iliac bone *Candida albicans* osteomyelitis in a patient with iliac crest bone autograft: a case report and review of the literature, *Infection*. 40 (2012) 445-449.
- Zhao J., Shinkai M., Takezawa T., Ohba S., Chung U., Nagamune T. Bone regeneration using collagen type I vitrigel with bone morphogenetic protein-2, *J. Biosci. Bioeng.* 107 (2009) 318-323.
- Zimmermann G., Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes, *Injury*. 42 (2011) S16-S21.

Justificación y objetivos.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente en cuanto a que en la OP concurren una serie de circunstancias, tales como menor capacidad osteogénica de las MSC, disminución de la expresión de BMPs y deficiencia de estrógenos, que dificultan y retrasan notablemente la regeneración de defectos óseos, el objetivo de este trabajo es actuar aumentando la formación y reduciendo la resorción para regenerar tejido óseo. Para ello, proponemos diseñar, elaborar, caracterizar y evaluar, en modelo de defecto óseo crítico en animal osteoporótico, sistemas inyectables nanoestructurados a base de hidrogeles termosensibles activados con BMP-2 como sustancia osteogénica en combinación con 17β -estradiol. De acuerdo con el proceso de regeneración ósea, la BMP-2 participa en todas las etapas del mismo, por lo que debe incorporarse en formulaciones de liberación sostenida, al igual que el agente estrogénico para asegurar la calidad del hueso formado en el defecto.

Las etapas a cubrir son:

- 1.- Diseño y optimización de los procesos de preparación de los hidrogeles en base a sus características reológicas que pueden afectar a la temperatura de gelificación y a su inyectabilidad.
- 2.- Diseño y optimización de micropartículas para la liberación sostenida de las sustancias activas. Selección del polímero biodegradable y del método de elaboración en función de las propiedades fisico-químicas de las sustancias activas. Caracterización de las mismas en cuanto a morfología y tamaño, rendimiento de encapsulación y velocidad de liberación de la sustancia activa.
- 3.- Caracterización *in vitro* de los sistemas en cuanto a características reológicas, porosidad, estabilidad estructural, biocompatibilidad e inyectabilidad.
- 4.- Aplicación y evaluación de los sistemas en un defecto crítico, de 8 mm en calota, en un modelo de rata osteoporótica por ovariectomía bilateral y tratamiento prolongado con un glucocorticoide.

Capítulo 2.

Elaboración y caracterización de geles supramoleculares de polipseudorrotaxanos. Aplicación a un defecto óseo crítico en ratas osteoporóticas

1. Introducción.

Los polipseudorrotaxanos basados en la ciclodextrina forman geles supramoleculares que pueden revertir sus propiedades mecánicas bajo ciertas condiciones (Li et al., 2011, Arunachalam y Gibson, 2014). Estos geles supramoleculares están recibiendo muchísima atención como geles inyectables que pueden ser fácilmente administrados usando técnicas no invasivas. Además, son capaces de permanecer en el sitio a tratar y resistir las condiciones fisiológicas durante el tiempo requerido (Loethen et al., 2007, del Rosario et al., 2015). El auto-ensamblaje de los polipseudorrotaxanos a través de enlaces cristalinos entre las α -ciclodextrinas (α CD) le da consistencia al sistema, pero a su vez, estas interacciones se rompen fácilmente bajo condiciones de esfuerzos de cizalla suaves (por ejemplo, con la fuerza que se hace al empujar el émbolo de una jeringa) lo que facilita su inyección. Pocos segundos después de ser sometidos a estos esfuerzos, estos geles son capaces de recobrar sus características, lo que hace que sean sistemas ideales para permanecer en el lugar del defecto (Zhao et al., 2006; Tran et al., 2011; Liu et al., 2015; Pradal et al., 2015; Bai et al., 2016; Álvarez-Lorenzo et al., 2017; Rey-Rico et al., 2017; Zhao et al., 2017).

Los polipseudorrotaxanos se forman por interacciones de los grupos hidrófobos de los polímeros (poloxámeros o poloxaminas) y la cavidad interna de las ciclodextrinas, de tal forma que se produce un fenómeno llamado enhebramiento, por su similitud con el proceso de enhebrar una aguja. Si el polímero que se enhebra en la ciclodextrina es sensible a estímulos, el gel formado también lo será (Zhao y Xu, 2010; Ghasemi-Mobarakeh et al., 2011). Por ejemplo, usando un polímero sensible a la temperatura, es de esperar que los geles supramoleculares no sólo se formen mediante enlaces cristalinos entre las moléculas de α CD, sino con la participación del auto-ensamblaje de ciertas regiones del polímero a la temperatura corporal. Estos dos mecanismos de unión reversible suelen

conducir al reforzamiento de las redes a la temperatura fisiológica. A este respecto, se han formado geles de polipseudorrotaxanos mezclando α CD con copolímeros de poli(óxido de etileno) (PEO) y poli(óxido de polipropileno) (PPO) en cadenas lineales (Poloxámeros, Pluronic®) o en forma de X (Poloxaminas, Tetronic®). De hecho, ya han sido previamente caracterizados en términos estructurales y determinada su capacidad de liberación de fármacos (Simões et al., 2012; 2013). Además, se ha demostrado que la adición de α CD y, por tanto, la formación de un gel supramolecular mejora las propiedades mecánicas del sistema, retrasa su erosión y favorece el control de la liberación de fármacos tanto *in vivo* como *in vitro* (del Rosario et al., 2015), en comparación con geles formados por cada uno de los polímeros por separado.

No obstante, todavía se desconoce el comportamiento de las diferentes interacciones y movilidad de las cadenas de polímeros y de la CD en los geles supramoleculares (Valero et al., 2016). La difusión del agua y de otros componentes, tales como fármacos, vendrá determinada, muy probablemente, por los espacios vacíos apilados en las estructuras nanocilíndricas y de los movimientos relativos de los componentes a través de la red molecular. La movilidad y la distancia espacial de las cadenas de polímeros pueden determinar la capacidad de ensamblaje, que regula la respuesta a ciertos estímulos como la temperatura (Shvartzman-Cohen et al., 2008; Campanella et al., 2017).

En este capítulo, en primer lugar, se muestran los resultados de un estudio por resonancia magnética nuclear de espectroscopía de orden difusional (RMN-DOSY) de mezclas de Pluronic®, Tetronic® y α CD realizado para la caracterización de los sistemas de polipseudorrotaxanos, que permitieron calcular los coeficientes de difusión de los solutos y conocer la accesibilidad del agua a los mismos en mezclas binarias y ternarias. Además, en este trabajo se propone, por primera vez, un nuevo experimento de RMN, denominado espectroscopía optimizada de difusión/intercambio de agua - DOSY (WDE-DOSY) para determinar el factor de renovación de agua o tasa

de intercambio entre las moléculas de agua atrapadas por los componentes y el agua libre.

En un segundo paso, se caracterizó la microestructura del hidrogel mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y se analizó su porosidad. Además, se estudió la respuesta a la temperatura, la idoneidad para dispersar microesferas que albergaran sustancias activas, la erosión con el tiempo, la viabilidad celular y la diferenciación osteogénica de MSCs de médula ósea de rata (rMSCs).

Finalmente, en un tercer paso, se evaluó un sistema de liberación local y sostenida de la combinación BMP-2 y 17 β -estradiol encapsuladas en microesferas de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y ácido poliláctico (PLA-S), respectivamente, dispersas en el gel para regenerar un defecto óseo de 8 mm de diámetro en la calvaria de ratas osteoporóticas (OP) y sanas (no-OP). Se estudió la liberación de la BMP-2 (*in vivo* e *in vitro*) y del 17 β -estradiol (*in vitro*), la sinergia entre el efecto anti-resorción del 17 β -estradiol y el efecto osteogénico de la BMP-2 y, por último, el efecto de una segunda dosis de ambas sustancias tanto en ratas OP como en ratas no OP.

2. Procedimiento experimental.

2.1. Materiales.

Los polímeros utilizados fueron: poliláctico (PLA-S, Resomer RG203S) y poliláctico-co-glicólico 50:50 (PLGA, Resomer RG504) adquiridos a Evonik Industries, AG (Darmstadt, Alemania), Pluronic[®]F127 (Poloxámero 407) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU) y Tetronic[®] 1307 (BASF, New Jersey, EEUU). La α -ciclodextrina (α CD) fue donada por Wacker (Burghausen, Alemania). Las sustancias activas fueron 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) y la proteína morfogenética ósea, BMP-2 con un ED₅₀ de

0,85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, medido por la capacidad de inducir la producción de fosfatasa alcalina en células C2C12 (GenScript, Piscataway, USA).

La fabricación del hidrogel, la preparación de las microesferas y el procedimiento quirúrgico, se llevaron a cabo en condiciones asépticas. Excepto las sustancias activas, todos los componentes líquidos y material de laboratorio fueron autoclavados (121 °C, 30 min; Auster, Selecta, España). Los polímeros se esterilizaron por irradiación gamma (25 kGy, ^{60}Co) (Unidad de esterilización Gamma de Aragogamma, Barcelona, España).

2.2. Preparación de los geles.

Se prepararon disoluciones de Pluronic®F127 (P) y de Tetronic® 1307 (T) al 30 % p/p, en tampón fosfato de pH 7,4 (0,066 M) a 4 °C agitando en vórtex (Genie®2, posición 10) cada cierto tiempo. La disolución de αCD (30 % p/p) se preparó también en tampón fosfato, pero con agitación magnética continua a 55 °C. Estas disoluciones de partida se mezclaron (siendo la de αCD la última en añadirse), en un baño de hielo y se diluyeron con tampón fosfato para obtener las diferentes concentraciones finales que se recogen en la Tabla 1, en la que las formulaciones se han nombrado por el porcentaje final de cada uno de los componentes en la mezcla en el siguiente orden, P/T/CD. Las disoluciones se mantuvieron a 4 °C. La gelificación se comprobó mediante la prueba del tubo invertido tras permanecer las muestras a 37 °C durante 15 minutos.

Tabla 1. Composición de las diferentes formulaciones preparadas.

Código de la formulación (P/T/CD)	Pluronic F127 (% p/p)	Tetronic 1307 (% p/p)	α-CD (% p/p)
11/7/7	11	7	7
11/7/6	11	7	6
11/6/7	11	6	7
11/6/6	11	6	6
10/7/7	10	7	7
10/6/6	10	6	6
10/7/6	10	7	6
10/6/7	10	6	7
9/7/7	9	7	7
9/7/6	9	7	6
9/6/7	9	6	7
9/6/6	9	6	6
7,5/7,5/7,5	7,5	7,5	7,5

2.3. Preparación de las microesferas.

Las microesferas de PLA-S se prepararon mediante el método de emulsión y evaporación del disolvente. Se emulsionan 0,5 mL de una solución de PLA-S (200 mg) y 4 mg de 17 β -estradiol en una mezcla diclorometano:metanol (DCM:MeOH) 80:20 con 4 mL de una disolución acuosa de alcohol de polivinilo (PVA) al 1% usando un vórtex (Genie®2, posición 10) durante 1 min y se vierte en 100 mL de PVA al 0,15 % que se mantiene en agitación continua durante 1 h para que se evapore por completo el DCM.

Las microesferas de PLGA se prepararon usando el método de doble emulsión (agua/aceite/agua). Para ello, se disolvieron 115 mg de PLGA en 2 mL de DCM. Esta fase orgánica se emulsionó con 200 μ L de una disolución acuosa de BMP-2 (0,66 μ g/ μ L) en PVA (0,2%) durante 1 minuto usando un vórtex (Genie®2, posición 10). Posteriormente, esta emulsión se mezcló

con 10 mL de PVA al 0,2% durante 15 segundos utilizando un vórtex (Genie®2, posición 10) y se vertió sobre 100 mL de PVA (0,1%) dejándose en agitación durante 1 hora para que se evapore el DCM.

Ambos tipos de microesferas fueron separadas por filtración (filtros de 0,45 μm , supor-450-filters, Pall Corporation), liofilizadas y conservadas en nevera hasta su uso.

2.4. Caracterización de los hidrogeles. Experimentos de RMN.

Para el análisis por RMN se prepararon los componentes por separado, disoluciones de P, T y αCD , en un rango de concentraciones comprendido entre 1% y 7% p/p y los sistemas binarios y ternarios que consistieron en una disolución de los componentes en agua, añadidos en diferente orden en el caso de los últimos. Para realizar el estudio, las muestras fueron liofilizadas, reconstituidas con $\text{H}_2\text{O}:\text{D}_2\text{O}$ 90:10 v/v y transferidas a tubos estándar de RMN.

Los espectros de RMN se obtuvieron a 25 °C en un espectrómetro Varian Inova 17.6 T (resonancia de protones a 750 MHz) equipado con una sonda HCP y gradientes triaxiales. El espectro fue procesado y analizado con el software MestreNova v11.0 (Mestrelab Inc.). Los coeficientes de difusión de los componentes y del agua fueron obtenidos usando secuencias One-shot (Pelta et al., 2002) y SL-DOSY (Park y Lee, 2006), respectivamente. La accesibilidad del agua a los componentes fue medida usando el experimento Water-Logsy (Dalvit et al., 2001; Ludwig et al., 2008).

2.4.1. Espectro 1D 1H por RMN (1D 1H).

Este tipo de espectro se midió siguiendo el procedimiento 1D Water-Control (Zheng et al., 2017) que realiza una supresión fuerte del pico del agua.

2.4.2. Espectro 1D Water-Logsy.

Este tipo de espectro (Dalvit et al., 2001; Ludwig et al., 2008) consistió en el registro de una serie de medidas a diferentes tiempos de mezclado de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 1; 1,5 y 2,0 segundos (s).

2.4.3. Experimento Water-Diffusion-Exchanged DOSY (WDE-DOSY)

Teoría

La secuencia de pulsos del experimento WDE-DOSY (Figura 1a) está basada en el experimento propuesto por Dötsch y Wider, 1995 para la obtención de coeficientes de difusión aparentes de aquellos solutos cuyos valores se ven incrementados por el fenómeno de intercambio con un disolvente que tiene un coeficiente de difusión mucho mayor. En nuestro esquema se redujo la dimensionalidad del experimento propuesto por Dötsch y Wider al reemplazar la dimensión de evolución t_1 por un esquema de excitación selectiva SPFGSE (Single-Pulse-Field-Gradient-Spin-Echo) (Hwang y Shaka, 1995) que hace que se elimine, por desfase, la magnetización transversal original del resto de señales. La secuencia incorpora a continuación, un módulo DOSY basado en el esquema BPP-STE-LED (Johnson, 1999). El primer gradiente bipolar (bloque (G_1) - 180° - $(-G_1)$) codifica la difusión, seguido por un pulso duro de 90° que transforma en longitudinal la magnetización del H_2O previamente seleccionada. Le sigue un periodo de espera (Δ) durante el que pueden tener lugar fenómenos de transferencia de la magnetización del agua hacia ciertos protones del soluto que se hallen próximos a ella. Aquellos protones del soluto que no reciban magnetización desde el H_2O durante este periodo no generarán señal alguna en el espectro final. A continuación, se aplica el segundo gradiente bipolar para decodificar la difusión y, finalmente, un corto periodo LED-WET para la supresión de la intensa señal del agua antes de la detección. De este modo se pueden detectar, sin interferencia de la señal del agua, las señales de los protones del soluto que hayan presentado magnetización transferida por el agua.

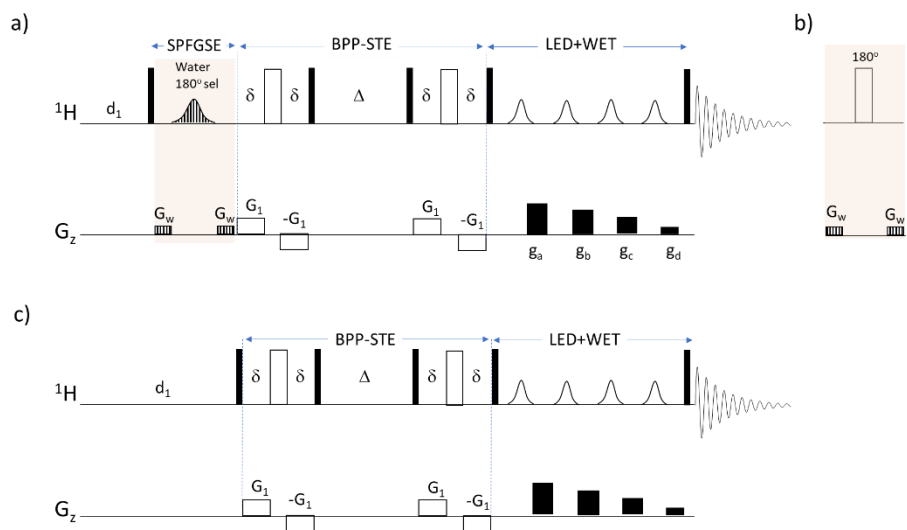


Figura 1. Secuencia de pulsos utilizada para la medida de los coeficientes de difusión. a) esquema WDE-DOSY utilizado para medir la difusión incrementada por el intercambio químico o la proximidad de NOE (Nuclear Overhauser Effect) a las moléculas de agua; b) modificación para WDE-DOSY^{ef} y c) BPP-STE-LED-WET. Las barras delgadas y gruesas representan pulsos fuertes de 90° y 180° , respectivamente. La primera y segunda parejas de gradientes bipolares G_1 y $-G_1$ se usan para codificar/decodificar la difusión, respectivamente. Los pulsos con forma rectangular son pulsos selectivos. En a) el pulso con relleno rallado es un pulso gaussiano selectivo de 180° aplicado a la frecuencia del agua ($\sim 4,7$ ppm). Los pulsos con relleno liso se utilizan en la secuencia WET justo antes de la detección de la FID (Free Induction Decay).

La transferencia de la magnetización desde los protones del H_2O hacia los del soluto puede realizarse mediante los dos mecanismos que se representan en la Figura 2. El primero (Figura 2a) es el intercambio que se produce entre un protón lábil del soluto (por ejemplo, un protón del grupo amida) con uno del agua, denominado water-EXSY (Chemical EXchange SpectroscopY). El segundo (Figura 2b) es la interacción NOE (Nuclear Overhauser Effect) intermolecular, que ocurre debido a la proximidad espacial entre cualquier tipo de protón (lábil o no) del soluto y los protones del agua, denominado water-NOESY.

En general, cuando alguno de estos mecanismos de intercambio agua-soluto se produce de forma significativa, el resultado, en un experimento DOSY, es un incremento en el coeficiente de difusión del soluto debido a la contribución de la difusión de la molécula de agua libre a la difusión original de este (Moonen et al., 1992; Dötsch y Wider, 1995; Liu et al., 1999). Para que la señal del protón del soluto sea detectada, los protones del agua deben residir durante una parte significativa del periodo de tiempo Δ , que se fija en el experimento, en las proximidades de cierto protón no lábil del soluto (localizado a la típica distancia NOE de 2,5 a 4,5 Å).

En el presente trabajo, el experimento WDE-DOSY fue utilizado para el estudio del intercambio de agua con solutos que tienen protones no lábiles, por lo que, en este caso, el único mecanismo relevante es el water-NOESY. Como se aprecia en la Figura 2b, el mecanismo water-NOESY es un equilibrio que implica la existencia de dos tipos de especies de agua en disolución; agua libre con su típica difusión rápida y agua unida al soluto, con una difusión más lenta y aproximadamente igual a la de este. La magnetización que se transfiere al soluto a través del mecanismo water-NOESY ha pasado cierto tiempo residiendo en el agua libre antes de ser transferida al soluto. Una vez transferida, esa magnetización (que será finalmente detectada) difunde a la velocidad original del soluto. Esto genera un coeficiente de difusión aparente para el soluto, que será mayor que su coeficiente de difusión original. Para eliminar el efecto de este tipo de equilibrios y obtener el valor del coeficiente de difusión real, manteniendo una secuencia lo más parecida a WDE-DOSY, se utiliza el esquema WDE-DOSY^{ref} (Figura 1b). Esta última, simplemente omite el pulso selectivo de 180° en el agua y lo sustituye por un pulso duro de 180°, de forma que la propia magnetización de los protones del soluto no es eliminada en la parte SPFGSE del experimento. Una vez aplicada esta modificación, la contribución al coeficiente de difusión real al equilibrio water-NOESY sólo supone entre el 0 y el 3%, por lo que puede ser despreciada y considerar que el coeficiente de difusión obtenido se corresponde con el coeficiente de difusión del soluto en ausencia del equilibrio con el agua.

Se analizaron las señales correspondientes a cada componente de la muestra mediante la ecuación de Stejskal-Tanner (Ecuación 1) (Dötsch y Wider, 1995).

$$I_G = I_0 \cdot \exp[-K^2 D \cdot (\Delta - \frac{\delta}{3})] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde I_G es la intensidad del pico para un determinado gradiente G , I_0 es la intensidad del pico obtenido con el gradiente bipolar de menor potencia utilizado (G_1) y $K = \gamma \cdot G \cdot \delta$, siendo γ la constante giromagnética del protón. Para una señal determinada-del espectro, el ajuste a la Ecuación 1 de las intensidades de los subespectros en la dimensión de difusión proporciona el parámetro D , que, en el experimento WDE-DOSY, se corresponde con el coeficiente aparente de difusión del soluto (D_p^{app}) como se describió anteriormente. El espectro de referencia (WDE-DOSY^{ref}) para cada muestra se obtuvo siguiendo la secuencia de pulsos que se indica en la Figura 1b. El ajuste de las intensidades obtenidas en este experimento a la Ecuación 1 permite obtener D que se corresponde ahora con el coeficiente de difusión real del soluto (D_p).

Bajo condiciones de intercambio rápido de agua-soluto con respecto al tiempo de difusión fijado (Δ), es decir, cuando la velocidad del intercambio es mucho mayor que $1/\Delta$, el D_p^{app} puede considerarse como la suma de dos contribuciones (Ecuación 2): la fracción de tiempo que reside la magnetización en los protones del agua antes del intercambio (f_w) y la fracción de tiempo que reside la magnetización en los del soluto después de un equilibrio de intercambio tipo water-EXSY ó water-NOESY, f_p (Liu et al., 1999).

$$D_p^{app} = f_p \cdot D_p + f_w \cdot D_w \quad \text{Ecuación 2}$$

siendo $f_p + f_w = 1$, se obtiene:

$$f_w = 1 - \frac{D_w - D_p^{app}}{D_w - D_p} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde D_w es el coeficiente de difusión del agua obtenido mediante el experimento DOSY-H₂O, y D_p es el coeficiente de difusión real del soluto, obtenido con el experimento WDE-DOSY^{ref}. Por lo tanto, la metodología WDE-DOSY permite determinar f_w , que se ha denominado como el factor de renovación de agua, un parámetro que es relevante en el estudio de la solvatación de los solutos y que en este experimento puede determinarse para cada protón no lábil del soluto que sea observable. El valor de f_w puede variar entre 0 y 1, para una ausencia total de renovación y una renovación completa de las moléculas de agua durante el tiempo de difusión fijado (Δ), respectivamente.

Espectro WDE-DOSY

Se midieron, para cada muestra, varios espectros WDE-DOSY con la secuencia de pulsos indicada en la Figura 1a. El primer pulso de agua selectivo de 180° a la frecuencia del H₂O, tuvo una duración de 2,4 ms y un ancho de banda de 375 Hz alrededor del pico del agua. Durante el periodo LED (Longitudinal Edy current compensated), la secuencia incorpora un esquema para la supresión de señal/es del disolvente/s (WET) (Smallcombe et al., 1995; Mo y Raftery, 2008), en este caso la del pico del H₂O. El esquema WET utilizado está basado en 4 pulsos de 90° con forma E-BURP de 2 ms de duración cada uno y separados por los gradientes g_a , g_b , g_c y g_d de 2 ms cada uno, que se aplican con una potencia de 22, 11, 5,5 y 2,5 G/cm, respectivamente. Los gradientes PFGs (Pulse Field Gradients) bipolares utilizados para codificar/decodificar la difusión tienen forma rectangular y una duración total (δ), suma del gradiente positivo y negativo, de 2 ó 5 ms para los distintos espectros. El tiempo de difusión (Δ) se ajustó a 500 ms. En cada espectro se utilizó un gradiente con forma rectangular y la fuerza de los gradientes bipolares (G_1) se varió linealmente desde los 11,2 y los 39,2 G/cm para detectar 32 puntos (subespectros) en la dimensión de la difusión. El tiempo de recuperación antes de la adquisición (scans), d_1 , fue de 4 s y el tiempo de adquisición de la FID (*Free Induction Decay*) (aq) fue de 1,3 s.

a) Water-EXSY



b) Water-NOESY

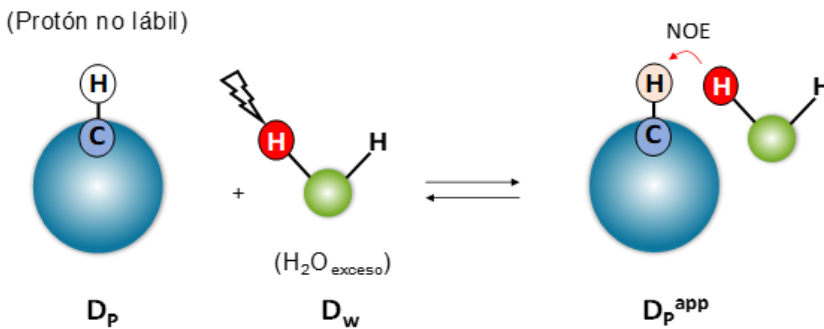


Figura 2. Esquema de los equilibrios químicos que conducen a la transferencia de magnetización desde los protones de la molécula de agua hacia los del soluto y con ello a una difusión incrementada en el experimento WDE-DOSY. a) mecanismo water-EXSY: se basa en la existencia de un equilibrio de intercambio químico entre un protón del agua y un protón lábil del soluto que se libera a la solución. b) mecanismo water-NOESY: se basa en la existencia de un equilibrio en el que la molécula de agua se intercambia entre su estado libre en solución y su estado unido al soluto. La secuencia WDE-DOSY inicialmente selecciona la magnetización del agua (indicado con un rayo en el esquema) y elimina la de las señales del soluto, pero en el mecanismo b) una vez que una molécula de agua se une al soluto, sus protones excitados pueden transferir parte de su magnetización a un protón próximo (lábil o no) del soluto y así ser finalmente detectado. Se indica el tipo de coeficiente de difusión que se obtiene. D_p coeficiente de difusión del soluto en ausencia del equilibrio, D_w coeficiente de difusión del agua libre y D_p^{app} coeficiente de difusión aparente del soluto incrementado por la interacción con el agua.

2.4.4. Espectro DOSY.

Los coeficientes de difusión reales de cada componente también se obtuvieron utilizando la secuencia de pulsos BPP-STE-LED-WET (bipolar gradients-stimulated echo-longitudinal eddy current compensated-water-taylorized-excitation) indicada en la Figura 1c. El experimento es una modificación sencilla de la secuencia de pulsos convencional para medidas de difusión BPP-STE-LED (Johnson, 1999) que consiste en la incorporación del esquema WET (Smallcombe et al., 1995; Mo y Raftery, 2008) durante el periodo LED de la secuencia para la supresión del pico del H₂O. Los parámetros utilizados para la secuencia WET son los que se han descrito en el apartado anterior para la secuencia WDE-DOSY. El resto de parámetros se mantuvieron también igual, con excepción de la duración de los dos pulsos de gradiente bipolar PFG (δ) para codificar/decodificar la difusión que se fijó en 5 ms. De la misma manera, para una señal cualquiera del espectro el ajuste a la Ecuación 1 permite obtener, en este caso, el coeficiente de difusión real del soluto, D_p .

2.4.5. Experimentos DOSY-H₂O.

El coeficiente de difusión de la molécula de H₂O como disolvente se midió en las muestras a estudiar utilizando una versión del experimento DOSY basado en la secuencia SL-STE (slice-selective-stimulated echo) (Park y Lee, 2006). El pulso de excitación selectivo y de ángulo 90° tiene forma Hermitiana. Su duración es de 0,8 ms y se aplica simultáneamente a un gradiente para la selección espacial (G_{SS}) de potencia 0,19 G/cm. Este pulso excita exclusivamente a los protones del agua localizados en una rodaja de muestra de espesor controlable (Thk), alrededor del isocentro de la bobina de gradientes, lo que coincide con el centro del volumen de muestra. El espesor de la rodaja viene dado por la Ecuación 4.

$$Thk = \frac{B_w}{\gamma \cdot G_{SS}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde γ es la constante giromagnética del protón, 26.751 rad·Hz/G y B_w es la anchura de banda del pico aplicado (1.000 Hz). En nuestro estudio se tomó un espesor de rodaja, Thk de 0,2 cm. Con este método espacial de selección, tomado de la espectroscopía de resonancia magnética por imágenes (MRI), sólo se genera y detecta señal de RMN de ese pequeño volumen de la muestra, lo que permite reducir la intensa señal del disolvente hasta un nivel adecuado para su detección. El tiempo de difusión (Δ) fue de 100 ms. La duración del gradiente de pulsos bipolares PFG que codifican la difusión (δ) fue de 1 ms. La potencia del gradiente (G) varió linealmente desde los 3,1 hasta los 39,2 G/cm para detectar 30 puntos en la dimensión de la difusión. También en este caso d_1 fue de 4 s y el tiempo de obtención del FID, 1,3 s. En este experimento la señal de interés es la del agua (~4,7 ppm) y el ajuste de los datos obtenidos a la Ecuación 1 permite estimar su coeficiente de difusión (D_w).

2.5. Caracterización de las microesferas.

Las microesferas fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología, tamaño, eficiencia de encapsulación y perfil de liberación de las sustancias activas. El estudio de la morfología se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, Jeol JSM-6300) y el tamaño se determinó utilizando un difractor láser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments).

La eficiencia de encapsulación se determinó utilizando 3 alícuotas de cada lote de microesferas. En el caso de la BMP-2, se determinó en los lotes elaborados con ^{125}I -BMP-2. El método para el marcaje de la BMP-2 consistió en mezclar BMP-2 (25 μL de una disolución de 1 mg/mL) con 10 μL de ^{125}I Na (1mCi) (Perkin-Elmer, Boston, EEUU) en tubos recubiertos con 50 μg de Iodogen (Pierce® Pre-coated Iodination Tube, Thermo Scientific) y añadir tampón fosfato (0,5 M y pH=7) hasta llegar a un volumen de 100 μL . La mezcla se incubó en agitación continua (120 rpm) durante 15 min, pasado este tiempo se añaden 50 μL de una disolución acuosa saturada de tirosina

para eliminar el ^{125}I que hubiera quedado sin reaccionar con la BMP-2 y se ajustó a un volumen de 200 μL con tampón fosfato. La ^{125}I -BMP-2 se purificó utilizando columnas Zeba™ Spin Desalting (Thermo Scientific).

Tanto el rendimiento como la estabilidad de marcaje se monitorizaron por cromatografía de capa fina. Se depositaron 5 μL de disolución de ^{125}I -BMP-2 (15.000-20.000 cpm) sobre una tira de papel impregnada en sílica gel (iTLC, Varian Iberica, SL) de 11,5 x 1 cm y se desarrolla la cromatografía con metanol al 85% en agua. El soporte se seca a temperatura ambiente (RT) y se corta por la mitad para determinar la radiactividad contenida en cada porción utilizando un contador gamma (Cobra II, Packard®). El ^{125}I libre se desplaza en la tira ($R_f=1$) mientras que la ^{125}I -BMP-2 se queda retenida en la base ($R_f=0$) (de la Riva et al., 2009). Este ensayo se realizó por duplicado.

El rendimiento de encapsulación se calculó midiendo la radiactividad en tres alícuotas de microesferas, preparadas con ^{125}I -BMP-2, en un contador gamma (Cobra II, Packard®) y comparándola con la radiactividad inicial utilizada en la preparación del lote.

El rendimiento de encapsulación de las microesferas de 17β -estradiol se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm previa disolución de las microesferas en una mezcla de MeOH:DCM (20:80).

2.6. Caracterización *in vitro* del sistema completo.

2.6.1. Liberación de sustancias activas y uniformidad de dosis.

El ensayo de liberación del 17β -estradiol se realizó por triplicado a 37 °C usando como medio de liberación una mezcla de tampón fosfato (0,066 M, pH=7,4) con MeOH en una relación 1:1. Para estudiar la influencia del hidrogel en la cinética de liberación del 17β -estradiol, se llevaron a cabo 2 ensayos. En el primero se dispersaron 25 mg microesferas en 5 mL de medio y en el otro, las microesferas incorporadas en el hidrogel (250 mg/mL) se incuban en el medio. La cantidad de 17β -estradiol liberado en el

sobrenadante se determinó por espectrofotometría a 280 nm durante 6 semanas.

El ensayo de liberación de BMP-2 se llevó a cabo *in vivo* e *in vitro* usando lotes marcados con ^{125}I . El ensayo *in vitro* se realizó por triplicado incubando 3 mg de microesferas libres o incorporadas en 100 μL de gel en 2 mL de tampón fosfato a 37 °C. La cantidad de ^{125}I -BMP-2 liberada en el sobrenadante se determinó mediante un contador gamma (Cobra II, Packard®).

Para probar la inyectabilidad del sistema se llevó a cabo un ensayo de uniformidad de dosis. Para ello se cargan 2 jeringas de 1 mL con una suspensión de microesferas de 17β -estradiol dispersas en el gel y se descargan, de cada jeringa, 5 dosis de 100 μL a través de una aguja de 20 G. Las muestras son entonces lavadas 2 veces con tampón fosfato, centrifugadas a 10.000 rpm y liofilizadas para ser disueltas en MeOH:DCM (20:80) y valoradas por espectrofotometría a 280 nm, siguiendo el mismo procedimiento descrito para el rendimiento de encapsulación.

2.6.2. Estudio de las propiedades reológicas.

El comportamiento reológico se estudió en un reómetro Bohlin CVOD 100 equipado con un sistema de control de temperatura Peltier y usando una geometría de cono-plato de 40 mm de diámetro, con un ángulo de 4 ° y con un espesor de muestra (gap) de 1 mm. La dependencia de la viscosidad con la temperatura se midió a una velocidad de cizalla fija de 10 s^{-1} en el rango de 0 a 80 °C. La evolución del módulo elástico (G') y del viscoso (G'') con la temperatura se llevó a cabo en el intervalo de 0 a 50 °C, con una velocidad angular fija de 1 rad/s y bajo un estrés oscilatorio de 0,2387 Pa utilizando una geometría de plato plano de 20 mm de diámetro.

El comportamiento viscoelástico se midió para las mezclas P/T 11/7 y para el sistema P/T/CD 11/7/7 con y sin microesferas blancas de PLGA/PLA-S (250 mg/mL).

La variación de la viscosidad con la velocidad de cizalla se evaluó para el sistema P/T/CD 11/7/7 a 20 °C y a 37 °C. El intervalo de velocidad de cizalla aplicado varía de 0,076 s⁻¹ a 30 s⁻¹, en un ciclo de ida y vuelta aumentando y disminuyendo la velocidad. El tiempo total del ensayo fue de 16,6 min.

2.6.3. Estructura interna y porosidad.

Se evaluó la estructura interna y la porosidad del gel recién preparado y tras incubarlo en medio acuoso con (250 mg/mL) y sin microesferas. Para ello, se pusieron alícuotas de 2 mL de gel en moldes cilíndricos graduados y se mantuvieron a 37 °C hasta su gelificación. Después se añadieron cuidadosamente 5 mL de tampón fosfato (pH 7,4) y se incubaron durante 1, 2, 3 y 4 semanas a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo programado, se retiran tres muestras por cada formulación a ensayar, se congelan con nitrógeno líquido para que el gel mantenga su estructura interna y se liofiliza.

La porosidad de los geles liofilizados se estimó mediante la densidad real (ρ_{true}) determinada con un picnómetro de helio (Micromeritics, AccuPyc 1330) y la densidad aparente (ρ_{app}) que se calcula con la masa total del cilindro formado y su volumen geométrico. Para obtener la porosidad se utilizó la Ecuación 5.

$$Porosidad (\%) = \left(1 - \frac{\rho_{app}}{\rho_{true}}\right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Se realizó un corte a los geles liofilizados y se visualizaron mediante SEM (SEM, Jeol JSM-6300) recubiertos con plata.

2.6.4. Sembrado y cultivo de células mesenquimales de médula ósea de ratas.

Aislamiento de las células.

Los experimentos con animales se llevaron a cabo en conformidad con la directiva de la Comunidad Europea sobre el cuidado y el uso de animales en procedimientos experimentales (2010/63/UE). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación y Bienestar Animal (CEIBA) de la Universidad de La Laguna.

Las rMSCs fueron obtenidas de tibia y fémur de ratas macho Sprague Dawley de 6 semanas y aproximadamente 200 g de peso siguiendo el método de centrifugación descrito previamente por otros autores (Dobson et al., 1999). El proceso comienza con el sacrificio de las ratas por inhalación de CO₂ y, una vez rasurados los cuartos traseros, el animal completo se sumerge en alcohol de 70° durante unos 10 minutos y, a partir de ese momento, cualquier manipulación se realiza en campana de flujo laminar para garantizar la asepsia. Posteriormente se les extrajo la tibia y el fémur y se seccionaron los huesos en dos, con cuidado de aprovechar las porciones distales del fémur y la parte proximal de la tibia que se depositaron en *ependorfs* individuales manteniendo los cóndilos tibiales y femorales hacia arriba donde, con una aguja de 18 G, se les realizó una pequeña incisión para facilitar la extracción de la médula. A continuación, se centrifugaron durante 1 min a 400 g a temperatura ambiente, se desecharon los huesos y los pellets se resuspendieron en medio de cultivo primario (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*, DMEM) para centrifugarlos de nuevo durante 8 min a 300 g. Por último, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio completo, MC (DMEM con alto contenido en glucosa, 10 % de suero bovino fetal (FBS, Biowest), 2 mM de L-glutamina (Sigma) y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma)) y sembradas en placas de cultivo de plástico e incubadas hasta confluencia a 37 °C y un 5% de CO₂. Las rMSC fueron despegadas con tripsina (5 min, 37 °C), resuspendidas en medio fresco y contadas. A

continuación, se centrifugan de nuevo (300 g, 8 min, 4 °C), se resuspenden en el volumen necesario de FBS (4 °C) para una concentración de $2-8 \times 10^6$ células/mL que se diluye con el mismo volumen de medio de congelación (dimetilsulfóxido, DMSO al 20 % en FBS a 4 °C), para obtener una concentración de $1-4 \times 10^6$ células/mL. La suspensión se reparte en alícuotas que se conservan congeladas hasta su uso. Antes de su uso es necesario eliminar el DMSO, para ello, se centrifuga (300 g, 8 min, RT) y el pellet obtenido se resuspende en medio fresco y se siembran.

Cultivo de rMSC en el gel.

El gel liofilizado se reconstituye con MC o con medio de diferenciación osteoblástica (MD) que consiste en MC suplementado con dexametasona (10^{-8} M), β -glicerol-fosfato (10 mM) y ácido ascórbico (50 μ g/mL). La suspensión de rMSCs ($1,25 \times 10^6$ células/mL) se dispersa, mediante agitación suave con vórtex, en 5 mL de gel en estado líquido (baño de hielo) seguidamente alícuotas de 200 μ L fueron depositadas en los pocillos de placas de 48 (50.000 células/pocillo) e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ durante 5 minutos para inducir la gelificación y adhesión de las células. A continuación, se añadieron 500 μ L del correspondiente medio a cada pocillo para su cultivo, cambiando el medio cada 3 días. La distribución homogénea de las células en el gel se verificó mediante observación en microscopio invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss®).

Viabilidad celular.

Para estudiar la viabilidad de las rMSC sembradas en el gel se utilizó la citometría de flujo tiñendo las células con calceína-AM para identificar las células vivas y yoduro de propidio (PI) para las células muertas. El procedimiento consistió en recolectar las células tras 5 días de cultivo, lavarlas con solución salina equilibrada de Hank (HBSS), teñirlas con calceína-AM (1 μ M) incubándolas durante 30 min a 37 °C y protegidas de la

luz. Pasado este tiempo, se centrifugan 5 min a 400 g, se lavan una vez con HBSS, se añade el PI en HBSS (0,75 μ M) y se incuban durante otros 30 min a 37 °C. La viabilidad celular se determinó por la fluorescencia intracelular verde y roja usando un citómetro de flujo (Accuri C6, BD Biosciences). Para el análisis de la fluorescencia dual se utilizó un láser de argón (488 nm). Para medir la fluorescencia roja que provoca el PI en FL3 se utilizó un filtro de 625/35 nm y uno de 530/30 para la fluorescencia verde en FL1. Se midieron 10.000 células en cada muestra.

Diferenciación osteogénica in vitro.

La capacidad osteogénica de las rMSCs en el gel, se determinó mediante tinción de fosfatasa alcalina. Las células en el gel fueron cultivadas en medio de diferenciación (MD) durante 7, 14 y 21 días. Una vez transcurrido este tiempo para separar las células del gel se lavan 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , se centrifugan, se resuspenden en 100 μ L de PBS, se llevan a un portamuestras de cristal, se secan y se fijan con una disolución de formol neutro al 10% durante 60 s. En el siguiente paso se lavan con 2 mL de tampón de lavado (PBS con 0,05% de Tween 20) y se incuban en una disolución de sustrato NBT/BCIP (cloruro de nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) a temperatura ambiente durante 20 minutos en ausencia de luz. A continuación, se lavan con 2 mL de tampón de lavado, se montan en glicerol tamponado y se observan inmediatamente al microscopio. Este ensayo se realiza por duplicado.

2.7. Caracterización *in vivo* del sistema completo.

2.7.1. Modelo animal.

En este estudio se utilizaron 40 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con pesos comprendidos entre los 200 y 250 g. A un grupo de 20 animales

(grupo OP) se les provocó la osteoporosis mediante un procedimiento quirúrgico que consistió en una ovariectomía bilateral por incisión dorsal bajo anestesia inhalatoria (isofluorano, ISOFLO®). Además, dos semanas después de la ovariectomía, se administró una dosis de 0,3 mg/kg de dexametasona 21-isonicotinato (DEX) (Deyanil Retard, Fatro Ibérica, Spain) por vía subcutánea cada 2 semanas (Govindarajan et al., 2013) durante un máximo de 4 meses. Las 20 ratas restantes se usaron como control SHAM de ratas sanas o no-OP. Como las ratas OP, las no-OP se sometieron a la misma cirugía simulando una ovariectomía, sin extirpar los ovarios. Cuatro meses tras la operación, todas las ratas (40 ratas) fueron sometidas a un proceso quirúrgico bajo anestesia inhalatoria (isofluorano) en el que se les realizó un defecto crítico de 8 mm de diámetro en el cráneo utilizando un trepanador, como se ha descrito anteriormente (Rodríguez-Évora et al., 2013). Previo a la intervención se rasuró la cabeza del animal y se aplicó povidona yodada (Betadine®) y, posteriormente, se realizó una incisión sagital a lo largo del cráneo, desplazando la piel y la gálea aponeurótica hacia los extremos de la cabeza dejando la calota expuesta. Con ayuda del trepanador se practicó un defecto crítico, transóseo circular de 8 mm de diámetro (Spiecer et al., 2012) entre el bregma y la lambda, a lo largo de la sutura sagital. Se inyecta el sistema (100 µL de gel con microesferas) en el lugar del defecto (Figura 3) y se cierra la herida con grapas quirúrgicas. La analgesia consistió en buprenorfina administrada por vía subcutánea (0,05 mg/kg) durante la cirugía y paracetamol (70 mg/100mL) en el agua durante 3 días. Tras la operación a los animales se les permitió moverse, beber y comer libremente.

Tanto las ratas OP como no-OP se dividieron en 4 grupos para recibir los distintos tratamientos. Los 4 grupos ensayados fueron, uno con P/T/CD con microesferas blancas, otro con 4 µg de BMP-2 encapsulados en microesferas de PLGA dispersos en el gel P/T/CD (grupo BMP), el grupo BMP-βE recibió 4 µg de BMP-2 y 200 µg de 17β-estradiol ambos encapsulados en microesferas de PLGA y PLA-S, respectivamente, dispersas en el sistema P/T/CD y, por último, el grupo BMP-βEx2 que consistió en ratas tratadas de la misma manera que el grupo BMP-βE, pero que

recibieron una segunda dosis de microesferas con BMP y 17β -estradiol en el lugar del defecto 6 semanas después de la primera (Tabla 2).

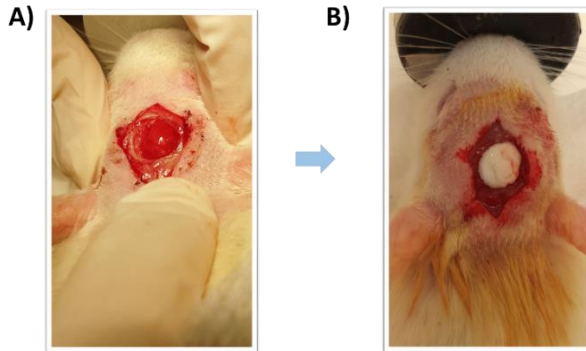


Figura 3. Defecto óseo de 8 mm de diámetro practicado en la calvaria de las ratas A) antes y B) con 100 μ L del sistema P/T/CD 11/7/7 con microesferas dispersas de PLA-S y PLGA rellenando el defecto.

2.7.2. Liberación *in vivo*.

La liberación *in vivo* se estudió monitorizando la cantidad remanente de ^{125}I -BMP-2 en el defecto óseo después de la implantación del sistema, usando un método no invasivo, como ya se ha descrito (Rodríguez-Évora et al., 2013; 2014; del Rosario et al., 2015). Para ello, se mide la radiactividad remanente en el defecto con un contador gamma tipo sonda (Captus[®], Nuclear Iberica) acoplado a un colimador de 3,2 x 2 cm. Las ratas se sedan para cada tiempo de muestreo con anestesia inhalatoria (isofluorano) y se toman 5 medidas (27 KeV durante 1 min) de la radiactividad remanente. El promedio de las medidas realizadas justo tras la implantación se considera como la dosis administrada, es decir el 100%, y el porcentaje cedido se obtiene como la diferencia entre esta dosis y la radiactividad remanente para cada tiempo, todo ello se corrige por el factor de desintegración del trazador, en este caso el ^{125}I , que posee un periodo de semidesintegración ($t_{1/2}$) de 60 días.

2.7.3. Evaluación histológica e histomorfométrica.

Para evaluar los efectos regenerativos de la liberación de la BMP-2 y de la combinación de la BMP-2 con el 17 β -estradiol, se examinaron las muestras de los 8 grupos de 5 ratas cada uno, 12 semanas después de la aplicación del sistema. Las muestras fueron fijadas con una solución al 4% de formaldehído y descalcificadas con Histofix® Decalcifier 3DC (Panreac, Barcelona, España). A continuación, las muestras se deshidrataron en series de alcoholes de gradación creciente y se incluyeron en Paraplast®. Se obtuvieron secciones de 5 μ m de grosor con un microtomo (Microm HM325, Thermo Scientific).

La estructura y madurez del hueso neoformado se identificó mediante la tinción topográfica de hematoxilina-eritrosina y la tinción histoquímica de VOF que permite estimar el grado de mineralización presente en el hueso. Esta técnica tiñe de rojo-marrón zonas que presentan una alta mineralización y en diferentes tonos de azul zonas con bajo grado de mineralización (Martínez-Sanz et al., 2011). Las secciones fueron analizadas con un microscopio (LEICA DM 4000B). Para la evaluación histomorfométrica se utilizó un software de análisis de imagen (Leica Q-win V3 Pro-image Analysis System, Barcelona, España). Para obtener el porcentaje de reparación se definió una región de interés (ROI), consistente en una sección circular de 50 mm² cuyo centro coincide con el centro del defecto. La formación de hueso neoformado se expresó como porcentaje de reparación mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{reparación} = \frac{\text{nueva área con hueso}}{\text{área del defecto original dentro del ROI}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

La condición osteoporótica fue confirmada histológicamente e histomorfométricamente determinando el grosor del hueso cortical y el grosor del espacio intercortical en secciones transversales de calvaria.

Para determinar la calidad del hueso reparado en el momento del análisis, se determinó la relación entre el área de hueso maduro (MB) y de hueso

inmaduro (IB) y se comparó la tasa MB/IB entre los distintos grupos experimentales.

Tabla 2. Grupos experimentales de 5 ratas cada uno. ^(a) Incluye 5 ratas adicionales para los ensayos de liberación in vivo de la BMP-2.

	Grupo	Especificaciones
OP	Blanco	Microesferas blancas (5 mg de microesferas de PLGA y 12 mg de microesferas de PLA-S)
	BMP	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg BMP-2 y 12 mg de microesferas blancas de PLA-S
	BMP-βE	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg de BMP-2 y 12 mg de microesferas de PLA-S conteniendo 200 µg de 17β-estradiol
	BMP-βEx2	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg de BMP-2 y 12 mg de microesferas de PLA-S conteniendo 200 µg de 17β-estradiol administrando una segunda dosis a las 6 semanas.
No-OP	Blanco	Microesferas blancas (5 mg de microesferas de PLGA y 12 mg de microesferas de PLA-S)
	BMP	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg BMP-2 y 12 mg de microesferas blancas de PLA-S
	BMP-βE ^(a)	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg de BMP-2 y 12 mg de microesferas de PLA-S conteniendo 200 µg de 17β-estradiol
	BMP-βEx2	5 mg de microesferas de PLGA conteniendo 4 µg de BMP-2 y 12 mg de microesferas de PLA-S conteniendo 200 µg de 17β-estradiol administrando una segunda dosis a las 6 semanas.

Para el análisis inmunohistoquímico, las secciones fueron desparafinadas y rehidratadas en tampón Tris salino (TBS) (pH 7,4; 0,1 M Trizma base; 0,04 M tris-hidrocloruro; 0,15 M NaCl), el cual fue utilizado para todas las incubaciones y lavados. Las secciones fueron sometidas a un proceso de desenmascaramiento antigénico en tampón citrato (pH 6) a 90 °C durante 5 minutos. A continuación, se incubaron en una disolución de peróxido de

hidrógeno al 0,3% en TBS durante 20 min para inactivar la actividad peroxidasa endógena. Posteriormente, las secciones se incubaron con una disolución de suero bovino fetal (FBS) al 2% en TBS para el bloqueo de los sitios de unión inespecíficos. La reacción inmunohistoquímica indirecta se llevó a cabo incubando las secciones con los antisueros policlonales anti-colágeno tipo I y anti-osteocalcina a dilución 1/100 (Millipore, Barcelona, España) en TBS-Tritón X-100 al 0,2%, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, las secciones se incubaron de manera secuencial con un anticuerpo secundario (Donkey anti-rabbit IgG) (Millipore, Barcelona, España) conjugado a biotina a dilución 1/200 y seguidamente con un complejo estreptavidina-peroxidasa (Millipore, Barcelona, España) a dilución 1/300 durante 60 minutos en cada caso. La actividad peroxidasa se reveló incubando las secciones con una disolución de 4-cloro-1-naftol (Sigma, Poole, Reino Unido) al 0,04% y peróxido de hidrógeno al 0,01% en tampón Tris-HCl (0,05 M; pH 7,6). Tras el revelado, las secciones se lavaron exhaustivamente y se montaron con glicerina tamponada para su posterior análisis. La especificidad de la reacción inmunohistoquímica se confirmó realizando el correspondiente control negativo, reemplazando el antisuero policlonal específico por suero bovino normal y confirmando la ausencia de marcaje bajo estas condiciones.

La medida de la inmunoreacción para el colágeno tipo I y la osteocalcina se realizó mediante un software de análisis de imagen (ImageJ, NIH, Bethesda, MD). La intensidad de inmunoreacción se evaluó en la ROI estableciendo un valor umbral fijo a partir del cual se consideró positiva la inmunoreacción. Se determinó el área con inmunotinción positiva y se dividió entre el área total (mm^2) de la ROI. Los valores así obtenidos se normalizaron con respecto a los scaffolds blancos y se representaron como intensidad de tinción relativa.

2.7.4. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se sometieron inicialmente a un análisis de la varianza (ANOVA I) para poner de manifiesto diferencias entre los distintos tratamientos y posteriormente a un test de Tukey para comparar todos los tratamientos entre sí. El nivel de significación estadística establecido por defecto fue de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como medias \pm SD.

3. Resultados.

3.1. Caracterización del hidrogel.

En primer lugar, se determinó qué concentración mínima de la mezcla de todos los componentes era capaz de mantener la respuesta termosensible del sistema. El objetivo fue conseguir un sistema inyectable a temperatura ambiente que presentara una transición rápida a un gel viscoso a la temperatura corporal. Para detectar este comportamiento se aplicó la prueba del tubo invertido para combinaciones del P a concentraciones comprendidas entre el 7,5 y el 11 % p/p, con T y α CD en el intervalo del 6 al 7,5 % p/p para ambos (Tabla 1).

Todas las formulaciones eran líquidas a 4 °C pero solo 3 gelificaron a 37 °C. De estas tres formulaciones, todas contenían un 11 % de P y un 6 o 7 % de T y α CD. Solo la combinación de P al 11 %, T al 7 % y α CD al 7% (11/7/7), presentó reversibilidad cuando se sometían a varios ciclos de cambio de temperatura de 4 a 37 °C. Además, mantuvo sus propiedades cuando se liofilizó y se reconstituyó en agua. Por todo esto, esta formulación fue seleccionada para el resto de los experimentos.

3.1.1. Estudio de difusión y solvatación de los solutos por RMN-DOSY.

Se midieron varios espectros WDE-DOSY, con la secuencia indicada en la Figura 1. Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C para minimizar los efectos de ensamblaje de los grupos PPO inducido por la temperatura. Para las soluciones de α CD sola a concentraciones de 1%, 3%, 5% y 7%, p/p (α CD1, α CD3, α CD5 y α CD7), se obtuvieron unos coeficientes de difusión en el rango de $2,7 \times 10^{-10}$ a $4,2 \times 10^{-10}$ m²/s. Para las soluciones que contienen únicamente P al 1%, 3% y 5% p/p (P1, P3 y P5) y las que contienen únicamente T al 1%, 3%, 5% y 7% p/p (T1, T3, T5 y T7) el rango de los coeficientes de difusión fue de $0,3 \times 10^{-10}$ a $0,7 \times 10^{-10}$ y $0,3 \times 10^{-10}$ a $0,5 \times 10^{-10}$ m²/s (Tabla 3), respectivamente.

Se ha aplicado la metodología WDE-DOSY en el estudio de la solvatación de solutos en soluciones preparadas con un único componente (Figuras 4, 5 y 6) y en soluciones con dos o tres componentes de la mezcla P, T y α CD (Figuras 7, 8, 9, 10 y 11).

Para el estudio WDE-DOSY con las soluciones de α CD (α CD1, α CD3, α CD5 y α CD7), las señales de RMN analizadas fueron las que estaban en el rango de 3,3 - 4,0 ppm, correspondientes a los protones H2 y H6 de los anillos de glucosa de la α CD. Para la muestra α CD1, el espectro de WDE-DOSY no proporcionó ningún valor debido a que la concentración estaba por debajo del límite de detección del método. Para las otras tres soluciones, se obtuvieron los parámetros de la ecuación de Stejskal-Tanner (Ecuación 1), y con ellos, los correspondientes coeficientes de difusión y los factores de renovación de agua (Ecuaciones 2 y 3) (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes de difusión y factor de renovación de agua (f_w) obtenidos mediante diferentes espectros de difusión RMN para las muestras disueltas en agua, a 25 °C. Los valores de los coeficientes de difusión se expresan en unidades de $\times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. La difusión convencional del agua es D_w (obtenida con el experimento DOSY-H₂O), D_p^{app} es el coeficiente de difusión aparente del soluto que se incrementa por el equilibrio de intercambio con el agua (obtenida con el experimento WDE-DOSY) y D_p es el coeficiente de difusión del soluto en ausencia de este equilibrio (obtenida con el experimento WDE-DOSY^{ef}). (°) $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$; (b) $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 5 \text{ ms}$; (°) $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 5 \text{ ms}$; (°) BPP-STE-LED-WET DOSY; (°) calculado usando la Eq. 3; f Señal de baja intensidad.

Muestra/pico	(D_w)	(D_p^{app})		(D_p)		(D_p^{app})		(D_p)		(D_p^{app})		(D_p)		(D_p^{app})		(D_p)		(D_p^{app})		(D_p)		
		α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD	α CD
α CD1	22,8																					
α CD3	21,8	f	4,6 ^(b)	4,2 ^(b)	---																	
α CD5	20,9	3,8 ^(a)	3,0 ^(b)	3,1 ^(b)	0,04																	
α CD7	20,7	3,6 ^(a)	2,9 ^(b)	2,9 ^(b)	0,04																	
P1	20,0	3,5 ^(a)	2,7 ^(b)	2,7 ^(b)	0,04																	
P3	19,7																					
P5	16,4																					
T1	20,7																					
T3	20,6																					
T5	20,5																					
T7	21,8																					
P α CD	18,2	5,1 ^(a)	0,2 ^(b)	0,2 ^(b)	0,27																	
P α CDT	20,0	5,4 ^(a)	0,1 ^(b)	0,1 ^(b)	0,27																	
T α CD	18,2	5,1 ^(a)	0,2 ^(b)	0,3 ^(b)	0,27																	
T α CDP	17,3	4,8 ^(a)	0,1 ^(b)	0,1 ^(b)	0,27																	
PT α CD	18,3	5,0 ^(a)	0,1 ^(c)	0,1 ^(c)	0,27																	

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos con los experimentos WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la muestra de α CD5. El perfil de intensidad de señal con respecto al incremento en el gradiente de fuerza decae ligeramente más rápido para el WDE-DOSY que para el WDE-DOSY^{ref}. El ajuste de cada curva a la ecuación de Stejskal-Tanner (Ecuación 1) proporciona unos coeficientes de difusión D_p^{app} de $3,6 \times 10^{-10}$ m²/s y D_p , de $2,9 \times 10^{-10}$ m²/s (Tabla 3). El hecho de que se obtenga una difusión más rápida con el ensayo WDE-DOSY refleja el incremento debido a la transferencia de magnetización desde moléculas de agua próximas que difunden mucho más rápido. Sin embargo, para estos resultados, el valor de f_w calculado fue relativamente bajo (0,04). Con las muestras α CD3 y α CD7, se obtuvieron valores idénticos de f_w (Tabla 3).

El estudio WDE-DOSY de las diferentes muestras en las que sólo había P, se centró en el análisis de las señales de los protones de los grupos PEO y PPO, y que aparecen como picos bien diferenciados a 3,55 y 1,01 ppm, respectivamente (Figura 5 arriba). En la Figura 5 (abajo, izquierda) se representa el análisis de la muestra P5, donde la señal obtenida para los grupos PEO presenta la misma atenuación en ambos espectros, el WDE-DOSY y el WDE-DOSY^{ref}, por lo que el ajuste de estas curvas a la ecuación de Stejskal-Tanner proporciona coeficientes de difusión D_p^{app} y D_p muy similares, $0,4 \times 10^{-10}$ m²/s y $0,3 \times 10^{-10}$ m²/s, respectivamente. Para estos valores, el resultado de f_w es 0,01. La situación es bastante diferente para los grupos PPO, en este caso, la señal se atenúa mucho más rápidamente para la curva obtenida con el ensayo WDE-DOSY que para la obtenida con el WDE-DOSY^{ref}, y los coeficientes de difusión calculados son $3,7 \times 10^{-10}$ m²/s y $0,3 \times 10^{-10}$ m²/s, para D_p^{app} y D_p , respectivamente. Claramente, en la muestra P5, el agua situada en las proximidades de los protones de los grupos PPO presenta un mayor grado de renovación ($f_w = 0,21$), en el intervalo de tiempo fijado en el experimento (500 ms), que la presentada con los grupos PEO ($f_w = 0,01$). La situación de la muestra P3 fue muy similar y proporcionó resultados comparables a los obtenidos para P5

(Tabla 3). Los resultados de P1 no se han podido dar debido a la baja sensibilidad método.

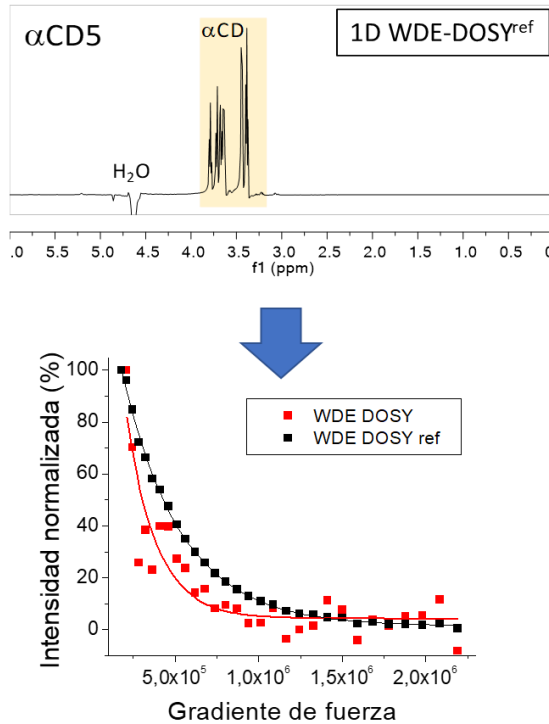


Figura 4. Estudio WDE-DOSY de la muestra α CD5. Arriba: espectro 1D WDE-DOSY obtenido con $\Delta = 0,5$ s y $\delta = 0,2$ ms. La región sombreada alrededor de cada pico representa el área que se consideró para el análisis. Abajo: Curvas de atenuación de intensidad normalizada de WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} de cada pico relevante. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app}

El estudio WDE-DOSY de la solución que contenía únicamente T a diferentes concentraciones se representa en la Figura 6 para la muestra T5. Como en el caso del P, los espectros se atenúan de forma similar para los grupos PEO, pero no así para los grupos PPO. Los coeficientes de difusión D_p^{app} y D_p tanto de los grupos PEO como de los PPO son similares a los

encontrados en el P (Tabla 3). El cálculo de f_w de los grupos PEO da un valor de 0 y para los grupos PPO, de 0,16. Los resultados de coeficientes de difusión y f_w para las otras muestras, T1, T3 y T7, son comparables a los obtenidos para T5 (Tabla 3) y se pueden establecer las mismas conclusiones en términos de solvatación de las unidades PEO y PPO que con el Pluronic.

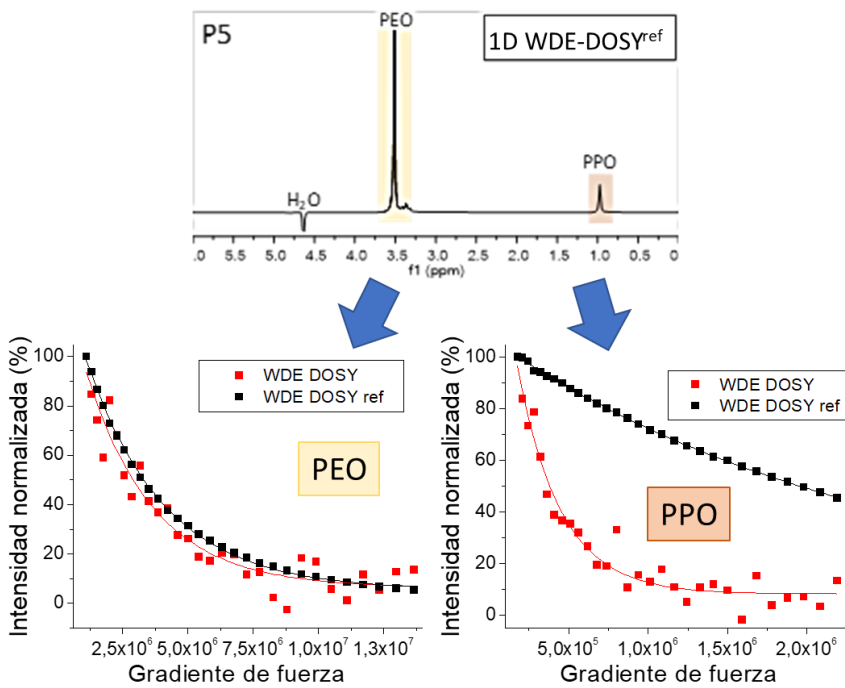


Figura 5. Estudio WDE-DOSY de la muestra P5. Arriba: espectro 1D WDE-DOSY obtenido con $\Delta = 0,5$ s y $\delta = 0,2$ ms. La región sombreada alrededor de cada pico representa el área que se consideró para el análisis. Abajo: Curvas de atenuación de intensidad normalizada de WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} de cada pico relevante para el grupo PEO (izquierda) y el PPO (derecha). Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

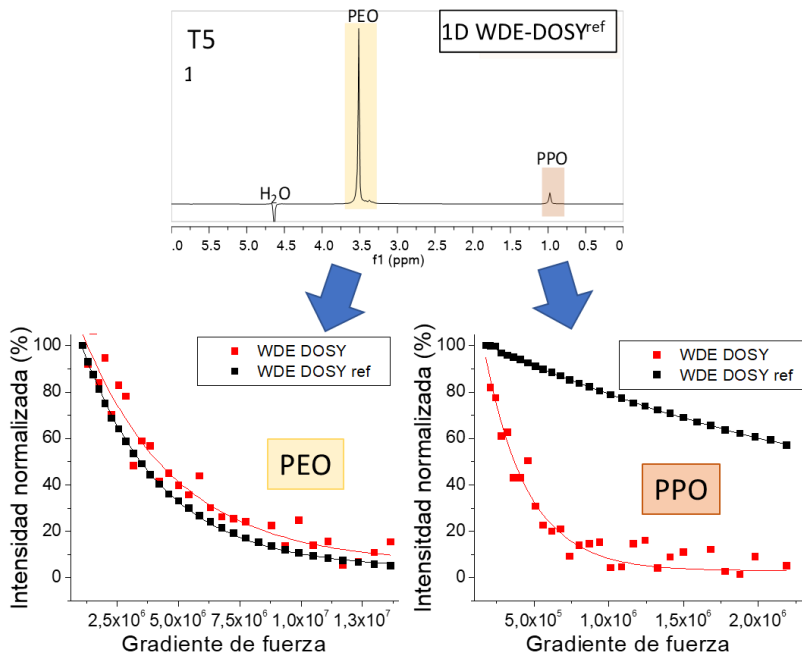


Figura 6. Estudio WDE-DOSY de la muestra T5. Arriba: espectro 1D WDE-DOSY obtenido con $\Delta = 0,5$ s y $\delta = 0,2$ ms. La región sombreada alrededor de cada pico representa el área que se consideró para el análisis. Abajo: Curvas de atenuación de intensidad normalizada de WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} de cada pico para el grupo PEO (izquierda) y el PPO (derecha). Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

Posteriormente, se llevó a cabo el estudio WDE-DOSY para las mezclas binarias y ternarias, P α CD, P α CDT, T α CD, T α CDP y PT α CD. Las Figuras 7 y 8 muestran el estudio de los perfiles de intensidad obtenidos para el espectro WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} de las mezclas binarias P α CD y T α CD. En este caso, las curvas muestran una clara diferencia entre el espectro WDE-DOSY y el WDE-DOSY^{ref} en el caso de la α CD, en comparación con las obtenidas con la solución de α CD sola (Figura 4). En ambas mezclas, el valor de f_w obtenido fue de 0,27; un valor considerablemente más alto al obtenido con la α CD sola (0,04). Los valores de f_w para los grupos PEO y PPO fueron de

0,00 y 0,18, respectivamente, para la mezcla P α CD y de 0,00 y 0,22, respectivamente, para la mezcla T α CD, valores muy similares a los obtenidos para ambos grupos cuando se estudió el P y el T por separado (Tabla 3).

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran el estudio del espectro WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para las mezclas ternarias PT α CD, P α CDT y T α CDP. En este caso, el valor de f_w para la α CD fue, al igual que para las mezclas binarias, de 0,27. Para los grupos PPO y PEO se tienen, nuevamente valores muy similares a los obtenidos cuando se realizó el estudio del P y el T por separado (PT α CD: $f_w(\text{PEO})=0,00$; $f_w(\text{PPO})=0,18$; P α CDT: $f_w(\text{PEO})=0,00$; $f_w(\text{PPO})=0,14$; T α CDP: $f_w(\text{PEO})=0,00$; $f_w(\text{PPO})=0,19$) (Tabla 3).

En resumen, para los componentes por separado, P o T, a las diferentes concentraciones estudiadas, los resultados obtenidos (Tabla 3) mostraron esencialmente valores nulos de f_w para los grupos PEO, mientras que para los grupos PPO, el valor de f_w se situó en 0,20 y 0,17 para el P y T respectivamente, y se mantuvieron constantes en el rango de concentraciones estudiado. Estos resultados de f_w para los grupos PPO y PEO fueron prácticamente idénticos a los obtenidos para los mismos grupos en las mezclas binarias y ternarias de P y T con α CD (Tabla 3).

En la Figura 12 se han representado los valores de los factores de renovación de agua (f_w) para las diferentes muestras. Como puede apreciarse, el comportamiento de todas las mezclas es bastante similar, los factores de renovación de agua son mucho más altos para la α CD y el grupo PPO que para el PEO. Por otro lado, la renovación de moléculas de agua de la α CD aumenta notablemente en las mezclas binarias y ternarias respecto a la α CD sola.

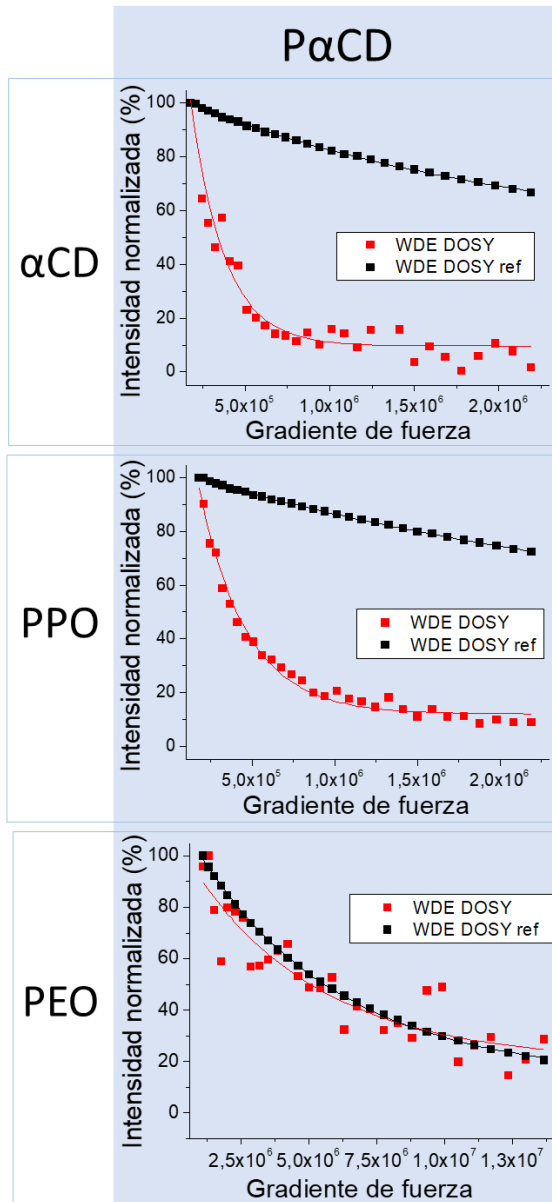


Figura 7. Curvas de atenuación de intensidad normalizada de WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la α CD y los grupos PPO y PEO en la solución binaria de PaCD. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

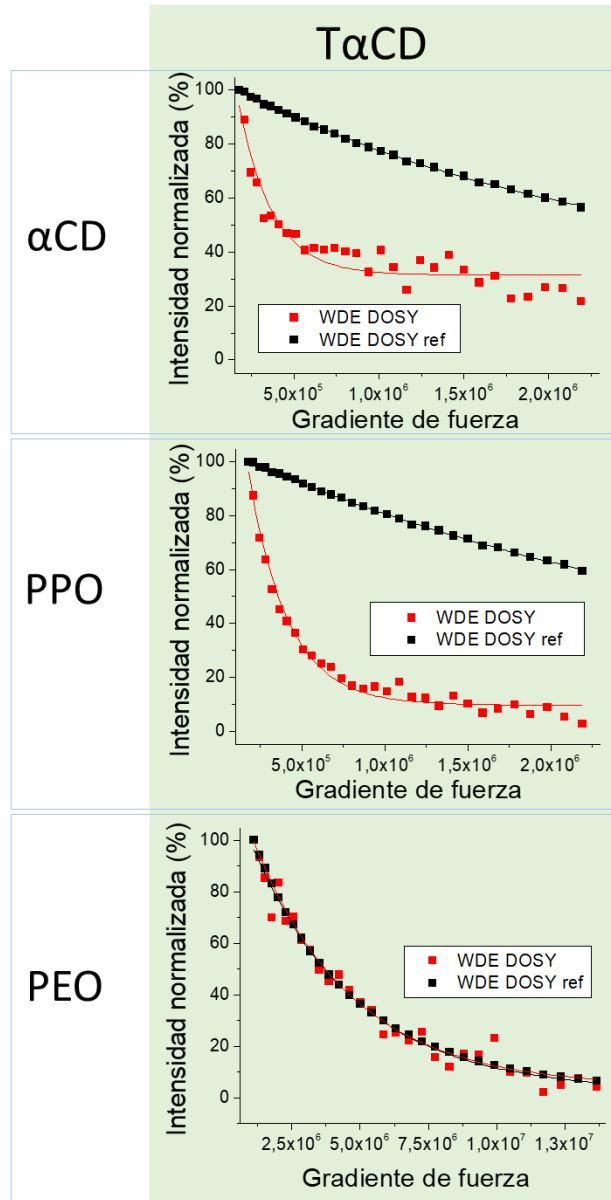


Figura 8. Curvas de atenuación de intensidad normalizada WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la α CD y los grupos PPO y PEO en la solución binaria de TaCD. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

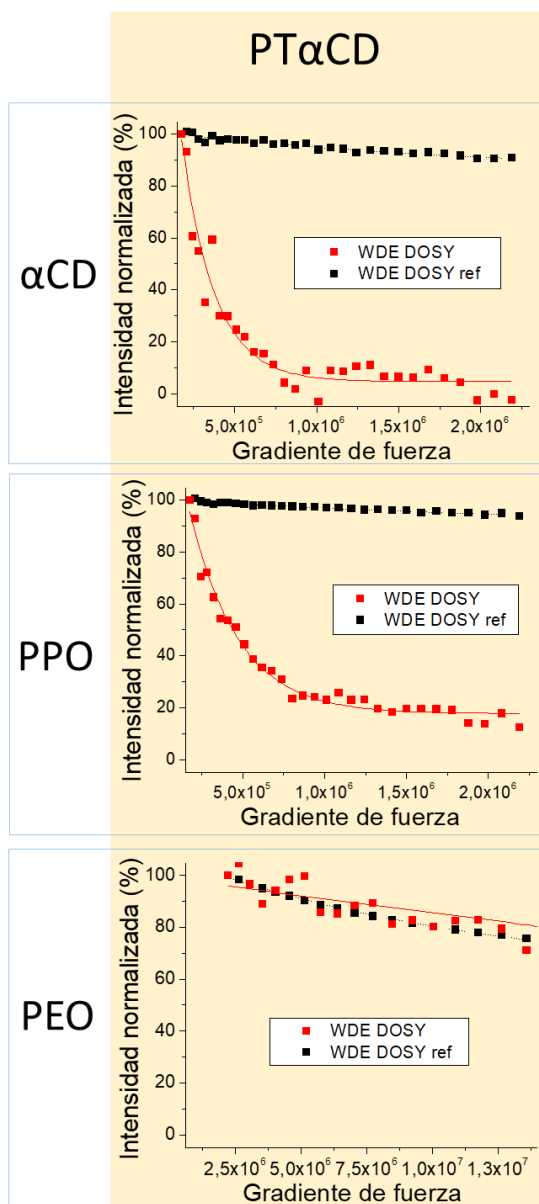


Figura 9. Estudio WDE-DOSY de la mezcla ternaria PTαCD. Curvas de atenuación de intensidad WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la αCD y los grupos PPO y PEO. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

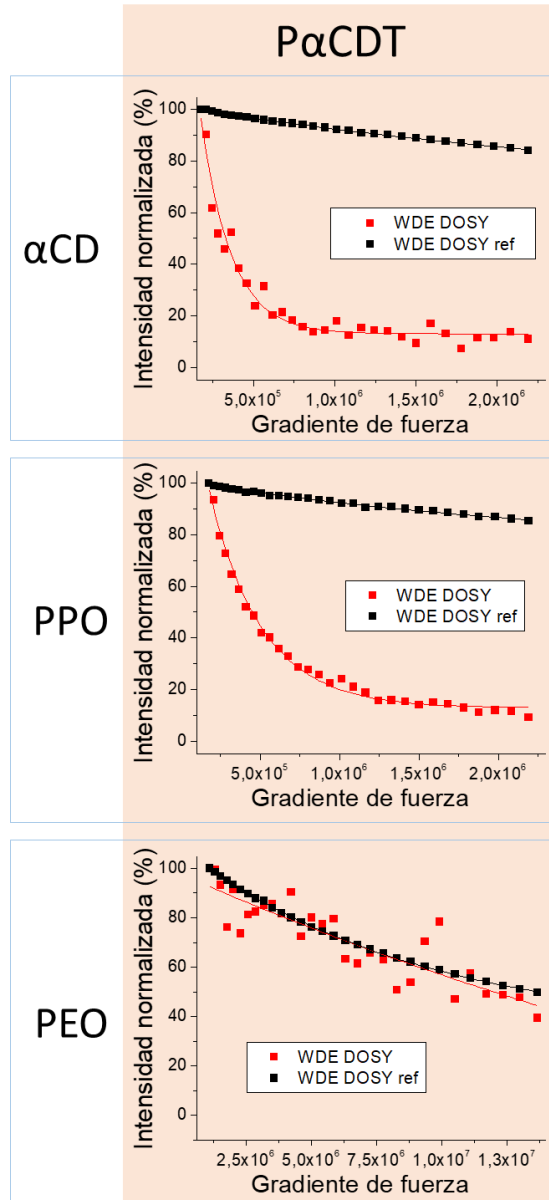


Figura 10. Estudio WDE-DOSY de la mezcla ternaria Pa α CDT. Curvas de atenuación de intensidad WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la α CD y los grupos PPO y PEO. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app}

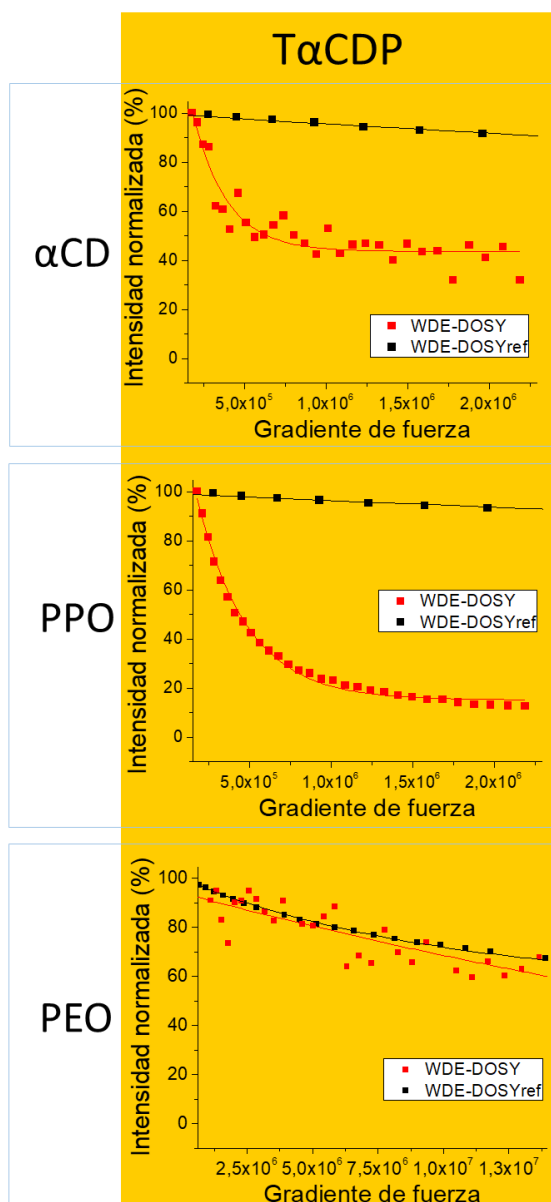


Figura 11. Estudio WDE-DOSY de la mezcla ternaria Ta α CDP. Curvas de atenuación de intensidad normalizada WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref} para la α CD y los grupos PPO y PEO. Una curva con un decaimiento más rápido para WDE-DOSY que WDE-DOSY^{ref} refleja un incremento en el coeficiente de difusión del soluto dando como resultado un coeficiente de difusión aparente del mismo, D_p^{app} .

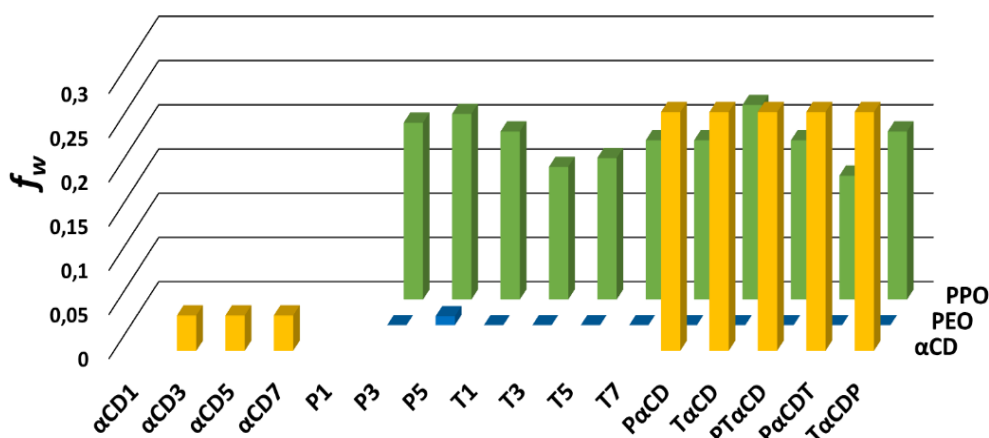


Figura 12. Representación de los factores de renovación de agua (f_w), obtenidos mediante WDE-DOSY, presentados por la α CD y los grupos PEO y PPO del P y/o T en las diferentes muestras estudiadas.

3.1.2. Características de las microesferas.

El diámetro medio de las microesferas de PLA-S conteniendo 17β -estradiol fue de $78,9 \mu\text{m}$ ($10\% < 27,9 \mu\text{m}$ y $90\% < 124,4 \mu\text{m}$) y de $108,1 \mu\text{m}$ ($10\% < 70,2 \mu\text{m}$ y $90\% < 149,4 \mu\text{m}$) para las microesferas de PLGA encapsulando BMP-2. En la Figura 13 se muestran imágenes obtenidas mediante SEM de ambos tipos de microesferas. La eficiencia de encapsulación fue del $90,6 \pm 4\%$ para el 17β -estradiol y del $60 \pm 7\%$ para la BMP-2.

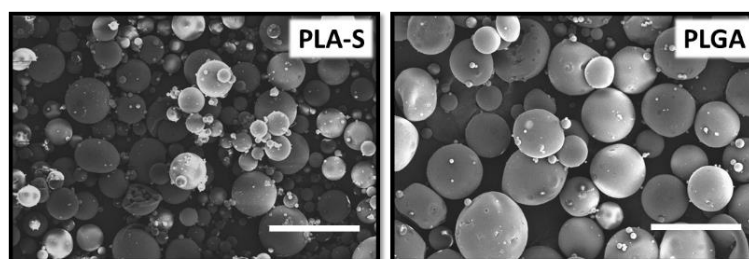


Figura 13. Imágenes de las microesferas de PLA-S and PLGA obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran su morfología. Barra de escala = $200 \mu\text{m}$.

3.1.3. Viabilidad celular.

En la Figura 14 (imagen superior) se muestran las rMSCs homogéneamente distribuidas en el sistema P/T/CD 11/7/7 recién preparado. Los resultados de los estudios de citometría de flujo se exponen en la Figura 14 (imagen inferior). En el gráfico de puntos de la izquierda se representa la población de células en función de la luz dispersada hacia delante (FSC) que nos da información acerca del volumen de la partícula y de la dispersión lateral (SSC) que nos da información de la complejidad interna de dichas partículas. En el mismo, aparece acotada la población utilizada en el estudio para descartar ruido y poblaciones residuales. En el gráfico de densidad de puntos de la derecha se representa la intensidad de fluorescencia verde (calceína AM) en el eje “y” y de fluorescencia roja (PI) en el eje “x”. La población de células vivas marcadas con calceína-AM aparece en la esquina superior izquierda de la gráfica, mientras que la población de células muertas y no sanas, que pierden la integridad de su membrana, aparecen en la parte inferior derecha. Las gráficas de densidad obtenidas del análisis de citometría de flujo indicaron que el 98% de las células estaban vivas después de 5 días de cultivo en el gel.

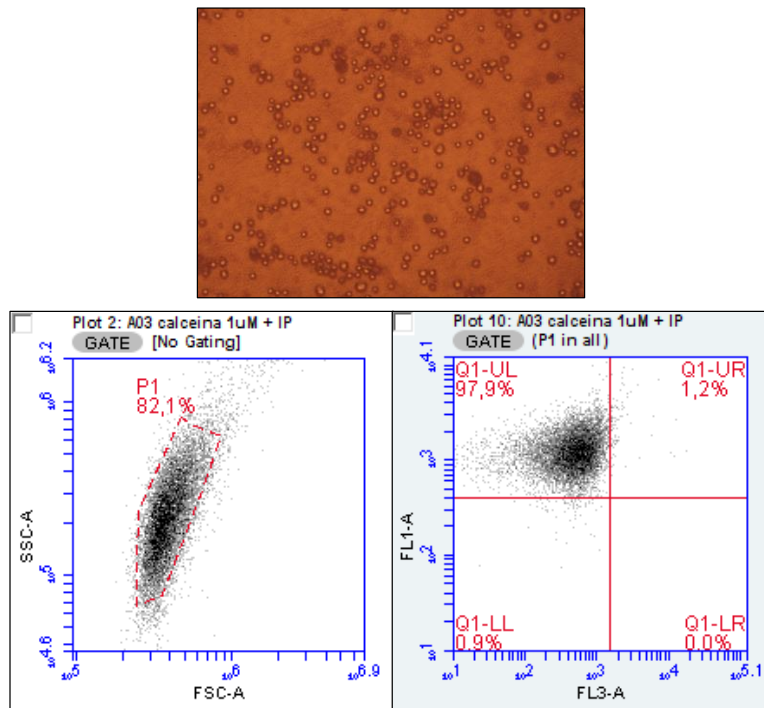


Figura 14. Viabilidad de las rMSC en el sistema P/T/CD 11/7/7. Las células se encuentran homogéneamente distribuidas en el gel inmediatamente después de su formación (imagen superior). Después de 5 días de cultivo, se recolectaron las células y se tiñeron con calceína-AM y yoduro de propidio y se analizaron con un citómetro de flujo. El gráfico de puntos de la derecha muestra las características de la población de células tomadas para el estudio y en el de la izquierda aquellas que están vivas (cuadrante superior izquierdo) o muertas (cuadrante inferior derecho).

Diferenciación osteogénica in vitro.

Los resultados del estudio de diferenciación osteogénica *in vitro* de las rMSCs (pase 2) a lo largo de 21 días mostraron que tras 7 días algunas células mostraban una tinción positiva a fosfatasa alcalina (Figura 15A). A los 14 días se aprecia un mayor número de células teñidas (Figura 15B), mientras que a los 21 días se observó un importante aumento en el número de células con tinción osteogénica positiva (Figura 15C y D).

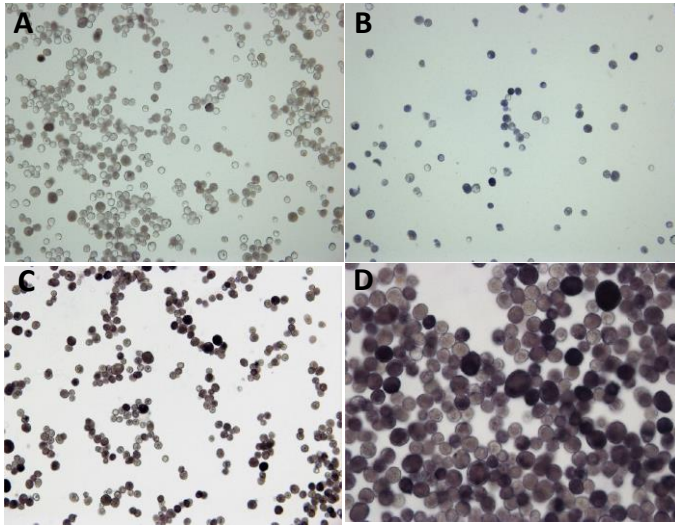


Figura 15. Tinción de la fosfatasa alcalina de las rMSCs encapsuladas en el sistema P/T/CD 11/7/7. Las células que expresan fosfatasa alcalina se tiñeron de azul tras 7 (A, 20x), 14 (B, 20x) y 21 (C, 20x y D, 40x) días de diferenciación osteogénica.

3.2. Caracterización *in vitro* del sistema completo.

3.2.1. Liberación *in vitro* de sustancias activas y uniformidad de dosis.

El sistema es capaz de modular la liberación *in vitro* del 17β -estradiol y de la BMP-2 únicamente en las primeras horas (Figura 16). Se observó un perfil de cesión similar para ambos fármacos con aproximadamente un 50% liberado a lo largo de la primera semana y el 60-65% al cabo de 4 semanas.

Por otro lado, los resultados del test realizado con la jeringa de 1 mL (20G) mostraron que el sistema es fácilmente inyectable y descarga dosis uniformes del 90,2 % \pm 5% de la dosis teórica.

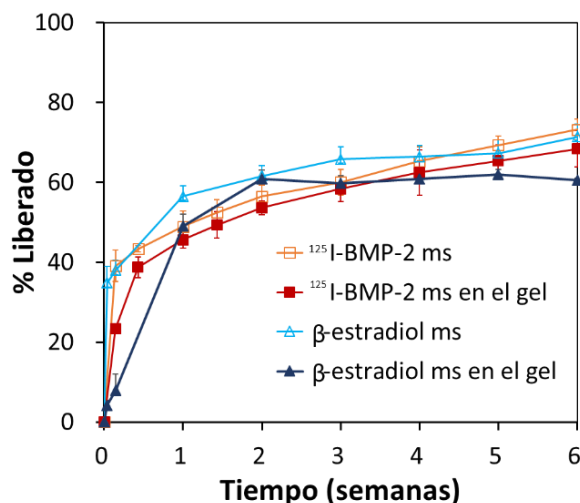


Figura 16. Perfiles acumulados de liberación *in vitro* de BMP-2 y 17β-estradiol obtenidos a partir de formulaciones incubadas en tampón fosfato pH 7,4 para la liberación de la BMP-2 y en tampón fosfato pH 7,4:MeOH (50:50) para la liberación del 17β-estradiol a 37 °C (n=3).

3.2.2. Propiedades reológicas.

En concordancia con los resultados obtenidos con la prueba del tubo invertido, el sistema P/T/CD 11/7/7 gelificó con la temperatura (Figura 17) y presentó una viscosidad máxima alrededor de 37 °C. Este incremento no se apreció para el mismo sistema en ausencia de αCD.

Teniendo en cuenta la potencial aplicación en regeneración ósea de defectos críticos, donde distintas sustancias activas con diferentes perfiles de liberación pueden ser requeridas, se estudió también el comportamiento reológico del sistema ternario conteniendo las microesferas de PLA-S/PLGA (250 mg/mL) dispersas en el seno del gel. En este caso, se produce un incremento de la viscosidad y un aumento de la viscosidad máxima a valores más bajos de temperatura (Figura 17).

El comportamiento viscoelástico medido por reometría oscilatoria (Figura 18) mostró resultados concordantes con el perfil de viscosidad obtenido. La temperatura de gelificación, tomada como aquella a la que el módulo

elástico (G') pasa a ser mayor que el módulo viscoso (G''), resultó estar próxima a los 28 °C para el sistema ternario, tanto recién preparado como el reconstituido después de liofilizar, desplazándose ligeramente hasta los 29,5 °C cuando se añadieron las microesferas.

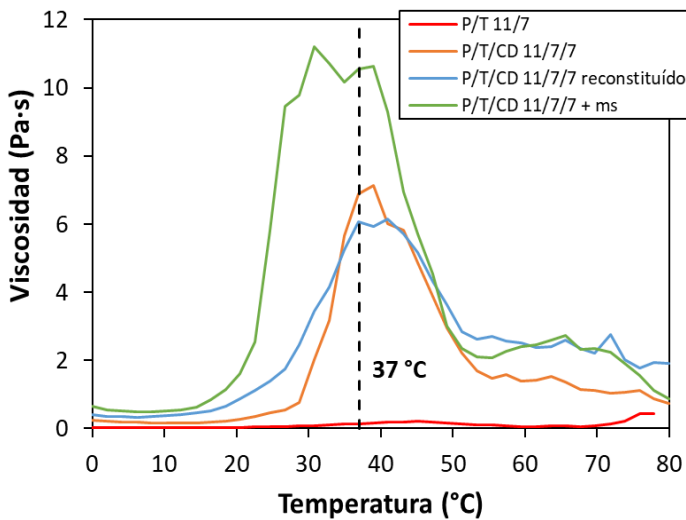


Figura 17. Evolución de la viscosidad con la temperatura de la solución P/T 11/7 (línea roja) y sistema supramolecular P/T/CD 11/7/7 en tampón fosfato pH 7,4 recién preparado (línea naranja), reconstituido después liofilización (línea azul) y con microesferas (ms) de PLA-S/PLGA (250 mg/ml) (línea verde).

El análisis de la variación de la viscosidad del hidrogel P/T/CD 11/7/7 conteniendo microesferas de PLA-S y PLGA (250 mg/mL) con la velocidad de cizalla, demostró que el sistema disminuía su viscosidad a medida que aumentaba la velocidad, tanto a 20 °C (Figura 19), como a 37°C. El ciclo de aumento-disminución de la velocidad de cizalla aplicado permitió constatar que se trata de un sistema que recupera sus características iniciales cuando el esfuerzo cesa.

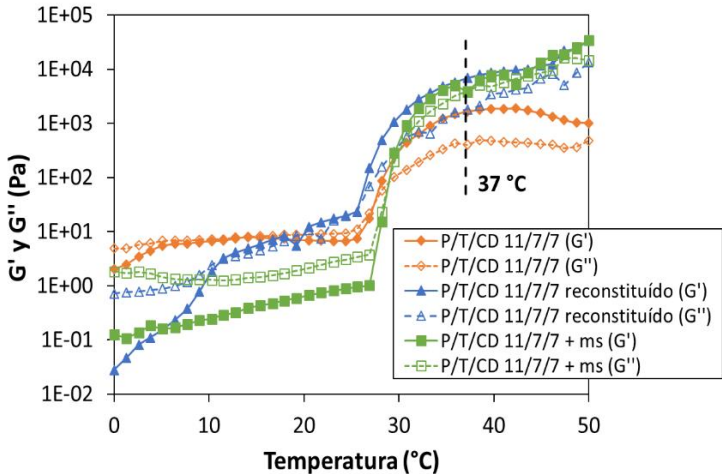


Figura 18. Evolución de los módulos elástico (G' , símbolos rellenos) y viscoso (G'' , símbolos vacíos) del sistema supramolecular P/T/CD 11/7/7 recién preparado (líneas rojas), reconstituido después de liofilizar (líneas azules) y con microesferas (ms) de PLA-S / PLGA (250 mg/ml) (líneas verdes).

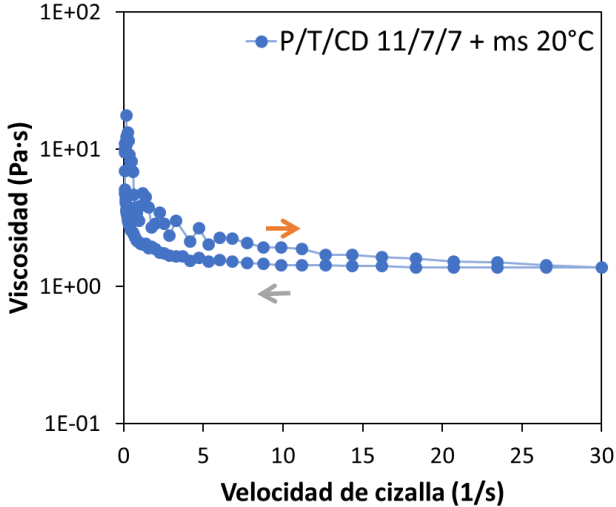


Figura 19. Comportamiento viscoelástico del sistema P/T/CD 11/7/7 con microesferas de PLA-S y PLGA (250 mg/mL) a 20 °C en el que se representa la variación de la viscosidad en función de la velocidad de cizalla aplicada.

3.2.3. Estructura interna y porosidad.

Se evaluó la estructura interna de la mezcla ternaria, con y sin microesferas (250 mg/mL), recién preparado y tras incubación en medio acuoso durante varias semanas a 37 °C.

Las imágenes del SEM (Figura 20) revelan que los geles liofilizados presentan, inicialmente, poros uniformemente distribuidos de un diámetro medio de 4,36 μm (SD \pm 1,36 μm). La porosidad del gel conteniendo microesferas es menor, 75% (SD \pm 1%) frente a 81% (SD \pm 1%) del gel sin microesferas. Durante las 4 semanas de incubación en tampón fosfato se observó un lento aumento de la porosidad en ambos casos (Figura 21). Las imágenes del SEM (Figura 20) también mostraron un incremento en el número y tamaño de los poros con el tiempo. Para el gel sin microesferas, después de 2 semanas de incubación, se apreció un cambio en la morfología de los poros apareciendo grietas en su estructura, hecho que no ocurrió en el gel con microesferas.

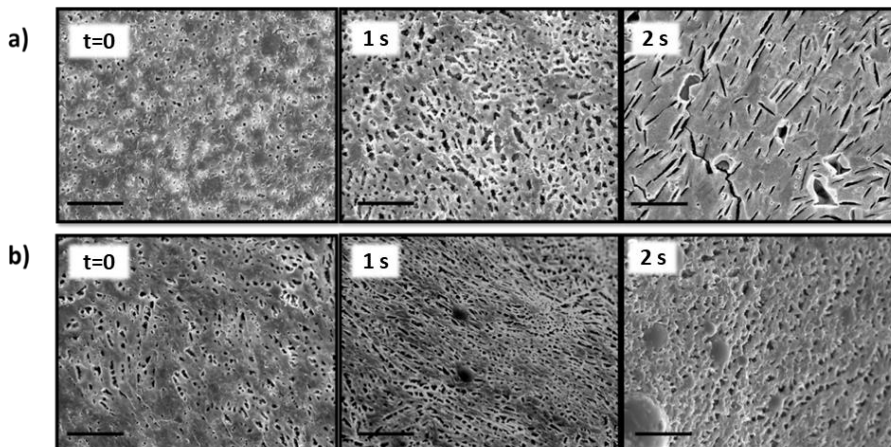


Figura 20. Imágenes SEM que muestran la estructura interna del gel P/T/CD 11/7/7 liofilizado sin (a) y con (b) microesferas (250 mg/ml), recién preparado ($t = 0$) y después de la incubación en tampón fosfato pH 7,4 a 37 °C durante 1 y 2 semanas (s). Barra de escala: 100 μm .

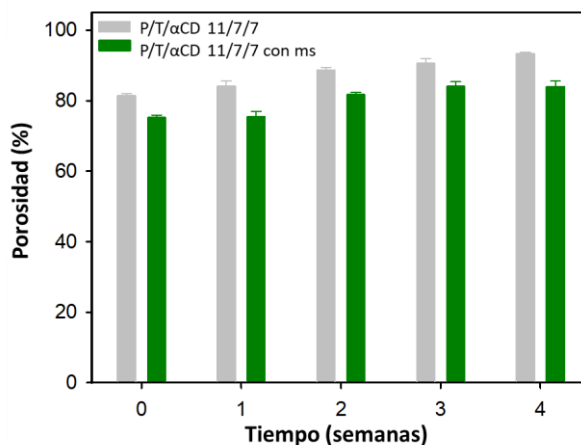


Figura 21. Evolución de la porosidad del sistema P/T/CD 11/7/7 con y sin microesferas (ms) (250 mg/mL) durante la incubación en tampón fosfato pH 7,4 a 37 °C durante 4 semanas.

3.3. Caracterización *in vivo* del sistema completo.

3.3.1. Liberación *in vivo* de la BMP-2.

El porcentaje de BMP-2 liberado desde el sistema, calculado a partir de las medidas de radiactividad remanente (^{125}I -BMP-2) en el defecto óseo realizado, mostraron que el 90% de la proteína se libera en una semana y el total en 2 semanas. Además el sistema no fue capaz de modular el efecto burst (Figura 22).

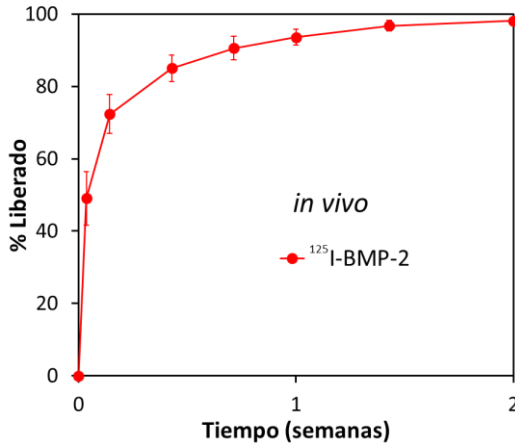


Figura 22. Perfil de liberación *in vivo* de ^{125}I -BMP-2 preencapsulado en microesferas y dispersas en el gel P/T/CD, tras su implantación en el defecto óseo practicado en la calvaria de rata. ($n=5$).

3.3.2. Análisis histológico, histomorfométrico e inmunohistoquímico.

El análisis histológico de las muestras de calvaria procedentes de animales no-OP y OP (ovariectomizados y tratados con dexametasona durante 4 semanas), muestran claras diferencias en el grosor del mismo. El hueso de animales OP fue un 35-40 % más delgado y presentaba una apariencia más porosa, con ausencia de trabéculas en la zona intercortical, por lo que esta zona fue más compacta en los animales no-OP que en los OP (Figura 23).

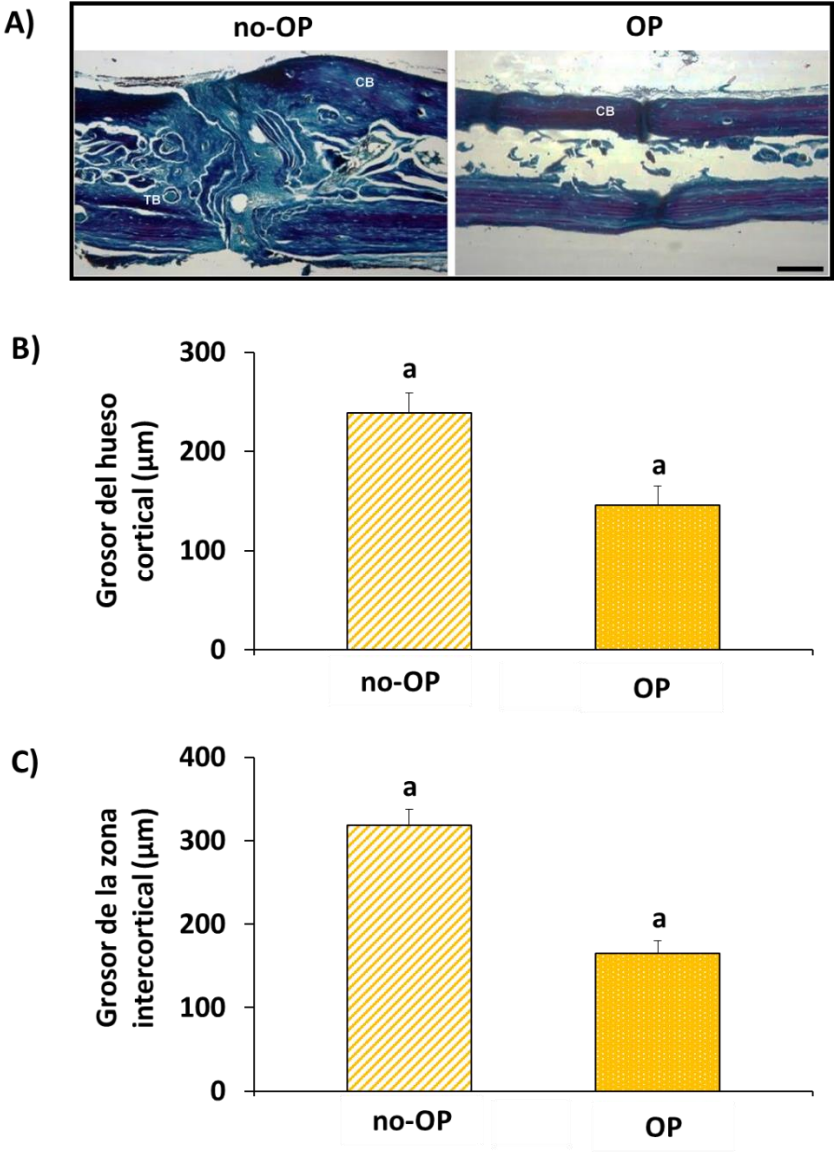


Figura 23. A) Imágenes representativas en sección transversal de la calvaria mostrando las diferencias en la microarquitectura del hueso en ratas OP y no-OP. Se observa la ausencia de hueso trabecular en las ratas OP (tinción VOF). CB: hueso compacto, TB: hueso trabecular. Barra de escala = 150 µm. B) Análisis histomorfométrico comparando el grosor del hueso cortical y C) del intercortical entre ratas OP y no-OP. Se representan los valores medios ± SD (n=3). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, p < 0,05.

El análisis de las muestras, después de 3 meses de la implantación del sistema con los diferentes tratamientos (Tabla 2), mostró que en los grupos blancos no se había producido reparación del defecto, salvo una ligera formación de hueso en los márgenes del mismo, y que la mayor parte estaba ocupado por tejido conectivo tanto en los animales OP como en los no-OP (Figura 24).

Los grupos con BMP-2 mostraron un gran porcentaje de reparación respecto a los grupos blancos. El grupo BMP de animales no-OP presentó una reparación ligeramente mayor que el mismo grupo de animales OP, 50,4% frente a 46,3% (Figura 25).

El tratamiento combinado de BMP-2 y 17β -estradiol no modificó la respuesta observada en los grupos de animales no-OP respecto a los animales tratados únicamente con BMP-2, mientras que en los grupos OP se observó un aumento significativo alcanzándose un porcentaje de reparación del 61,5% con la combinación de BMP-2 y 17β -estradiol (Figura 25).

La segunda dosis, administrada después de 6 semanas, grupo BMP- β Ex2, no modificó la respuesta observada con una sola dosis en ningún caso, ni en animales no-OP ni en los OP (Figura 25).

El análisis del hueso formado con respecto al área de hueso maduro (hueso más mineralizado) y de hueso inmaduro (hueso menos mineralizado) muestra que hay diferencias significativas entre los animales OP y los no-OP. La tasa estimada entre las áreas de hueso maduro e inmaduro (MB/IB) muestra una mayor mineralización en el hueso formado en los animales no-OP que en los OP, independientemente del tratamiento (Figura 26).

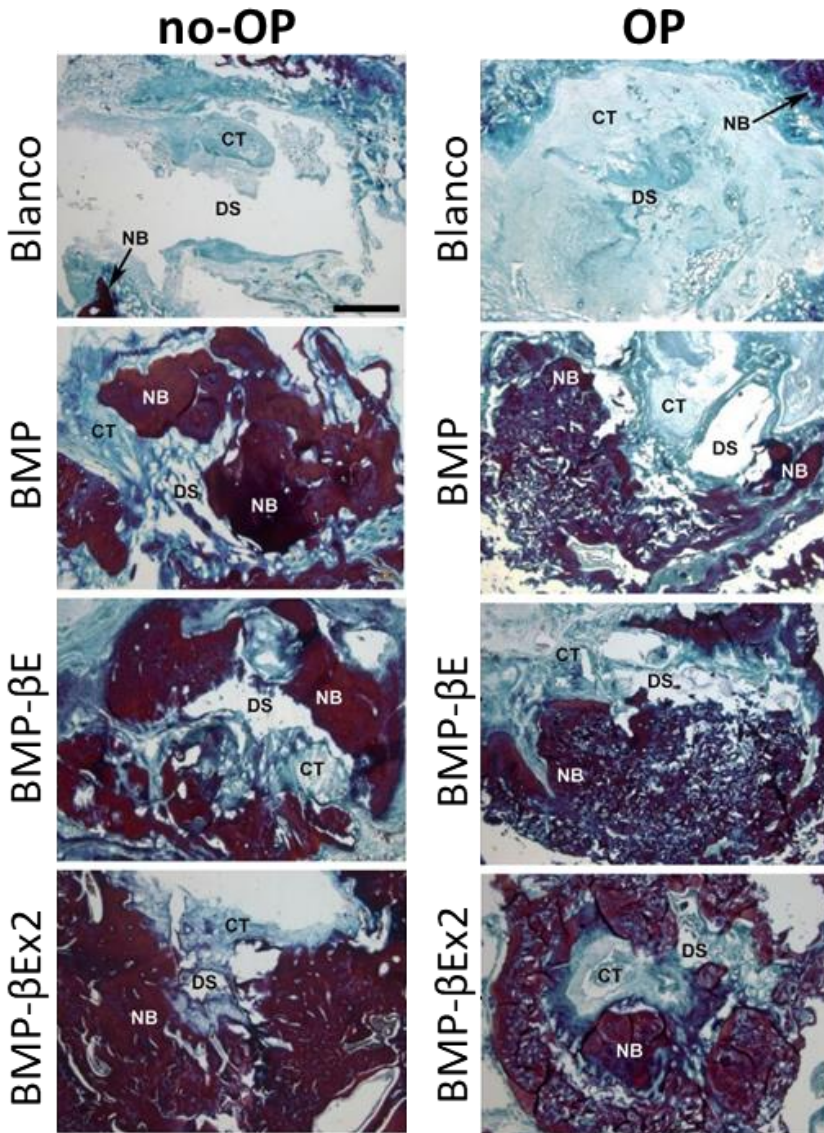


Figura 24. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto en la calvaria mostrando el nivel de regeneración en los diferentes grupos experimentales a las 12 semanas desde la implantación, en ratas OP y no-OP. CT: tejido conectivo; NB: hueso nuevo, DS: Defecto sin rellenar. Barra de escala = 1,5 mm.

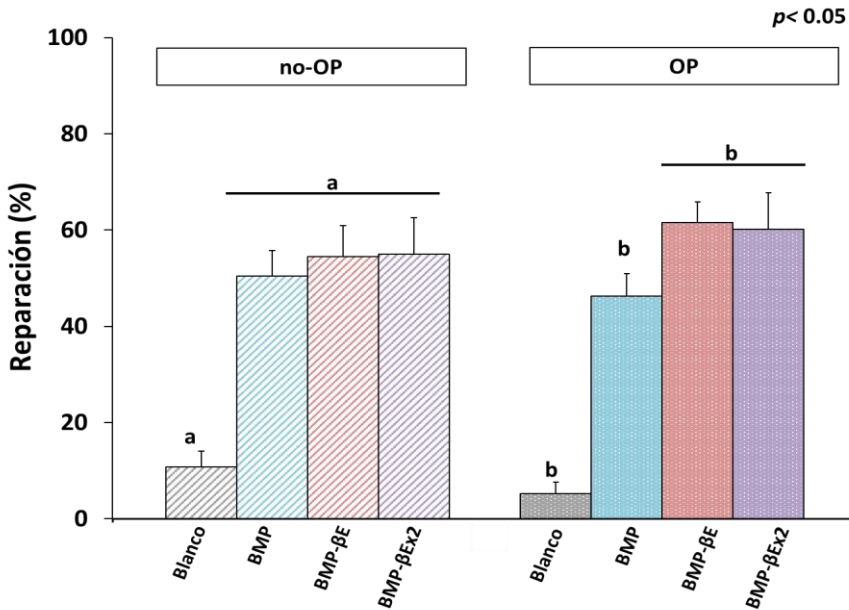


Figura 25. Análisis histomorfométrico comparando los porcentajes de reparación en los diferentes grupos experimentales a las 12 semanas desde la implantación. Se representan los valores medios \pm SD ($n=3$). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

La detección inmunorreactiva, en el hueso formado, de colágeno tipo I, un marcador de osteogénesis temprana, mostró diferencias significativas entre los grupos blancos y los grupos tratados, tanto en animales no-OP como en los OP. También y, solamente en los animales OP, se observó una tinción relativa significativamente mayor en el grupo tratado con la combinación de BMP-2 y 17β -estradiol frente al grupo tratado con BMP-2 sola (Figuras 27A y 28). Sin embargo, no se apreciaron diferencias al comparar en conjunto los grupos OP y no-OP.

También se observaron diferencias significativas en la detección inmunorreactiva de osteocalcina, un marcador de la osteogénesis tardía y de la mineralización, entre los grupos blancos y los tratados en ambas clases de animales, OP y no-OP, pero sin diferencias significativas entre los

distintos tratamientos. Sin embargo, al contrario que con el colágeno I, en este caso, sí se apreciaron diferencias entre los grupos no-OP y OP en la expresión de osteocalcina. Los grupos no-OP presentan intensidades de tinción relativa mucho mayores que los OP (Figuras 27B y 29).

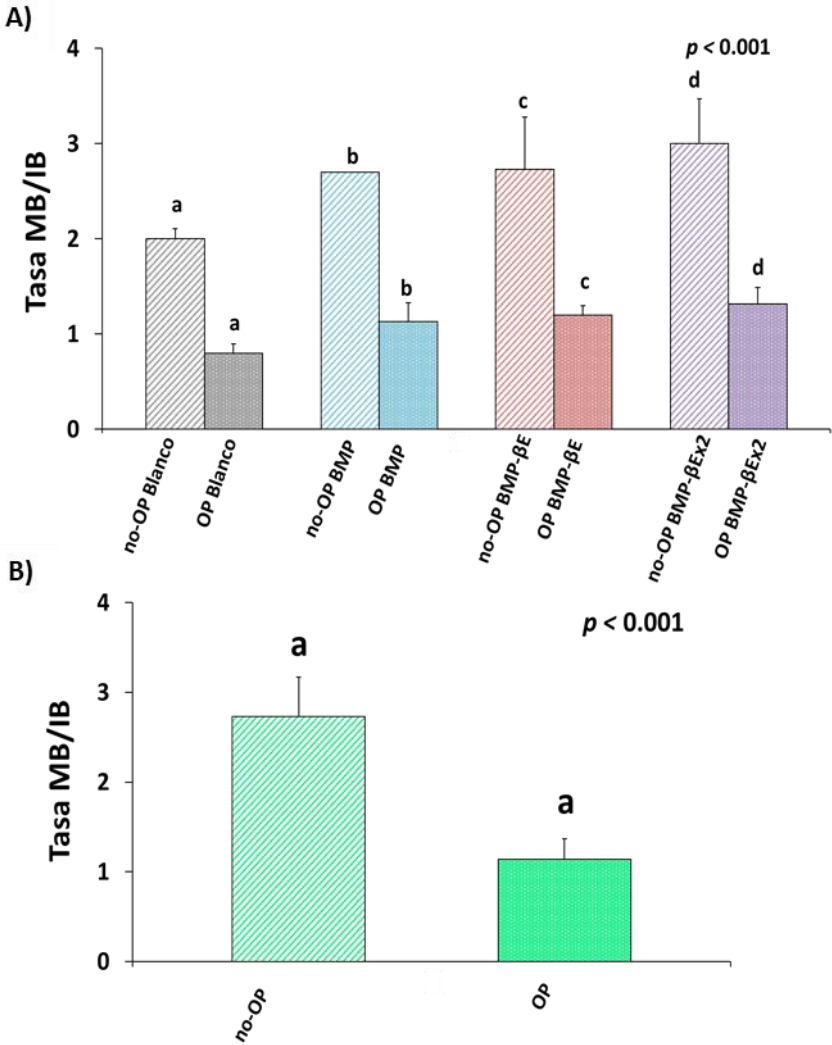


Figura 26. Análisis histomorfométrico mostrando la tasa de hueso maduro/hueso inmaduro (MB/IB) A) en los diferentes grupos experimentales y B) entre las ratas OP y las no-OP. Se ha estimado utilizando la tinción VOF. Se representan los valores medios \pm SD (n=3). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,001$.

Elaboración y caracterización de geles supramoleculares de polipseudorrotaxanos. Aplicación a un defecto óseo crítico en ratas osteoporóticas.

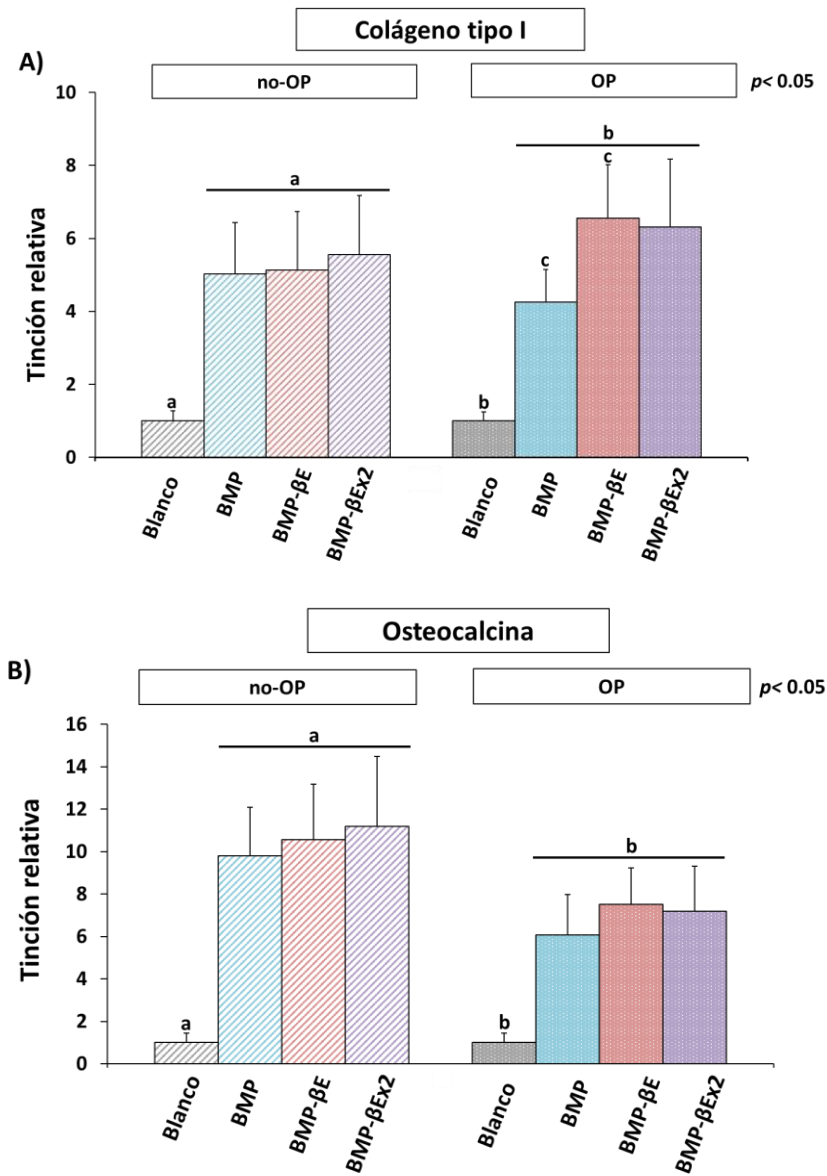


Figura 27. Análisis histomorfométrico mostrando los valores de inmunorreacción para A) el colágeno tipo I y B) osteocalcina en los diferentes grupos experimentales, a las 12 semanas desde la implantación. Se representan los valores de tinción relativa con respecto al obtenido en el grupo blanco. Valores medios \pm SD (n=3). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

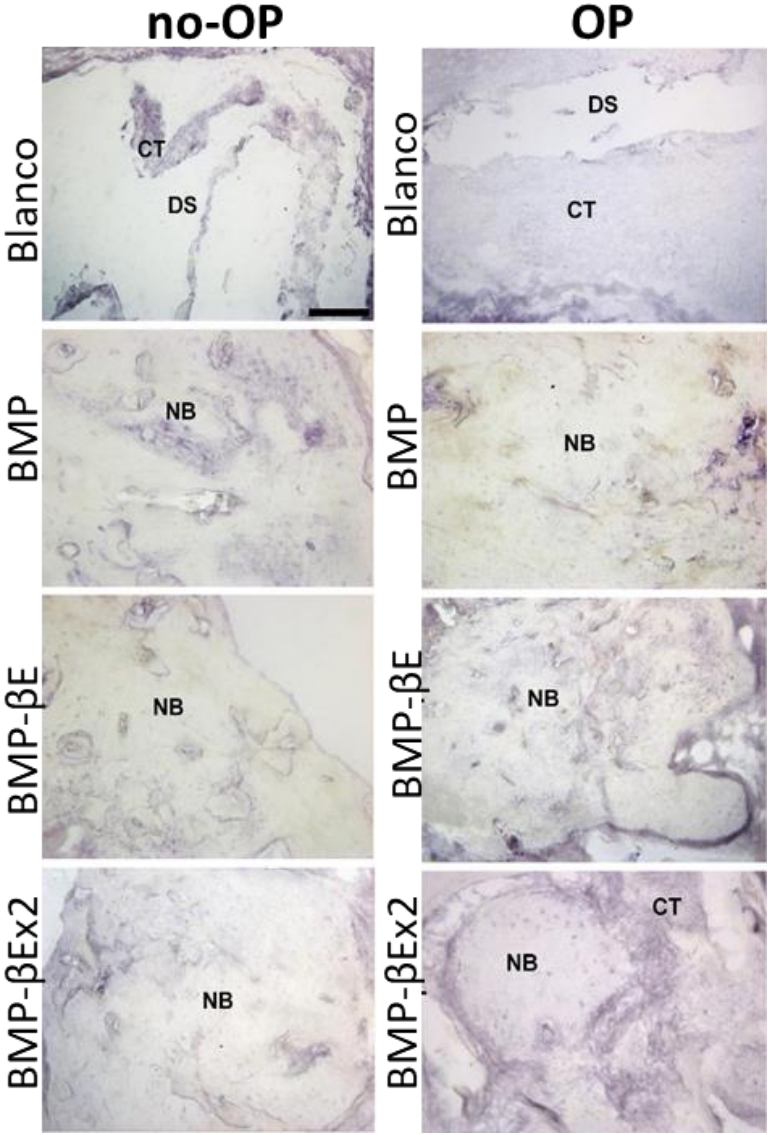


Figura 28. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto crítico en la calvaria de ratas OP y no-OP mostrando la inmunorreacción para el colágeno tipo I en los diferentes grupos experimentales, a 12 semanas de la implantación. CT: tejido conectivo, NB: hueso nuevo, DS: Defecto sin rellenar. Barra de escala = 300 μm.

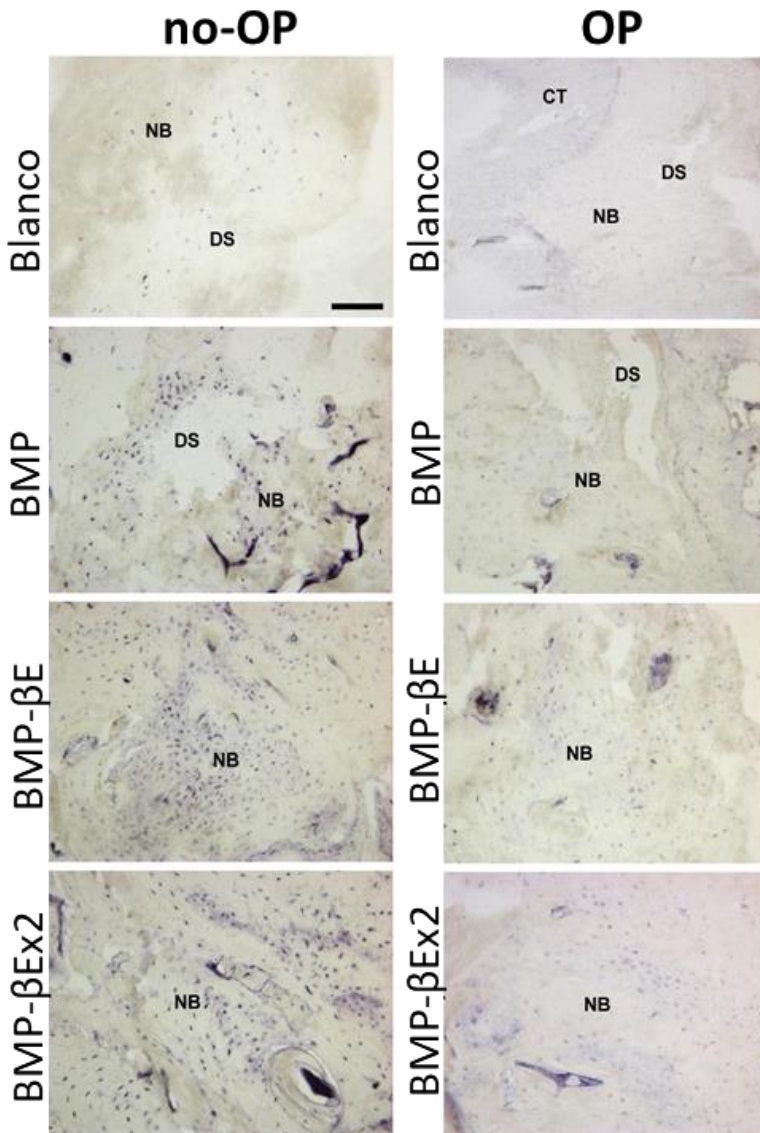


Figura 29. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto crítico en la calvaria de ratas OP y no-OP mostrando la inmunorreacción para la osteocalcina en los diferentes grupos experimentales, a 12 semanas de la implantación. CT: tejido conectivo, NB: hueso nuevo, DS: Defecto sin rellenar. Barra de escala = 300 μm .

4. Discusión.

El gel, diseñado y elaborado en esta etapa del trabajo, es inyectable y gelifica a la temperatura corporal a través de dos mecanismos reversibles de entrecruzamiento que hacen que las redes formadas se refuercen a dicha temperatura. El autoensamblaje tiene lugar por la disposición cristalina de las α CD y por las interacciones entre los grupos PPO de las cadenas poliméricas. Si bien es cierto que la combinación de un único polímero con α CD ha sido ampliamente estudiada (Zhao y Xu, 2010; Sui et al., 2010; Simões et al., 2013; González-Gaitano et al., 2015), la combinación de dos polímeros con diferente estructura (uno de ellos un poloxámero lineal, P y otro una poloxamina con forma de X) con α CD para la formación de estructuras supramoleculares, no había sido explorada hasta ahora. Por ello, en este trabajo se ha realizado una caracterización exhaustiva de la formulación P/T/CD 11/7/7.

Los experimentos de difusión DOSY han permitido conocer los coeficientes de difusión de los componentes por separado, a diferentes concentraciones, y en las mezclas binarias y ternarias. Los valores que se han obtenido para la α CD están de acuerdo con los esperados para el tamaño de la molécula de α CD libre, y la diferencia de valores entre las muestras puede ser debida al efecto de la viscosidad inducida por el cambio de concentración y a un cierto grado de auto-ensamblaje de la α CD.

Los coeficientes de difusión obtenidos con los mismos experimentos para el P y el T aportan valores consistentes con el mayor tamaño de estos polímeros (12.600 y 18.000 Da para el P y el T, respectivamente). Se aprecia una diferencia significativa en los coeficientes de difusión de los polímeros cuando se aumenta su concentración que no puede ser atribuida sólo a la variación en la viscosidad, sino también a la formación de agregados de gran tamaño. Debe tenerse en cuenta que la concentración crítica micelar (CCM) de ambos polímeros es ligeramente inferior al 1% w/w, y que, además, a medida que la concentración de polímero aumenta, también lo hace el tamaño y la cantidad de micelas (González-López et al., 2008).

El experimento WDE-DOSY (Figura 1a) tuvo como objetivo determinar la accesibilidad del agua a determinados lugares de un soluto. La metodología originariamente propuesta por Moonen et al. (1992) con algunas variantes, ha sido utilizada previamente para medir las tasas de intercambio de protones lábiles de un soluto con el agua, por ejemplo, las tasas de intercambio de los protones de las aminos de péptidos y proteínas (Moonen et al., 1992; Dötsch y Wider, 1995; Liu et al., 1999; Seba et al., 2006; Brand et al., 2007). Sin embargo, es la primera vez que se utiliza esta metodología (experimento WDE-DOSY) para obtener información acerca de la hidratación de los protones no lábiles de un soluto.

La metodología propuesta consiste en la medida de tres tipos de experimentos de tipo DOSY, nombrados como 1) WDE-DOSY, 2) WDE-DOSY^{ref} y 3) un espectro DOSY, que fue optimizado para medir la difusión del agua en muestras que contenían una alta proporción de agua no deuterada ($\geq 90\%$ H₂O) (experimento DOSY-H₂O). A partir de estos espectros se han determinado los parámetros requeridos para el cálculo de f_w , D_p^{app} y D_p para cada señal de interés del soluto/s a estudiar, y D_w para la señal de la difusión del agua en la muestra. Como se mencionó, el factor de renovación de agua, f_w , mide la fracción de tiempo en la que el agua retenida por el soluto es liberada al medio en relación a un determinado periodo de tiempo que se fija en el experimento (Δ), de tal manera que un valor de f_w de 0 significa que las moléculas de agua atrapadas están permanentemente unidas a algún protón del soluto durante el diferencial de tiempo. Por el contrario, un valor de f_w próximo a 1 implica un intercambio total entre el agua atrapada y el agua del medio.

En lo que se refiere a la sensibilidad del experimento WDE-DOSY, al igual que otros experimentos de RMN, esta aumenta con la concentración de soluto y con el número de scans del experimento. WDE-DOSY es un experimento de RMN cuantitativa que requiere obtener una señal de RMN con la suficiente sensibilidad sobre el nivel de ruido como para ser integrable. Por otra parte, dado que la intensidad de señal de WDE-DOSY

depende del efecto NOE de los protones del soluto con el H₂O (Figura 2), para un valor dado de la concentración de muestra y número de scans, su sensibilidad aumenta cuando se reduce la movilidad molecular del soluto. Esto implica que la sensibilidad por scan se incrementa con el tamaño molecular del soluto y con factores experimentales que afecten a la movilidad molecular, como pueden ser el aumento de la viscosidad de la disolución o la reducción de la temperatura. En los resultados obtenidos, la baja sensibilidad registrada para las muestras α CD1 y P1 no permitieron el cálculo de los coeficientes de difusión aparentes, sin embargo, sí pudieron medirse para las muestras más concentradas.

El coeficiente D_p^{app} obtenido para α CD5 es mayor que el D_p de la misma muestra (Tabla 3), lo que confirma la obtención de un coeficiente incrementado por el efecto del equilibrio entre el soluto y el agua. Sin embargo, esta diferencia no es suficiente para explicar el bajo valor de la tasa de intercambio de agua ($f_w = 0,04$). Esto último implica que existen moléculas de agua en las proximidades de la cavidad interna de la α CD que están fuertemente unidas y que sufren una muy baja renovación durante el incremento de tiempo del experimento WDE-DOSY ($\Delta = 500$ ms).

El análisis de los resultados obtenidos para la muestra P5 (Figura 5) sugirió que para los grupos PEO el decaimiento de la curva es similar para ambos espectros, WDE-DOSY y WDE-DOSY^{ref}, mientras que los obtenidos para los grupos PPO son considerablemente diferentes, observándose una atenuación de la intensidad mucho más marcada en el espectro WDE-DOSY. Esto se traduce en valores de f_w significativamente diferentes para ambos grupos (Tabla 3). Además, este comportamiento se repite para el resto de las muestras de P (P3 y P5), lo que implica que las moléculas de agua unidas a los protones de los grupos PPO del Pluronic se renuevan constantemente, en cambio, el valor casi nulo de f_w correspondiente a los grupos PEO de las muestras de P (Tabla 3), demuestra que las moléculas de agua unidas a los protones de estos grupos no sufren apenas renovaciones en el tiempo de difusión tomado ($\Delta = 500$ ms).

Los resultados obtenidos para el Tetronic, son similares a los obtenidos para el P, demostrando nuevamente que las moléculas de agua están situadas en las proximidades de los protones de ambos grupos, pero que sólo en el caso de los grupos PPO se renuevan en el intervalo de tiempo que se ha tomado para la realización del experimento ($\Delta = 500$ ms).

Cuando el experimento se llevó a cabo con las mezclas binarias y ternarias de P, T y α CD (Figuras 7 a 11) se observó el mismo comportamiento de los grupos PPO y de los PEO que el que se obtuvo para las muestras de P y T por separado. En cambio, el comportamiento de la α CD en los sistemas binarios y ternarios varió considerablemente respecto a la disolución de α CD sola. En las mezclas binarias y ternarias se produjo una atenuación de la intensidad, obtenida con el espectro WDE-DOSY, que resultó en un aumento considerable del f_w de la α CD. Esto implica que, una vez se forman las estructuras supramoleculares, se produce un importante intercambio del agua atrapada que está unida a los protones de los anillos de glucosa de la α CD durante 500 ms. En general, estos resultados indican que el P o el T, cuando se mezclan con la α CD, modifican considerablemente las características de solvatación de los protones de los anillos de la molécula de α CD, los cuales están situados su cavidad interna. El valor tan bajo de f_w obtenido para la α CD sola puede indicar que las moléculas de agua atrapadas en la α CD forman, junto con los protones de las moléculas de glucosa, un grupo muy estable en su cavidad. De manera diferente, en las mezclas binarias de α CD y P o T se forma un polipseudorrotaxano complejo muy estable (Simões et al., 2014; Valero et al., 2016) y las unidades PEO ocupan la cavidad interna de las moléculas disponibles de α CD. De esta manera, la entrada de moléculas de agua en la α CD y la posibilidad de que ocupen posiciones más estables se reduce considerablemente en las mezclas binarias y ternarias estudiadas, lo cual se refleja en los valores más altos de f_w .

En resumen, los estudios de RMN confirman que se forman estructuras de polipseudorrotaxanos (Figura 30) en ambos casos, mezclas binarias y mezclas ternarias, causando una importante variación en la movilidad de

las especies de α CD (decrece) y en la movilidad del agua interna (se incrementa). Respecto a los copolímeros, el hecho de que se enhebran en la α CD formando polipseudorrotaxanos hace que la movilidad de las cadenas sea tan baja como cuando los copolímeros forman micelas. Debido a que se espera que sólo las unidades PEO sean las que se localicen en las cavidades de la α CD, previsiblemente, los grupos PPO quedarán disponibles para interactuar unos con otros (como ocurre en el caso de las micelas) explicándose así el mantenimiento de la respuesta a la temperatura en los sistemas ternarios.

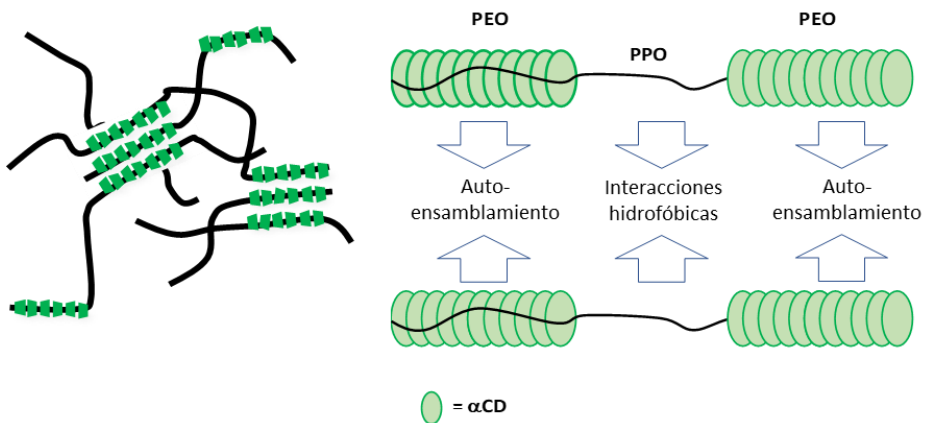


Figura 30. Modelo estructural de polipseudorrotaxano formado por la asociación en disolución de los componentes α CD, P y ó T.

Los resultados obtenidos mediante el estudio reológico del sistema hidrogel elegido como óptimo permitieron concluir que las formulaciones ternarias, ya sean recién preparadas, reconstituidas o con microesferas, pueden ser fácilmente inyectables con una jeringa, manteniendo la transición sol-gel con la temperatura. Incluso antes de alcanzar la temperatura corporal, antes de los 30 °C, las unidades PEO se enhebran en las cavidades de la α CD facilitando el contacto de los grupos PPO entre sí provocando un ensamblaje inducido por la temperatura, lo que se traduce en un aumento considerable de la viscosidad (Figura 17).

Además, se ha comprobado que la unión de los dos copolímeros, sin ciclodextrina, sistema P/T 11/7 (Figura 17), no parece ser suficientemente

fuerte para causar un cambio significativo en la viscosidad del sistema. Debe tenerse en cuenta que se eligió la concentración mínima de cada polímero que en presencia de α CD provoca gelificación *in situ*. Por lo tanto, la formación de polipseudorrotaxanos (verificados con los estudios de RMN) jugaron un papel claro tanto a 4 °C como a 37 °C. Por debajo de la temperatura de gelificación, la adición de la ciclodextrina, y por tanto la formación de un polipseudorrotaxano, provocó un claro incremento de la viscosidad del sistema ($\approx 0,5$ Pa·s), en comparación con la viscosidad del agua (0,001 Pa·s) y con el sistema binario P/T 11/7 (0,05 Pa·s).

Desde un punto de vista práctico, es interesante destacar que las propiedades reológicas del sistema ternario no se ven afectadas tras la liofilización y reconstitución (Figura 17), lo que supone una ventaja para la comercialización, tanto en cuanto a la durabilidad como a la rapidez en la preparación de éste.

Además, teniendo en cuenta que estos sistemas ternarios serán aplicados para regeneración ósea conteniendo microesferas de distintas sustancias activas, se han estudiado las modificaciones en las características del gel debidas a su presencia. La adición de microesferas al P/T/CD 11/7/7 reflejó un aumento de viscosidad lo que sugiere que se produce una unión/adsorción de las cadenas de polímeros (P y T) sobre la superficie de las microesferas como previamente se observó en otros sistemas de liberación de fármacos expuestos a cadenas de polímeros libres (Dunn et al., 1997; Shuhra et al., 2014). En este sistema, el máximo de viscosidad se alcanza a una temperatura menor que en el sistema sin microesferas, lo cual refuerza la hipótesis de las interacciones hidrofóbicas entre los grupos PPO y la superficie de las microesferas de PLA-S/PLGA. Esto último concuerda con lo observado en los estudios de RMN en los cuales no se ve alterado el ambiente de los grupos PPO en los polipseudorrotaxanos, y con los resultados obtenidos en el estudio de la evolución de los módulos elástico y viscoso con la temperatura (Figura 18). Por lo tanto, los grupos PPO están disponibles para interactuar con los componentes del medio,

como por ejemplo, fármacos dispersos en los geles supramoleculares (Polymeri et al., 2016).

Por otro lado, la evolución de la porosidad de los sistemas P/T/CD y P/T/CD con microesferas tras la incubación pone de manifiesto que la inclusión de las microesferas le confiere una mayor estabilidad al sistema, manteniéndose su porosidad a lo largo de 2 semanas (Figura 21), probablemente debido a la unión de los grupos PPO con los polímeros hidrofóbicos de las microesferas.

En cuanto a la compatibilidad del sistema con el entorno celular, los resultados obtenidos probaron que el sistema ternario aporta un medio adecuado para el crecimiento, proliferación y diferenciación de las rMSCs, células con un gran potencial en medicina regenerativa, (Squillaro et al., 2016; Zheng et al., 2017) y abriendo la posibilidad de ser utilizado como sistema de encapsulación de células.

Además, la respuesta del sistema frente al esfuerzo, disminuyendo su viscosidad al aumentar la velocidad de cizalla, que concuerda con lo obtenido por otros autores para geles formados por mezclas binarias de P o T con CD (Simões et al., 2012; del Rosario et al., 2015), y la gran uniformidad de las dosis descargadas desde una jeringa, hacen concluir que el sistema es idóneo para ser utilizado como sistema inyectable que garantiza la administración de sustancias activas de manera reproducible. En cuanto al control de la velocidad de cesión de las sustancias activas hay que decir que, aunque las microesferas gobiernan su liberación, el hidrogel contribuyó a modular la liberación inicial *in vitro* de ambos fármacos (Figura 16).

Por último, la evaluación del sistema P/T/CD con microesferas como andamio y sistema de cesión de factores implicados en la remodelación ósea se realizó en ratas, tal y como se ha descrito en apartados anteriores. En primer lugar, se puso a punto el tratamiento quirúrgico (ovariectomía) y farmacológico (dexametasona) para desarrollar la osteoporosis en los animales. Al contrario de muchos autores que utilizan histomorfometría o

densitometría de huesos largos para confirmar la condición de osteoporosis, en este estudio se analizó histológicamente la calvaria de las ratas, de acuerdo con el modelo animal seleccionado. Desde nuestro punto de vista, es esencial que el hueso en el que se practica el defecto y que se pretende utilizar para valorar la eficacia regenerativa del sistema desarrollado, presente signos evidentes de afectación osteoporótica. Se observó una estructura más porosa, con corticales más finas y pérdida de la microarquitectura trabecular en los animales OP, confirmando que el tratamiento utilizado para inducir la osteoporosis fue el adecuado, por lo que se validó el modelo osteoporótico.

Aunque es cierto que el efecto regenerativo de la BMP-2 en defectos críticos ha sido ampliamente estudiado durante las últimas 2 décadas, la escasez y lo contradictorio de los resultados referentes a la regeneración ósea en condiciones de osteoporosis (Segredo-Morales et al., 2017) hizo necesario el planteamiento de una estrategia que contemplara algunas deficiencias específicas de esta patología. Por ello, las sustancias activas utilizadas fueron BMP-2 y 17β -estradiol. Los análisis histológicos del tejido formado en el defecto por la acción de los distintos tratamientos pusieron en evidencia una menor respuesta osteogénica en el grupo de animales OP. Incluso con los scaffolds blancos que indujeron un pobre efecto regenerativo, insuficiente para ser considerados útiles desde un punto de vista osteogénico, las diferencias son apreciables entre OP y no-OP. Con respecto al efecto de la BMP-2, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en términos de área reparada, se apreció una menor respuesta en el grupo OP. Estas observaciones confirmaron un retraso en el proceso de formación ósea consecuencia de la osteoporosis. Además, la adición de 17β -estradiol, como era de esperar, potencia el efecto de la BMP-2 solamente en el grupo de animales OP. Los resultados referentes a la presencia de colágeno tipo I confirmaron los datos de reparación. La expresión de colágeno tipo I, un marcador de la osteogénesis temprana, fue significativamente mayor en animales OP tratados con la combinación de BMP-2 y 17β -estradiol, indicando un incremento de la

osteosíntesis. La deficiencia de estrógenos causa la OP post-menopáusica debido a que estos están implicados en la remodelación ósea modulando tanto las acciones de los osteoclastos como de los osteoblastos. De hecho, la terapia hormonal sustitutiva (HRT) está indicada, con grandes restricciones actualmente, para paliar los síntomas de la menopausia y para tratar la osteoporosis postmenopáusica. Además, el retraso en la curación de fracturas y la falta de propiedades biomecánicas del callo formado como consecuencia de la deficiencia de estrógenos, pueden ser paliadas con la HRT (Cortet, 2011). Concretamente, en un defecto igual al tratado en este trabajo, se ha demostrado que la administración subcutánea de 17β -estradiol mejora la regeneración ósea, incrementa el porcentaje de reparación y reduce el número de osteoclastos, en ratas ovariectomizadas estrógeno deficientes tratadas con injertos de hueso bovino (de Almeida et al., 2015). Sin embargo, no se pueden ignorar los efectos adversos asociados a la administración sistémica de estrógenos, por lo que no parece justificado tratar un defecto crítico de esta forma cuando generalmente se requiere cirugía y, por tanto, se puede acceder al defecto de forma local. Precisamente para evitar el riesgo de efectos sistémicos, en el presente estudio, se inyectó localmente 17β -estradiol pre-encapsulado en microesferas dispersas en el P/T/CD para controlar su liberación y con esto, minimizar los riesgos. Con esta estrategia, combinación de 17β -estradiol y BMP-2 liberados desde microesferas incorporadas en el gel, se consiguió un aumento relativo del porcentaje de regeneración del defecto en animales OP. Sin embargo, el análisis de la osteocalcina, un marcador de osteogénesis tardía y de mineralización, aportó valores bajos en los animales OP, indicando que el tejido formado presentaba características de hueso inmaduro. De hecho, la relación del porcentaje de hueso maduro e inmaduro (tinción VOF) mostró una gran diferencia entre los grupos OP y los no-OP (Figura 26). La osteoporosis produce una disminución de la absorción del calcio, que se ve incrementada cuando se administran glucocorticoides. Éstos, además, inhiben la reabsorción renal tubular y también son capaces de reducir la síntesis de proteínas de unión al calcio (Donatti et al., 2011). La suma de los efectos debido a la ovariectomía

seguido de la administración de dexametasona en el metabolismo del calcio puede explicar la baja mineralización observada en el hueso formado en los grupos OP. La adición de 17β -estradiol incrementó la formación de hueso en el defecto porque reemplaza la falta de estrógenos en las ratas ovariectomizadas, pero la administración crónica de dexametasona redujo la mineralización y, consecuentemente, la maduración del hueso en estos grupos de ratas, lo que explicaría en parte la débil mineralización del tejido óseo formado en los animales OP.

No obstante, también debe tenerse en consideración que, de acuerdo a la literatura, en general, la reparación ósea en OP está retrasada por lo que se sospechó que una de las causas de la inmadurez detectada en el tejido formado pudo ser una liberación poco prolongada de la BMP-2 *in vivo* (Figura 22). Por ello, aprovechando la inyectabilidad del sistema, 6 semanas después de la primera dosis se inyectó una segunda dosis de 17β -estradiol y BMP-2 de manera local en el lugar del defecto. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, esta segunda dosis no modificó los efectos obtenidos respecto al grupo con una única dosis. Las causas que pueden haber estado implicadas pueden ser muy diversas, entre otras, debemos considerar que el momento de la administración no fuera el adecuado, quizás una inyección más temprana hubiera mejorado los resultados o es posible que, una vez se pone en marcha el proceso de reparación, la administración de una segunda dosis no tenga ningún efecto.

Es importante destacar que la tendencia a la diferenciación hacia adipocitos de las MSC tampoco se observó en las muestras analizadas de nuevo tejido que rellenaba los defectos en ninguno de los casos, ni para animales OP ni para animales no-OP. Ninguno de los grupos OP presentó adipogénesis, con lo cual todos los componentes del sistema impiden que esto ocurra durante, al menos, 12 semanas.

Aunque es difícil comparar estos resultados con los publicados debido a la diferencia en los modelos de OP, a variaciones en las dosis y formulaciones, tiempos de muestreo y parámetros utilizados para evaluar la respuesta,

generalmente, se reconoce que la administración local de BMP-2 mejora la regeneración de defectos óseos en animales OP. De hecho, incluso algunos autores han observado una mayor reparación del defecto en grupos OP que en grupos no OP (Sarban et al., 2009; Park et al., 2013) y, excepcionalmente, algunos encuentran una regeneración del 100% en ambos grupos (Ghodasra et al., 2016). Además, muchos estudios no incluyen un grupo de animales sanos como control (Yamaji et al., 2007; Li et al., 2010), por lo que no es fácil concluir si la respuesta al tratamiento está afectada por las condiciones OP. En general, cuando se incluye un grupo sano control y se obvian las diferencias en los diseños experimentales de los distintos estudios, nuestros resultados coinciden con aquéllos en los que la BMP-2 es administrada localmente en un defecto óseo y mejora el proceso regenerativo en los animales OP.

Aunque sorprendentemente no se ha encontrado ninguna referencia a estudios realizados con la combinación BMP-2 y 17β -estradiol, nuestras observaciones podrían ser comparables con lo descrito en un modelo de rata OP inducida por un tratamiento mixto de ovariectomía y administración de dexametasona similar al utilizado en el presente estudio (Lee et al., 2015). No obstante, estos autores no utilizaron la combinación con 17β -estradiol, sino que inyectaron BMP-2 en un gel de ácido hialurónico para regenerar defectos de 5 mm en el peroné de ratas OP y no-OP. Al igual que en el presente estudio, los autores indican que el grupo tratado con BMP-2 responde mejor que el grupo tratado con el hidrogel blanco.

5. Bibliografía.

- Arunachalam M., Gibson H. W. Recent developments in polypseudorotaxanes and polyrotaxanes, *Prog. Polym. Sci.* 39 (2014) 1043-1073.
- Alvarez-Lorenzo C., García-González C. A., Concheiro A. Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine, *J. Control. Release.* 268 (2017) 269-281.
- Bai X., Lu S. Y., Cao Z., Gao C. M., Duan H. G., Xu X. B., Sun L., Gao N. N., Feng C., Liu M. Z. Self-reinforcing injectable hydrogel with both high water content and mechanical strength for bone repair, *Chem. Eng. J.* 288 (2016) 546-556.
- Brand T., Cabrita E. J., Morris G. A., Günther R., Hofmann H. J., Berger S. Residue-specific NH exchange rates studied by NMR diffusion experiments, *J. Magn. Reson.* 187 (2007) 97-104.
- Campanella C., Lopez-Fontal E., Milanesi L., Tomas S. Modulation of the cooperativity in the assembly of multistranded supramolecular polymers, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19 (2017) 9617-9624.
- Cortet B. Bone repair in osteoporotic bone: postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis, *Osteoporos. Int.* 22(6) (2011) 2007-2010.
- Dalvit C., Fogliatto G., Stewart A., Veronesi M., Stockman B. Water LOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability, *J. Biomol. NMR.* 21 (2001) 349-359.
- de Almeida J. M., Bosco A. F., Faleiros P. L., Pazmiño V. F., Murakawa A. C., Bonfante S., Nagata M. J. H., Garcia V. G. Effects of oestrogen deficiency and 17beta-estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft, *Arch. Oral Biol.* 60(4) (2015) 631-41.
- de la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Schulz-Siegmund M., Peck M. K., Delgado A., Évora C. VEGF-controlled release within

- a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 50-58.
- del Rosario C., Rodríguez-Évora M., Reyes R., Simões S., Concheiro A., Évora C., Alvarez-Lorenzo C., Delgado A. Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 463-473.
 - Dobson K. R., Reading L., Haberey M., Marine X., Scutt A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femuræ, *Calcif. Tissue Int.* 65 (1999) 411-413.
 - Donatti T. L., Koch V. H., Takayama L., Pereira R. M. Effects of glucocorticoids on growth and bone mineralization, *J. Pediatr. (Rio J.)* 87(1) (2011) 4-12.
 - Dötsch V., Wider G. Exchange rates of internal water molecules in proteins measured using pulsed field gradients, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 6064-6070.
 - Dunn S. E., Coombes A. G. A., Garnett M. C., Davis S. S., Davies M. C., Illum L. In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers, *J. Control. Release.* 44 (1997) 65-76.
 - Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M. P., Morshed M., Nasr-Esfahani M. H., Baharvand H., Kiani S., Al-Deyab S. S., Ramakrishna S. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5 (2011) e17-e35.
 - Ghodasra J. H., Nickoli M. S., Hashmi S. Z., Nelson J. T., Mendoza M., Nicolas J. D., Bellary S. S., Sonn K., Ashtekar A., Park C. J., Babu J., Yun C., Ghosh A., Kannan A., Stock S. R., Hsu W. K., Hsu E. L. Ovariectomy-induced osteoporosis does not impact fusion rates in a recombinant human bone morphogenetic protein-2-dependent rat posterolateral arthrodesis model, *Glob. Spine.* 6(1) (2016) 60-68.

- Gonzalez-Gaitano G., Silva M. A., da Radulescu A., Dreiss C. A. Selective tuning of the self-assembly and gelation of a hydrophilic poloxamine by cyclodextrins, *Langmuir*. 31 (2015) 5645-5655.
- Gonzalez-Lopez J., Alvarez-Lorenzo C., Taboada P., Sosnik A., Sandez-Macho I., Concheiro A. Self-associative behavior and drug-solubilizing ability of poloxamine (Tetronic) block copolymers, *Langmuir*. 24 (2008) 10688-10697.
- Govindarajan P., Khassawna T., Kampschulte M., Böcker W., Huerter B., Dürselen L., Faulenbach M., Heiss C. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone, *Int. J. Exp. Pathol.* 94(6) (2013) 387-398.
- Hwang T. L., Shaka A. J. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients, *J. Magn. Reson.* A112 (1995) 275-279.
- Johnson C. S. Jr. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications, *Progr. Nucl. Magn. Reson.* 34 (1999) 203-256.
- Lee J. H., Baek H. R., Lee K. M., Zheng G. B., Shin S. J., Shim H. J. Effects of ovariectomy and corticosteroid-induced osteoporosis on the osteoinductivity of rhBMP-2 in a segmental long-bone defect model, *Tissue Eng. Part A*. 21(15-16) (2015) 2262-2271.
- Li M., Liu X., Liu X., Ge B. Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468(7) (2010) 1978-85.
- Li J. J., Zhao F., Li J. Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90 (2011) 427-443.
- Liu M., Harold T. C., Hawkes G. E., Nicholson J. K., Lindon J. C. Determination of the relative NH proton lifetimes of the peptide

- analogue viomycin in aqueous solution by NMR-based diffusion measurement, *J. Biomol. NMR.* 13 (1999) 25-30.
- Liu S., Xie R. J., Cai J., Wang L., Shi X. T., Ren L., Wang Y. J. Crosslinking of collagen using a controlled molecular weight bio-crosslinker: beta-cyclodextrin polyrotaxane multi-aldehydes, *RSC Adv.* 5 (2015) 46088-46094.
 - Loethen S., Kim J. M., Thompson D. H. Biomedical applications of cyclodextrin based polyrotaxanes, *Polym. Rev.* 47 (2007) 383-418.
 - Ludwig C., Michiels P. J., Wu X., Kavanagh K. L., Pilka E., Jansson A., Oppermann U., Günther U. L. SALMON: solvent accessibility, ligand binding, and mapping of ligand orientation by NMR spectroscopy, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1-3.
 - Martínez-Sanz E., Ossipov D. A., Hilborn J., Larsson S., Jonsson K. B., Varghese O. P. Bone reservoir: Injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation, *J Control. Release.* 152(2) (2011) 232-240.
 - Mo H., Raftery D. Improved residual water suppression: WET180, *J. Biomol. NMR.* 41 (2008) 105-111.
 - Moonen C. T. W., van Gelderen P., Vuister G. W., van Zijl P. C. M. Gradient-enhanced exchange Spectroscopy, *J. Magn. Reson.* 97 (1992) 419-425.
 - Park K. D., Lee Y. J. Slice-selected LED and BPLED: application of slice selection to DOSY, *Magn. Reson. Chem.* 44 (2006) 887-891.
 - Park S. B., Park S. H., Kim N. H., Chung C. K. BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporosis model, *Spine J.* 13(10) (2013) 1273-1280.
 - Pelta M. D., Morris G. A., Stchedroff M. J., Hammond S. J. A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* 40 (2002) S147-S152.
 - Polymeri A., Giannobile W. V., Kaigler D. Bone marrow stromal stem cells in tissue engineering and regenerative medicine, *Horm. Metab. Res.* 48 (2016) 700-713.

- Pradal C., Grondahl L., Cooper-White J. J. Hydrolytically degradable polyrotaxane hydrogels for drug and cell delivery applications. *Biomacromol.* 16 (2015) 389-403.
- Rey-Rico A., Babicz H., Madry H., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Cucchiaroni M. Supramolecular polypseudorotaxane gels for controlled delivery of rAAV vectors in human mesenchymal stem cells for regenerative medicine, *Int. J. Pharm.* 531 (2017) 492-503.
- Rodríguez-Évora M., Delgado A., Reyes R., Hernández-Daranas A., Soriano I., San Román J., Évora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 49(5) (2013) 873-884.
- Rodríguez-Évora M., Reyes R., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Delgado A., Évora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 959-969.
- Sarban S., Senkoğlu A., Isikan U. E., Korkusuz P., Korkusuz F. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats?: a preliminary study, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467(12) (2009) 3113-3120.
- Seba H. B., Thureau P., Ancian B., Thévan A. Combined use of Overhauser spectroscopy and NMR diffusion experiments for mapping the hydration structure of nucleosides: structure and dynamics of uridine in water, *Magn. Reson. Chem.* 44 (2006) 1109-1117.
- Segredo-Morales E., García-García P., Évora C., Delgado A. BMP delivery systems for bone regeneration: Healthy vs osteoporotic population. *Review. J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* 42 (2017) 107-118.
- Shubhra Q. T. H., Toth J., Gyenis J., Feczko T. Poloxamers for surface modification of hydrophobic drug carriers and their effects on drug delivery. *Polym. Rev.* 54 (2014) 112-138.

- Shvartzman-Cohen R., Florent M., Goldfarb D., Szleifer I., Yerushalmi-Rozen R. Aggregation and self-assembly of amphiphilic block copolymers in aqueous dispersions of carbon nanotubes, *Langmuir*. 24 (2008) 4625-4632.
- Simões S. M. N., Veiga F., Torres-Labandeira J. J., Ribeiro A. C. F., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. Poloxamine-cyclodextrin-simvastatin supramolecular systems promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells, *Macromol. Biosci.* 13 (2013) 723-734.
- Simões S. M. N., Veiga F., Torres-Labandeira J. J., Ribeiro A. C. F., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. Syringeable self-assembled cyclodextrin gels for drug delivery, *Curr. Topics Med. Chem.* 14 (2014) 494-509.
- Simões S. M. N., Veiga F., Torres-Labandeira J. J., Ribeiro A. C. F., Sandez-Macho M. I., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C. Syringeable pluronic- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80 (2012) 103-112.
- Smallcombe S. H., Patt S. L., Keifer P. A. WET solvent suppression and its application to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Ser. A.* 117 (1995) 295-303.
- Spicer P. P., Kretlow J. D., Young S., Jansen J. A., Kasper F. K., Mikos A. G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1918-1929.
- Squillaro T., Peluso G., Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update, *Cell Transplantation*. 25 (2016) 829-848.
- Suh H., Jun H. W. Physicochemical and release studies of naproxen in poloxamer gels, *Int. J. Pharm.* 129(1) (1996) 13-20.
- Sui K., Shan X., Gao S., Xia Y., Zheng Q., Xie D. Dual-responsive supramolecular inclusion complexes of block copolymer poly(ethylene glycol)-block-poly[(2-dimethylamino)ethyl methacrylate] with α -cyclodextrin, *J. Polym. Sci. A. Polym. Chem.* 48 (2010) 2143-2153.

- Tran N. Q., Joung Y. K., Lih E., Park K. M., Park K. D. RGD-conjugated in situ forming hydrogels as cell-adhesive injectable scaffolds, *Macromol. Res.* 19 (2011) 300-306.
- Valero M., Castiglione F., Mele A., da Silva M. A., Grillo I., Gonzalez-Gaitano G., Dreiss C. A. Competitive and synergistic interactions between polymer micelles, drugs, and cyclodextrins: the importance of drug solubilization locus, *Langmuir.* 32 (2016) 13174-13186.
- Yamaji K., Kawanami M., Matsumoto A., Odajima T., Nishitani Y., Iwasaka K., Yoshimitsu K., Yoshiyama M. Effects of dose of recombinant human BMP-2 on bone formation at palatal sites in young and old rats, *Dent. Mater. J.* 26(4) (2007) 481-486.
- Zhao X., Song W. J., Li W. C., Liu S., Wang L., Ren L. Collagen membranes crosslinked by beta-cyclodextrin polyrotaxane monoaldehyde with good biocompatibilities and repair capabilities for cornea repair, *RSC Adv.* 7 (2017) 28865-28875.
- Zhao S. P., Xu W. L. Thermo-sensitive hydrogels formed from the photocrosslinkable polypseudorotaxanes consisting of beta-cyclodextrin and Pluronic F68/PCL macromere. *J. Polym. Res.* 17 (2010) 503-510.
- Zhao S. P., Zhang L. M., Ma D., Yang C., Yan L. Fabrication of novel supramolecular hydrogels with high mechanical strength and adjustable thermosensitivity, *J. Phys. Chem. B.* 110 (2006) 16503-16507.
- Zheng G., Torres A. M., Price W. S. Water control: self-diffusion based solvent signal suppression enhanced by selective inversion, *Magn. Reson. Chem.* 55 (2017) 447-451.

Capítulo 3.
Regeneración ósea en osteoporosis mediante
liberación de BMP-2 y PRGF desde un hidrogel
compuesto por Tetronic®-Alginato.

1. Introducción.

El alginato es un polímero de origen natural, concretamente es un copolisacárido compuesto de dos unidades monoméricas, ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G). El entrecruzamiento de sus cadenas por medio de un ion divalente como el Ca^{2+} da lugar a la formación de un gel más estable. La interacción entre el catión bivalente y grupos carboxilos (COO^-) y OH^- del monómero G del alginato forma un enlace intercatenario responsable de la unión de cavidades que forman una estructura tipo “caja de huevos” (Figura 1), (Lin et al., 2004, Grassi et al., 2006). Este tipo de reticulaciones entre el alginato e iones divalentes ha sido extensamente explotada con distintas finalidades, entre las que podemos destacar la de scaffolds en ingeniería de tejidos y como vehículo de fármacos en preparaciones farmacéuticas.

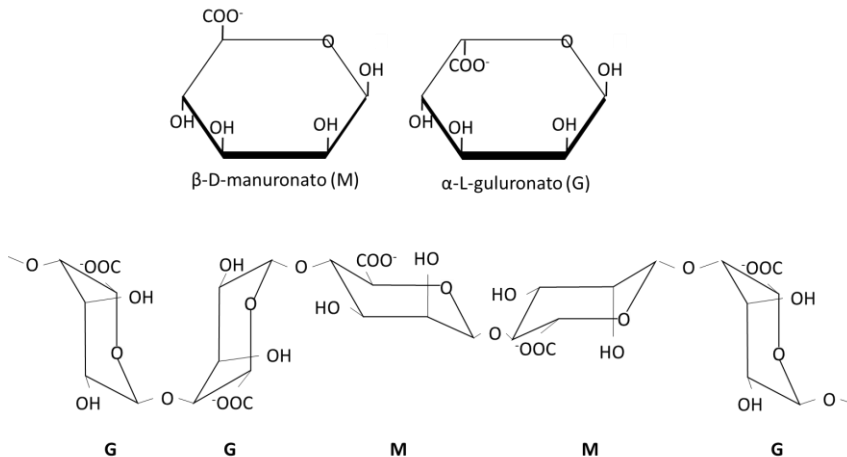


Figura 1. Estructura de los grupos ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-gulurónico (G) que forman el alginato y disposición espacial de los mismos.

Específicamente, se utilizan para la encapsulación de fármacos de distinta naturaleza (Gombotz y Wee, 1998; Lee et al., 2000; Augst et al., 2006; Jain y Bar-Shalom, 2014) y para la encapsulación de células (Martín del Valle et

al., 2009; Wang et al., 2009). Además, las esponjas de alginato y los hidrogeles se han propuesto como scaffolds para la proliferación y diferenciación *in vitro* de células, y para la regeneración de tejido *in vivo*. Tanto las esponjas como las micropartículas de alginato han sido previamente estudiadas, en nuestro grupo de investigación, como scaffolds y sistema de liberación de factores de crecimiento para la regeneración de un defecto intramedular en fémur de conejo (de la Riva et al., 2009). Por otra parte, las propiedades físicoquímicas de los Tetronics los convierten en biomateriales muy útiles como scaffolds y vehículos para la liberación sustancias activas pre-encapsuladas en regeneración ósea (Rodríguez-Évora et al., 2014; del Rosario et al., 2015). Aprovechando estas características, se ha propuesto la elaboración y caracterización de un nuevo sistema constituido por alginato y Tetronic® 1307. Aunque las mezclas de alginato con otras poloxámeros que gelifican *in situ* como los Pluronicos sí han sido estudiadas como sistemas de liberación de fármacos (Lin et al., 2004; Abrami et al., 2014; Chen et al., 2011), es la primera vez que se estudia la combinación Tetronic®- alginato en regeneración ósea.

La sangre es una fuente natural de factores de crecimiento y más concretamente el plasma y las plaquetas. De hecho, está extensamente documentado que las plaquetas contienen depósitos de varios factores de crecimiento y de citoquinas en los gránulos alfa (Anitua et al., 2006). El plasma rico en plaquetas (PRP) se ha venido utilizando desde 1990, demostrándose que contribuye a la aceleración del proceso de regeneración ósea (Anitua et al., 2008). Algunas aplicaciones potenciales de estos productos ricos en plaquetas incluyen la regeneración ósea y la osteointegración de implantes de titanio. Sin embargo, hay contradicciones entre los autores acerca de los beneficios potenciales de aplicar PRP (Anitua et al., 2006), algunos autores han encontrado mejorías significativas en la curación de tejido utilizando PRP (Marx et al., 1998; Anitua, 1999; Sammartino et al., 2005), otros en cambio, no observaron efecto alguno (Aghaloo et al., 2002; Froum et al., 2002; Raghoobar et al., 2005). Estas diferencias se deben, muy probablemente, a la falta de estandarización y de definición de las preparaciones de PRP, ya que los

protocolos y las técnicas biológicas y quirúrgicas utilizadas para su obtención varían considerablemente (Sanchez et al., 2003; Weibrich et al., 2005).

Para paliar este problema, Anitua ha trabajado desde 1999 en una técnica estandarizada de extracción de plasma rico en plaquetas obteniendo un producto seguro llamado plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) (Anitua, 1999). Utilizando esta técnica es posible preparar de cada paciente un pequeño volumen de plasma enriquecido en una amplia gama de mediadores biológicamente activos (Anitua et al., 2015). El resultado se ha utilizado satisfactoriamente en la reparación y la regeneración de diferentes tipos de lesiones en muchos campos de la medicina, como odontología, traumatología, oftalmología y dermatología, entre otros (Anitua et al., 2012). Las plaquetas liberan diferentes factores de crecimiento y citoquinas tales como TGF- β , PDGF, VEGF, factor de crecimiento de células epiteliales (EGF), FGF y factor activador de plaquetas-4 (PAF-4) (Paknejad et al., 2012), que tienen un importante papel en la regeneración ósea incrementando la vascularización y favoreciendo el proceso de curación (Sanchez et al., 2003; Weibrich et al., 2005).

En el trabajo que se refleja en el presente capítulo se han estudiado las propiedades de un hidrogel (T-A) termosensible compuesto por una poloxamina (Tetronic® 1307), reforzado con alginato (A) entrecruzado con cloruro de calcio (CaCl_2). En el seno del hidrogel T-A se han combinado microesferas de PLA-S que contienen 17β -estradiol, microesferas de PLGA con BMP-2 y con PRGF. Consideramos que estas combinaciones junto con una apropiada estrategia de liberación podrían mejorar la regeneración de daño óseo crítico en OP. Por ello, el objetivo planteado lleva consigo la preparación y caracterización de un hidrogel inyectable termosensible como sistema de liberación local, y su aplicación en el contexto de la regeneración ósea de defectos óseos en ratas osteoporóticas. Se ha combinado el 17β -estradiol con un inductor osteogénico como el PRGF que contiene un cóctel de factores de crecimiento o únicamente con BMP-2. Además, se ha estudiado el sinergismo de la combinación de las mencionadas fuentes de factores de crecimiento.

2. Procedimiento experimental.

2.1. Materiales.

Los materiales se utilizaron bajo condiciones asépticas, todo el material de laboratorio y los componentes líquidos se autoclavaron de la misma forma que se detalla en el Capítulo 2. El Tetronic® 1307 (T), la BMP-2, el 17 β -estradiol, el PLA-S (Resomer® R 203 S) y PLGA (Resomer® RG 504) fueron los descritos en el Capítulo 2.

Se utilizó alginato sódico, Pronova® UP MVG, que fue adquirido a Novamatrix (Sandvika, Noruega) y cloruro cálcico (Merck, Alemania) que fue utilizado como entrecruzante del alginato.

2.2. Preparación y caracterización del PRGF.

La preparación del PRGF se llevó a cabo tal y como se ha descrito (Anitua et al., 2015). Las muestras de sangre se tomaron voluntariamente de entre los miembros del grupo de investigación y se almacenaron en tubos que contenían un 3,8 % (p/v) de citrato de sodio. Luego, la sangre fue centrifugada a 580 g durante 8 min y el plasma se dividió en la fracción 1 (F1) y la fracción 2 (F2). La fracción pobre en plaquetas (F1), se descartó y se utilizó la fracción F2 que es la capa de 2 mL aproximadamente de plasma rico en plaquetas que se sitúa justo encima de la capa leucocitaria (Figura 2).

La liberación de factores de crecimiento y morfógenos se provocó por la adición de un activador del PRGF (cloruro de calcio) al concentrado de plaquetas. Para caracterizar el PRGF, se determinó tanto el número de plaquetas como el contenido en factores de crecimiento. El recuento de plaquetas en la sangre periférica y en la fracción F2 se realizó con un analizador hematológico (Micro 60, Horiba ABX, Montpellier, France). Además, el sobrenadante liberado tras la activación de las plaquetas fue

recogido por centrifugación a 1000 g durante 10 min y los niveles de TGF β 1, PDGF-AB, IGF y VEGF se determinaron utilizando un kit comercial de un enzimo-inmuno ensayo de adsorción (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN) (Okada et al., 2016).

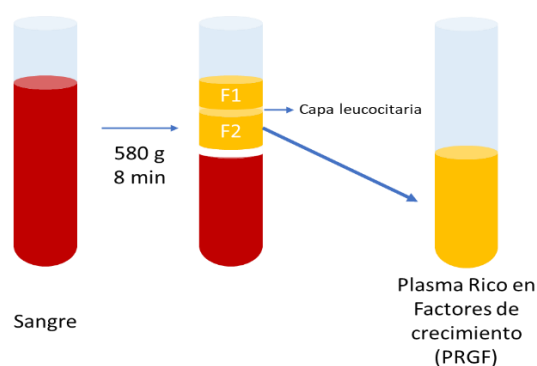


Figura 2. Esquema del proceso de obtención del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) a partir de la sangre. F1: fracción 1 y F2: fracción 2.

2.3. Preparación de las microesferas.

Las microesferas de PLGA y PLA-S se prepararon y caracterizaron de la misma forma que se indica en el apartado *Materiales y métodos* del Capítulo 2, variando la concentración de PLGA y de PLA-S en la fase orgánica a 150 mg/mL y 300 mg/mL, respectivamente. Esta variante de las microesferas se ha denominado ms'.

2.4. Preparación de los hidrogeles.

Las disoluciones de T-1307 al 30% (p/p), el alginato UP al 6% (p/p) y el CaCl₂ al 26,5% (p/p) se prepararon con agua esterilizada (Mili-Q). Las disoluciones de T-1307 y de alginato fueron sometidas a agitación magnética durante toda la noche a 4 °C y a temperatura ambiente, respectivamente y fueron guardadas a 4 °C hasta su uso.

Para la preparación del hidrogel de T-A, las disoluciones fueron mezcladas en baño de hielo para mantener el estado líquido y diluir hasta la concentración final de 21% de T-1307, 1,5% de alginato y el 1% de CaCl₂. Para esto, las disoluciones de T-1307 se mezclaron con el alginato agitando en un vórtex (Genie®2, posición 10) durante 3 min. La mezcla se mantuvo en un baño de hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadió la disolución de CaCl₂ y se agitó en un vórtex (Genie®2, posición 10) durante 3 min. Finalmente, el sistema particulado se prepara mezclando las microesferas con el hidrogel (180 mg/mL).

Los sistemas que contienen PRGF se prepararon como se describe en los párrafos anteriores, pero el sistema se liofilizó para ser reconstituido con el PRGF.

2.5. Caracterización *in vitro* del sistema completo.

Se prepararon bajo condiciones asépticas cinco tipos de hidrogeles de Tetronic-Alginato: a) Tetronic-Alginato (T-A), b) Tetronic-Alginato con microesferas de PLA-S conteniendo 17 β -estradiol (T-A- β E), c) Tetronic-Alginato-PRGF con microesferas de PLA-S conteniendo 17 β -estradiol (T-A-PRGF- β E), d) Tetronic-Alginato con microesferas de PLA-S conteniendo 17 β -estradiol y microesferas de PLGA conteniendo BMP-2 (T-A- β E-BMP) y e) Tetronic-Alginato-PRGF con microesferas de PLA-S conteniendo 17 β -estradiol y microesferas de PLGA conteniendo BMP-2 (T-A-PRGF- β E-BMP-2). Las dosis de las sustancias activas contenidas en 100 μ L de hidrogel fueron: 200 μ g de 17 β -estradiol, 4 μ g de BMP-2 y 73 μ L de PRGF.

Para verificar la formación del gel se utilizó la prueba del tubo invertido después de incubar los sistemas durante 15 minutos a 37 °C.

La morfología de la superficie y la estructura porosa del hidrogel se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, Jeol JSM-6300) de las formulaciones liofilizadas. El análisis químico elemental de la superficie se realizó mediante SEM-EDX (Espectroscopía de Energía Dispersiva de rayos X).

La porosidad del hidrogel y la variación de la viscosidad con la temperatura de los sistemas T-A, T-A-PRGF y T-A-PRGF-microesferas blancas (T-A-PRGF-ms') así como la variación de la viscosidad con la velocidad de cizalla de los sistemas T-A y T-A-PRGF-ms', se obtienen de la misma forma que en el Capítulo 2.

Para comprobar la estabilidad del hidrogel, se colocaron 100 μ L del gel T-A en un molde cilíndrico de aproximadamente 8 mm de diámetro que simulaba el posterior defecto que se haría en las calvarias de las ratas (Figura 3). El hidrogel se incubó en el molde con 25 mL de agua (mili-Q) a 37 °C durante 4 semanas. Las muestras fueron tomadas a 0, 1, 2, 3 y 4 semanas y liofilizadas. La morfología de sus superficies se visualizó con un microscopio (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software) y con el SEM.



Figura 3. Molde cilíndrico de aproximadamente 8 mm de diámetro que se utiliza, cargado con 100 μ L de hidrogel de T-A (altura 1,5 mm), para realizar los estudios de estabilidad *in vitro*.

Para estudiar la influencia del PRGF en la liberación *in vitro* del 17 β -estradiol los ensayos se realizaron con los sistemas T-A-ms' y T-A-PRGF-ms', de la misma manera que en el Capítulo 2. Brevemente, 25 mg de 17 β -estradiol-ms' en 100 μ L de gel con y sin PRGF fueron incubados a 37°C con 5 mL de metanol:agua (MeOH:H₂O) (50:50) y cada cierto tiempo los sobrenadantes fueron valorados por espectrofotometría a 280 nm .

La uniformidad de dosis se comprobó usando microesferas de ¹²⁵I-BMP-2. Se tomó una jeringa de 1 mL cargada con el sistema T-A-PRGF- β E-¹²⁵I-BMP-2 en frío. Después de 10 min a la temperatura ambiente se descargan 5 dosis de 100 μ L y se mide la radioactividad en un contador gamma (Cobra II, Packard®).

2.6. Caracterización *in vivo* del sistema completo.

El protocolo de los experimentos al igual que en los ensayos anteriores fue aprobado por el CEIBA de la Universidad de La Laguna y siguiendo la directiva de la Comunidad Europea sobre el Uso y Cuidado de los Animales en Procedimientos Experimentales (2010/63/UE). También los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en condiciones asépticas.

2.6.1. Modelo animal.

El modelo animal que se utilizó para la evaluación *in vivo* de este sistema es idéntico al utilizado para el sistema P/T/CD y que se describió en el Capítulo 2. En este caso, se utilizaron 50 ratas hembras Sprague-Dawley, divididas en dos grupos de 25 animales cada uno. A uno de los dos grupos se le indujo la osteoporosis (grupo OP) mediante ovariectomía bilateral y administración crónica de dexametasona y el otro grupo se utilizó como control (no-OP). Tanto las ratas OP como no OP se dividen en 5 grupos de 5 ratas cada uno para recibir los distintos tratamientos según se detalla en la Tabla 1.

Cuatro meses después de la ovariectomía, se practica, con un trepanador, un defecto crítico de 8 mm en el cráneo de las ratas anestesiadas con isofluorano (ISOFLO®), como se ha descrito anteriormente en el Capítulo 2 (Rodríguez-Évora et al., 2013), se inyectan en el defecto 100 µL de cada una de las variantes a evaluar (Tabla 1) y se sutura la herida. Los animales se dejan en libertad de movimiento, de comida y bebida. La analgesia consistió en buprenorfina administrada de forma subcutánea (0,05 mg/kg) tras la operación y en la administración de paracetamol (70 mg/100 mL) en el agua durante 3 días tras la operación. Los animales fueron sacrificados 12 semanas después de la operación y se tomaron muestras del nuevo hueso formado.

Tabla 1. Grupos experimentales de 5 ratas cada uno. Se inyecta un volumen de 100µL del gel con y sin PRGF y las sustancias activas como se describe en las especificaciones. ^(a) Incluye 5 ratas adicionales para los ensayos de liberación *in vivo* de la BMP-2.

	Grupo	Especificaciones
OP	Blanco	Microesferas blancas
	βE	Microesferas de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol
	βE-PRGF	Microesferas de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol reconstituido con 73µL de PRGF.
	βE-BMP	Microesferas de PLGA con 4 µg de BMP-2 y de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol.
	βE-PRGF-BMP	Microesferas de PLGA con 4 µg de BMP-2 y de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol reconstituido con 73µL de PRGF.
No-OP	Blanco	Microesferas blancas
	βE	Microesferas de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol
	βE-PRGF	Microesferas de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol reconstituido con 73µL de PRGF.
	βE-BMP ^(a)	Microesferas de PLGA con 4 µg de BMP-2 y de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol.
	βE-PRGF-BMP ^(a)	Microesferas de PLGA con 4 µg de BMP-2 y de PLA-S con 200 µg de 17β-estradiol reconstituido con 73µL de PRGF.

2.6.2. Ensayo de liberación *in vivo* de la BMP-2.

Los ensayos de liberación de la BMP-2 se llevaron a cabo en dos grupos de 5 ratas cada uno (Tabla 1). A un grupo se le inyectó 100 µL de gel de alginato y Tetronic con microesferas de 17β-estradiol y microesferas de ¹²⁵I-BMP-2 (T-A-βE-BMP) y al otro grupo se le implantó el mismo gel reconstituido con PRGF (T-A-PRGF-βE-BMP). Se midió periódicamente la cantidad de ¹²⁵I-BMP-2 remanente en el defecto usando un contador gamma tipo sonda (Captus®, Nuclear Ibérica) como ya se ha descrito anteriormente (Capítulo 2).

2.6.3. Histología e histomorfometría.

Para determinar la capacidad de las sustancias activas para regenerar el defecto provocado en la calvaria de las ratas, se valoran histológicamente las muestras del tejido formado en el defecto. Los protocolos de preparación y análisis de las muestras han sido descritos detalladamente en el Capítulo 2.

3. Resultados.

3.1. Caracterización del hidrogel.

3.1.1. Caracterización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF)

El PRGF fue caracterizado en cuanto a enriquecimiento del plasma en plaquetas y factores de crecimiento. En la Tabla 2 se detallan los resultados y se indica la dosis de cada uno de los factores de crecimiento, valorados por ELISA®, que contiene cada 100 µL de gel, volumen que es inyectado en el defecto.

3.1.2. Características de las microesferas.

El diámetro medio de las microesferas de PLGA que contienen BMP-2 fue de 108,9 µm, (10% < 54,8 µm y 90% < 139,3 µm) y de las microesferas de PLA-S que contienen 17β-estradiol fue de 83,2 µm, (10% < 32,6 µm y 90% < 117,8 µm). La eficiencia de encapsulación fue del 70% para el caso de la BMP-2 y del 81 % en el caso del 17β-estradiol.

Tabla 2. Número de plaquetas (Plt) en sangre y en la fracción de plasma rico en plaquetas de 6 donantes. Concentración de cada factor de crecimiento en el PRGF y dosis de factores de crecimiento (pg) inyectadas en 100 μ L de hidrogel.

Plt/ μ L $\cdot 10^3$ (sangre)	Plt/ μ L $\cdot 10^3$ (plasma)	Enrique- cimiento en plaquetas	PDGF-AB (pg/mL)	IGF (pg/mL)	TGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
191 \pm 56	384 \pm 81	2,1 \pm 0,5	24.456 \pm 7.175	122.784 \pm 36.027	25 \pm 7,5	293 \pm 86
Dosis de GF inyectados en el defecto (pg/100 μ L gel)			1.883 \pm 94,2	9.454 \pm 472,7	1,99 \pm 0,10	22,5 \pm 1,1

3.2. Caracterización *in vitro* del sistema completo.

3.2.1. Estructura interna y porosidad.

La porosidad del hidrogel resultante fue del 78% \pm 1,35 y 73% \pm 1,15, para el sistema sin y con microesferas, respectivamente. Las imágenes obtenidas mediante SEM y microscopio (estereomicroscopio) confirman que el hidrogel de T-A es un gel poroso formado por la red de polímeros que da lugar a una estructura homogénea con poros interconectados, que evoluciona hacia una estructura menos uniforme cuando se incuba en agua (Figura 4). El Tetronic se pierde por disolución en el medio y queda el esqueleto formado por el alginato entrecruzado, que va incrementado su porosidad por erosión. El análisis mediante EDX muestra el calcio localizado en la superficie del hidrogel, observándose que tras 4 semanas la cantidad de calcio disminuye hasta 7 veces.

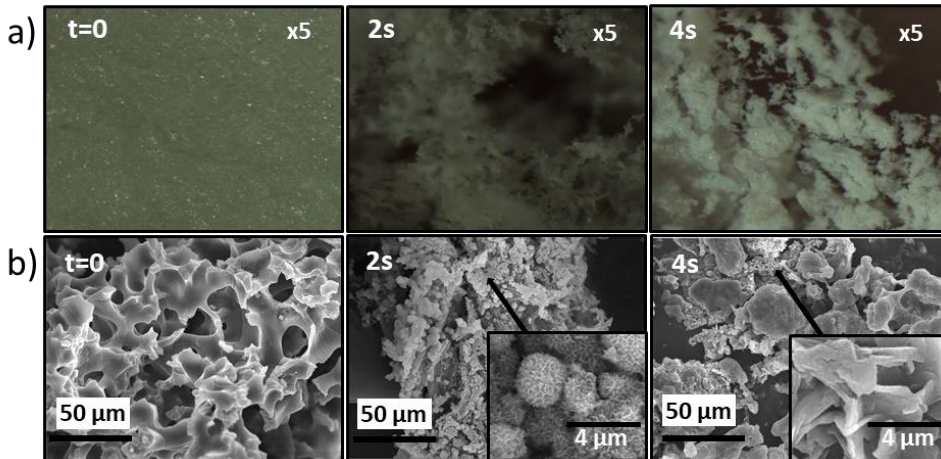


Figura 4. Imágenes de la evolución del hidrogel T-A durante 4 semanas de incubación en agua a 37 °C, obtenidas a) con un estereomicroscopio a 5 aumentos y b) mediante SEM, que muestran la estructura interna de hidrogel. Los cuadros muestran detalles de la estructura a mayor aumento.

3.2.2. Propiedades reológicas.

Se analizó la variación de la viscosidad con la temperatura del gel de T-A y del gel reconstituido con PRGF (T-A-PRGF), así como del sistema con PRGF y microesferas blancas (T-A-PRGF-ms') (Figura 5).

Se detecta un máximo en la viscosidad de los tres geles en torno a los 22-24 °C. El T-A y el T-A-PRGF muestran un comportamiento similar, con una viscosidad máxima de unos 35-40 Pa·s, mientras que la adición de las microesferas provoca un aumento de esta hasta los 55-60 Pa·s. Aunque la temperatura a la que se alcanzan estos máximos es prácticamente la misma, la presencia de PRGF, pero, sobre todo, la adición de las microesferas hace que la viscosidad comience a aumentar a valores menores de temperatura (Figura 5). Como ya se ha comentado en el Capítulo 2, este hecho se debe a las interacciones que ocurren entre el PLA-S y el PLGA de la superficie de las microesferas con los grupos PPO del T-1307 (Segredo-Morales et al., 2018a).

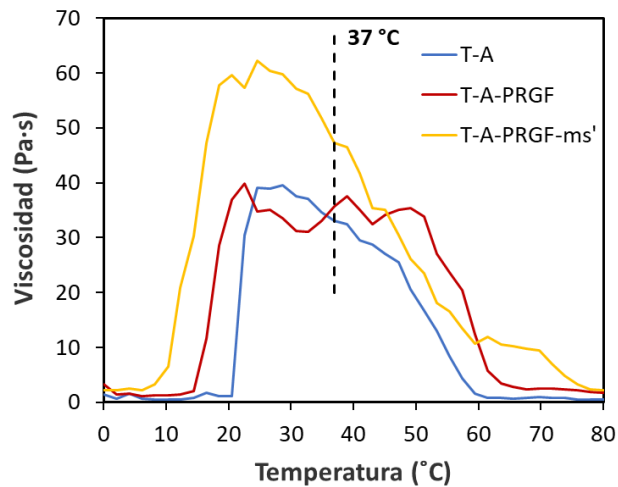


Figura 5. Evolución de la viscosidad con la temperatura para el hidrogel T-A recién preparado (T-A) (azul), tras ser liofilizado y reconstituido con PRGF (T-A-PRGF) (rojo), y conteniendo mezcla de microesferas de PLA-S y PLGA (180 mg/mL de gel) (T-A-PRGF-ms') (amarillo).

Teniendo en cuenta la importancia del comportamiento reológico de un hidrogel en la inyectabilidad y en la capacidad de adaptarse a la forma del defecto a reparar, se llevó a cabo un análisis de la evolución de la viscosidad con la velocidad de cizalla. En la Figura 6 se muestra la evolución de la viscosidad frente al aumento (curva hacia adelante) y disminución (curva hacia atrás) de la velocidad de cizalla, a 20 °C, de los sistemas T-A-ms' (Figura 6A) y T-A-PRGF-ms' (Figura 6B). Ambos sistemas muestran una disminución progresiva de la viscosidad a medida que aumenta la velocidad de cizalla, siendo prácticamente superponible con la curva generada cuando esta disminuye, lo que indica que el gel, tras ser sometido a un estrés mecánico, recupera sus propiedades reológicas (Figura 6).

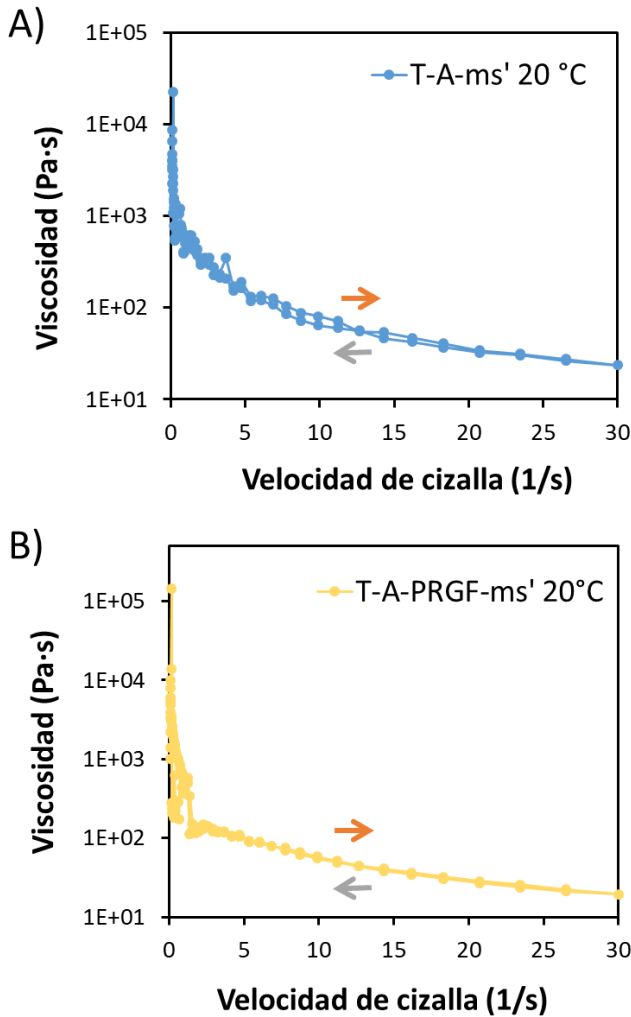


Figura 6. Comportamiento reológico A) del sistema T-A con microesferas de PLA-S y PLGA (180 mg/mL) a 20 °C y B) del sistema T-A-PRGF con microesferas de PLA-S y PLGA (180 mg/mL) a 20 °C en el que se representa la variación de la viscosidad en función de la velocidad de cizalla aplicada.

3.2.3. Liberación *in vitro* de sustancias activas y uniformidad de dosis.

Los perfiles de liberación obtenidos *in vitro* reflejan que el PRGF no afecta a la cinética de liberación del 17 β -estradiol desde las microesferas (Figura 7).

Sólo en el primer día el porcentaje liberado de 17β -estradiol se reduce ligeramente por el PRGF, 12% frente al 18%. Después de 6 semanas, independientemente del PRGF, se ha liberado el 80% del fármaco.

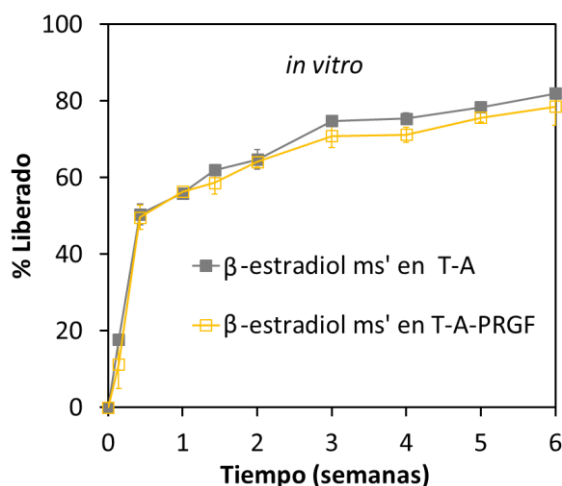


Figura 7. Perfil de liberación *in vitro* del 17β -estradiol desde las microesferas (*ms'*) de PLA-S dispersas en los sistemas T-A- β E (β E) y T-A-PRGF- β E (PRGF- β E) ($n=3$) en una mezcla de agua:MeOH (50:50) a 37°C ($n=3$)

La uniformidad de dosis y la inyectabilidad probada con una jeringa de 1 mL (20G) fue del 90,0 % \pm 3% de la dosis calculada.

3.3. Caracterización *in vivo* del sistema completo.

3.3.1. Liberación *in vivo* de la BMP-2.

La medida de la radiactividad remanente en el defecto permite construir los perfiles de liberación *in vivo* de BMP-2 desde el gel y estudiar la influencia del PRGF en la cinética de cesión de la proteína. La Figura 8 pone de manifiesto que los perfiles de liberación de ^{125}I -BMP-2 para los sistemas con y sin PRGF son prácticamente superponibles. De nuevo, el efecto del PRGF sólo se aprecia en el primer día, que es capaz de modular ligeramente la liberación (un 34% frente a un 41% sin PRGF). Tras 6

semanas de ensayo se libera aproximadamente el 90% de la BMP-2 encapsulada (Figura 8).

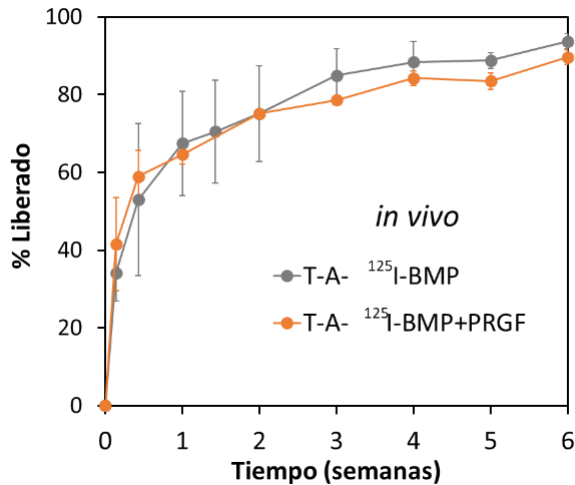


Figura 8. Perfil de liberación in vivo de la ¹²⁵I-BMP-2 desde las microesferas de PLGA dispersas en el sistema T-A-βE-BMP (βE-BMP) y T-A-PRGF-βE-BMP (PRGF-βE-BMP) tras la implantación en el defecto realizado en la calvaria de ratas (n=5).

3.3.2. Análisis histológico, histomorfométrico e inmunohistoquímico.

El análisis histológico de las muestras de calvaria de animales OP y no-OP 4 meses después de la ovariectomía y el tratamiento con dexametasona muestran nuevamente claras diferencias entre el grosor del hueso y su microarquitectura respecto a los animales sanos (Figura 9).

El análisis de las muestras después de 12 semanas de la implantación de los diferentes sistemas revela que no hay reparación en los grupos blancos tanto OP como no-OP, con una ligera formación de hueso en los bordes del defecto (Figura 10). El tejido conectivo ocupa una gran parte del área del defecto en algunos animales de ambos grupos blancos (Figura 11). Sin embargo, se observa una gran proporción de tejido adiposo mezclado con tejido conectivo en los animales OP.

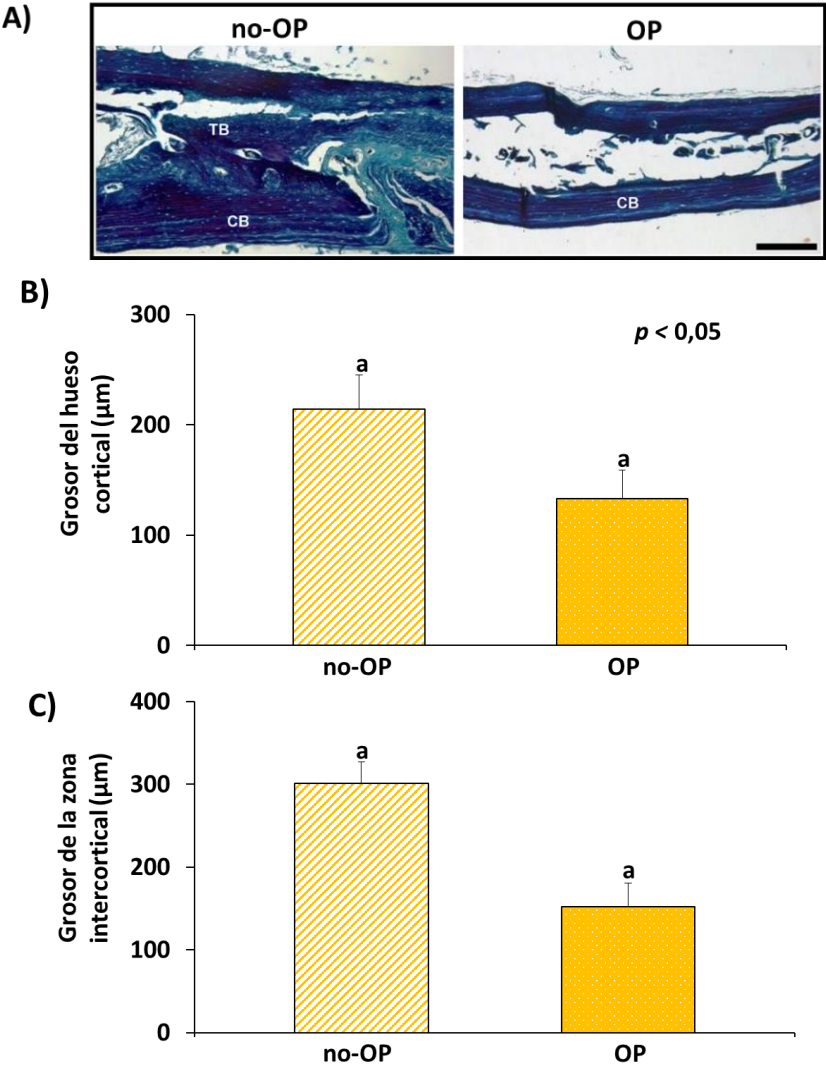


Figura 9. A) Imágenes representativas de la sección transversal de la calvaria de ratas no-OP y OP que muestran las diferencias en la microarquitectura del hueso además de las diferencias en el grosor y en la ausencia de hueso trabecular en las ratas OP (obtenido mediante tinción VOF). Análisis histomorfométrico comparando B) el grosor del hueso cortical y C) el intercortical entre ratas OP y no-OP. Valores medios \pm SD (n=3), $p < 0,05$. CB: hueso compacto, IZ: zona intercortical, TB: hueso trabecular. Barra de escala 180 μ m.

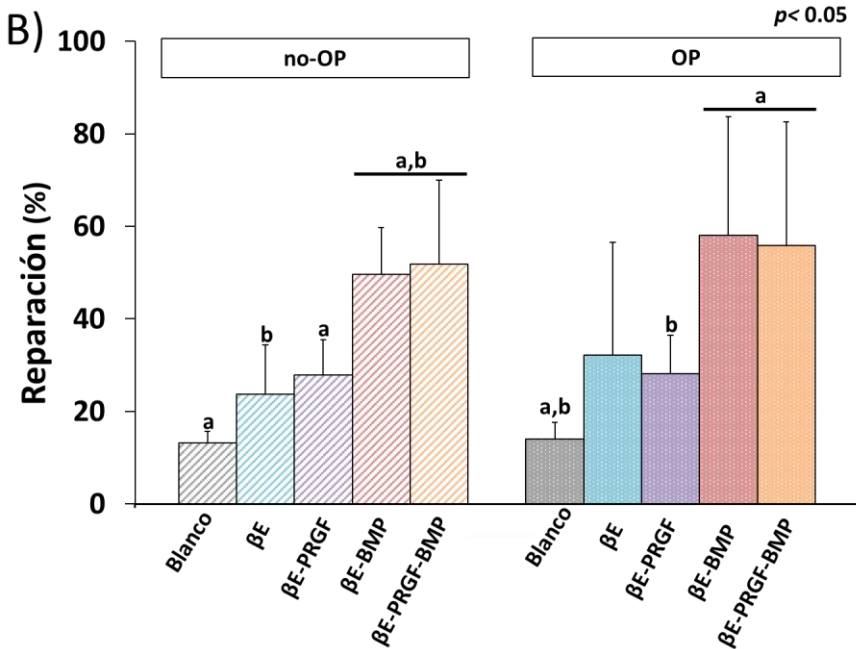


Figura 10. Análisis histomorfométrico comparando los porcentajes de reparación ósea en los diferentes grupos experimentales a las 12 semanas desde la implantación. Se representan los valores medios \pm SD ($n=3$). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

En los grupos tratados con 17β -estradiol (βE) la reparación fue del 24% y el 32%, en animales no-OP y OP, respectivamente (Figura 10). El nuevo hueso está irregularmente distribuido, un poco en los bordes del defecto y algo más en el centro. En los grupos OP, se observa una gran proporción de tejido adiposo, así como de tejido conectivo (Figura 11).

Se observaron tasas de reparación más altas, entre un 50% y un 58% en los grupos tratados con la combinación de BMP-2 con 17β -estradiol. Ambos grupos, con y sin PRGF, muestran diferencias significativas respecto a los grupos blancos en los animales OP y no-OP. Los grupos tratados con BMP-2 muestran una mayor respuesta que los grupos a los que no se les ha administrado BMP-2. Sin embargo, sólo en los grupos no-OP tratados con las combinaciones de βE -BMP y PRGF- βE -BMP las diferencias con los grupos que no contenían BMP-2 (βE y PRGF- βE) resultaron significativas (Figura 10). En los grupos OP la elevada

variabilidad intra-grupo impide detectar diferencias estadísticamente significativas.

En resumen, no hay diferencias entre los animales OP y los no-OP para la mayoría de los tratamientos utilizados. Además, el PRGF no mejora la respuesta inducida por el 17β -estradiol sólo o por la combinación de 17β -estradiol y BMP-2 (Figura 10).

La tasa de MB/IB fue significativamente más alta en animales no-OP que en animales OP independientemente del tratamiento recibido. Además, la tasa MB/IB en los grupos OP tratados con las combinaciones que contenían BMP-2 fue más elevada que en otros grupos (Figura 12).

Por otro lado, la intensidad de la tinción relativa para colágeno tipo I fue significativamente mayor en los grupos tratados con BMP-2 que en los grupos blancos tanto en muestras de animales OP como no-OP (Figuras 13A y 14).

También se observaron diferencias en la intensidad relativa de tinción de la osteocalcina entre los grupos blancos y los grupos tratados en ambos casos, OP y no-OP (Figuras 13B y 15). Sin embargo, sólo se detectan diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados con BMP-2 en los animales no-OP (Figuras 13B y 15), la gran variabilidad en los grupos OP impide confirmar que estas también sean significativas en los grupos OP.

Para estos dos marcadores estudiados no se observan diferencias entre ninguno de los tratamientos entre animales OP y no-OP.

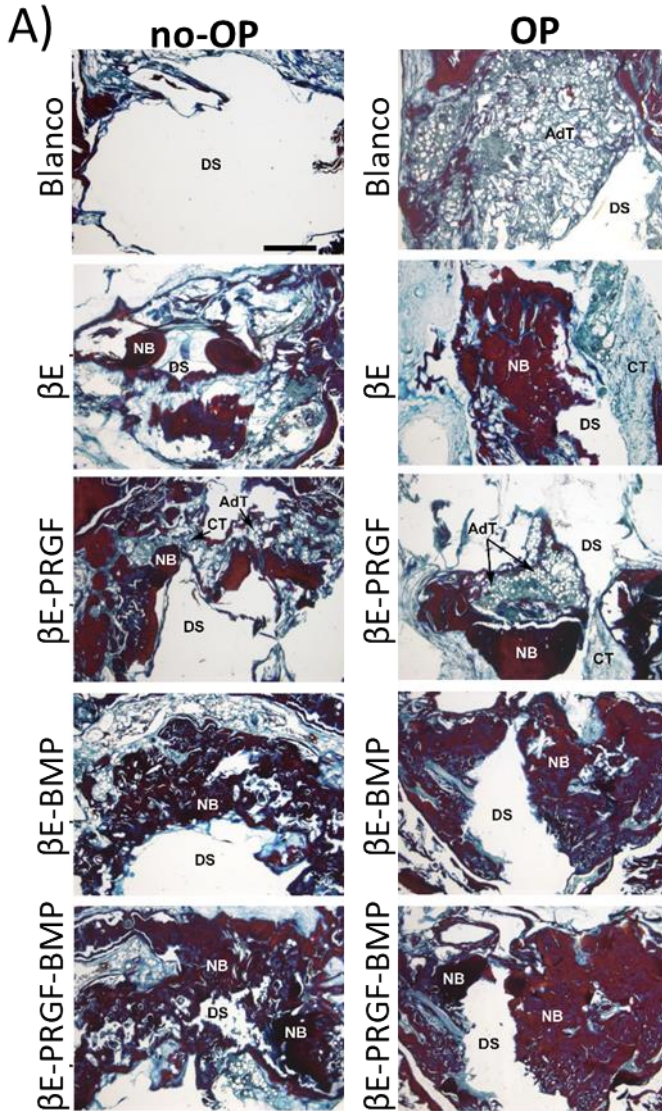


Figura 11. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto en la calvaria mostrando el nivel de regeneración en los diferentes grupos experimentales a las 12 semanas desde la implantación, en ratas OP y no-OP. CT: tejido conectivo; NB: hueso nuevo, DS: Defecto sin rellenar. Barra de escala = 1,5 mm.

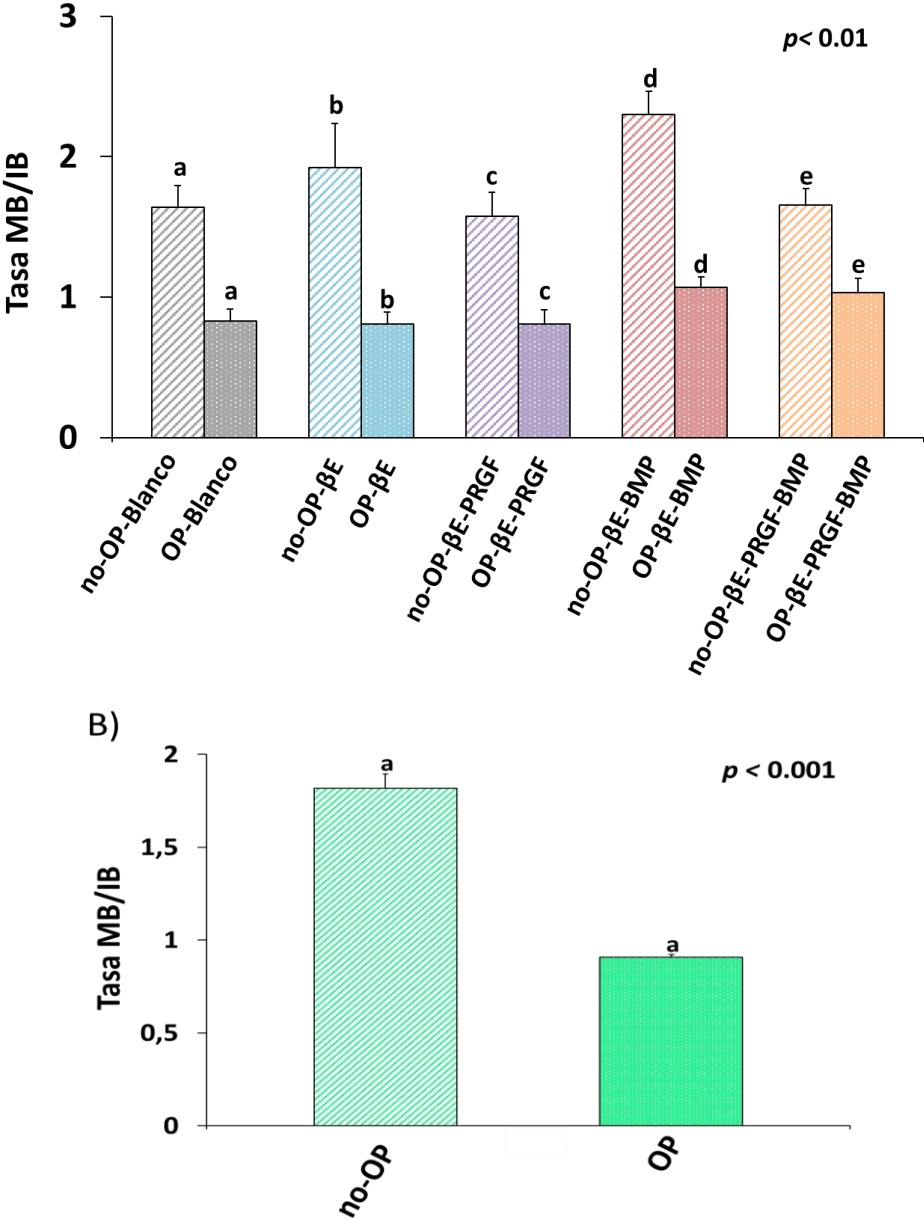


Figura 12. Análisis histomorfométrico mostrando la tasa de hueso maduro/hueso inmaduro (MB/IB) A) en los diferentes grupos experimentales y B) entre las ratas OP y las no-OP. Se ha estimado utilizando la tinción VOF. Se representan los valores medios ± SD (n=3). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,001$.

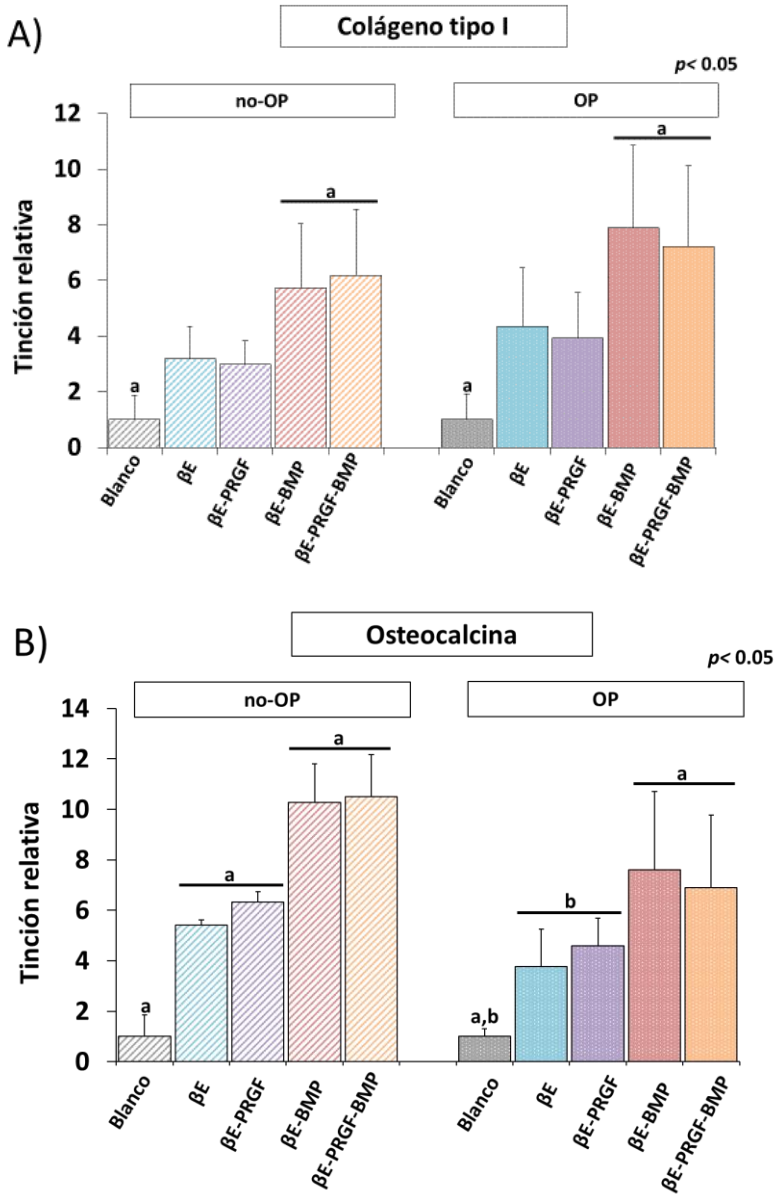


Figura 13. Análisis histomorfométrico mostrando los valores de inmunorreacción para A) el colágeno tipo I y B) osteocalcina en los diferentes grupos experimentales, a las 12 semanas desde la implantación. Se representan los valores de tinción relativa con respecto al obtenido en el grupo blanco. Valores medios \pm SD (n=3). La misma letra en diferentes barras indica diferencias significativas entre ellos, $p < 0,05$.

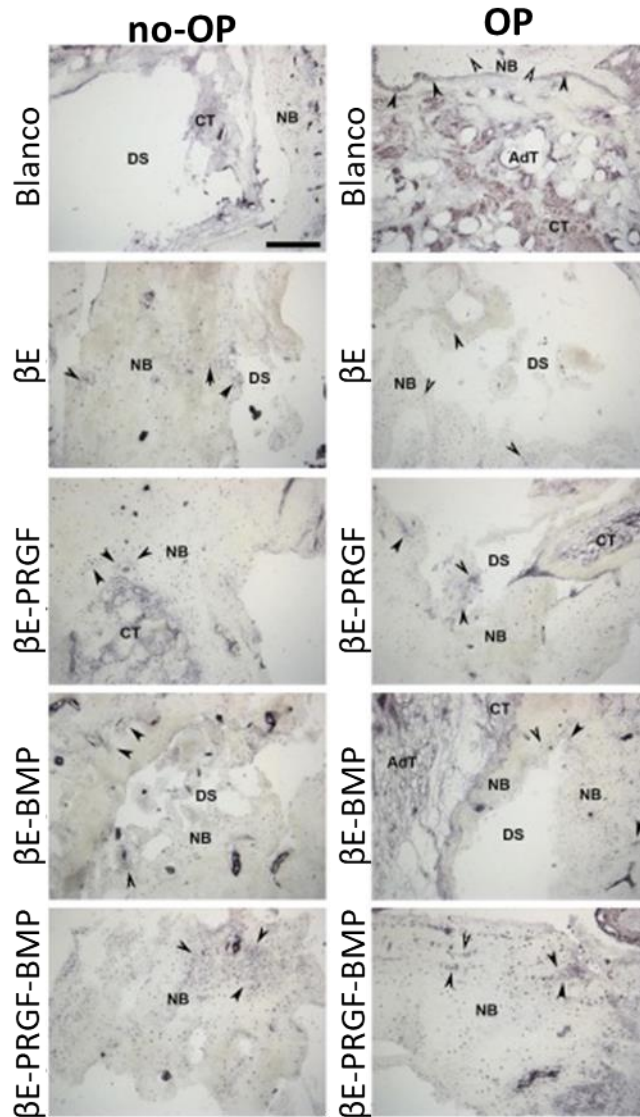


Figura 14. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto crítico en la calvaria de ratas OP y no-OP mostrando la inmunorreacción para el colágeno tipo I en los diferentes grupos experimentales, a 12 semanas de la implantación. Las flechas representan el inmunomarcaje en osteoblastos, osteocitos y áreas de matriz extracelular o nuevo hueso formado AdT: tejido adiposo, CT: tejido conectivo, NB: nuevo hueso formado, DS: defecto sin rellenar. Barra de escala = 300 μ m.

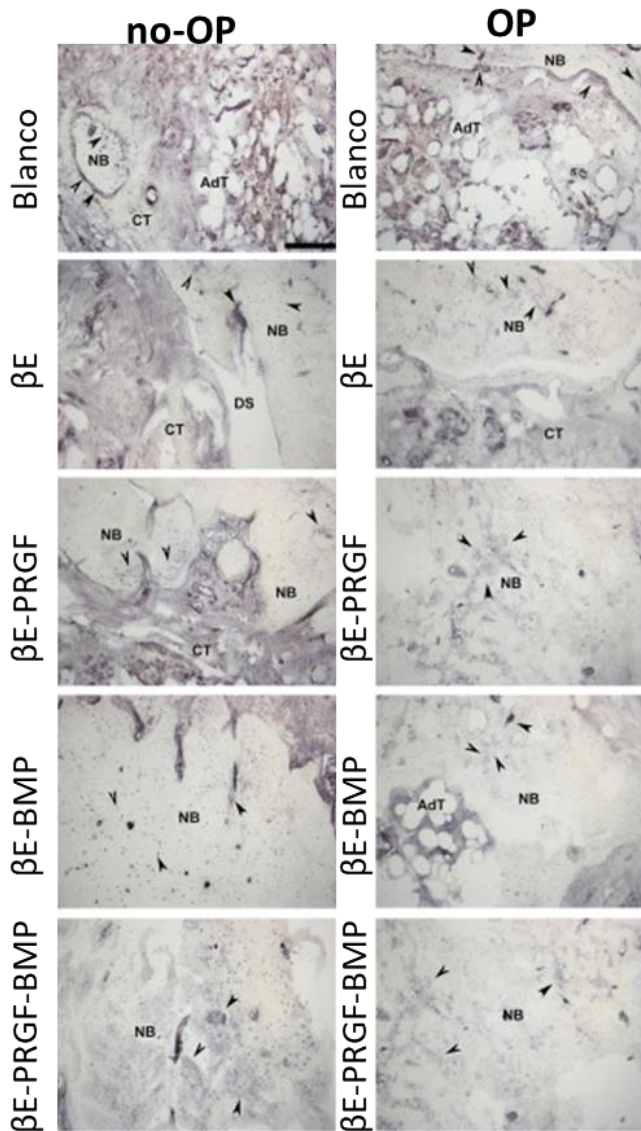


Figura 15. Imágenes representativas en sección horizontal del defecto crítico en la calvaria de ratas OP y no-OP mostrando la inmunorreacción para la osteocalcina en los diferentes grupos experimentales, a 12 semanas de la implantación. Las flechas representan el inmunomarcaje en osteoblastos, osteocitos y áreas de matriz extracelular o nuevo hueso formado. AdT: tejido adiposo, CT: tejido conectivo, NB: nuevo hueso formado, DS: defecto sin rellenar. Barra de escala = 300 μ m.

4. Discusión.

El Tetronic 1307 es una poloxamina que gelifica a la temperatura corporal y que ha sido previamente utilizada por nuestro grupo de investigación como sistema inyectable para la regeneración ósea (Rodríguez-Évora et al., 2014). En el presente trabajo, el Tetronic 1307 que, una vez expuesto a la temperatura fisiológica, es capaz de formar un gel, se refuerza con la adición de alginato entrecruzado con CaCl_2 , incrementando su viscosidad y reduciendo su temperatura de gelificación. Este sistema, aunque se prepara y se almacena en frío, es un sistema de fácil manejo que no presenta problemas para ser inyectado. De hecho, los resultados del ensayo de uniformidad de dosificación llevado a cabo, después de permanecer el sistema 10 min a temperatura ambiente, demostraron que se descarga de forma reproducible. Además, la formación del gel a una temperatura inferior a 37 °C no es un inconveniente, por el contrario, supone una gran ventaja a la hora de reducir el tiempo de cirugía.

En cuanto a la evolución de la estructura del gel preparado en este estudio, tal y como se esperaba, tras su incubación *in vitro*, el Tetronic se disuelve en el medio y se va perdiendo, permaneciendo la estructura del alginato entrecruzado e incrementándose lentamente su porosidad. De hecho, ésta fue una de las hipótesis utilizada a la hora de diseñar el sistema, teniendo en cuenta que el proceso de regeneración del defecto óseo en osteoporosis parece ser más lento que en condiciones no-OP, la adición de alginato persigue prolongar la permanencia del scaffold en el defecto para que este actúe como soporte y guía favoreciendo la formación de nuevo tejido. Además, hay que tener en cuenta que el sistema completo contiene PRGF y microesferas que pueden modificar las propiedades reológicas del hidrogel. Aunque se esperaba que la adición de PRGF produjera un incremento de la viscosidad máxima, la viscosidad de este sistema resultó ser similar al preparado en agua (T-A). El efecto del PRGF se limita a producir una ligera reducción de la temperatura de gelificación, que no supone una gran repercusión en la preparación ni en las características reológicas del sistema. Sin embargo, la adición de las microesferas sí que provoca un incremento significativo de la viscosidad y una disminución de la temperatura de gelificación debido a la interacción

entre las microesferas y el T-1307 tal y como se argumentó anteriormente (Segredo-Morales et al., 2018a).

Una vez comprobado que las características del sistema cumplen los requisitos de propiedades reológicas, estabilidad y liberación controlada de las sustancias activas, el siguiente objetivo fue evaluar el efecto regenerativo de varias combinaciones de sustancias activas dispersas en el gel, además de verificar el efecto de la adición de PRGF en la formación de hueso. Los resultados muestran que el grupo tratado con 17β -estradiol sólo, o combinado con PRGF mejora ligeramente la reparación del defecto frente a los grupos tratados con el sistema blanco. En ambos modelos, no-OP y OP, se aprecia una débil formación de hueso localizada en los márgenes del defecto. Por el contrario, los grupos tratados con BMP-2 en sus dos combinaciones (β E-BMP y PRGF- β E-BMP), muestran una notable reparación con porcentajes de regeneración que doblan los obtenidos en los grupos sin BMP-2, observándose también zonas de osificación intramembranosa en el interior de toda la zona dañada.

El análisis histológico e histomorfométrico mostró que el nuevo hueso en el defecto de los grupos no-OP está más mineralizado que en los grupos OP, independientemente del tratamiento. De hecho, los grupos implantados con el sistema conteniendo solamente microesferas con 17β -estradiol y aquéllos en los que se combinó 17β -estradiol con PRGF y BMP-2, mejoraron la reparación en diferentes grados en ambos casos, OP y no-OP, respecto a los grupos blancos, pero no la mineralización, como demostraron las tasas MB/IB.

La adición de 17β -estradiol tal y como indicamos anteriormente está justificada porque las principales acciones del 17β -estradiol en el hueso a través del receptor de estrógeno β , involucran la expresión génica y la síntesis de proteínas relacionadas con la osteosíntesis y la mineralización (Qiu et al., 2014; Liao et al., 2016; Wang et al., 2016; Alhodhodi et al., 2017). El 17β -estradiol también promueve la deposición del calcio (Li et al., 2014; Liao et al., 2016). Por todo esto, la adición de 17β -estradiol persigue el restablecimiento de los niveles de estrógeno locales en hueso de ratas OP para equilibrar el balance entre la formación y la resorción ósea y, consecuentemente, mejorar el proceso de regeneración y mineralización.

Al igual que los resultados recogidos en el Capítulo 2, la combinación de 17β -estradiol con BMP-2 mejora el porcentaje de hueso reparado en las ratas OP, pero no su mineralización. En este punto se planteó como posible explicación a la débil mineralización, el hecho de que la concentración del 17β -estradiol en el defecto sea inferior a la mínima eficaz como consecuencia, probablemente, de la dosis y o de la cinética de liberación del mismo. Predecir la concentración de 17β -estradiol en el defecto es complicado ya que es un fármaco muy poco soluble en agua, y el medio acuoso que se utiliza para los ensayos de cesión *in vitro* contiene un 50% de MeOH, por lo que se espera que la liberación del 17β -estradiol *in vivo* sea más lenta que *in vitro* (Segredo-Morales et al., 2018b). Por ello y por los resultados obtenidos en el estudio anterior (Capítulo 2), en esta parte del trabajo se incrementó la velocidad de liberación del 17β -estradiol en la segunda fase, disminuyendo la cantidad de polímero utilizado en la preparación de las microesferas del sistema P/T/CD. Además, con la idea de propiciar la mineralización del tejido que rellena el defecto, se prolongó la liberación de la BMP-2, duplicando la concentración de polímero en la preparación de las microesferas, con el propósito de ampliar la disponibilidad de BMP-2 en el defecto. Sin embargo, ninguna de las estrategias aplicadas, tal y como han puesto de manifiesto nuestros resultados, resultó ser eficaz. Por último, tampoco se puede descartar el hecho de que el 17β -estradiol esté actuando mediante otro subtipo de receptor como el α ER o el GPR130 lo que conduciría a una respuesta celular diferente.

En cuanto a la incorporación del PRGF, se esperaba que ejerciera un cierto efecto en las primeras etapas de la regeneración y que, a su vez, contribuyera a incrementar el tiempo de residencia del sistema en el defecto y modular la liberación de las sustancias activas. Sin embargo, el PRGF no produjo ninguna mejora en la regeneración del defecto y no potenció la acción del 17β -estradiol ni de la BMP-2, lo que podría achacarse a que la dosis de factores de crecimiento contenida en el volumen de PRGF inyectada en el defecto fuera excesivamente baja. En cualquier caso, las condiciones presentes en el entorno de estos defectos críticos probablemente no son las más propicias para facilitar la regeneración, pues las células que están localizadas en los bordes del defecto son las únicas disponibles para interactuar con los agentes incluidos en el sistema. Además, probablemente, gran parte de la dosis liberada a tiempos cortos se pierda porque la población celular disponible

es insuficiente para aprovechar la totalidad de la dosis de sustancia activa liberada. Por último, tal y como se comentó, la eficacia del PRGF depende de varios factores, y los efectos de las terapias con este preparado son variables e impredecibles en pacientes ortopédicos. Aunque el PRGF ha sido probado con éxito en diferentes lesiones (Anitua et al., 2012; Rodríguez-Agirretxe et al., 2017; Vaquerizo et al., 2017), e incluso aceptando su contribución a la reparación de algunos tejidos, su papel en lesiones óseas complicadas no está probado (Oryan et al., 2015). El presente estudio demuestra su falta de eficacia en un modelo OP inducido mediante ovariectomía y administración de glucocorticoides.

5. Bibliografía.

- Abrami M., D'Agostino I., Milcovich G., Florentino S., Farra R., Asaro F., Lapasin R., Grassi G., Grassi M. Physical characterization of alginate-Pluronic F127 gel for endumial NABDs delivery, *Soft. Matter*. 10(5) (2014) 729-737.
- Aghaloo T. L., Moy P. K., Freymiller E. G. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60(10) (2002) 1176-1181.
- Alhodhodi A., Alkharobi H., Humphries M., Alkhafaji H., El-Gendy R., Feichtinger G., Speirs V., Beattie J. Oestrogen receptor β (ER β) regulates osteogenic differentiation of human dental pulp cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 174 (2017) 296-302.
- Anitua E., Alkhraisat M. H., Orive G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors, *J. Control. Release* 157 (2012) 29-38.
- Anitua E., Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants, *Int. J. Maxillofac. Implants.* 14(4) (1999) 529-535.
- Anitua E., Orive G., Aguirre J. J., Andía I. Clinical outcome of immediately loaded dental implants bioactivated with plasma rich in growth factors: a 5-year retrospective study, *J. Periodontol.* 79 (2008) 1168-1176.
- Anitua E., Sánchez M., Nurden A. T., Nurden P., Orive G., Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies, *Trends in Biotech.* 24(5) (2006) 227-234.
- Anitua E., Zalduendo M. M., Prado R., Alkhraisat M. H., Orive G. Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: Evaluation of the effect of leukocyte inclusion, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 103 (2015) 1011-1020.
- Augst D., Kong H. J., Mooney D. J. Alginate hydrogels as biomaterials, *Macromolecular Biosci.* 6(8) (2006) 623-633.
- Chen C., Fang C., Al-Suwayeh S. A., Leu Y., You Fang J. Transdermal delivery of selegiline from alginate-Pluronic composite thermogels, *Int. J. Pharm.* 415(1-2) (2011) 119-128.

- de la Riva B., Nowak C., Sánchez E., Hernández A., Schulz-Siegmund M., Pec M.K., Delgado A., Évora C. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 50-58.
- del Rosario C., Rodríguez-Évora M., Reyes R., Simões S., Concheiro A., Évora C., Alvarez-Lorenzo C., Delgado A. Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 463-473.
- Froum S. J., Wallace S. S., Tarnow D. P., Cho S. C. Effect of platelet-rich plasma on bone growth and osseointegration in human maxillary sinus grafts: three bilateral case reports, *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* 22(1) (2002) 45-53.
- Gombotz W. R., Wee S. F. Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31(3) (1998) 267-285.
- Grassi G., Crevatin A., Farra R., Guarnieri G., Pascotto A., Rehimers B., Lapasin R., Grassi M. Rheological properties of aqueous pluronic-alginate systems containing liposomes, *J. Colloid Interface Sci.* 301 (2006) 282-290.
- Jain D., Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40 (2004) 1576-1584.
- Lee K. Y., Rowley J. A., Eiselt P., Moy E. M., Bouhadir K. H., Mooney D. J. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by cross-linker type and cross-linking density, *Biomacromolecules.* 33(11) (2000) 4291-4294.
- Li Y., Yan M., Wang Z., Zheng Y., Li J., Ma S., Liu G., Yu J. 17 β -estradiol promotes the odonto/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via mitogen-activated protein kinase pathway, *Stem Cell Res. Ther.* 5 (2014) 125.
- Liao J., Zhou Z., Huang L., Li Y., Li J., Zou S. 17 β -estradiol regulates the differentiation of cementoblasts via Notch signaling cascade, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477 (2016) 109-114.
- Lin R., Sung K. C., Vong W. J. In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine, *Biomacromolecules.* 5 (2004) 2358-2365.
- Martín del Valle M., Herrero E. P., Martins D. A. O., Galán M. A. Immobilisation of cells in biocompatible films to cell therapy, *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* 2 (2009) 14-19.

- Marx R. E., Carlson E. R., Eichstaedt R. M., Schimmele S. R., Strauss J. E., Georgeff K. R. Growth factor enhancement for bone grafts, *Oral Maxillofac. Surg.* 85(6) (1998) 638-646.
- Okada H., Takahashi K., Ogura N., Tomoki R., Ito K., Kondoh T. Plasma rich in growth factors stimulates proliferation, migration, and gene expression associated with bone formation in human dental follicle cells. *J. Dent. Sci.* 11 (2016) 245-252.
- Oryan A., Alidadi S., Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration, *Expert Opin. Biol. Ther.* 16 (2015) 213-232.
- Paknejad M., Shayesteh Y. S., Yaghobee S., Shariat S., Dehghan M., Motahari P. Evaluation of the effect of plasma rich in growth factors (PRGF) on bone regeneration, *J. Dent. (Tehran)*. 9(1) (2012) 59-67.
- Qiu X., Jin X., Shao Z., Zhao X. 17 β -Estradiol induces the proliferation of hematopoietic stem cells by promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Tohoku J. Exp. Med.* 233 (2014) 141-148.
- Raghoobar M., Schortinghuis J., Liem R. S. B., Ruben J. L., Van der Wal J. E., Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin. Oral Implants Res.* 16(3) (2005) 349-356.
- Rodríguez-Agirretxe I., Freire V., Muruzabal F., Orive G., Anitua E., Díez-Feijóo E., Acera A. PRGF fibrin membrane as an adjuvant to nonpenetrating deep sclerectomy: A 2-Year pilot study. *Ophthalmic Res.* 59 (2017) 45-52.
- Rodríguez-Évora M., Delgado A., Reyes R., Hernández-Daranas A., Soriano I., San Román J., Évora C. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 873-884.
- Rodríguez-Évora M., Reyes R., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Delgado A., Évora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 959-969.
- Sammartino G., Tia M., Marenzi G., Espedito Di Lauro A., D'agostino E., Claudio P. P. Use of autologous platelet-rich-plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted

- mandibular third molars, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63(6) (2005) 766-770.
- Sánchez R., Sheridan P. J., Kupp L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 18(1) (2003) 93-103.
 - Segredo-Morales E., Martín-Pastor M., Salas A., Évora C., Concheiro A., Alvarez-Lorenzo C., Delgado A. Mobility of water and polymer species and rheological properties of supramolecular polypseudorotaxane gels suitable for bone regeneration. *Bioconjug. Chem.* 29(2) (2018a) 503-516.
 - Segredo-Morales E., Reyes R., Arnau M.R., Delgado A., Évora C. In situ gel-forming system for dual BMP-2 and 17 β -estradiol controlled release for bone regeneration in osteoporotic rats. *Drug Deliv. And Transl. Res.* 8(5) (2018b) 1103-1113.
 - Vaquerizo V., Padilla S., Aguirre J. J., Begoña L., Orive G., Anitua E. Two cycles of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) intra-articular injections improve stiffness and activities of daily living but not pain compared to one cycle on patients with symptomatic knee osteoarthritis, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* (2017) 1-7.
 - Wang N., Adams G., Buttery L., Falcone F. H., Stolnik S. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells, *J. Biotechnol.* 144 (2009) 304-312.
 - Wang Y., Li M., Zhang H., Tang M., Guo C., Deng A., Chen Y., Xiao L. Opposite function of ER α and ER β in controlling 17 β -Estradiol-mediated osteogenesis in osteoblasts, *Arch. Med. Res.* 47 (2016) 255-261.
 - Weibrich G., Kleis W. K., Hitzler W. E., Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet rich plasma: a technical report, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 20(1) (2005) 118-123.

Discusión general.

En este estudio se han propuesto dos sistemas hidrogeles que permitan la liberación de 17β -estradiol y BMP-2 formulados en microesferas, para la regeneración de un defecto óseo crítico en un modelo animal de rata OP y se han comparado los resultados obtenidos con un modelo no-OP.

El primer sistema, obtenido por la combinación de un poloxámero (P), una poloxamina (T) y α -ciclodextrina, P/T/CD, se formuló a partir de las concentraciones mínimas de estos componentes que presentaran un evidente comportamiento de gelificación a temperaturas próximas a 37 °C. Las interacciones entre los distintos componentes del sistema, incluida el agua, se estudiaron mediante análisis de RMN. Los resultados mostraron que los coeficientes de difusión en agua de los componentes en la mezcla (α CD, poloxámero y poloxamina) son menores al que presentan cada uno de ellos por separado. Esto es debido a las interacciones y fenómenos de agregación que tienen lugar entre ellos para formar el sistema supramolecular y que están ampliamente documentados (Pradal et al., 2013; Zhou et al., 2013; Simões et al., 2014). Sin embargo, en este trabajo la aplicación de la metodología WDE-DOSY ha permitido estudiar, por primera vez, las interacciones de los distintos monómeros (α CD, PPO y PEO) presentes en el sistema con el agua y, por tanto, los cambios en la accesibilidad de la misma al sistema ternario final. Se observó que la tasa de renovación de agua con las unidades PEO de los polímeros es mucho menor que la que presentan los grupos PPO y que ambas se mantienen con independencia de que los polímeros estén por separado o formando parte del sistema. Sin embargo, en el caso de la α CD, la tasa de renovación de agua aumenta de forma importante cuando ésta se encuentra en el sistema supramolecular con respecto a cuando está sola. Estos resultados ponen de manifiesto que los grupos que se “enhebran” en la α CD son los PEO, desplazando el agua unida en la cavidad de la α CD y aumentando con ello la tasa de renovación de ésta en el sistema supramolecular. Por otro lado, las unidades de PPO, quedan libres para interactuar entre ellas manteniendo así el comportamiento termosensible del sistema formado por el autoensamblaje de las uniones PEO-CD.

El segundo sistema es un hidrogel a base de la misma poloxamina (T) a una concentración más elevada, que se refuerza con una estructura más rígida de alginato entrecruzado para aumentar su tiempo de permanencia en el defecto y también se incorpora PRGF. Además de estas estrategias para mejorar la respuesta, se realizaron algunas modificaciones en la elaboración de las microesferas. Tanto la disminución de la concentración de PLA como el aumento de la concentración de PLGA, descrita en el Capítulo 3, permitieron, como era de esperar, una liberación más rápida y completa del 17β -estradiol como una más lenta para la BMP-2, respectivamente (Figura 1A y B). De esta manera, en 6 semanas se libera un 78-85% del 17β -estradiol total frente al 60-65% cedido desde las microesferas elaboradas siguiendo el protocolo inicial (Figura 1A). Por otro lado, el aumento de la concentración de polímero retrasa la liberación de la BMP-2 de 2 a 6 semanas (Figura 1B).

Aunque, de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, ambos sistemas pueden ser adecuados para ser utilizados como scaffolds en regeneración ósea, hay que indicar que los hidrogeles no modifican el perfil de liberación de las sustancias activas, lo cual supone una limitación. Hubiera sido conveniente una liberación a tiempos cortos más controlada y con un menor efecto burst.

Los análisis reológicos mostraron que el sistema T-A alcanza una viscosidad mayor y a una temperatura inferior que el sistema P/T/CD. Ambos hidrogeles responden por igual a la adición de las microesferas, duplicando su viscosidad (Figura 17, Capítulo 2 y Figura 5, Capítulo 3) pero manteniendo su inyectabilidad y su capacidad para gelificar en el sitio del defecto tras su implantación. Este hecho podría deberse a que los grupos PPO del Pluronic® y Tetronic® del sistema P/T/CD o del Tetronic® en el sistema T-A interaccionan con los polímeros que constituyen las microesferas (PLA-S/PLGA).

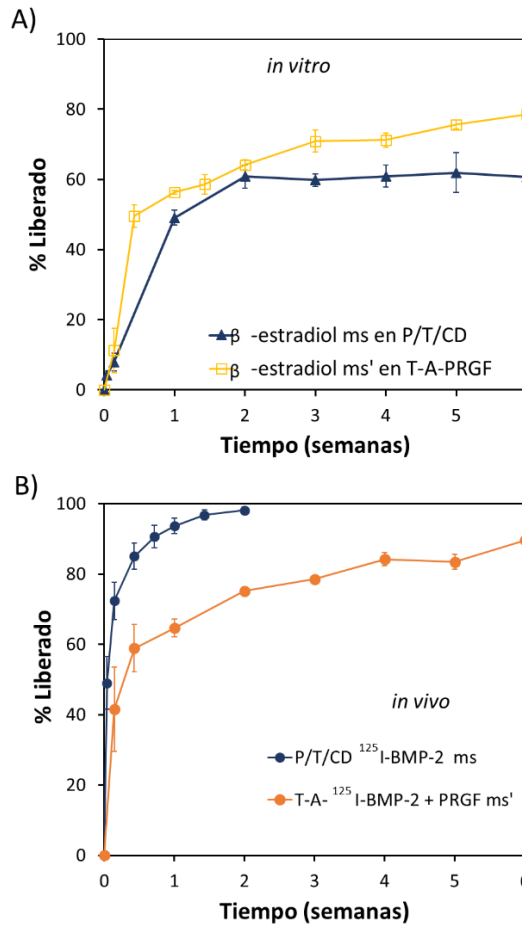


Figura 1. Perfil de liberación A) *in vitro* del 17β-estradiol, obtenido a partir de formulaciones incubadas en tampón fosfato (pH 7,4):metanol (50:50) para las microesferas ms y en agua:metanol (50:50) para las microesferas ms' ambas a 37°C (n=3) y B) *in vivo* de la BMP-2 (n=5) para los sistemas P/T/CD y T-A-PRGF.

En resumen, en cuanto a la valoración *in vitro* de ambos sistemas, incluyendo características reológicas y estabilidad frente a la erosión en medio acuoso, que podría predecir la permanencia en el lugar de administración y el control de la liberación de las sustancias activas tanto *in vitro* como *in vivo* (sólo BMP-2), el sistema T-A parece más prometedor que el P/T/CD ya que la estructura de alginato permanece

intacta durante al menos 4 semanas, se consigue una cesión más rápida del 17β -estradiol, se prolonga la liberación de BMP-2 y, por último, la gelificación del T-A a temperaturas inferiores no sólo no impide su fácil manejo, sino que además facilita y reduce el tiempo de cirugía.

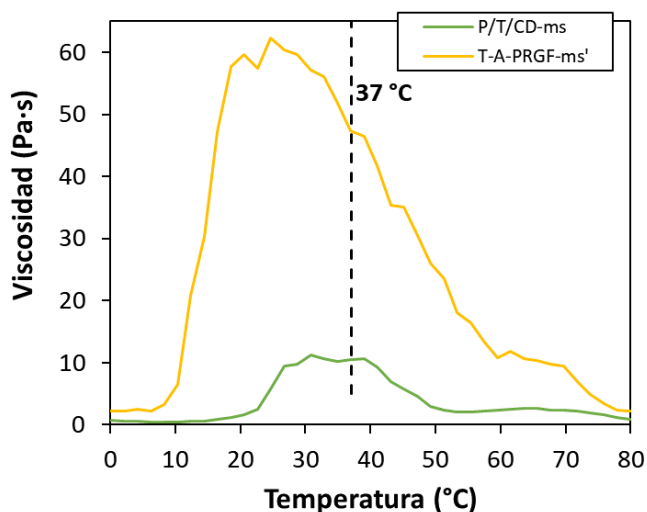


Figura 2. Evolución de la viscosidad con la temperatura del sistema P/T/ α CD 11/7/7 con microesferas (ms) de PLA-S/PLGA (250 mg/ml de gel) (verde) y del sistema T-A-PRGF conteniendo mezcla de microesferas de PLA-S y PLGA (180 mg/mL de gel) (T-A-PRGF-ms') (amarillo).

En cuanto a los ensayos *in vivo*, lo primero a resaltar es que el procedimiento utilizado para desarrollar el modelo animal utilizado induce osteoporosis en el hueso en el que se practica el defecto, a diferencia de otros autores que sólo muestran la osteoporosis observada en huesos largos y el defecto se practica en otras zonas del esqueleto (Everson et al., 2012; Saidak et al., 2012; Wölfle et al., 2014). En este estudio, se observó una clara diferencia en la microarquitectura del hueso extraído de la calvaria entre animales no-OP y OP.

Con respecto a los porcentajes de reparación ósea, en contra de lo esperado, fueron similares con ambos sistemas. El defecto en los grupos

tratados con la combinación de BMP-2 y 17β -estradiol se regenera en un porcentaje entre el 50% observado con T-A-ms' y el 62% con el sistema P/T/CD-ms sin diferencias importantes entre los grupos no-OP y OP (Figura 3). Además, se pudo comprobar que la BMP-2 mejora la reparación ósea en todos los casos, mientras que el aporte de 17β -estradiol sólo tiene efectos significativos en animales OP. La ineficacia de la administración de una segunda dosis en mitad del tratamiento (sistema hidrogel P/T/CD) (Capítulo 2, Figura 25) hizo descartar esta posibilidad para el ensayo del T-A. Igualmente, la adición de PRGF al sistema T-A, que perseguía aportar factores de crecimiento extras que ayudaran en el inicio del proceso de regeneración ósea, no produjo ningún efecto apreciable.

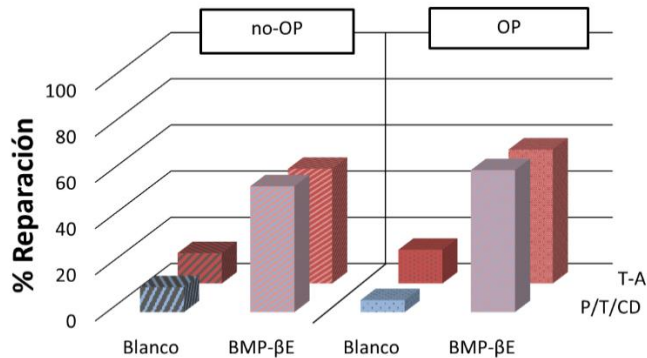


Figura 3. Comparación entre los porcentajes de reparación ósea obtenidos para los sistemas hidrogel P/T/CD y T-A, en ratas no-OP y OP para los grupos blanco y BMP-βE.

Por otra parte, se observan, para ambos hidrogeles, diferencias significativas en la tasa de MB/IB del hueso formado entre los animales no-OP y OP, siendo de 2,7 y 1,6 con P/T/CD y de 1,8 frente 0,9 con T-A, en animales no-OP y OP respectivamente (Figura 4). Estos resultados permiten corroborar que el proceso de regeneración ósea se ve retrasado en condiciones osteoporóticas.

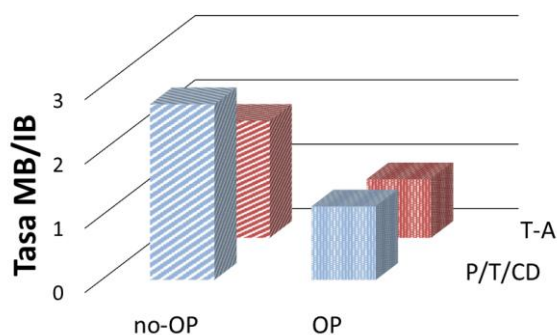


Figura 4. Comparación entre las tasas medias MB/IB para los sistemas hidrogel P/T/CD y T-A, en ratas no-OP y OP obtenidas para los distintos grupos tratados.

Además, los niveles de colágeno tipo I y de osteocalcina confirman lo que ya indicaban los análisis histomorfométricos, el hueso formado en los animales OP está menos mineralizado independientemente del grupo tratado. Sin embargo, observando las Figuras 3 y 4, y siempre teniendo en cuenta el riesgo que conlleva la comparación de resultados obtenidos en dos experimentos distintos con animales si, asumimos que no hay diferencias significativas en la tasa de regeneración observada tras la implantación de ambos sistemas, debemos reconocer que el tejido óseo formado en los grupos no-OP es de mejor calidad que en los OP, tanto con el sistema P/T/CD como con el T-A, puesto que la tasa MB/IB es claramente mayor en no-OP (Figuras 3 y 4). Desde nuestro punto de vista es importante resaltar que la caracterización *in vitro* nos indicaba que el T-A podría ser mejor scaffold y, de hecho, si nos fijamos en la tasa de reparación inducida por los sistemas blancos, se corrobora esa predisposición (Figura 3) pero la tasa MB/IB, en los grupos de animales tratados, resultó ser ligeramente inferior.

Evidentemente ninguno de los dos sistemas por sí mismo es capaz de inducir formación de tejido óseo suficiente para reparar el defecto, se requiere de un aporte de sustancias activas. Por ello, se ha incluido la BMP-2, porque es una proteína que ha demostrado su capacidad

osteoinductora y el 17β -estradiol porque, como se ha indicado anteriormente, en la osteoporosis post-menopáusica hay un déficit de estrógenos. Con ello se pretendía actuar sobre los dos procesos implicados en la remodelación ósea. Además, teniendo en cuenta la insuficiente y lenta capacidad de reparación de las células osteoporóticas, nuestra idea se centró en proporcionar estas sustancias de forma lenta y prolongada en el tiempo, de ahí que se incluyeran en los sistemas pre-encapsuladas en microesferas.

Aunque potencialmente las características de ambos sistemas hidrogel en cuanto a inyectabilidad y adaptación al defecto son favorables y se consiguen porcentajes de reparación sustanciales, ninguna de las dos estrategias utilizadas: una segunda dosis del sistema P/T/CD o una modificación de la cinética de liberación de BMP-2 y del 17β -estradiol, mejoraron los resultados inicialmente obtenidos ni en cuanto a tasa de reparación, ni en lo que es más importante, el grado de mineralización del nuevo tejido óseo que rellena el defecto en los animales OP. Por tanto, debemos seguir optimizando este tipo de sistemas porque lo que sí está claro es que en la regeneración ósea de defectos OP se requiere reforzar las estrategias empleadas en no-OP. Primero, el tiempo de permanencia del scaffold, probablemente sería conveniente prolongarlo y para ello sería muy útil poder hacer un seguimiento *in vivo* de su evolución en el defecto. En este mismo sentido, ayudaría mucho a mejorar el sistema, realizar ensayos de liberación *in vivo* del 17β -estradiol, para conocer su perfil de cesión en su entorno fisiológico. Pues de acuerdo con los resultados observados con BMP-2, la liberación *in vivo* es más rápida que *in vitro*, pero en el caso del 17β -estradiol creemos que podría ser más lenta ya que los disolventes que se utilizan *in vitro* aumentan su solubilidad. Y por último no podemos olvidar que las dosis utilizadas en el estudio podrían haber sido insuficientes para una correcta mineralización del hueso formado.

Bibliografía:

- Everson C. A., Folley A. E., Toth J. M. Chronically inadequate sleep results in abnormal bone formation and abnormal bone marrow in rats, *Exp. Biol. Med.* 237(9) (2012) 1101-1109.
- Pradal C., Jack K. S., Grøndahl L., Cooper-White J. J. Gelation kinetics and viscoelastic properties of pluronic and α -cyclodextrin-based pseudopolyrotaxane hydrogels, *Biomacromolecules*. 14(10) (2013) 3780-3792.
- Saidak Z., Hay E., Marty C., Barbara A., Marie P. Strontium ranelate rebalances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling, *Aging cell*. 11(3) (2012) 467-474.
- Simões S. M. N., Veiga F., Ribeiro A. C. F., Figueiras A. R., Taboada P., Concheiro A., Álvarez-Lorenzo C. Supramolecular gels of poly- α -cyclodextrin and PEO-based copolymers for controlled drug release, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87 (2014) 579-588.
- Wölfle J.V., Fiedler J., Dürselen L., Reichert J., Scharnweber D., Förster A., Schwenzer B., Reichel H., Ignatius A., Brenner R.E. Improved anchorage of Ti6Al4V orthopaedic bone implants through oligonucleotide mediated immobilization of BMP-2 in osteoporotic rats, *PloS One*, 9 (2014), e86151.
- Zhou Y., Fan X., Xue D., Xing J., Kong J. Thermosensitive supramolecular hydrogels from atom transfer radical polymerization of polypseudorotaxanes self-assembled by triblock copolymer and α -cyclodextrins, *React. Funct. Polym.* 73 (3) (2013) 508-517.

Conclusiones.

1. Se requiere al menos un 11% de P y un 7% de T y de α CD para que el sistema terciario P/T/ α CD mantenga sus características reológicas en el intervalo de temperaturas entre 4 °C y 37 °C. El hidrogel 11/7/7 presenta una estructura de polipseudorrotaxanos y la α CD en su composición modifica la accesibilidad del agua y, por tanto, los coeficientes de difusión de sus mezclas.
2. La presencia de alginato entrecruzado en el sistema T-A refuerza la estructura del hidrogel proporcionándole resistencia a la desestructuración por efecto del medio acuoso. La adición de PRGF no modifica las características del sistema e *in vivo* no ejerce respuesta sinérgica en ninguna de las combinaciones estudiadas.
3. La adición de microesferas a ambos hidrogeles modifica las características del sistema lo que se refleja en una ligera reducción de la porosidad, un aumento de la estabilidad y una reducción de la temperatura de gelificación manteniendo su inyectabilidad y su capacidad para adaptarse a la geometría del defecto óseo a reparar.
4. Ambos sistemas soportan el proceso de liofilización manteniendo sus características tras su reconstitución, lo que los hace formulaciones potencialmente estables de fácil manejo y comercialización.
5. El aumento de la concentración de polímero en la elaboración de las microesferas con BMP-2 y la reducción de la concentración de PLA en las microesferas de 17β -Estradiol retrasa y acelera su liberación, respectivamente. La cinética de liberación de la BMP-2 y del 17β -Estradiol es controlada únicamente por las microesferas, los hidrogeles modulan ligeramente la liberación inicial.
6. La combinación de BMP-2 y 17β -estradiol en los sistemas testados es el tratamiento que induce mayor porcentaje de reparación del defecto óseo en el modelo osteoporótico animal propuesto y

similar al observado en los grupos no-osteoporóticos. La administración de una segunda dosis no mejora la respuesta.

7. La combinación de BMP-2 y 17β -estradiol, independientemente del sistema aplicado, no es capaz de inducir el mismo grado de mineralización que el observado en los grupos no-osteoporóticos.
8. A pesar de las aportaciones logradas en este estudio aún queda un largo camino por recorrer en cuanto a optimización de combinación de agentes activos, velocidades de liberación de los mismos y sistemas de administración.

Anexo.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Drug Delivery Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jddst

BMP delivery systems for bone regeneration: Healthy vs osteoporotic population. Review



Elisabet Segredo-Morales, Patricia García-García, Carmen Évora*, Araceli Delgado**

Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Institute of Biomedical Technologies (ITB), Center for Biomedical Research of the Canary Islands (CIBICAN), Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2017
 Received in revised form
 26 May 2017
 Accepted 26 May 2017
 Available online 28 May 2017

Keywords:

Bone regeneration
 BMPs
 Controlled release
 Osteoporosis
 Release kinetics

ABSTRACT

Different systems loaded with bone morphogenetic proteins (BMPs) and in particular BMP-2 and BMP-7 have been proposed to repair bone critical-sized defects. Taking into account the reduced bone repair capacity in osteoporosis, this review focuses on the strategies proposed to repair bone defects in healthy and osteoporosis models using BMPs and paying special attention to the optimization of BMPs' release kinetics. Despite the large number of reports dedicated to bone regeneration, little attention has been paid to optimizing BMP systems for bone regeneration in osteoporosis. In general, most authors suggest that BMP should be released in a controlled manner to maintain effective concentrations in the defect for some time. However, most of the reported *in vitro* release assays were badly designed which makes it difficult to predict the *in vivo* release kinetics. According to published reports, it seems that in osteoporosis the reparative response to BMPs is slower and requires higher doses but the quality of the bone formed is the same as in the healthy population. We conclude that there is still plenty of work to be done for optimizing BMPs systems for osteoporosis.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	107
2. Bone remodeling: osteoporosis and therapy	108
3. BMPs and MSC in bone regeneration. Alterations in osteoporosis	110
4. Bone morphogenetic proteins controlled release	110
4.1. BMP-2 in non-osteoporosis models	110
4.2. BMPs in osteoporosis models	113
5. Discussion and conclusions	115
Acknowledgments	116
References	116

1. Introduction

Bones are often subjected to injuries commonly related to sports, work accidents, road traffic accidents and diseases such as tumors or infections [1–3] resulting in a large loss of mass which

bones cannot self-repair. Consequently, critical-size defects appear [4]. Likewise, complications in fracture healing sometimes lead to non-union fractures. The treatment of these conditions, both non-unions and critical-sized defects, often requires the use of bone grafts to fill the lack of bone in the defect [5]. Today bone graft is considered the gold standard for treatment of bone defects, but several drawbacks exist [6–9]. The main limitations of this technique are the limited availability and the risks involved in removing living bone tissue such as donor site pain and morbidity [10,11]. The use of allografts and xenografts could be a good alternative but the

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: cevora@ull.es (C. Évora), adelgado@ull.es (A. Delgado).

risk of rejection by the immune system exists [9,12]. For all these reasons, great effort has been put in to develop new systems to efficiently induce bone tissue regeneration.

Bone repair is a complex cascade of biological events controlled by numerous cytokines and growth factors that provide signals at local injury sites, allowing progenitors and inflammatory cells to migrate and trigger healing processes. One approach in tissue engineering includes delivery of growth factors to stimulate cellular adhesion, proliferation and differentiation, thus promoting bone regeneration. In such an approach, growth factors may be delivered at localized orthopaedic sites in combination with optimally designed biodegradable carriers. The carrier primarily acts as a local regulator to control doses and growth factors release kinetics, thus increasing their potential retention time at therapeutic concentration levels. However, the importance of the carrier is not limited to such roles, but their role must be extended to serving as temporary substrate and three-dimensional matrix for cellular infiltration in which cells can grow and differentiate into particular tissue types in concert with degradation of the carrier material.

Scaffolds for bone regeneration should meet certain criteria to serve this function, including mechanical properties similar to those of the bone repair site, biocompatibility and biodegradability or osteointegration at a rate commensurate to remodeling. Scaffolds serve mainly as osteoconductive support. The new bone is formed from cells and substances from adjacent living tissue. In addition to osteoconductivity, scaffolds can be used as delivery vehicles for active molecules involved in the process of bone regeneration such as platelet derived growth factor (PDGF), bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), insulin-like growth factors (IGFs) and transforming growth factors (TGFs) that transform recruited precursor cells from the host into bone matrix producing cells, thus providing osteoinduction. Combination of scaffolds, signal molecules and cells is a strategy to mimic the physiological cascade of events that take place during the process of bone formation [13–15].

According to Lee et al., 2010 [16] and to our own experience [17–22], the spatiotemporal control over the location and bioactivity of factors after introduction into the body is crucial to achieve tangible therapeutic effects. The complex processes of cell migration, proliferation and differentiation are typically dependent on both presence of specific growth factors and their time-dependent and spatial distributions. Complex biomaterial systems governing the release kinetics of the different growth factors may be critical to control biological processes. Nowadays the repair of critical bone defects remains a major clinical orthopaedic challenge. The situation may be worse in osteoporotic patients. Although much emphasis has been placed on the design, development and evaluation of biocompatible systems to induce bone regeneration, little attention has been paid to the extra requirements in osteoporosis.

BMPs, and in particular BMP-2 and BMP-7, have been extensively studied incorporated in scaffolds or systems to repair bone critical size defects, because of their high capacity to induce bone formation. Therefore, this review is focused on the strategies proposed during the XXI century to repair large bone loss in osteoporosis models using these growth factors and paying special attention to the optimization of BMPs' release kinetics. This review includes, firstly, a brief exposition of some aspects of osteoporosis which helps to understand the bone regeneration strategies applied until now. Secondly, an overview of the controlled release systems proposed for BMPs, in particular BMP-2, applied for bone regeneration in non-osteoporotic population. Finally, the last part constitutes the discussion on the recent strategies proposed for bone regeneration in osteoporotic population.

2. Bone remodeling: osteoporosis and therapy

Osteoporosis is a major health care problem worldwide. Osteoporosis is predominantly a disease of aging, affecting postmenopausal women and older men as well as patients suffering secondary osteoporosis caused by prolonged glucocorticoid treatment. The high risk of fractures with the consequent associated morbidity and mortality leads to increased financial burden on healthcare systems. The incidence of osteoporosis-related fractures is expected to rise substantially over the coming decades. The estimated number of hip fractures worldwide will rise from 1.7 million in 1990 to 6.3 million in 2050. Approximately 1 in 2 women and 1 in 4 men will have an osteoporosis-related fracture sometime after 50 years of age [23].

The development and maintenance of bones depends on the coordinated actions of matrix-resorbing hematopoietic lineage-derived osteoclasts and matrix producing mesenchyme-derived osteoblasts. The dynamic process of bone remodeling is supported by the tightly balanced actions of osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes. The predominant form of bone turnover in skeletally mature adults has a metabolic role in mineral homeostasis and is mediated by the coordinated activities of osteoclasts and osteoblasts within each basic multicellular unit. Basic multicellular unit based bone remodeling is initiated by bone resorbing osteoclasts. The osteoblast refills bone cavities with organic bone matrix called osteoid and the mineralization of osteoid gives the tissue strength and stiffness (Fig. 1). Finally, osteoblasts become bone-lining cells on the surface of the newly formed bone, die by apoptosis or become osteocytes (Fig. 1). So, within each basic multicellular unit, activities are “coupled” if the amount of bone formed by osteoblasts equals and compensates for bone that was previously resorbed by osteoclasts. As this balance is governed by factors released by the osteocyte network, these bone cells play an important role in bone homeostasis. Osteocytes regulate the differentiation and function of osteoclasts and osteoblasts through the release of signaling molecules. Consequently, within a basic multicellular unit, unbalanced bone remodeling can cause alterations in bone mass because the refilling of resorption porous can be incomplete and progressive bone loss may occur. All this may lead trabecular perforations, deterioration of trabecular microarchitecture and increased bone fragility.

In the regulation of bone formation and resorption numerous systemic molecules are involved, such as steroid hormones, parathormone (PTH), vitamin D and its metabolites, and calcitonin, as well as locally secreted proteins, such as macrophage colony-stimulating factor (mCSF), osteoprotegerin (OPG), sclerostin, receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), and various growth factors, which exhibit control over remodeling behaviors. Furthermore, the major osteogenic pathways of mesenchymal progenitor cells are the BMP signaling cascade, Wnt/frz/LRP5 signaling and the PTH1R pathway. Their upstream regulation involves inhibitors of the respective cascades, like Noggin and its DAN family relatives for BMP signaling, and sclerostin, Dickkopf-related protein 1 (Dkk1) and secreted Frizzled-related proteins (sFRPs) for the Wnt signaling pathway (Fig. 1). However, dysregulation of these modulators can lead to alteration of the balance between osteoclast and osteoblast activity, as it is normally the case for primary osteoporosis arising in postmenopausal women and elderly men [24,25]. Osteoporosis leads to fragility fractures because bone formation and/or the mechanical response to physical strain are not sufficient to produce adequate fracture resistance. From this brief update of bone biology, it becomes clear that the supply rate of new osteoblasts and osteoclasts and the timing of the

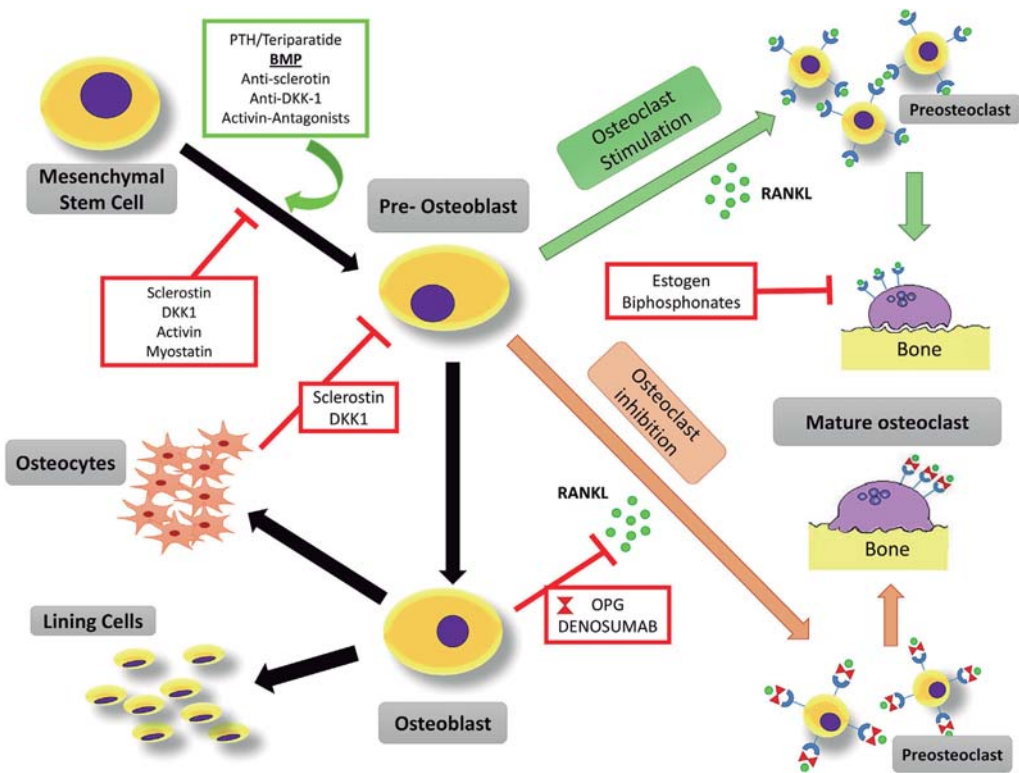


Fig. 1. Bone regeneration and remodeling cascade, bone formation and bone resorption are regulated by key factors. Parathormone (PTH) and bone morphogenetic protein (BMP) signaling leads to activation of osteoblast differentiation. Contrary, Dickkopf-related protein 1 (DKK1) and sclerostin are antagonistic inhibitors of the WNT signaling pathway. On the other part, osteoclasts initiate the remodeling process when receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) bind to its receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), located on the surface of the osteoclasts. This bound is naturally inhibited by osteoprotegerin (OPG) and therapeutically by the antibody denosumab. Estrogens reduce the production of RANKL by the osteoblasts.

death of these cells by apoptosis are critical determinants of the initiation of new basic multicellular units and/or extension or shortening of the lifetime of existing ones.

Although the aim of this review is not focused on the treatment of osteoporosis, it can help to understand the difficulty that regenerating bone defects entails in this pathology. An overview of current therapy and new strategies under study is included. Signaling pathways are critical in regulation of how osteoclasts and osteoblasts control bone turnover leading to bone loss after menopause and during normal aging [26]. Obviously, osteoclasts and osteoblasts results target for pharmaceutical intervention and the currently available osteoporosis treatments target for either resorptive events (inhibiting osteoclasts' functions) or anabolic events (stimulating osteoblasts) [27].

Most of the current therapies for treating osteoporosis focus on inhibiting bone resorption and there are only a few agents available that promote bone formation. Anti-resorptive treatments consist primarily of bisphosphonates, hormone replacement therapy, strontium ranelate, calcitonin, selective estrogen receptor modulators (SERM) or the most recent agent cathepsin K inhibitors and RANKL antibody such as denosumab, designed on the base of bone biology. On the anabolic side, among the drugs that enhance bone formation instead of reducing bone resorption, parathormone and its fragment teriparatide (PTH1-34) are the only anabolic drugs against osteoporosis marketed today [27]. These new agents are

largely focused on targets in signaling pathways that stimulate osteoblast function as other agents acting on the same pathway as parathormone, abaloparatide [28,29]. Thus, on the base of the Wnt/betacatenin signaling pathway, which is a key regulator of bone homeostasis and a strong regulator of bone formation, new therapeutic options have emerged as a potential alternative targeted to the parathormone signaling pathway. These include antibodies for sclerostin [30] and Dkk-1, as well as inhibitors of sFRPs-1 and glycogen synthase kinase 3 β . Dkk-1 is a negative regulator of bone homeostasis and levels are significantly higher in osteoporotic women compared with controls. Manipulation of its function and expression has therapeutic significance for the treatment of osteoporosis and progressive Dkk-1 reduction has been shown to increase trabecular and cortical bone mass in mice and primates [31]. Osteocytes produce sclerostin, an inhibitor of the anabolic Wnt signaling pathway, which constitutes a key negative regulator of bone formation [25]. Blosozumab and romosozumab humanized monoclonal antibodies targeted to sclerostin are undergoing clinical study for the treatment of osteoporosis [32,33].

In recent years, the understanding of bone physiology and the mechanisms involved in the development of osteoporosis has significantly advanced and this has led to the new therapies [23]. Despite the fact that the recent development of new agents has shown remarkable anabolic activity in bone leading to increased bone density, bone resorption and formation remain coupled.

Consequently, anti-resorptive treatments increase bone mineral density but only to a certain extent because a reduction of osteoclast avoids bone formation by osteoblasts. Similarly, the anabolic agent stimulates osteoblasts and subsequently osteoclasts, which limits the effect. One option could be the combination of anti-resorptive and anabolic therapies. In this way, an additive effect on bone mineral density of the combination of teriparatide and denosumab was demonstrated for the first time. However, anti-fracture efficacy has not been demonstrated yet [27].

3. BMPs and MSC in bone regeneration. Alterations in osteoporosis

Mesenchymal stem cells (MSC) are the cellular sources of fracture healing. Upon stimulation with cytokines and chemokines, hMSC migrate to the fracture site where they proliferate and differentiate into osteogenic precursor cells [34]. Recruitment of hMSC to the fracture site requires active migration towards chemokines or cytokines and invasion by proteolytic interaction with the extracellular matrix (ECM) [35]. Some of the most potent chemoattractants belong to the tumor necrosis factor (TNF) and the transforming growth factor beta (TGF- β) super-families [36,37]. Growth factors of TGF- β family play important roles in skeletal development. As a member of the TGF- β family, BMP-2 and BMP-7 are known to induce migration in hMSC [38,39]. With regard to the osteoinduction of MSC, key agents are also BMPs [40]. BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, and BMP-7 induce osteoblast differentiation (Fig. 1) [41]. BMP signaling leads to activation of the expression and activity of genes necessary for osteoblast differentiation [42].

Analysis of a large number of osteoporotic fractures from both animal studies and clinical reports support that osteoporosis is associated with delayed fracture healing [43–45]. Animal models revealed a delay in callus formation and endochondral ossification of the osteoporotic fracture [46,47]. Fractures to the osteoporotic bone typically feature more complex fracture patterns, reduced cancellous and cortical bone, leading to an impaired stability of the osteosynthetic fixation [48]. In general, osteoporotic bones seem to present a reduced capacity for self-repair of fractures [44].

Molecular biological alterations of MSC have been detected in osteoporotic samples. A significantly reduced migration and invasion upon BMP-2 or BMP-7 stimulation in hMSC derived from osteoporotic patients, was demonstrated [35]. Nevertheless, the maintained migration and invasion response upon BMP stimulation illustrates the therapeutic potential of these substances in the treatment of osteoporosis fractures. Furthermore, decreased proliferative capacity [34], production of type I collagen-deficient matrix [49], and tendency to adipogenic differentiation significantly reduced osteogenic differentiation capacity of hMSC from osteoporotic patients [40,49,50]. hMSC of osteoporotic patients seem to feature an impaired phosphorylation of some proteins in response to BMP-2 and decreased basal expression levels of some genes [42]. However, it has been reported that hMSC from healthy and osteoporotic patients responded with further increase of osteogenic differentiation similar to BMP-2 stimulation [49].

Moreover, estrogen deficiency, a main post-menopausal osteoporosis characteristic, leads to moderately delayed fracture healing and impaired callus biomechanics, while hormone replacement can rescue these effects [51,52]. 17 β -estradiol induces apoptosis in bone resorbing osteoclasts and is antiapoptotic in osteoblasts, leading to an overall building of bone [53,54]. Furthermore, 17 β -estradiol also induces transcription of alkaline phosphatase and BMP-2 in osteoblasts, thus regulating osteoblast differentiation [55].

Glucocorticoid is known to induce osteoporosis mainly by suppressing osteoblast-mediated osteogenesis [51]. Also dexamethasone suppresses both the BMP and Wnt pathways by

enhancing the expression of their antagonists, suggesting that glucocorticoids can suppress osteoblastic differentiation and activity through the dual signaling modulation [56].

All these findings together with the decrease of the expression of BMPs in osteoporosis, make BMP-2 a promising cytokine for the treatment of osteoporotic fractures [57]. BMP-2 and BMP-7 are both clinically approved for the treatment of distinct fracture entities [58,59].

4. Bone morphogenetic proteins controlled release

As already mentioned above, the spatiotemporal control of exogenous factors delivery to maintain a sufficient concentration of the growth factors at the target site, in a manner that mimics the normal physiologic process, is essential for bone regeneration. BMPs are expressed throughout the physiological repair process because they are involved in cell recruitment, proliferation and differentiation of MSCs to osteoblast lineage [3,60,61]. Therefore, systems should be designed to mimic the physiological release profile.

4.1. BMP-2 in non-osteoporosis models

A large number of studies has been carried out using BMP-2 for bone regeneration in healthy population (Tables 1 and 2). Consequently, we have restricted our literature review only to the articles where the release kinetics of BMP-2 from systems applied to critical defects in non-osteoporosis models, was monitored. However, little attention has been paid to the optimal BMP-2 release profile to enhance *in vivo* osteogenic efficacy. Based on *in vitro* release assays, some authors report that long-term delivery with no or short burst release enhances the *in vivo* osteogenic efficacy of BMP-2 in a rat ectopic model (not included in Table 1 because of ectopic model) [62]. Other authors suggest that a burst release followed by sustained release better promotes new bone formation [63,64]. As shown in Table 2, *in vitro* release assays do not reflect the BMP-2 *in vivo* release. In general, *in vivo* release is faster than *in vitro* (Fig. 2) [19,99,101]. *In vivo* release is affected by physiological determinants such as blood flow rate, inflammatory reactions and cellular activity, which can accelerate protein release, modify the system degradation and therefore justify a faster *in vivo* data recording. Our previous results clearly demonstrate that controlling the presence of BMP-2 at the defect site is essential to accomplish substantial bone regeneration [19,20]. However, the optimal BMP-2 residence time in the defect to efficiently induce bone regeneration also depends on the composition and structure of the 3D scaffold. Our previous results obtained in a critical size calvaria model in rats with BMP-2 formulated in scaffolds, indicated that highly porous solid scaffolds seem to require slower *in vivo* BMP-2 delivery than hydrogel carriers [19–22]. Slowly degradable scaffolds probably hinder the cells' entry and delays new bone formation. In fact, we did not observe any effect when BMP-2 was released in less than one week from solid scaffolds [19]. In contrast, high regeneration was observed when the BMP-2 release period was 3–6 weeks ([19,21], Table 2). BMP-2 was released from hydrogels in 1–2 weeks because of dissolution of the hydrogel and regeneration of the defect was similar or even better than with the solid scaffolds. The scaffolds must leave place for new tissue but at the same time the carrier must provide support and BMP-2 during time enough to initiate the repair process [20,22].

As BMP-2 is in the market as a solution to be soaked in a collagen sponge, several studies are dedicated to comparing the newly proposed BMP delivery system with the commercial one (Tables 1 and 2). In fact, many of the undesirable effects of BMP may be due to high doses and non-optimized protein released from the

Table 1Summary of biodegradable/osteointegrable BMP-2 delivery systems tested *in vitro* for release kinetics and *in vivo* for bone regeneration in a critical-size bone defect.

Delivery system	<i>In vitro</i> BMP-2 release profile	Critical bone defect/ BMP-2 dose	Bone regeneration	ref
BMP loaded injectable poly(phosphazene) nanocomplex hydrogel. For comparison, a BMP aqueous solution was used.	No burst. 50% released in 3 W and \approx 100% in 7 W at nearly constant rate	Mouse calvarial (5 mm \emptyset)/ 5 and 10 μ g BMP	At 8 W, BV of 17.5 mm ³ and 33 mm ³ were obtained with 5 μ g and 10 μ g of BMP respectively, in nanocomplex hydrogel. With BMP in solution (10 μ g), only 3.8 mm ³ of regenerated bone was observed.	[65]
Modified mPEG-PLGA thermosensitive hydrogel. Autologous bone implant used for comparison.	No burst. Near linear rate reaching \approx 40% released at the end of assay (4w).	Rabbit femora segment (10 mm)/ 5, 10 and 20 μ g BMP	At 8 W and 12 W, bone healing rate correlated with the BMP dose. Complete bone healing was only obtained with 20 μ g BMP and with the autograft implant. Bone healing not occur with blank hydrogel.	[66]
PEGylated fibrinogen hydrogel matrix	\approx 6% released at 1 d and 7% at the end of assay (10 d)	Mouse calvarial (5 mm \emptyset)/1 μ g BMP	At 6 W, there was 39% more new bone compare with the blank matrix.	[67]
Glycidyl methacrylate modified HA hydrogel with 3 different degradation rate.	BMP was released in \approx 5 d from all hydrogels. 100% was released from the fast and intermediate degrading hydrogels and \approx 75% from the slow one.	Rat calvarial (5 mm \emptyset)/5 μ g BMP	At 6 W, similar mineral volume was obtained with the 3 types of HA containing BMP (\approx 6.5–7.5 mm ³) but higher than with blanks (\approx 1.3–2 mm ³)	[68]
BMP dispersed in PEG-silk hydrogel without and with polymeric particles (PLA or PLGA)	\approx 3–4.5 released at 1 d followed by a constant released reaching at the end of assay (61 d) the \approx 25%, 22.5% and 19.5% from pure gel or the combination with PLGA and PLA particles respectively.	Rat calvarial (8 mm \emptyset)/2.5 μ g BMP	At 8 W, with scaffolds containing BMP, the percentage of new bone was significantly higher with gel containing PLA particles (32.5%) than that containing PLGA particle (15.4–20.6%) or the gel alone (13.8%).	[69]
RGD-Alginate hydrogel compared with collagen sponge, both of them surrounded by a PCL nanofiber mesh	\approx 3% and 15% was released at 1 d from alginate and collagen respectively. From both scaffolds, \approx 20% was released at 5 d and \approx 20–25% at 2 W with no further release until the end of assay (26 d)	Rat femora segment (8 mm)/30 μ g BMP	At 8 and 12 W, total BV and BV within the defect space was significantly higher with alginate than with collagen. The heterotopic BV was significantly lower in alginate (30%) than in collagen (50%).	[70]
Collagen scaffold with and without a peptide nanofiber (NF) based hydrogel	\approx 20% and 7% released at 1 d; \approx 37% and 26% at the end of assay (23 d) from Col and Col-NF respectively	Rat cleft palate (7 \times 2.5 \times 1 mm ³)/ 12 μ g BMP	54% and 75% of bone filling at 4 W, reaching at 8 W, the 72% and 88% with BMP in Col and Col-NF respectively. BMP in Col-NF show bone bridging from 4 W, with the Col scaffold do not.	[71]
Keratine as hydrogel or as freeze-dried scaffold. For comparison collagen scaffold was used.	\approx 12% was released from keratine carriers at 1 d, reaching 16% at 5 d from keratine scaffold and 32% at 1 W from keratine gel. From collagen sponge \approx 6% was released in 1 d and \approx 7% in 5 d. No further release observed from any carrier (end of assay at 4 W).	Rat mandible (5 mm \emptyset)/5 μ g BMP	All BMP carriers (collagen, keratine gel, and keratine scaffold) were statistically equivalent and show a 100% of regeneration at 8 W compared with the blank carriers (40–75%). Keratine gels and scaffolds containing BMP had significantly less ectopic growth than BMP in collagen at both, 8 W and 16 W.	[72]
Keratose scaffold. Collagen scaffold (Infuse [®]) for comparison.	BMP-2 from keratose and collagen scaffolds shows a logarithmic release profile. \approx 61% and 36% released at 1 d reaching \approx 80% and 75% at 4 W (end of assay) from keratose and collagen scaffolds respectively.	Rat femora segment (8 mm)/50 μ g BMP	At 8 W and 16 W, regeneration was similar with both, Keratose and Infuse [®] scaffolds containing BMP. The regenerated bone show greater volume and mineral content but less density than the normal bone. In addition, keratose reduce the formation of adipose tissue within the defect.	[73]
Collagen-chondroitin sulfate disc loaded with BMP and coated with PLLA-sucrose acetate isobutyrate.	No release was detected during the first 2 days. At 3 d \approx 12% was released and 50% at the end of assay (2 W).	Rat femora (3.2 mm \emptyset)/1 and 2 μ g BMP	At 3 W, radiological and histological scores with the two BMP doses were almost the same and significantly higher than those of blank scaffold or empty defect.	[74]
Biomimetic heparin-binding peptide amphiphile nanofibers gel into a collagen matrix. For comparison collagen scaffold was used.	\approx 23% was released from nanofibers gelled with heparan sulfate, reaching \approx 34% at 5 d with nearly no further released (end of assay at 8 d). Release was faster from nanofibers without HS (\approx 45% released at 1 d and \approx 84% at 5 d with no further release)	Rat femora segment (5 mm)/1 μ g BMP	BMP in scaffold with heparan sulfate (HS) nanofibers show a significantly greater volume of regenerated bone (20.3 mm ³) than those without HS (5.9 mm ³) or those with BMP in the collagen scaffolds (8.2 mm ³).	[75]
BMP dispersed in Collagen-HAP scaffold	\approx 10% released at 1 d followed by a sustained released reaching the 25% at the end of assay (3 W)	Rat calvarial (7 mm \emptyset)/ 2 μ g BMP	At 8 W, area of new bone and the % BV/TV were significantly higher (\approx 1.9 mm ² and \approx 42%) compared with the blank scaffold (\approx 0.2 mm ² and \approx 4%)	[76]
BMP onto Collagen-HAP disc (Healos [®]) coating with PEG hydrogel.	Only 2% released at the end of assay (10 d)	Mouse calvarial (3.5 mm \emptyset)/2 μ g BMP.	At 4 W, BV significantly higher with scaffold containing BMP, in young (5 \pm 0.8 mm ³) and old (4.6 \pm 0.5 mm ³) mice, compared with blank scaffold (0.8 \pm 0.1 mm ³)	[77]
BMP incorporated in apatite-coated collagen scaffold. BMP in non-coated scaffold for comparison.	Non coated scaffold release 98% at 1 d. The Apatite coated collagen show a 32% released at 1 d followed by a sustained release, reaching >90% in 13 d.	Mouse calvarial (4 mm \emptyset)/1 μ g BMP	At 8 W, BMP from apatite-coated collagen resulted in 2.5-fold higher bone formation volume (\approx 88%) and 4.0-fold higher bone formation area (92%) than non-coated one.	[78]
BMP encapsulated in PLGA microparticles and dispersed into a Collagen-HAP scaffold	No burst. Constant rate reaching \approx 12% released at the end of assay (4w).	Rat calvarial (7 mm \emptyset)/6.6 μ g BMP	At 8 W, area of new bone was significantly higher (\approx 4.4 mm ²) compared with the blank scaffold (\approx 1.9 mm ²).	[79]
Collagen (InductOs [®]) vs fibrin matrix	<5% released at 1 d; \approx 10% and \approx 30% at 12 d from collagen and fibrin respectively, reaching the \approx 15% and \approx 75% respectively at 14 d (end of assay).	Rat femora segment (4 mm)/BMP: 72 μ g (collagen) and 10 μ g (fibrin)	At 8 W, no significant differences in bone formation between both, collagen and fibrin scaffolds containing BMP (27–32 mm ³) but significantly higher compared with blank scaffolds (14–15 mm ³).	[80]

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Delivery system	In vitro BMP-2 release profile	Critical bone defect/ BMP-2 dose	Bone regeneration	ref
Gelatin/nanoHAp/fibrin scaffold. BMP loaded in the fibrin glue	BMP was released at \approx constant rate: 1.5% at 1 d, 50% at 15 d and 100% released at 40 d.	Rabbit radius segment (15 mm)/10 μ g BMP	At 12 W, bone mineral density with BMP scaffold (0.238 g/cm ²) was similar to the normal bone (0.287 g/cm ²) and significantly higher than blank scaffold or empty defect (0.176 or 0.049 g/cm ² respectively)	[81]
PLGA/nanoHAp particulates dispersed in fibrin gel. For comparison fibrin gel was used.	From fibrin gel, \approx 15% was released at 1 d and 60% at 2 W with no further released. From the gel containing PLGA/HA particulates, \approx 9% was released at 1 d, \approx 40% at 4 W and \approx 50% at the end of assay (8 W)	Rat calvarial (8 mm \emptyset)/5 μ g BMP	At 8 W, bone regeneration with BMP in gel containing PLGA/HA particulates (\approx 92%) was significantly higher than from BMP in fibrin gel (\approx 72%) or the blanks (\approx 19%). Radiologically, results obtained with both systems were similar (\approx 86–88%) but higher than blanks (\approx 24%).	[82]
honeycomb-like porous PCL scaffolds. BMP loaded using fibrin sealant	Triphasic release profile with concentration peaks at 2 h, 7 d and 16 d.	Rabbit ulna segment (15 mm)/75 μ g BMP	At 8 W, a BV/TV (\approx 53%) significant higher than blank scaffold or empty defect (\approx 18–20%) respectively)	[83]
BMP joint to heparin-PLGA nanoparticles (NP) and disperse in fibrin gel. For comparison, BMP in fibrin gel alone was used.	\approx 5% and 18% released at 1 d from NP-fibrin and fibrin gel respectively. At the end of assay (15 d) BMP released reach \approx 23% (1%/day) from NP-fibrin and 58% (4%/day up to 9 d) from fibrin.	Rat calvarial (8 mm \emptyset)/4 μ g BMP	At 4 W, bone regeneration was significantly higher with scaffolds containing BMP compared with blank one. Significantly improved bone regeneration was get with BMP in NP-fibrin compared with that in fibrin gel.	[84]
Fibrin glue. For comparison, same dose of BMP in solution was used.	\approx 40% released at 1 d, 70% at 3 d and \approx 95% at 10 d (end of assay 17 d).	Rabbit tibia segment (10 mm)/100 μ g BMP	At 8 W, there were significant differences in BV/TV between BMP treatments and blank scaffold (\approx 27%). BV/TV was significantly higher with BMP suspended in fibrin (\approx 48%) than in solution (\approx 36%)	[85]
BMP incorporated in CS matrix with and without HAp microspheres	From CS matrix, 20% released at 1 d reaching 80% at 30 d. Release was slower from HAp/CS composite (<5% at 1 d and 75% at 45 d). No further release until end of assay (60 d)	Rabbit radius segment (20 mm)/5 μ g BMP	At 12 W and 16 W, bone healing was significantly higher with BMP incorporated in HAp/CS composite (scores \approx 10 and 12) than in CS matrix (scores \approx 8 and 9).	[86]
BMP-loaded CS-NP and dispersed in a Photocrosslinked hydrogel (PH). For comparison BMP dispersed in the PH was used.	\approx 30% and 35% released at 1 d from BMP encapsulated (NP) and solution respectively. At the end of assay (1 W) BMP released reach 50% and 89% from NP and solution respectively.	Rabbit radius segment (18 mm)/50 μ g BMP	At 4 W and 12 W, BMP in NP produce a significantly higher BMC and BMD compared with BMP in solution. At 12 W, BMP in NP complete bone repair with an appearance similar to the normal radius, BMP in solution do not.	[87]
BMP-loaded 2-N,6-O-sulfated CS-NP in a gelatin sponge. For comparison BMP disperse in the gelatin sponge was used.	From CS-NP in the gelatin sponge \approx 15% BMP was released at 1 d followed by a gradual release reaching 78% at the end of assay (3 W). From gelatin sponge or a mixture of gelatin + CS, 45% BMP was released at 1 d reaching 95% release at 1 W with no further release (end of assay 3 W)	Rabbit radius segment (18 mm)/50 μ g BMP	At 4 W, 8 W and 12 W, bone regeneration obtained with BMP-loaded CS-NP in gelatin sponge was significantly greater than with BMP in a mixture of gelatin + CS or gelatin sponge. No significant differences were found between BMP in gelatin and the blank scaffold (without BMP)	[88]
Gelatin microparticles in a porous PPF scaffold	19.7% was released at 1 d reaching \approx 40% at the end of assay (4 W).	Rat calvarial (8 mm \emptyset)/0.63, 1.25 and 2.5 μ g BMP	At 12 W, bone regeneration was significantly higher and dose dependant for 2.5 μ g (37.4%) and 1.25 μ g (19.4%) doses compared with blank scaffold. No difference was found between blank and scaffold with 0.63 μ g of BMP.	[89]
Poly(LA-co-CL) scaffolds with BMP: adsorbed, covalently linked or encapsulated (PLGA microspheres).	BMP physically adsorbed and the encapsulated show a burst release (1 d) followed by a plateau and a sustained released respectively, both of them given the greatest release between 21 and 40 d (end of assay 70 d). BMP covalently linked showed no release.	Rat mandible (5 mm \emptyset)/1 μ g BMP	At 4 W, results showed accelerated bone regeneration with the different ways to join the BMP (BV/TV 10–13%) except for that covalently linked (<5%) that was comparable to the blank scaffold (without BMP).	[90]
BMP in PU and in PLGA-L or PLGA-S microspheres/PU composite scaffolds.	36%, 25% and 3% released at 1 d followed by: \approx 58%, 50% and 10% at 5 d; 78%, 68% and 22% at 21 d (end of assay) from PU, PLGA-L/PU and PLGA-S/PU respectively	Rat femur plug (3 mm \emptyset x 5 mm deep)/2 μ g BMP	At 4 W, significantly higher BV/TV with all scaffolds containing BMP compared with blank scaffold (\approx 32%). BMP-PU showed significantly higher BV/TV (\approx 52%) compared with BMP-PLGA/PU scaffolds (\approx 40%) that showed no significant difference between them (PLGA-S and PLGA-L).	[63]
BMP in PU and in PLGA microspheres/PU composite scaffolds. For comparison collagen scaffold was used.	36% and 3% released at 1 d followed by: 58% and \approx 10% at 4 d; 61% and 22% at 21 d (end of assay) from PU and PLGA/PU respectively. From collagen, 92% was released at 1 d and 100% at 2 d.	Rat femora segment (6 mm)/2 μ g BMP.	At 4 W and 8 W, BV significantly higher with BMP from PU scaffold (\approx 45 mm ³) than from collagen (\approx 30 mm ³) and both of them higher than PLGA/PU (\approx 10–12 mm ³) composite that no show significant differences with the blank scaffold. No differences in bone regeneration between 4 W and 8 W in any case.	[64]
PLGA/PEG scaffold	\approx 20% released at 1 d and 70% at 3 W.	Mouse calvarial (5 mm \emptyset)/1 μ g BMP	At 6 W, a bone volume of 55% was observed compared with the 31% in the blank scaffold	[91]
PCLF/HAp/PVA scaffold	A burst release of \approx 1.4 μ g at 1 d followed by a cumulative release of \approx 1.8 μ g at 5 d and \approx 2 μ g at 10 d. No further release until the end of assay (3 W)	Rabbit calvarial (15 mm \emptyset)/50 μ g BMP.	At 6 W, significantly higher BV and BMD with BMP scaffold (65 mm ³ and 110 mg/cm ³ respectively) compared with blank scaffold (25 mm ³ and 75 mg/cm ³ respectively)	[92]
Core-shell electrospun fiber mats of PEO-(PCL/PEG), with different porosity and pore size. BMP incorporated in the core (PEO).	5% and 67% released at 4 h and 15% and 72% at 2 W from low and high porosity mats respectively, with no further release until end of assay (27 d).	Rat calvarial (5 mm \emptyset)/0.135 μ g BMP	At 8 W, a bone regeneration of 55% and 80% of the defect area was obtained with low and high porosity mats respectively, compared with the \approx 37–40% obtained with blanks (without BMP).	[93]

Table 1 (continued)

Delivery system	In vitro BMP-2 release profile	Critical bone defect/ BMP-2 dose	Bone regeneration	ref
PLGA tube coating with a polyelectrolyte (poly-L-lysine and HA) crosslinked at different extend. BMP was adsorbed to the final structure.	BMP is released in 1 d with no further release (end of assay at 7 d). The % released depend on the crosslinker concentration, increasing from $\approx 20\%$, $\approx 50\%$ and $\approx 90\%$ as the crosslinker concentration diminish from 70, 30 and 10 mg/mL respectively.	Rat femora segment (6 mm) $\approx 1.3, 7, 15$ and $29 \mu\text{g}$	At 8 W, except with the lower BMP dose, all scaffolds containing BMP showed significant bone regeneration compared with the control but with no significant differences among them.	[94]
BMP onto porous scaffold (crystalallite) produced from marine sponges	27% released at 1 d, 77% at 7 d and 82% at the end of assay (28 d)	Rabbit femora segment (8 mm)/ 30 μg BMP	At 3 months, BMP loaded sponge show a better bone healing than the blank material (qualitative evaluation only).	[95]
Porous silk fibroin scaffold	75% released during the first week. No further release until the end of assay (4 W).	Mouse calvarial (4 mm \emptyset)/ $2.4 \pm 0.14 \mu\text{g}$ BMP.	At 5 W, bone healing was improved with scaffold containing BMP compared with blank scaffold.	[96]
collagen type I vitrified	$\approx 6\%$ released at 1 d followed by a sustained released reaching the 15% at the end of assay (15 d)	Mouse calvarial (4 mm \emptyset)/0.19 or 0.78 μg BMP	At 4 W, bone regeneration area was significantly higher with both low (14.5%) and high (40.2%) BMP doses than blank scaffold.	[97]

PLGA: poly (lactic-co -glycolic acid); PLA: polylactic acid; PCL: Polycaprolactone; poly(LA-co-CL): poly(L-lactide)-co-(ϵ -caprolactone); PCLF: polycaprolactone fumarate; PU: polyurethane; PEO: Poly(ethylene oxide); PVA: Polyvinyl alcohol; HAP: Hydroxiapatite; CS: Chitosan; PPF: poly(propylene fumarate); NP: nanoparticles; BV: bone volume; TV: Total volume; BMC: bone mineral content; BMD: bone mineral density.

Note: it has only been included research works where the *in vivo* administered dose was indicated.

collagen. However, whereas research studies have been conducted on a wide variety of animal models with the aim of improving the clinical use of BMP-2, this use of BMP-2 remains very restricted. In addition, a large number of different materials have been used to make the scaffolds to try to improve the release of the protein. In spite of the great variety of systems, doses and results, in general, there is no great difference between the results observed with the collagen sponge compared to the new systems proposed. For example, similar *in vivo* release kinetics and bone mineral content in a rabbit ulna defect were observed after implantation of an injectable biphasic calcium phosphate paste in comparison with a collagen sponge containing the same dose of BMP-2 [101]. In contrast, 2.5-fold greater bone volume was detected in a rat femora segment treated with the same dose of BMP-2 in a hybrid nanofiber mesh/alginate delivery system than in the collagen. Authors explained this difference by the significantly greater protein retention in the hybrid system compared to the collagen sponge [100].

4.2. BMPs in osteoporosis models

Despite the fact that many efforts have been dedicated to the development of systems for bone regeneration (Tables 1 and 2), according to the revised literature sources, little attention has been paid to the development of controlled delivery systems adapted to the special osteoporosis conditions. Therefore, in the case of osteoporosis, we have included all articles using any type of BMPs formulation to regenerate any type of bone defect. In addition, the articles studying the effect of BMPs in old population were also included as aging osteoporosis. Having in mind that osteoporosis delays the healing, consequence of alteration of many pathways involved in bone formation, the challenge in osteoporosis is still higher.

To our knowledge, the first studies with BMP dedicated to bone regeneration in osteoporosis date from 2005. Within the range of time chosen in the present review, taking into account the role that metallic implants play in orthopaedic surgery and especially in the elderly and osteoporotic population, it is worth highlighting an article dedicated to the study of the effect of a coating with non-glycosylated BMP-2 on the osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants [102]. The experiment lasted 20 weeks and was performed on tibia of aged sheep with signs of osteoporotic bone. The results demonstrated that BMP-2 facilitates

osteointegration and improved the mechanical properties of the bone formed. The authors studied 2 doses of BMP-2, $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. The osteointegration experiments were carried out with $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ because more protein was *in vitro* released the first 2 weeks, 0.18% or 0.21% of the initial amount from the implant coated with $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ and $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively. Similarly, using tibial model in ovariectomized rats, the osteointegration of Ti6AlV4 implants was improved by linking BMP-2 ($2 \text{ ng}/\text{mm}^2$) and VEGF ($2 \text{ ng}/\text{mm}^2$) on the surface implants [103]. The *in vitro* release kinetics previously tested showed that approximately 20% and 50% of bioactive BMP-2 and VEGF were delivered in 4 weeks and 1 week, respectively. Effectively, after 12 weeks, positive results were observed due to BMP-2. Nevertheless, VEGF did not induce any significant effects on the parameters used to evaluate the implant integration (bone-implant contact and pull-out force up). The authors explain this failure was due to several causes such as cellular target of action or low local concentration. Likewise, chitosan/gelatin multilayers containing BMP-2 ($234 \text{ ng}/\text{rod}$) and calcitonin ($226 \text{ ng}/\text{rod}$) were deposited on Ti6Al4V (TC4) implants to control the proteins release. *In vitro* approximately 80% of both was released in one week. The osteointegration of the implants were tested in a femoral defect in osteoporotic rabbits. The proteins induced new bone formation, enhanced healing and improved stability in the osteoporosis model used [104].

The regenerative effect of BMP-2 or BMP-7 included in different scaffolds or delivery systems has also been studied in osteoporotic specimens in a very few articles. The effect of the dose of BMP-2 included in a polylactate-polyglycolate copolymer/gelatin sponge on bone formation after 6 weeks' implantation in the palatal subperiosteal site of young and old male rats, has been studied. In younger populations, in the range of 0–24 μg of BMP-2 the effect increased up to a maximum score as the dosage increased and after reaching the maximum score the effect decreased as the dosage increased. In contrast, in old rats after a maximum was reached the effect did not change as the dosage changed. In addition, the effect in older populations never got to the maximum score observed in young rats. In conclusion, these results seem to indicate that BMP-2 was less effective in old rats than in young ones [105].

Later, the osteogenic effect of BMP-2 was demonstrated using an absorbable collagen sponge in a tibial critical size defect in rats. Bone repair in ovariectomized and non-ovariectomized rats was enhanced by rhBMP-2 with respect to their own control group

Table 2Summary of biodegradable/osteointegrable BMP-2 delivery systems tested *in vivo* for release kinetics and bone regeneration in a critical-size bone defect.

Delivery system	<i>In vitro</i> , BMP-2 release profile	<i>In vivo</i> , BMP-2 release profile	Critical bone defect/BMP-2 dose	Bone regeneration	ref
Biphasic calcium phosphate (BCP) and a BCP/collagen sponge composite.		Similar release profile from the two systems. No burst and \approx constant release rate with more than 95% released at the end of assay (5 W)	Rabbit lumbar spine arthrodesis/ 6.3 mg BMP	At 5 W, 100% clinical fusion with the two systems.	[98]
Injectable biphasic calcium phosphate paste. For comparison collagen sponge.	6% released at 2 d with no further release until end of assay (3 W).	\approx 40% released in 1 d and 55%, 85% and 95% at 1 W, 2 W and 3 W respectively, compared with 45%, 70% and 95% released from collagen sponge at 1 d, 2 W and 3 W respectively.	rabbit ulna segment (0.5 \times 1 mm)/ 100 μ g BMP	At 4 W, The two delivery systems show similar bone mineral content (62–63%) but higher than any of blank materials (\approx 23%). The control (empty defect) was no healing at this time.	[66]
PLGA microspheres polypropylene fumarate (PPF) rod surrounded by a cylindrical gelatin hydrogel.	3.3% released at 1 d followed by a linear release reaching the \approx 10% released at the end of assay (32 d)	9.5% released at 3 d, \approx 75% at 2 W and \approx 90% at 6 W, with no further significant release until the end of assay (8 W). Similar release profile was obtained after SC implantation	Rat femora segment (5 mm)/ 6.6 \pm 0.5 μ g BMP	At 8 W, BV was significantly higher with BMP (\approx 52 mm ³) compared with the blank scaffold or empty defect (\approx 29 mm ³). Ectopically (SC) BMP scaffold induce less bone formation (BV \approx 2.3 mm ³)	[99]
Hybrid system of PCL nanofiber mesh and RGD-alginate. (Collagen sponge for comparison)		release profiles fit to an exponential decay with a $t_{1/2}$ of release of 3.19 d and 1.87 d for the mesh/alginate and collagen sponge respectively	Rat femora segment (8 mm)/ 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, and 5.0 μ g BMP (0.1 and 1.0 μ g in collagen sponges)	The BV vs dose curve exhibited linear biphasic behavior, slope decreasing significantly at doses \geq 1 μ g. Bridging observed with doses \geq 1 μ g. With 1 μ g, the mesh/alginate show significantly greater BV compared to the collagen sponge (at 4 W, 8 W, and 12 W). No differences were found at dose of 0.1 μ g.	[100]
Concentric system: an external, porous ring of β -TCP with a core of BMP-loaded PLGA microspheres + SPU. For comparison BMP in solution was administered.	<i>In vitro</i> , 20% and 50% was released after 1 d and 2 W respectively, then at constant rate (0.40%/d) reaching \approx 70% at 8 W (end of assay).	From the microspheres \approx 25% and 60% was released within 1 d and 1 W respectively. Then, release rate was constant (1%/d) and completed in 6 W. Adding the BMP in solution, 65% was cleared at 1 d and no detected after 3 d. Similar release profiles were obtained from the two poloxamines tested. When incorporated in solution, \approx 60–70% BMP was released at 1 d reaching 90% at 4 d and \approx 100% at 1 W. From Ms, \approx 35% released at 1 d followed by a controlled rate of 4.8%/day until completed release (>95%) at 2 W.	Rat calvarial (8 mm \varnothing)/1.6 and 6.5 μ g BMP	At 8 W and 12 W, the encapsulated BMP show a regeneration of 11% and 19% with the dose of 1.6 μ g, and 31% and 60% with 6.5 μ g, respectively. No significant repair with the same doses in solution, at any time, was observed.	[19]
BPM in solution or preencapsulated in PLGA microspheres (Ms) dispersed in poloxamine hydrogel (Tetronic® 908 and 1307)		When incorporated in solution, \approx 60–70% BMP was released at 1 d reaching 90% at 4 d and \approx 100% at 1 W. From Ms, \approx 35% released at 1 d followed by a controlled rate of 4.8%/day until completed release (>95%) at 2 W.	Rat calvarial (8 mm \varnothing)/6.5 μ g BMP	At 12 W, BMP encapsulated in microspheres show a significantly higher bone repair (80–90%) than when incorporated in solution (40%). Similar bone regeneration was obtained independently of the poloxamine gel used.	[20]
Macroporous, robocasted β -TCP ring with a core of BMP-loaded PLGA microspheres.		\approx 30% released at 1 d followed by a controlled rate of 0.2 μ g/day reaching >95% released at 3 W	Rat calvarial (8 mm \varnothing)/6 μ g BMP	At 12 W, significantly higher bone repair was obtained (\approx 70%) compared with the blank scaffold (\approx 15%).	[21]
Tetronic 908 (T) and Tetronic- α -CD (T-CD) supramolecular gel		60% and 70% released at 1 d from T and T-CD respectively. \approx 100% released in 7 d, in the two cases.	Rat calvarial (8 mm \varnothing)/3 and 6 μ g BMP	At 8 W, 35% bone regenerated with 3 μ g BMP in Tetronic. 70% regenerated with either 3 μ g or 6 μ g in T-CD	[22]

SPU: segmented polyurethane; β -TCP: Tricalcium phosphate β ; PCL: poly(ϵ -caprolactone); BV: bone volume; TV: total volume.

[106]. However, a better response was also observed in the non-osteoporotic group confirming the response previously observed by other authors [105]. Injectable scaffolds of rhBMP-2 (20 μ g) loaded gelatin microsphere (GM) and calcium phosphate composite (CPC) were proposed to control BMP-2 delivery rate to repair a critical vertebra defect in ovariectomized goats. Faster bone formation and higher pushout strength was observed with rhBMP-2/GM/CPC in comparison with rhBMP-2/CPC. Although the authors observed a higher bone mineralization rate in the rhBMP-2/GM/CPC group than in rhBMP-2/CPC at early time (45 days), no differences were found among the groups at the end of the experiments (140 days). According to the authors, rhBMP-2/GM/CPC improves early bone formation in osteoporosis because at early time (4 weeks), a larger amount of protein was *in vitro* release, 38% vs 15% from rhBMP-2/CPC. Therefore, the authors wondered if long retention time in the system produces loss of rhBMP-2 activity and leads to reduced effect [107].

More recently, the effect of the BMP-2 and FGF-2 (fibroblast

growth factor 2) combination on the regeneration of the calvaria of old mice, was studied. The goal was to test if the addition of low doses of FGF-2 would lead to effective low doses of BMP-2. These authors suggested that the addition of low dose of FGF-2 allows the use of low efficient dose of BMP-2 in old mice. However, as in many articles, the *in vitro* release assay of growth factors was performed, but subsequently not taken into account to discuss the results obtained [77].

Later on, 90 mg of rhBMP-2, in a collagen sponge, locally released enhances spinal fusion in ovariectomized rats and acts during early bone formation. Intramembranous and endochondral ossification were simultaneously affected [108]. The dose used in this study is surprisingly high. By contrast, in an osteoporotic posterolateral spinal fusion model in rats, 100% of fusion was observed in control and ovariectomized groups treated with 1 μ g of BMP-2 in a collagen sponge [109]. However, in a 5 mm defect in fibular mid-shafts in rats implanted with 10 μ g of rhBMP-2 in an hydrogel, the osteoporotic group showed less bone formation than

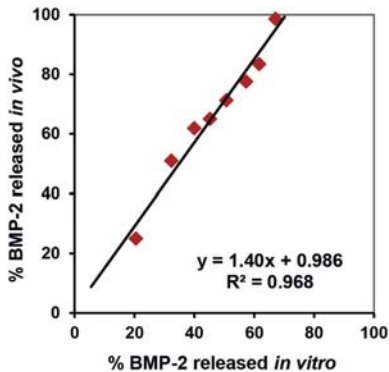


Fig. 2. *In vitro-in vivo* correlation of cumulative BMP-2 released from a scaffold of phosphate and segmented polyurethane. Both assays were carried out with ^{125}I -BMP-2. *In vitro*, ^{125}I -BMP-2 was measured in a gamma counter (Cobra[®], Packard). *In vivo*, ^{125}I -BMP-2 remaining at the calvarial defect site of rats was measure externally with a probe-type gamma counter (Captus[®], Nuclear Iberica). Data non-previously published. These data have been generated from Rodríguez-Évora et al. [19].

the non-osteoporotic group. In this study, the osteoporosis was induced with ovariectomy and dexametasone administration. The rhBMP-2 was less effective probably because of more aggressive osteoporosis induction [110].

With regard to BMP-7, two doses (10 and 30 μg) embedded in a collagen sponge were evaluated in a rat spinal fusion model. BMP-7 systematically impairs posterolateral fusion in ovariectomized rats whereas the same dose was sufficient to enhance arthrodesis in non-ovariectomized rats [111]. Briefly, the low dose was insufficient and no differences were observed between osteoporotic and non-osteoporotic rats. However, the negative effect of the lack of estrogens was clearly observed with the high dose of rh-BMP-7. The authors concluded that these results refer solely to the use of BMP-7 in this specific rat model. Although in a different animal model, local administration of BMP-7 (370 μg) in an 8 mm diameter defect in the mid-vertebral body in sheep improved bone healing [112]. The authors studied different microsphere formulations for BMP-7 control release. According to the results, the sustained slow release of BMP-7 from poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in the site of defect was the most effective system for this application improving the architecture and mechanical characteristics of the vertebral bodies. In the study, *in vitro* release kinetics was evaluated during 2 weeks. Poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres released approximately 2% of the dose whereas the other formulation with carboxymethylcellulose showed a burst effect of 10% in the same period of time [113].

Recently, the effect of BMP-7 and BMP-7 combined with zoledronate formulated in a collagen putty was tested to treat mid-diaphyseal open femoral osteotomies in ovariectomized versus healthy rats [114]. The authors observed a 100% union in the osteoporotic rats against 70% in the control group. The characteristics of the new bone were similar in both groups. The authors concluded that osteoporosis does not imply a greater difficulty for bone regeneration. Contrary to previously reported results [111], they suggested that the lack of estrogens may produce a hypersensitivity to BMP-7. The application of BMP-2 and zoledronate was also tested in a calvarial defect. The bone refilled at early time (4 weeks) was lower in comparison with the group treated with BMP-2. The negative effect induce by zoledronate was less evident after 8 weeks [115].

Lastly, we report the alternative gene strategies proposed to maintain the continuous supply of bioactive proteins.

An adenoviral vector carrying the human BMP-2 cDNA (Ad.BMP-2) as a BMP-2 delivery system to improve bone healing in osteoporosis, was proposed [116]. Ad.BMP-2 particles in buffered saline solution were injected directly into a defect created in the tibia of osteoporotic female sheep. The healing response, tested throughout 8 weeks, demonstrated that the *in vivo* gene delivery enhanced particularly the early bone healing phase in the osteoporotic ovine osteotomy model used. Likewise, the measure of luciferase as gene expression in the tibia defect was detected for up to 5 weeks providing BMP-2 during this period. One important limitation is that the 3-mm osteotomy gap used in this study is not a critical size defect since it heals spontaneously within 8–10 weeks. However, it is evident that the sustained released of BMP-2 in the defect site improved the early response.

Similarly, Youchao Tang, 2008 [117] applied autologous BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) or autologous BMSCs transfected with BMP-2 seeded in a macroporous coral hydroxapatite scaffold on a critical size mandibular defect in osteoporotic rats. Transfected cells expressed BMP-2 at least during 4 weeks. Eight weeks after implantation, transfected autogenous cells induced mature bone formation to fill the defect. In addition, the authors highlight that BMP-2 avoided the BMSC tendency to differentiate from adipocytes observed in the non-transfected group.

Lastly, to ensure the sustained release of growth factors and improve the recruitment, proliferation and differentiation capacity of BMP-7, a combination of adenovirus for both PDGF-b (adPDGF-b) and BMP-7 (adBMP-7) in mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds was implanted in a critical size defect in femur of osteoporotic rats. After 4 weeks, the synergistic repair effect was showed [118].

5. Discussion and conclusions

Growth factors are need to stimulate cell recruitment, proliferation and differentiation. However, the dose, time and release rate are essential for successful tissue formation. In order to produce correctly structured bone tissue at the defect site, the ideal scaffold should deliver the appropriate signaling molecules at the specific sequence. Therefore, when BMPs are released too fast for a short period or at no controlled rate, high risk of systemic exposure and undesirable effects might be expected. In order to avoid or reduce this risk, controlled release formulations of BMPs have been proposed. The gold is the release of the precise amount of BMPs to maintain the therapeutic concentration localized at the damaged tissue region. Many authors reported *in vitro* release kinetics of growth factors formulated for bone repair. However, as shown in Table 2, little attention has been paid to monitoring the *in vivo* release patterns, as well as the systemic concentrations of signaling molecules investigated regarding bone repair in healthy animals and even less in osteoporotic ones. As reflected in the studies dedicated to bone regeneration in osteoporosis, some experiments were designed without making any comparison with healthy groups. In addition, the *in vitro* release assays were made during a very short period of time, which makes it difficult to predict the *in vivo* release kinetics. According to the alterations shown in osteoporosis, the design of the scaffolds and the BMP release kinetics should be adapted to the specific requirements. Everything learned from the large number of studies aimed at the optimization of scaffolds, including controlled release systems of growth factors, and developed for the regeneration of bone defects in the healthy population should be used to faster achieve new systems to facilitate the repair of defects in osteoporosis. However, according to the studies published so far, it does not appear to be so. In addition, another important aspect that we have not discussed in depth in this review is the appropriate dose of growth factor to be included

in the system. The required dose varies depending on the defect, the release kinetics and the type of biomaterial used to make the scaffolds, but we must also remember that the bioactivity of the growth factors vary according to its origin and its manufacturing process. All this makes it very difficult to accumulate valid knowledge of previous studies.

Overall, the complexity of the *in vivo* healing environment requires further understanding of growth factors interactions in tissue repair to decide on the most appropriate approach in view of a stable clinical outcome. Thus, it is clear that further studies are required to establish an effective and safe dose of BMPs, fix the optimum release rate and the characteristics of ideal scaffolds for improving outcomes of bone regeneration in healthy and osteoporotic populations. In our experience, in a non-load defect, the release of BMP should be maintained for at least two weeks *in vivo*. In the case of osteoporosis, data from the literature indicate that a delay occurs in the regeneration process, so the time of release should be longer. Usually the *in vivo* release is faster than *in vitro*, therefore *in vitro* assays should be designed in such a way as to allow *in vivo*-*in vitro* correlation. If this goal is not achieved, the *in vitro* release assay is not worthwhile. Concerning the design of scaffold, the speed of degradation of the system must match with the speed of regeneration of the tissue. A very rapid degradation leaves the cells unguided to form new tissue, whereas a too slow degradation would hinder the tissue regeneration.

In conclusion, despite advances in bone regeneration, there is still a long way to go in this matter, particularly in optimizing systems for osteoporosis.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Science and Technology (MAT2014-55657-R).

References

- [1] S.L. Moran, A.Y. Shin, A.T. Bishop, The use of massive bone allograft with intramedullary free fibular flap for limb salvage in a pediatric and adolescent population, *Plastic Reconstr. Surg.* 118 (2006) 413–419.
- [2] M. Li, X. Liu, X. Liu, B. Ge, Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468 (2010) 1978–1985.
- [3] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P.V. Giannoudis, Bone regeneration: current concepts and future directions, *BMC Med.* 66 (2011) 1–10.
- [4] H.C. Fayaz, P.V. Giannoudis, M.S. Vrihas, R.M. Smith, C. Moran, H.C. Pape, C. Krettek, J.B. Jupiter, The role of stem cells in fracture healing and nonunion, *Int. Orthop.* 35 (2011) 1587–1597.
- [5] C. Laurencin, Y. Khan, S. El-Amin, Bone graft substitute, *Expert Rev. Med. Devices* 3 (2006) 49–57.
- [6] H.C. Pape, A. Evans, P. Kobbe, Autologous bone graft: properties and techniques, *J. Orthop. Trauma* 24 (Suppl 1) (2010) S36–S40.
- [7] J. Yuste, M. Alfonso, C. Bustos, J. Quintana, M. Rubio, C. Villas, J. del Pozo, Iliac bone *Candida albicans* osteomyelitis in a patient with iliac crest bone autograft: a case report and review of the literature, *Infection* 40 (2012) 445–449.
- [8] E. Guerado, C.H. Fuerstenberg, What bone graft substitutes should we use in post-traumatic spinal fusion? *Injury* 42 (Suppl 2) (2011) S64–S71.
- [9] G. Zimmermann, A. Moghaddam, Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes, *Injury* 42 (Suppl 2) (2011) S16–S21.
- [10] T.J. Blokhuis, J.J.C. Arts, Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths, *Injury* 42 (Suppl 2) (2011) S26–S29.
- [11] A. Tuchman, D.S. Brodke, J.A. Youssef, H. Meisel, J.R. Dettori, J. Park, S.T. Yoon, J.C. Wang, Iliac crest bone graft versus local autograft or allograft for lumbar spinal fusion: a systematic review, *Glob. Spine J.* 6 (2016) 592–606.
- [12] N. Shibuya, D.C. Jupiter, Bone graft substitute: allograft and xenograft, *Clin. podiatric Med. Surg.* 32 (2015) 21–34.
- [13] P. Janicki, G. Schmidmaier, What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells, *Injury* 42 (Suppl 2) (2011) S77–S81.
- [14] T.N. Vo, F.K. Kasper, A.G. Mikos, Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1292–1309.
- [15] M. Mehta, K. Schmidt-Bleek, G.N. Duda, D.J. Mooney, Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 1257–1276.
- [16] K. Lee, E.A. Silva, D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments, *J. R. Soc. Interface* 8 (2011) 153–170.
- [17] B. De la Riva, C. Nowak, E. Sánchez, A. Hernández, M. Schulz-Siegmund, M.K. Pec, A. Delgado, C. Évora, VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 50–58.
- [18] B. De la Riva, E. Sánchez, A. Hernández, R. Reyes, F. Tamimi, E.F. López-Cabarcos, A. Delgado, C. Évora, Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration, *J. Control. Release* 143 (2010) 45–52.
- [19] M. Rodríguez-Évora, A. Delgado, R. Reyes, A. Hernández-Daranas, I. Soriano, J. San Román, C. Évora, Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU–PLGA– β TCP concentric system in a critical size defect in rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 873–884.
- [20] M. Rodríguez-Évora, R. Reyes, C. Álvarez-Lorenzo, A. Concheiro, A. Delgado, C. Évora, Bone regeneration induced by an *in situ* gel-forming poloxamine, bone morphogenetic Protein-2 system, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014) 959–969.
- [21] C. Del Rosario, M. Rodríguez-Évora, R. Reyes, A. Delgado, C. Évora, BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 045008, <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/10/4/045008>.
- [22] C. del Rosario, M. Rodríguez-Évora, R. Reyes, S. Simões, A. Concheiro, C. C. Évora, Álvarez-Lorenzo, A. Delgado, Bone critical defect repair with poloxamine–cyclodextrin supramolecular gels, *Int. J. Pharm.* 495 (2015) 463–473.
- [23] L. Brewer, D. Williams, A. Moore, Current and future treatment options in osteoporosis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 67 (2011) 321–331.
- [24] T. Asafo-Adjei, A. Chen, A. Najjarzadeh, D. Puleo, Advances in controlled drug delivery for treatment of osteoporosis, *Curr. Osteoporos. Rep.* 14 (2016) 226–238.
- [25] F. Jakob, R. Ebert, A. Ignatius, T. Matsushita, Y. Watanabe, J. Groll, H. Walles, Bone tissue engineering in osteoporosis, *Maturitas* 75 (2013) 118–124.
- [26] N.M. Iniguez-Ariza, B.L. Clarke, Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis, *Maturitas* 82 (2015) 245–255.
- [27] T. Harsløf, B.L. Langdahl, New horizons in osteoporosis therapies, *Curr. Opin. Pharmacol.* 28 (2016) 38–42.
- [28] F. Cosman, G. Hattersley, M. Hu, G.C. Williams, L.A. Fitzpatrick, D.M. Black, Effects of abaloparatide-sc on fractures and bone mineral density in subgroups of postmenopausal women with osteoporosis and varying baseline risk factors, *J. Bone Mineral Res.* 32 (2017) 17–23.
- [29] T.J. Martin, E. Seeman, Abaloparatide is an anabolic, but does it spare resorption? *J. Bone Mineral Res.* 32 (2017) 11–16.
- [30] N.M. Appelman-Dijkstra, S.E. Papapoulos, Sclerostin inhibition in the management of osteoporosis, *Calf. Tissue Int.* 98 (2016) 370–380.
- [31] J. Tian, X. Xu, L. Shen, Y. Yang, B. Shuai, X. Zhu, C. Li, M. Chen, L. Lv, Association of serum Dkk-1 levels with β -catenin in patients with postmenopausal osteoporosis, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 35 (2015) 212–218.
- [32] C.P. Recknor, R.R. Recker, C.T. Benson, D.A. Robins, A.Y. Chiang, J. Alam, L. Hu, T. Matsumoto, H. Sowa, J.H. Sloan, R.J. Konrad, B.H. Mitlak, A.A. Sipsos, The Effect of discontinuing treatment with bisphosphonate: follow-up results of a phase 2 randomized clinical trial in postmenopausal women with low bone mineral density, *J. Bone Mineral Res.* 30 (2015) 1717–1725.
- [33] L. Bandeira, E.M. Lewiecki, J.P. Bilezikian, Romosozumab for the treatment of osteoporosis, *Expert Opin. Biol. Ther.* 17 (2017) 255–263.
- [34] E. Tsiroidis, N. Upadhyay, P. Giannoudis, Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury* 38 (Suppl 1) (2007) S11–S25.
- [35] F. Haasters, W.C. Prall, I. Westphal, W. Böcker, D. Padula, W. Mutschler, D. Docheva, M. Schieker, Overexpression of dnIKK in mesenchymal stem cells leads to increased migration and decreased invasion upon TNF α stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436 (2013) 265–270.
- [36] J.L. Crane, X. Cao, Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling, *J. Clin. Invest.* 124 (2014) 466–472.
- [37] E.L.S. Fong, C.K. Chan, S.B. Goodman, Stem cell homing in musculoskeletal injury, *Biomaterials* 32 (2011) 395–409.
- [38] J. Fiedler, G. Röderer, G. Günther, R.E. Brenner, BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells, *J. Cell. Biochem.* 87 (2002) 305–312.
- [39] D.H. Lee, B.J. Park, M. Lee, J.W. Lee, J.K. Kim, H.C. Yang, J.C. Park, Chemotactic migration of human mesenchymal stem cells and MC3T3-E1 osteoblast-like cells induced by COS-7 cell line expressing rhBMP-7, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1577–1586.
- [40] J.P. Rodríguez, S. Ríos, M. Fernández, J.F. Santibañez, Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women, *J. Cell. Biochem.* 92 (2004) 745–754.
- [41] G. Chen, C. Deng, Y. Li, TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation, *Int. J. Biol. Sci.* 8 (2012) 272–288.
- [42] B. Song, K.D. Estrada, K.M. Lyons, Smad signaling in skeletal development and regeneration, *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 (2009) 379–388.
- [43] H. Namkung-Matthai, R. Appleyard, J. Jansen, J. Hao Lin, S. Maastricht, M. Swain, M. R.S. Mason, G.A. Murrell, A.D. Diwan, T. Diamond, Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model, *Bone* 28 (2001) 80–86.

- [44] V.S. Nikolaou, N. Efstathopoulos, G. Kontakis, N.K. Kanakaris, P.V. Giannoudis, The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time, *Injury* 40 (2009) 663–668.
- [45] S. Xu, R. Yu, G. Zhao, J. Wang, Early period of fracture healing in ovariectomized rats, *Chin. J. Traumatology* 6 (2003) 160–166.
- [46] Y.J. Hao, G. Zhang, Y.S. Wang, L. Qin, W.Y. Hung, K. Leung, F.X. Pei, Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats, *Bone* 41 (2007) 631–638.
- [47] P. Giannoudis, C. Tzioupis, T. Almkali, R. Buckley, Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective, *Injury* 38 (Suppl 1) (2007) S90–S99.
- [48] P.V. Giannoudis, E. Schneider, Principles of fixation of osteoporotic fractures, *J. Bone Jt. Surg. Br.* 88 (2006) 1272–1278.
- [49] W.C. Prall, F. Haasters, J. Heggebö, H. Polzer, C. Schwarz, C. Gassner, S. Grote, D. Anz, M. Jäger, W. Mutschler, M. Schieker, Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440 (2013) 617–622.
- [50] J.P. Rodríguez, L. Montecinos, S. Ríos, P. Reyes, J. Martínez, Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation, *J. Cell. Biochem.* 79 (2000) 557–565.
- [51] B. Cortet, Bone repair in osteoporotic bone: postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis, *Osteoporos. Int.* 22 (2011) 2007–2010.
- [52] R. Oliver, Y. Yu, G. Yee, A. Low, A. Diwan, W. Walsh, Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats, *Osteoporos. Int.* 24 (2013) 2581–2589.
- [53] S. Kousteni, T. Bellido, L. Plotkin, C.A. O'Brien, D.L. Bodenner, L. Han, K. Han, G.B. Digregorio, J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, P.K. Roberson, R.S. Weinstein, R.L. Jilka, S.C. Manolagas, Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity, *Cell* 104 (2001) 719–730.
- [54] S.A. Krum, G.A. Miranda-Carboni, P.V. Hauschka, J.S. Carroll, T.F. Lane TF, L.P. Freedman, P. Leonard, M. Brown, Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival, *EMBO J.* 27 (2008) 535–545.
- [55] S.A. Krum, Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone, *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 401–408.
- [56] K. Hayashi, T. Yamaguchi, S. Yano, I. Kanazawa, M. Yamauchi, M. Yamamoto, T. Sugimoto, BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 261–266.
- [57] E.M.M. Van Lieshout, V. Alt, Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence? *Injury* 47 (Suppl 1) (2016) S43–S46.
- [58] S. Govender, C. Csimma, H.K. Genant, A. Valentin-Opran, Ye Amit, R. Arbel, H. Aro, D. Atar, M. Bishay, M.G. Börner, P. Chiron, P. Choong, J. Cinats, B. Courtenay, R. Feibel, B. GEulette, C. Gravel, N. Haas, M. Raschke, E. Hammacher, D. Van der Velde, P. Hardy, M. Holt, C. Josten, R.L. Ketterl, B. Lindeque, G. Lob, H. Mathevon, G. McCoy, D. Marsh, R. Miller, E. Munting, S. Oevre, L. Nordsletten, A. Patel, A. Pohl, W. Rennie, P. Reyniers, P.M. Rommens, J. Rondia, W.C. Rossouw, P.J. Daneel, S. Ruff, A. Rüter, S. Santavirta, T.A. Schildhauer, C. Gekke, R. Schnetzler, D. Segal, H. Seiler, R.B. Snowdowne, J. Stapert, G. Tagland, R. Verdonk, L. Vogels, A. Weckbach, A. Wentzensen, T. Wisniewski, Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients, *J. Bone & Jt. Surg.* 84 (2002) 2123–2134.
- [59] N.K. Kanakaris, N. Lasanianos, G.M. Calori, R. Verdonk, T.J. Blokhuis, P. Cherubino, P. De Biase, P.V. Giannoudis, Application of bone morphogenetic proteins to femoral non-unions: a 4-year multicentre experience, *Injury* 40 (Suppl 3) (2009) S54–S61.
- [60] V. Devescovi, E. Leonardi, G. Ciapetti, E. Cenni, Growth factors in bone repair, *La Chir. degli Organi Mov.* 92 (2008) 161–168.
- [61] R. Dimitriou, P.V. Giannoudis, Discovery and development of BMPs, *Injury* 36 (Suppl 3) (2005) S28–S33.
- [62] O. Jeon, S.J. Song, H.S. Yang, S. Bhang, S. Kang, M.A. Sung, J.H. Lee, B. Kim, Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008) 774–780.
- [63] B. Li, T. Yoshii, A.E. Hafeman, J.S. Nyman, J.C. Wenke, S.A. Guelcher, The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora, *Biomaterials* 30 (2009) 6768–6779.
- [64] K.V. Brown, B. Li, T. Guda, D.S. Perrien, S.A. Guelcher, J.C. Wenke, Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release, *Tissue Eng. Part A* 17 (2011) 1735–1746.
- [65] B. Seo, J. Koh, S. Song, Tuning physical properties and BMP-2 release rates of injectable hydrogel systems for an optimal bone regeneration effect, *Biomaterials* 122 (2017) 91–104.
- [66] K. Peng, M. Hsieh, C.T. Lin, C. Chen, M.S. Lee, Y. Huang, P. Chang, Treatment of critically sized femoral defects with recombinant BMP-2 delivered by a modified mPEG-PLGA biodegradable thermosensitive hydrogel, *BMC Musculoskelet. Disord.* 17 (2016) 286.
- [67] D. Ben-David, S. Srouji, K. Shapira-Schweitzer, O. Kosover, E. Ivanir, G. Kuhn, R. Müller, D. Seliktar, E. Livne, Low dose BMP-2 treatment for bone repair using a PEGylated fibrinogen hydrogel matrix, *Biomaterials* 34 (2013) 2902–2910.
- [68] J. Patterson, R. Siew, S.W. Herring, A.S.P. Lin, R. Goldberg, P.S. Stayton, Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration, *Biomaterials* 31 (2010) 6772–6781.
- [69] D. Ma, G. An, M. Liang, Y. Liu, B. Zhang, Y. Wang, A composited PEG-silk hydrogel combining with polymeric particles delivering rhBMP-2 for bone regeneration, *Mater. Sci. Eng. C* 65 (2016) 221–231.
- [70] L. Krishnan, L.B. Priddy, C. Esancy, B.S. Klosterhoff, H.Y. Stevens, L. Tran, R.E. Goldberg, Delivery vehicle effects on bone regeneration and heterotopic ossification induced by high dose BMP-2, *Acta Biomater.* 49 (2017) 101–112.
- [71] N.Z. Mostafa, R. Talwar, M. Shahin, L.D. Unsworth, P.W. Major, M.R. Doschak, Cleft palate reconstruction using collagen and nanofiber scaffold incorporating bone morphogenetic protein in rats, *Tissue Eng. Part A* 21 (1–2) (2015) 85–95.
- [72] C.J. Kowalczewski, S. Tombyln, D.C. Wasnick, M.R. Hughes, M.D. Ellenburg, M.F. Callahan, T.L. Smith, M.E. Van Dyke, L.R. Burnett, J.M. Saul, Reduction of ectopic bone growth in critically-sized rat mandible defects by delivery of rhBMP-2 from keratine biomaterials, *Biomaterials* 35 (2014) 3220–3228.
- [73] R.C. de Guzman, J.M. Saul, M.D. Ellenburg, M.R. Merrill, H.B. Coan, T.L. Smith, M.E. Van Dyke, Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds, *Biomaterials* 34 (2013) 1644–1656.
- [74] D.S. Keskin, A. Tezcaner, P. Korkusuz, F. Korkusuz, V. Hasirci, Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone repair, *Biomaterials* 26 (2005) 4023–4034.
- [75] S.S. Lee, B.J. Huang, S.R. Kaltz, S. Sur, C.J. Newcomb, S.R. Stock, R.N. Shah, S.I. Stupp, Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds, *Biomaterials* 34 (2013) 452–459.
- [76] E. Quinlan, E.M. Thompson, A. Matsiko, F.J. O'Brien, A. López-Noriega, Long-term controlled delivery of rhBMP-2 from collagen-hydroxyapatite scaffolds for superior bone tissue regeneration, *J. Control. Release* 207 (2015) 112–119.
- [77] L.F. Charles, J.L. Woodman, D. Ueno, G. Gronowicz, M.M. Hurley, L.T. Kuhn, Effects of low dose FGF-2 and BMP-2 on healing of calvarial defects in old mice, *Exp. Gerontol.* 64 (2015) 62–69.
- [78] H.S. Yang, W. La, S.H. Bhang, T. Lee, M. Lee, B. Kim, Apatite-coated collagen scaffold for bone morphogenetic protein-2 delivery, *Tissue Eng. Part A* 17 (2011) 2153–2164.
- [79] E. Quinlan, A. López-Noriega, E. Thompson, H.M. Kelly, S.A. Cryan, F.J. O'Brien, Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering, *J. Control. Release* 198 (2015) 71–79.
- [80] S. Schützenberger, A. Schultz, T. Hausner, R. Hopf, G. Zanoni, T. Morton, K. Kropik, M. Griensven, H. Redl, The optimal carrier for BMP-2: a comparison of collagen versus fibrin matrix, *Archives Orthop. Trauma Surg.* 132 (2012) 1363–1370.
- [81] Y. Liu, Y. Lu, X. Tian, G. Cui, Y. Zhao, Q. Yang, S. Yu, G. Xing, B. Zhang, Segmental bone regeneration using an rhBMP-2-loaded gelatin/nanohydroxyapatite/fibrin scaffold in a rabbit model, *Biomaterials* 30 (2009) 6276–6285.
- [82] S. Kim, S. Gwak, B. Kim, Orthotopic bone formation by implantation of apatite-coated poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite particulates and bone morphogenetic protein-2, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 87A (2008) 245–253.
- [83] J. Bae, H. Song, H. Kim, H. Lim, J. Park, Y. Liu, S.H. Teoh, Discontinuous release of bone morphogenetic protein-2 loaded within interconnected pores of honeycomb-like polycaprolactone scaffold promotes bone healing in a large bone defect of rabbit ulna, *Tissue Eng. Part A* 17 (2011) 2389–2397.
- [84] Y. Chung, K. Ahn, S. Jeon, J. Lee, S. Lee, G. Tae, Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex, *J. Control. Release* 121 (2007) 91–99.
- [85] Y. Li, R. Li, J. Hu, D. Song, X. Jiang, S. Zhu, Recombinant human bone morphogenetic protein-2 suspended in fibrin glue enhances bone formation during distraction osteogenesis in rabbits, *Archives Med. Sci.* 12 (2016) 494–501.
- [86] A. Yao, X. Li, L. Xiong, J. Zeng, J. Xu, D. Wang, Hollow hydroxyapatite microspheres/chitosan composite as a sustained delivery vehicle for rhBMP-2 in the treatment of bone defects, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 26 (2015) 1–12.
- [87] L. Cao, J.A. Werkmeister, J. Wang, V. Glatzauer, K.M. McLean, C. Liu, Bone regeneration using photocrosslinked hydrogel incorporating rhBMP-2 loaded 2-N, 6-O-sulfated chitosan nanoparticles, *Biomaterials* 35 (2014) 2730–2742.
- [88] L. Cao, J. Wang, J. Hou, W. Xing, C. Liu, Vascularization and bone regeneration in a critical sized defect using 2-N,6-O-sulfated chitosan nanoparticles incorporating BMP-2, *Biomaterials* 35 (2014) 684–698.
- [89] S. Young, Z.S. Patel, J.D. Kretlow, M.B. Murphy, P.M. Mountziaris, L.S. Baggett, H. Ueda, Y. Tabata, J.A. Jansen, M. Wong, A.G. Mikos, Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model, *Tissue Eng. Part A* 15 (2009) 2347–2362.
- [90] S. Suliman, Z. Xing, X. Wu, Y. Xue, T.O. Pedersen, Y. Sun, A.P. Døskeland, J. Nickel, T. Waag, H. Lygre, A. Finne-Wistrand, D. Steinmüller-Nethl,

- A. Krueger, K. Mustafa, Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo, *J. Control. Release* 197 (2015) 148–157.
- [91] C.V. Rahman, D. Ben-David, A. Dhillo, G. Kuhn, T.W.A. Gould, R. Müller, F.R. Rose, K.M. Shakesheff, E. Livne, Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 8 (2014) 59–66.
- [92] J. Kim, A. Sharma, B. Runge, H. Waters, B. Doll, S. McBride, P. Alvarez, M. Dadsetan, M.J. Yaszemski, J.O. Hollinger, Osteoblast growth and bone-healing response to three-dimensional poly(ϵ -caprolactone fumarate) scaffolds, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6 (2012) 404–413.
- [93] S. Srouji, D. Ben-David, R. Lotan, E. Livne, R. Avrahami, E. Zussman, Slow-release human recombinant bone morphogenetic protein-2 embedded within electrospun scaffolds for regeneration of bone defect: in vitro and in vivo evaluation, *Tissue Eng. Part A* 17 (2011) 269–277.
- [94] M. Bouyer, R. Guillot, J. Lavaud, C. Plettinx, C. Olivier, V. Curry, J. Boutonnat, J.L. Coll, F. Peyrin, V. Jossierand, G. Bettega, C. Picart, Surface delivery of tunable doses of BMP-2 from an adaptable polymeric scaffold induces volumetric bone regeneration, *Biomaterials* 104 (2016) 168–181.
- [95] S.K. Nandi, B. Kundu, A. Mahato, N.L. Thakur, S.N. Joardar, B.B. Mandal, In vitro and in vivo evaluation of the marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial, *Integr. Biol. J.* 7 (2015) 250–262.
- [96] V. Karageorgiou, M. Tomkins, R. Fajardo, L. Meinel, B. Snyder, K. Wade, J. Chen, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 78A (2006) 324–334.
- [97] J. Zhao, M. Shinkai, T. Takezawa, S. Ohba, U. Chung, T. Nagamune, Bone regeneration using collagen type I vitrigel with bone morphogenetic protein-2, *J. Biosci. Bioeng.* 107 (2009) 318–323.
- [98] J. Louis-Ugbo, H. Kim, S.D. Boden, M.T. Mayr, Retention of (125)I-labeled recombinant human bone morphogenetic protein-2 by biphasic calcium phosphate or a composite sponge in a rabbit posterolateral spine arthrodesis model, *J. Orthop. Res.* 20 (2002) 1050–1059.
- [99] D.H.R. Kempen, L. Lu, A. Hejjink, T.E. Hefferan, L.B. Creemers, A. Maran, A. Maran, M.J. Yaszemski, W.J. Dhert, Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration, *Biomaterials* 30 (2009) 2816–2825.
- [100] J.D. Boerckel, Y.M. Kolambkar, K.M. Dupont, B.A. Uhrig, E.A. Phelps, H.Y. Stevens, A.J. Garcia, R.E. Goldberg, Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration, *Biomaterials* 32 (2011) 5241–5251.
- [101] R.H. Li, X.J. Li, M.L. Boussein, C.A. Blake, D. D'Augusta, H. Kim, J.M. Wozney, H.J. Seeherman, rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (α -BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model, *J. Orthop. Res.* 21 (2003) 997–1004.
- [102] A. Sachse, O. Wagner, A. Wagner, M. Keller, W. Wetzel, F. Layher, R.A. Venbrocks, P. Hortschansky, M. Pietraszczyk, B. Wiederanders, H.J. Hempel, J. Bossert, J. Horn, K. Schmuck, J. Mollenhauer, Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep, *Bone* 37 (2005) 699–710.
- [103] J.V. Wölfle, J. Fiedler, L. Dürselen, J. Reichert, D. Scharnweber, A. Förster, B. Schwenzer, H. Reichel, A. Ignatius, R.E. Brenner, Improved anchorage of Ti6Al4V orthopaedic bone implants through oligonucleotide mediated immobilization of BMP-2 in osteoporotic rats, *PLoS One* 9 (2014) e86151.
- [104] L. Huang, Z. Luo, Y. Hu, X. Shen, M. Li, L. Li, Y. Zhang, W. Yang, P. Liu, K. Cai, Enhancement of local bone remodeling in osteoporotic rabbits by biomimic multilayered structures on Ti6Al4V implants, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 104A (2016) 1437–1451.
- [105] K. Yamaji, M. Kawanami, A. Matsumoto, T. Odajima, Y. Nishitani, K. Iwasaka, K. Yoshimitsu, M. Yoshiyama, Effects of dose of recombinant human BMP-2 on bone formation at palatal sites in young and old rats, *Dent. Mater. J.* 26 (2007) 481–486.
- [106] S. Sarban, A. Senkoğlu, U.E. İskan, P. Korkusuz, F. Korkusuz, Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats?: a preliminary study, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467 (2009) 3113–3120.
- [107] M. Li, X. Liu, X. Liu, B. Ge, Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study, *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468 (2010) 1978–1985.
- [108] S.B. Park, S.H. Park, N.H. Kim, C.K. Chung, BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporotic model, *Spine J.* 13 (2013) 1273–1280.
- [109] J.H. Ghodasra, M.S. Nickoli, S.Z. Hashmi, J.T. Nelson, M. Mendoza, J.D. Nicolas, S.S. Bellary, K. Sonn, A. Ashtekar, C.J. Park, J. Babu, C. Yun, A. Ghosh, A. Kannan, S.R. Stock, W.K. Hsu, E.L. Hsu, Ovariectomy-induced osteoporotic does not impact fusion rates in a recombinant human bone morphogenetic protein-2 dependent rat posterolateral arthrodesis model, *Glob. Spine J.* 6 (2016) 60–68.
- [110] J.H. Lee, H.R. Baek, K.M. Lee, G.B. Zheng, S.J. Shin, H.J. Shim, Effects of ovariectomy and corticosteroid-induced osteoporosis on the osteoinductivity of rhBMP-2 in a segmental long-bone defect model, *Tissue engineering. Part A* 15–16 (2015) 2262–2271.
- [111] P. Moazzaz, M.C. Gupta, M.M. Gilotra, M.N. Gilotra, S. Maitra, T. Theerajunyaporn, J.L. Chen, A.H. Reddi, R.B. Martin, Estrogen-dependent actions of bone morphogenetic protein-7 on spine fusion in rats, *Spine* 30 (2005) 1706–1711.
- [112] F.M. Phillips, A.S. Turner, H.B. Seim, J. MacLeay, C.A. Toth, A.R. Pierce, D.L. Wheeler, In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model, *Spine J.* 6 (2006) 500–506.
- [113] A.D. Diwan, A. Leong, R. Appleyard, D. Bhargav, Z.M. Fang, A. Wei, Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats, *Indian J. Orthop.* 6 (2013) 540–546.
- [114] N. Mathavan, M. Tagil, H. Isaksson, Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model, *Osteoporos. Int.* 28 (2017) 697–707.
- [115] J.H. Lee, H. Baek, K. Mee Lee, G.B. Zheng, S.J. Shin, Y.Z. Jin, The inhibitory effect of zoledronate on early-stage osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an osteoporotic model, *Growth factors* 3 (2015) 220–228.
- [116] M. Egermann, A.W. Baltzer, S. Adamaszek, C. Evans, P. Robbins, E. Schneider, C.A. Lill, Direct adenoviral transfer of bone morphogenetic protein-2 cDNA enhances fracture healing in osteoporotic sheep, *Hum. Gene Ther.* 17 (2006) 507–517.
- [117] Y. Tang, W. Tang, Y. Lin, J. Long, H. Wang, L. Liu, W. Tian, Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats, *Cell Biol. Int.* 32 (2008) 1150–1157.
- [118] Y. Zhang, N. Cheng, R. Miron, B. Shi, X. Cheng, Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects, *Biomaterials* 33 (2012) 6698–6708.

Mobility of Water and Polymer Species and Rheological Properties of Supramolecular Polypseudorotaxane Gels Suitable for Bone Regeneration

Elisabet Segredo-Morales,[†] Manuel Martín-Pastor,[‡] Ana Salas,[§] Carmen Évora,[†] Angel Concheiro,^{||} Carmen Alvarez-Lorenzo,^{*,||} and Araceli Delgado^{*,†||}

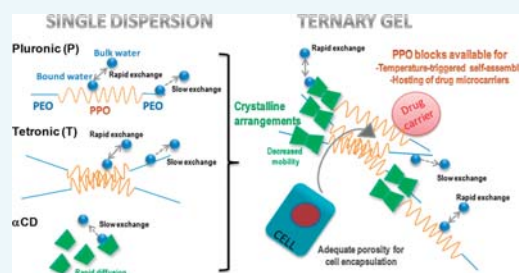
[†]Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Institute of Biomedical Technologies (ITB), Center for Biomedical Research of the Canary Islands (CIBICAN), Universidad de La Laguna, 30200 La Laguna, Spain

[‡]Unidad de Resonancia Magnética Nuclear, RIAIDT, Edificio CACTUS and ^{||}Departamento Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, R+DPharma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia and IDIS, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[§]Departamento Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC), Universidad de La Laguna, 38207 La Laguna, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The aim of this work was to prepare polypseudorotaxane-based supramolecular gels combining α CD with two temperature-responsive copolymers of different architecture (i.e., linear poloxamer P and X-shaped poloxamine T), at the lowest concentration as possible to form syringeable depots, and to shed light on the self-diffusion and spatial closeness of all components (including water) which in turn may determine the cooperative self-assembly phenomena and the performance of the gels at the macroscopic level. The exchange rate between bound water and bulk water was measured with a novel NMR experiment Water Diffusion Exchange-Diffusion Optimized Spectroscopy (WDE-DOSY). Polypseudorotaxane formation caused opposite effects on the mobility of α CD species (decreased) and internal water (increased) but did not affect PPO-water interaction. Consequently, designed ternary P/T/ α CD supramolecular gels exhibited in situ gelling at body temperature could host large amounts of PLA/PLGA microspheres and behaved as porous 3D-scaffolds for mesenchymal stem cells (MSCs) supporting their osteogenic differentiation. Interestingly, the gels withstood freeze-drying and reconstitution with minor changes in inner structure and rheological properties. The gathered information may help to understand better the supramolecular gels and provide tools for the rational design of syringeable bone scaffolds that can simultaneously accommodate cells and drug microcarriers for efficient tissue regeneration.



INTRODUCTION

Cyclodextrin (CD)-based polypseudorotaxanes are attractive components of biocompatible supramolecular gels that can reversibly alter their mechanical properties under stress conditions.^{1,2} These supramolecular gels are receiving a great deal of attention as syringeable depots that can be easily implanted using noninvasive maneuvers and that remain in the implantation site and withstand physiological conditions during the required time.^{3,4} The self-assembly of polypseudorotaxanes through crystalline arrangements among α CDs communicates strong consistency to the system at rest, but the interactions are easily broken under mild shearing conditions (e.g., pushing the plunger of a syringe) which facilitates the implantation. Recovery of the gel features in a few seconds after implantation is highly desirable for accurate and prolonged retention in the required site, particularly if intended for regenerative medicine purposes.^{5,6} To achieve this later feature several approaches to reinforce the

gelling process through covalent links among the polymer chains have been explored.^{7–12}

As an alternative, if the polymer to be threaded by α CDs is stimuli-responsive, the gel features could be also tuned by diverse inner and external variables.^{13,14} For example, using a temperature-responsive copolymer, it is expected that the supramolecular gels are formed through not only crystalline arrangements among α CDs but also with the participation of the self-assembly of certain copolymer regions at body temperature. These two mechanisms of reversible cross-linking should lead to reinforced networks at physiological temperature, while they can be still cleared through slow erosion. In this regard, polypseudorotaxane gels formed by mixing α CD with poly(ethylene oxide) (PEO)

Received: December 26, 2017

Revised: January 19, 2018

Published: January 22, 2018

and poly(propylene oxide) (PPO) block copolymers exhibiting either linear (poloxamer, Pluronic) or X-shaped (poloxamine, Tetronic) architecture have been characterized in terms of self-assembly properties (stacking) and drug loading and release capability.^{15,16} Compared to poloxamer or poloxamine in situ gelling systems (without α CD), supramolecular gels exhibit higher mechanical strength, delayed erosion, and prolonged drug release both in vitro and in vivo.⁴

Despite the already gathered information, there is still a paucity of knowledge about the inner arrangement and mobility of the polymer chains and cyclodextrins in the supramolecular gels.¹⁷ Empty spaces among stacked nanocylindrical structures and relative movements of the components may notably determine diffusion of water and small diffusible species, such as drugs, through the supramolecular network, which in turn dictates its performance as drug delivery systems and cell scaffolds. Mobility and spatial closeness of the copolymer chains may also determine the feasibility of the cooperative self-assembly phenomena that regulate the responsiveness to certain stimuli, particularly temperature.^{18,19}

The aim of this work was to design binary and ternary mixtures of α CD, Pluronic F127 (P), and/or Tetronic 1307 (T) and to characterize the obtained supramolecular gels in terms of diffusion of each component and rheological behavior of the system as a whole. Common polypseudorotaxane gels consist of α CD and one (co)polymer species at quite high concentration, with the risk of causing a polymer-induced differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) to a certain lineage. It has been shown that poloxamers may perform as adipogenic, while some poloxamines are osteogenic.²⁰ Thus, one main purpose of this study is to shed light on the dynamics of every component involved in the supramolecular network structure, including water, for a rational design of a suitable syringeable implant using the minimal proportions of block copolymers, while maintaining their temperature-responsiveness. To carry out the work, we first applied several types of DOSY NMR experiments useful for the characterization of the polypseudorotaxane systems. These experiments provided knowledge on the self-diffusion coefficients and the solvent accessibility in binary and ternary systems that were compared with those obtained for the raw materials in which the supramolecular structure is not formed. Single component dispersions of α CD, P, or T were prepared at concentrations ranging from 1 to 7% w/w. Binary and ternary polypseudorotaxane systems were prepared by dispersion of the components in water (adding the components in different sequences) and subsequent freeze-drying. The samples were reconstituted with H₂O:D₂O mixtures, and diffusion coefficients of the components and solvent were measured using sequences One-shot²¹ and SL-DOSY,²² respectively. The accessibility of the water solvent to the components was measured using a waterLogsy experiment.^{23,24} The exchange rate between the water molecules attached to the components and the bulk water was measured with a novel NMR experiment Water Diffusion Exchange- Diffusion Optimized Spectroscopy (WDE-DOSY) that is proposed here for first time. In a second step, one promising ternary supramolecular system was further characterized in terms of microstructure (SEM and porosity), temperature-induced gelling, ability to host microparticles that can encapsulate active substances, erosion, cell viability, and osteogenic differentiation.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of Copolymer/ α CD Concentration Required for in Situ Gelling. The present work fits into the field of the

design of syringeable supramolecular depots or scaffolds that can be easily implanted using noninvasive maneuvers and that remain in the implantation site and withstand physiological conditions during the required time. This challenge can be addressed by combining the self-assembly of polypseudorotaxanes through crystalline arrangements among α CDs, which is expected to be maintained in the 4 to 37 °C range, with the self-assembly of block copolymer chains driven by interactions among PPO blocks at body temperature. These two mechanisms of reversible cross-linking should lead to reinforced networks at physiological temperature. So far only combinations of one copolymer with α CD have been explored.^{14,16,25,26} Since supramolecular gels prepared combining simultaneously two temperature-responsive copolymers of different architecture (i.e., linear poloxamer P and X-shaped poloxamine T) both able to form polypseudorotaxanes with α CD have not been explored yet, preliminary tests were carried out to identify the minimum copolymers concentration required to form gels at body temperature. Temperature-responsive syringeable implants are expected to perform as free-flowing solutions at 4 °C and to undergo the sol-to-gel transition at 37 °C in a few minutes. In previous studies, we observed that polypseudorotaxane systems are homogeneously formed by careful mixing of previously prepared dispersions of each component and that P requires higher concentration than T to form well-structured supramolecular gels.^{15,16} Thus, the inverted tube test was applied for a preliminary screening of combinations of P in the 7.5–11% (w/w) range, with T and α CD at concentrations in the 6–7.5% (w/w) range (Table S1 in the Supporting Information). Formulations were named using the initial of each component followed by numbers indicating its final weight percentage in the mixture. All formulations were liquid at 4 °C, but only three of them gelled at 37 °C. These three formulations contained P at 11% and T and α CD at 6% or 7%. Nevertheless, only the formulation P/T/ α CD 11/7/7 exhibited reversible and reproducible behavior during several cold/heating cycles. Moreover, this formulation retained the reversible gelling capacity when reconstituted after being freeze-dried. Therefore, this ternary mixture was chosen for the further experiments.

DOSY Diffusion Study. Several WDE-DOSY spectra were recorded with the pulse sequence indicated in Figure 1. The diffusion coefficients of each component in single dispersions covering a wide range of concentrations and also in binary and ternary systems were obtained applying a conventional DOSY experiment following the sequence depicted in Figure 1c (results in Table 1). The studies were carried out at 25 °C to minimize the effects of the temperature-induced assembly of the PPO blocks on the results obtained for binary and ternary systems. The four solutions of pure α CD (named as α CD1, α CD3, α CD5, and α CD7) provided diffusion coefficients in the range 2.7–4.2 $\times 10^{-10}$ m² s⁻¹. These values agree with the expected one for the molecular size of the free α CD molecule, and the differences in diffusion can be mostly attributed to the change of viscosity with the concentration of the sample or to certain self-assembly of the α CD units.²⁷

For the solutions of solely P (i.e., P1, P3, and P5) and solely T (i.e., T1, T3, T5, and T7) the ranges of diffusion coefficients were 0.3–0.7 and 0.3–0.5 $\times 10^{-10}$ m² s⁻¹ (Table 1), respectively. These values are consistent with the large size of these block copolymers (12600 and 18000 Da for P and T, respectively). The effect of the concentration on the observed diffusion coefficient was relevant and cannot be attributed only to the variation in the sample viscosity but mainly to the formation of self-aggregates of larger size. It should be noted that the critical micelle

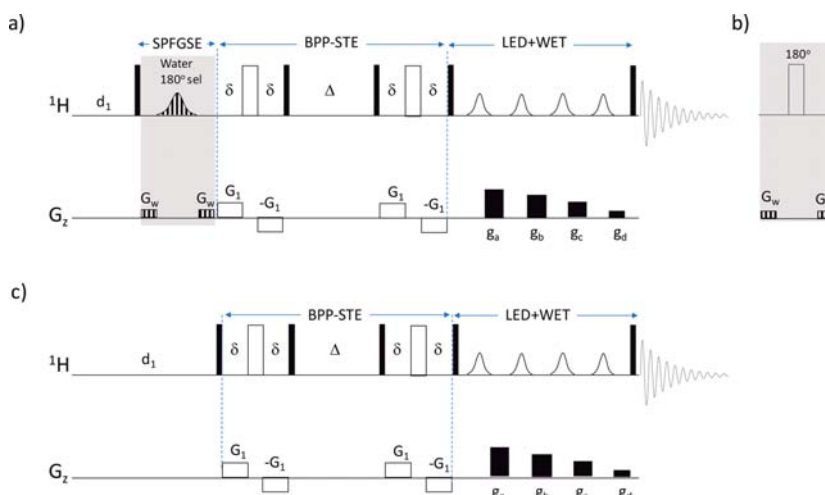


Figure 1. NMR pulse sequences used to measure diffusion coefficients. a) WDE-DOSY scheme used to measure diffusion enhanced by the chemical exchange or NOE proximity to the water molecules; b) modification for WDE-DOSY^{ref} and c) BPP-STE-LED-WET. The thin and thick bars represent hard 90° and 180° pulses, respectively. Selective shaped pulses used for the WET solvent suppression are indicated by the open shaped pulses. Bipolar gradients G_1 are used to encode/decode diffusion. In a) the shaped stripped pulse is a selective 180° Gaussian pulse applied at the frequency of the water solvent (~4.7 ppm). Then, binary and ternary systems were prepared using six concentrations of each component; namely, α CD and T were at 7% w/w and P at 11% w/w. In the case of the ternary systems the effect of the order of addition (P+ α CD+T, T+ α CD+P, P+T+ α CD) was investigated to elucidate whether α CD has more affinity for one of the two block copolymers, which in turn may cause changes in the supramolecular structures. All binary and ternary systems led to whitish dispersions exhibiting shear-thinning properties, which is typical of polypseudorotaxane formation. The systems were freeze-dried and then reconstituted with H₂O/D₂O mixtures. Diffusion coefficients recorded for these binary and ternary systems were $0.1\text{--}0.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (Table 1). These values are slightly lower than those corresponding to P or T in the pure dispersions. No differences were observed for ternary systems prepared adding the components in different order.

Table 1. Self-Diffusion Coefficients and the Calculated Fraction of Water Exchange (f_w) Obtained by Different Diffusion NMR Spectra for the Dispersed Samples at 25 °C^g

sample \ peak	SL-DOSY- H ₂ O (D_w) H ₂ O	WDE-DOSY (D_p^{app}) α CD	WDE-DOSY ^{ref} (D_p) α CD	DOSY rd (D_p) α CD	f_w^c α CD	WDE-DOSY (D_p^{app}) PEO	WDE-DOSY ^{ref} (D_p) PEO	DOSY rd (D_p) PEO ^b	f_w^c PEO	WDE-DOSY (D_p^{app}) PPO	WDE-DOSY ^{ref} (D_p) PPO	DOSY rd (D_p) PPO ^b	f_w^c PPO
α CD1	22.8	f	4.6 ^b	4.2 ^b	---								
α CD3	21.8	3.8 ^a	3.0 ^b	3.1 ^b	0.04								
α CD5	20.9	3.6 ^a	2.9 ^b	2.9 ^b	0.04								
α CD7	20.7	3.5 ^a	2.7 ^b	2.7 ^b	0.04								
P1	20.0					f	0.6 ^b	0.6	---	f	0.6 ^b	0.7	---
P3	19.7					0.6 ^b	0.6 ^b	0.5	0.00	4.3 ^a	0.5 ^b	0.5	0.20
P5	16.4					0.4 ^b	0.3 ^b	0.4	0.01	3.7 ^a	0.3 ^b	0.3	0.21
T1	20.7					0.6 ^b	0.6 ^b	0.5	0.00	4.3 ^a	0.5 ^b	0.6	0.19
T3	20.6					0.6 ^b	0.6 ^b	0.5	0.00	3.6 ^a	0.6 ^b	0.5	0.15
T5	20.5					0.3 ^b	0.3 ^b	0.3	0.00	3.5 ^a	0.3 ^b	0.3	0.16
T7	21.8					0.3 ^b	0.3 ^b	0.3	0.00	4.2 ^a	0.3 ^b	0.3	0.18
P α CD	18.2	5.1 ^a	0.2 ^b	0.2 ^b	0.27	0.2 ^b	0.1 ^b	0.2	0.00	3.5 ^a	0.2 ^b	0.2	0.18
P α CDT	20.0	5.4 ^a	0.1 ^b	0.1 ^b	0.27	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1	0.00	3.0 ^a	0.1 ^b	0.1	0.14
T α CD	18.2	5.1 ^a	0.2 ^b	0.3 ^b	0.27	0.3 ^b	0.3 ^b	0.3	0.00	4.2 ^a	0.3 ^b	0.3	0.22
T α CDP	17.3	4.8 ^a	0.1 ^b	0.1 ^b	0.27	0.1 ^b	0.1 ^b	0.1	0.00	3.3 ^a	0.1	0.1	0.19
PT α CD	18.3	5.0 ^a	0.1 ^c	0.1 ^c	0.27	0.1 ^c	0.1 ^c	0.1	0.00	3.4 ^b	0.1 ^c	0.1 ^c	0.18

^a $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 2 \text{ ms}$. ^b $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 5 \text{ ms}$. ^c $\Delta = 500 \text{ ms}$, $\delta = 5 \text{ ms}$. ^dBPP-STE-LED-WET DOSY. ^eCalculated using eq 3. ^fSignal with low intensity. ^gThe diffusion coefficients are expressed in units $\times 10^{10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. D_w is the diffusion of the bulk-water, D_p^{app} is an apparent diffusion coefficient of the solute that is enhanced by the equilibrium, and D_p is the diffusion coefficient of the solute specie in the absence of the equilibrium.

concentration (CMC) of these two varieties of block copolymers is slightly below 1% w/w, and therefore an increase in the number and size of the micelles is expected to occur as more copolymer is in the medium.²⁸

Study of Water Solvation from WDE-DOSY Spectra. The WDE-DOSY experiment of Figure 1a was aimed to determine

water-accessibility to specific sites of a solute. The experiment relies on the methodology exchange enhanced diffusion originally proposed by Moonen et al.²⁹ The original methodology and some variants have been applied for measuring exchange rates of labile protons of a solute with water such as the amide protons of peptides and proteins.^{29–33} However, to the best of our knowledge

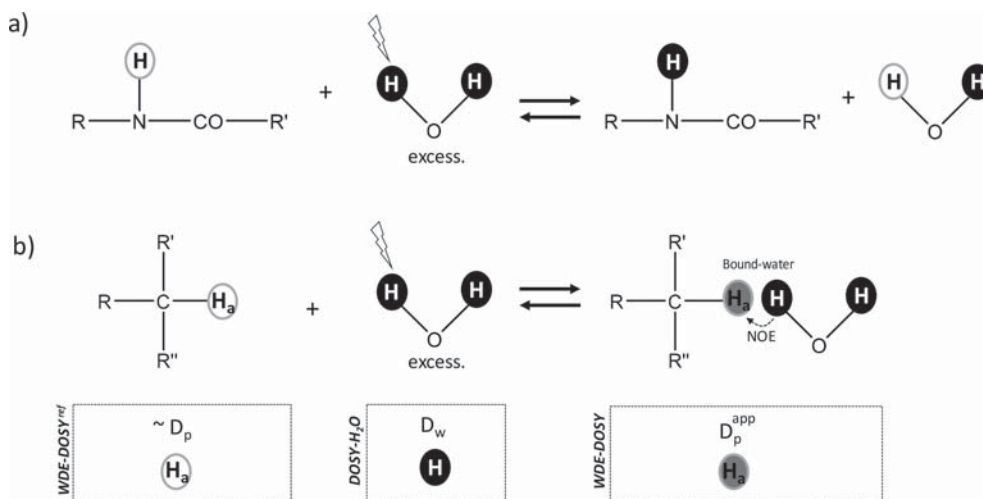


Figure 2. Scheme of the two mechanisms leading to exchange enhanced diffusion in NMR. a) Water-EXSY mechanism: a chemical exchange equilibrium occurs between a proton of the water and a labile proton of the solute that is released to the solution. b) Water-NOESY mechanism: an equilibrium in which the water molecule exchanges between its free state in solution and its bound state attached to the solute. WDE-DOSY initially removes (dephase) all the signals of the solute, but in mechanism b) the bound-water protons can transfer NOE to a nonlabile proton of the solute in its proximity and thus be detected. In b) the type of proton that generates the NMR signal in WDE-DOSY^{ref} and WDE-DOSY and the type of diffusion coefficient that is measured are shown. D_p is the diffusion coefficient of the solute specie in absence of the equilibrium, D_w is the diffusion of the bulk-water and D_p^{app} is an apparent diffusion coefficient of the solute that is enhanced by the equilibrium.

the methodology has not been exploited to get information about the hydration of the nonlabile protons. This later possibility has been explored here by using the WDE-DOSY experiments.

The description of the WDE-DOSY pulse sequence (Figure 1a) is given in the [Experimental Procedures](#) section (see [Theory of WDE-DOSY Experiment](#)). Briefly, the appearance of a certain proton signal of the solute in WDE-DOSY requires some type of interaction with water (during an adjustable diffusion period Δ) to build the peak; otherwise the peak is not seen. The two possible mechanisms for the interaction with water are *water-EXSY*^{29–33} and *water-NOESY*^{23,24} (Figure 2). They are effective to build intensity for the peaks of labile and nonlabile protons of the solute, respectively. Moreover, it is important to notice in Figure 2 that for the two mechanisms, the relevant proton magnetization resides during a certain time in different molecular species (water and solute) which in principle have very different diffusion coefficients. It introduces a modulation in the diffusion coefficients measured with WDE-DOSY which results in exchange enhanced diffusion. As a result of that, the diffusion coefficients determined by WDE-DOSY are apparent values (D_p^{app}) that are equal or faster than those measured for the same signal with a conventional DOSY experiment, in which the effects of the water-NOESY mechanism on the intensities can be neglected and the experiment directly provides the diffusion coefficient of the solute (D_p).

In the present work, the WDE-DOSY experiment was applied to the study of nonlabile protons; therefore, the only relevant mechanism is *water-NOESY*. The water protons must reside during enough time in the proximity of a certain nonlabile proton of the solute (i.e., located at the typical NOE distance of 2.5 to 4.5 Å) to build enough intensity for the solute proton signal to be detected. WDE-DOSY methodology provides access to the fraction of water exchange, f_w (see theory in the [Experimental Procedures](#) section), a parameter that is relevant in the study of hydration and that in this experiment can be determined for every

observable nonlabile proton of the solute. The parameter f_w was calculated applying eq 3 from the diffusion results of three different DOSY spectra, namely, (i) WDE-DOSY, (ii) WDE-DOSY^{ref} (or a conventional DOSY), and (iii) a DOSY spectrum that is optimized for measuring diffusion of the water peak in samples containing a high proportion of nondeuterated water (e.g., $\geq 90\%$ H₂O) which is referred to here as DOSY-H₂O. These three spectra provide, respectively, the three unknowns required in eq 3 for the calculation of f_w which are the diffusion coefficients, D_p^{app} and D_p , for a certain signal of a solute, and D_w that is the diffusion of the water signal in the sample. The parameter f_w measures the fraction of time that the bound-water is released to the medium and converted into bulk-water during the fixed period Δ incorporated in WDE-DOSY. Thus, a value f_w of 0 means that the bound-water molecule is permanently attached to a certain solute proton during the fixed period Δ of the experiment. On the contrary, a value of f_w close to the limit of 1 implies frequent exchanges between the bound-water and the bulk-water during the period Δ .

The WDE-DOSY methodology was applied to the study of water solvation in the dispersions prepared with single components (Figure 3) and with binary and ternary mixtures of α CD, P, and T (Figure 4).

The WDE-DOSY study was first carried out for the single dispersions of α CD prepared at four concentrations: α CD1, α CD3, α CD5, and α CD7. The NMR signals analyzed were those in the range 3.3–4.0 ppm corresponding to the glucose ring protons H₂ to H₆ of α CD. For the sample α CD1, the WDE-DOSY spectrum did not provide enough sensitivity which resulted in a poor fit to eq 1, and therefore these results were discarded. For a medium size structure such as the α CD molecule, the water-NOESY can be near to the so-called zero NOE-crossing regime,³⁴ and therefore the sensitivity per scan is low, which demands a longer measurement time and/or an increase of the concentration.

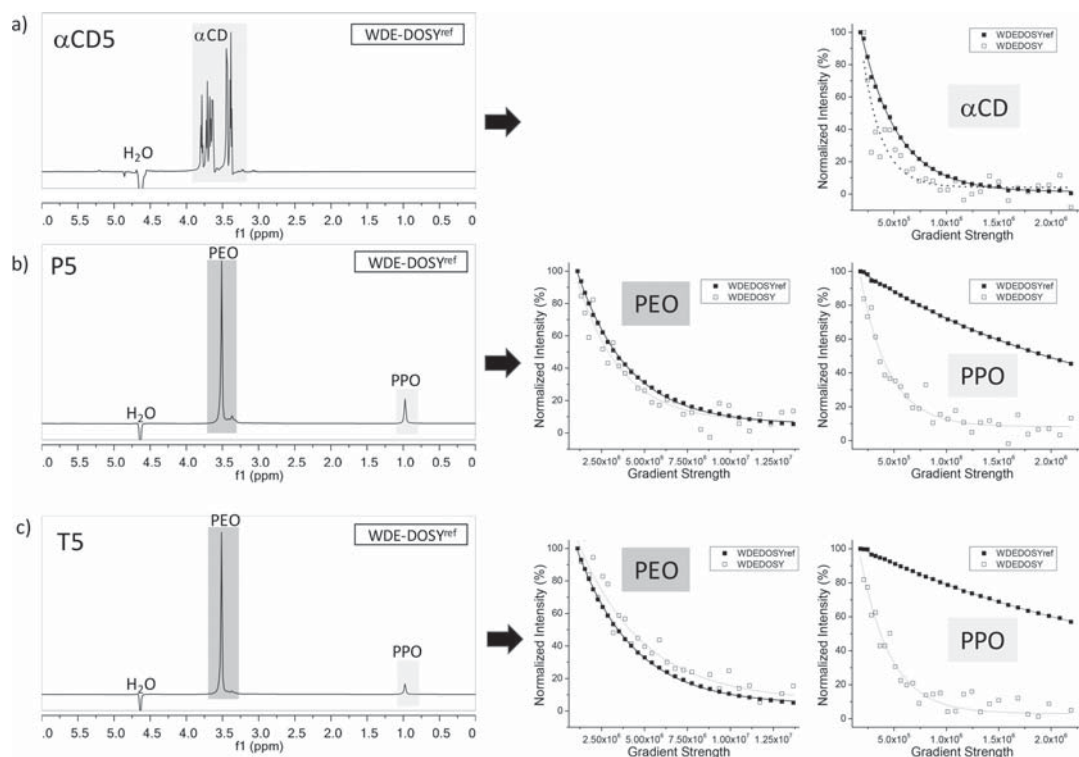


Figure 3. WDE-DOSY study of the single component dispersions. a) α CD5, b) P5, and c) T5. Left: first 1D trace of WDE-DOSY spectrum obtained with $\Delta = 0.5$ s and $\delta = 0.2$ ms. The shaded region around each peak represents the area that was considered for the analysis. Right: WDE-DOSY^{ref} and WDE-DOSY normalized intensity attenuation curves of each relevant peak plotted together. A faster decay curve for WDE-DOSY than WDE-DOSY^{ref} reflects the enhanced water exchange diffusion which results in an apparent diffusion coefficient, D_p^{app} , in the former spectrum.

The sensitivity of WDE-DOSY was much better for the other three samples of α CD prepared at higher concentration; they provided satisfactory fits to eq 1, and the corresponding diffusion coefficients are given in Table 1. Figure 3a illustrates the results of the WDE-DOSY methodology for sample α CD5. The profile of signal intensity with respect to the increment in the gradient-strength is represented in the plot at the right part of Figure 3a for the pair of spectra WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref}. The profile of the WDE-DOSY spectrum showed a slightly faster decay than that recorded for the WDE-DOSY^{ref} spectrum. The fitting of each curve to eq 1 provided diffusion coefficients D_p^{app} of $3.6 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and D_p of $2.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively (Table 1). The faster diffusion coefficient obtained for WDE-DOSY results reflects the enhancement due to water exchange. However, from these results the value of f_w calculated for α CD5 was 0.04 (see Table 1). The low value of f_w obtained indicates a model for the hydration in which there are bound-water molecules located at the internal cavity of the cyclodextrin, in the proximity of the H₂–H₆ protons. These water molecules are strongly attached to α CD with very little renewal by other bulk-water molecules during the time-scale of the WDE-DOSY experiment which in this case is given by Δ of 500 ms. The WDE-DOSY study carried out for α CD3 and α CD7 gave very similar low values of f_w (Table 1) which points to the same conclusions relative to the hydration.

The WDE-DOSY study of the single component dispersions prepared with P focused on the analysis of the proton signals of

the PEO and PPO units that are present in both P and T polymers and appear as singlets at 3.55 and 1.01 ppm, respectively. Figure 3b illustrates the WDE-DOSY analysis of P5; the plot corresponding to the PEO units showed a similar attenuation profile for the WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref} spectra, and the fitting of these curves to eq 1 gave very similar diffusion coefficients D_p^{app} and D_p of $0.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $0.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively (Table 1). From these results, the calculated value of f_w is 0.01 for the PEO protons of P5 (Table 1) and the interpretation for such a low value is that the PEO protons of P5 are in the proximity of bound-water, but they are not renewed during the time scale (Δ) used in the experiment of 500 ms. The situation is remarkably different for the PPO units of P5; in Figure 3b the intensity-attenuation plot for PPO decayed considerably faster for WDE-DOSY than WDE-DOSY^{ref}, and the calculated diffusion coefficients were D_p^{app} and D_p of $3.7 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ and $0.3 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectively (Table 1). Clearly, for the PPO units of P5 there is a significant diffusion enhancement in the WDE-DOSY spectrum, and the calculated value of f_w was 0.21 (Table 1). This means that the PPO units of P5 contain bound-water in the proximity of the P5 proton that is considerably renewed by bulk-water during the experimental time scale (Δ) of 500 ms. The situation for sample P3 was very similar and gave comparable results to P5 (see Table 1). The results of P1 are not given due to the poor sensitivity of the WDE-DOSY spectrum.

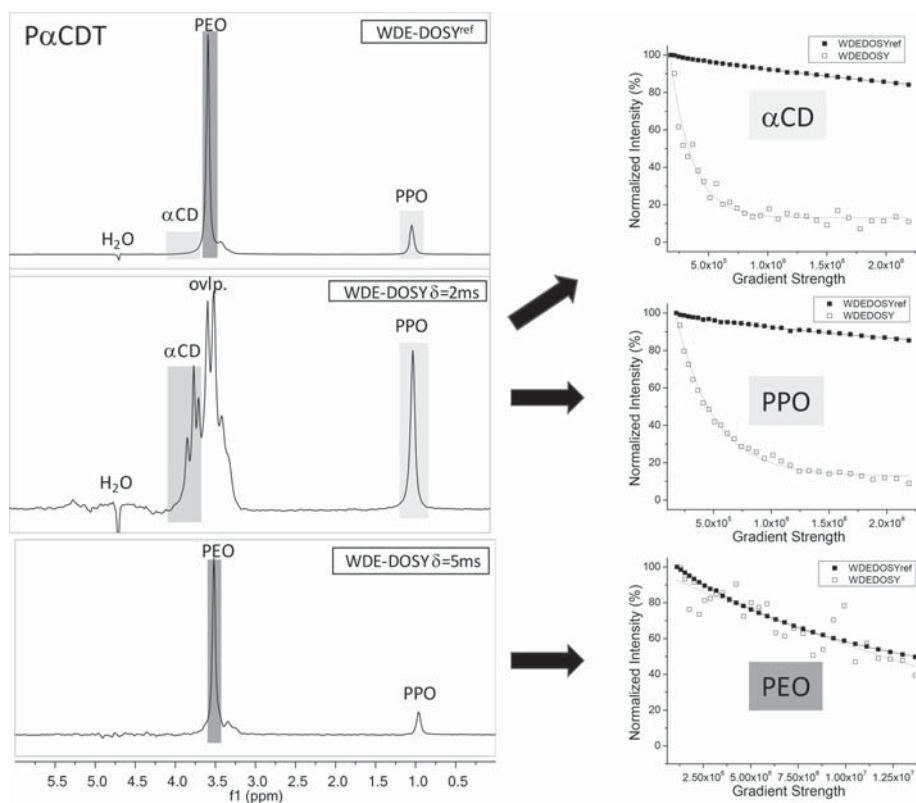


Figure 4. WDE-DOSY study of the ternary dispersion P α CDT. Left: three WDE-DOSY spectra obtained for the sample: (top) 1st trace of WDE-DOSY^{ref} and (middle) 1st trace of WDE-DOSY obtained with $\Delta = 0.5$ s, $\delta = 0.2$ ms. The (bottom) spectrum is the 1st trace of the WDE-DOSY spectrum obtained with $\Delta = 0.5$ s and $\delta = 0.5$ ms. The shaded region around each peak represents the area that was considered for the analysis. Right: the WDE-DOSY^{ref} and WDE-DOSY normalized intensity attenuation curves of each relevant peak are plotted together. A faster decay curve for WDE-DOSY than for WDE-DOSY^{ref} reflects the enhanced water exchange diffusion which results in an apparent diffusion coefficient, D_p^{app} , in the former spectrum.

The WDE-DOSY study for the single component dispersion prepared with T is illustrated in Figure 3c for the case of T5. The WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref} spectra were measured for each proton signal corresponding to the PEO and PPO units. The plot of the intensity profiles of WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref} were similar for the PEO protons and different for the PPO protons (see Figure 3c). The calculated values of f_w for the PEO and PPO protons of T5 were 0.00 and 0.16, respectively (Table 1). Once again these results suggest that the PEO (/PPO) units of T5 contain bound-water in the proximity of the T5 proton that is essentially not (/considerably) renewed by bulk-water during the experimental time scale of 500 ms. The results of f_w for the other samples T1, T3, and T7 were very comparable to T5, and similar conclusions can be drawn in terms of the hydration of the PEO and PPO units.

Then, the WDE-DOSY study was carried out for the binary or ternary mixtures prepared, namely P α CD, P α CDT, T α CD, T α CDP, and PT α CD. Figure 4 illustrates the case of the WDE-DOSY study of the ternary sample P α CDT. Interestingly, the plot of the intensity profiles of the WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref} spectra for the α CD protons in P α CDT (and in T α CDP and PT α CD) was very different from that corresponding to the pure solution α CDS (Figure 3a). In these binary and ternary

systems the value of f_w was 0.27, which was considerably larger than the value of 0.04 obtained for α CD in the pure solutions α CD3, α CDS, and α CD7 (see Table 1). The plots of Figure 4 corresponding to the PEO and PPO units are comparable to the corresponding plots in Figure 3b and 3c, and the interpretation of the curves is analogous to that commented above for PS or T5.

These findings mean that once the supramolecular structures are formed, there is a significant exchange or renewal of the bound-water that is attached to the glucose ring protons of α CD during the time-scale of $\Delta = 500$ ms (Figure 3a). Overall, these results indicate that P or T when mixed with α CD considerably modify the solvation characteristics of the glucose ring protons of α CD which are located toward the internal cavity of the cyclodextrin ring. The low value of f_w obtained for α CD in the single mixtures could indicate that bound-water molecules form a very stable cluster at the internal cavity of α CD. Differently, in the binary mixtures of α CD with P or T very stable polypseudorotaxane complexes are formed,^{17,35} and units of PEO occupy the internal cavity of all the available α CD molecules. Therefore, the entrance of water molecules to the interior of α CD and the possibility that they occupy the most stable positions are considerably reduced in the binary and ternary mixtures studied,

which is reflected in the values of f_w as a faster water renewal of the bound-water molecules.

For the single component dispersions prepared with P (/T) at the three (/four) different concentrations, the results of Table 1 show essentially null values of f_w for the PEO units, while for the PPO units f_w average values are 0.20 (/0.16) for P (/T) and remain very constant at the range of concentrations studied. Overall, these results indicate that the renewal of bound-water molecules is relatively faster for the PPO units and essentially null for the PEO units at the time-scale of $\Delta = 500$ ms. The results of f_w for the PPO and PEO units are essentially the same for the binary and ternary mixtures of P and/or T in combination with α CD (see Table 1).

In sum, NMR studies confirm that similar polypseudorotaxane structures are formed both in the binary and ternary systems and that this causes relevant changes in the mobility of α CD species (which decreases) and of internal water (which increases). Regarding the block copolymers, the threading with α CDs in the polypseudorotaxane makes the copolymer chains mobility to be as low as when the copolymer forms micelles. Since only PEO blocks are expected to localize in the α CD cavities, these later findings mean that the PPO blocks are still available to interact with each other (as occurs in the micelles) which explains the maintenance of the temperature-responsiveness in the ternary polypseudorotaxane systems undergoing in situ gelling transitions. This issue is analyzed in detail in the next section.

Rheological Properties. In agreement with results obtained by visual inspection, P/T/ α CD 11/7/7 showed temperature-responsive behavior (Figure 5) and exhibited maximum viscosity

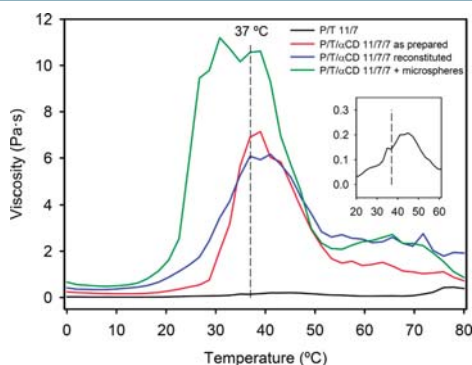


Figure 5. Evolution of the viscosity with the temperature of P/T 11/7 dispersion (black line) and the P/T/ α CD 11/7/7 supramolecular system in phosphate buffer pH 7.4 as freshly prepared (red line), reconstituted after freeze-drying (blue line), and with PLA/PLGA microspheres (250 mg/mL) (green line). The inset shows in more detail the viscosity values of P/T 11/7 dispersion in the 20–60 °C range.

at ca. 37 °C. Interestingly, in the absence of α CD this temperature-induced gelling did not occur, which means that the interconnection among micelles of P at 11% or T at 7% (and even in dispersions containing both copolymers together) is not sufficiently strong to cause a significant change in the macroviscosity of the system (see insert in Figure 5). It should be noted that we have chosen the lowest concentration of each block copolymer that in the presence of α CD renders in situ gelling polypseudorotaxane supramolecular systems. Therefore, the polypseudorotaxane assemblies (verified in the NMR studies) play a key role both at 4 and 37 °C. Below body temperature,

the cross-linking of the block copolymer chains through the crystalline arrangements of α CDs (which cause a strong attenuation of the mobility of α CD units, as explained above) provokes a clear increase in the viscosity of the system (~ 0.5 Pa·s) compared to water (0.001 Pa·s) and to the P/T 11/7 dispersions (~ 0.05 Pa·s). Thus, the ternary formulation can be still easily injected using a needle, but leakage and rapid clearance during the sol-to-gel transition may be minimized. On the other hand, once at 37 °C the polypseudorotaxane assemblies facilitate the contacts of the nonthreaded PPO blocks with each other making the temperature-induced assembly occur, reaching a viscosity of ca. 7 Pa·s.

From a practical point of view, it is interesting to note that the rheological properties of the ternary system were not altered after freeze-drying and reconstitution (Figure 5), which is advantageous in the gel marketing regarding both stability during storage and rapidness during preparation. Bearing in mind the potential application in bone regeneration of critical defects where different active substances with different release profiles could be needed, the rheological behavior of the ternary system containing a quite large amount of PLA/PLGA microspheres (250 mg/mL) was also studied. In this case, an increase in viscosity was observed when microspheres were added to the formulation (Figure 5), which suggests entanglements/adsorption of the copolymer chains onto the microspheres as previously observed for other drug carriers exposed to free copolymer chains.^{36,37} Also a shift in the maximum viscosity toward lower temperature values (~ 29 °C) was observed, which reinforces the hypothesis of hydrophobic interactions between the PPO blocks and the PLA/PLGA microspheres surface. This finding is also in good agreement with the fact that the microenvironment of PPO blocks is not altered in the polypseudorotaxanes, as observed in the NMR studies. Therefore, the PPO blocks are available for sorption onto and retention of drug carriers in the supramolecular gels.³⁸

The viscoelastic behavior recorded applying oscillatory rheometry (Figure 6) was in good agreement with the viscosity

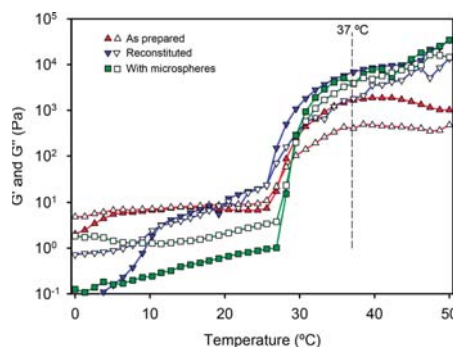


Figure 6. Evolution of storage (G' , full symbols) and loss (G'' , empty symbols) moduli of the P/T/ α CD 11/7/7 supramolecular system in phosphate buffer pH 7.4 as freshly prepared (red lines), reconstituted after freeze-drying (blue lines), and with PLA/PLGA microspheres (250 mg/mL) (green lines).

profile. The gelation temperature, defined here as the temperature where G' becomes greater than G'' , resulted in being close to 28 °C for the ternary system either as freshly prepared and after being reconstituted, shifting to 29.5 °C when microspheres were added.

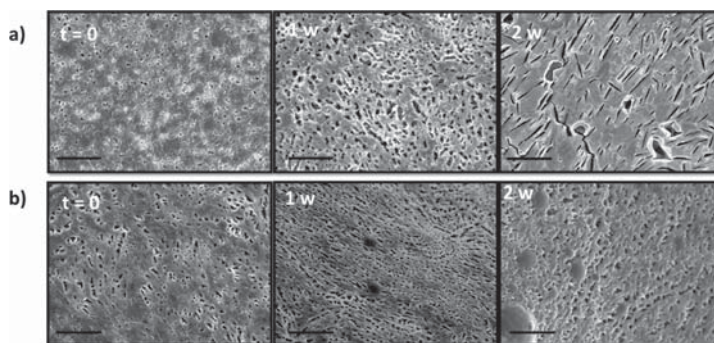


Figure 7. SEM images showing the internal structure of freeze-dried P/T/αCD 11/7/7 gel without (a) and with (b) microspheres (250 mg/mL), as freshly prepared ($t = 0$) and after incubation in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C during 1 and 2 weeks. Scale bar: 100 μm .

Internal Structure and Porosity. Internal structure of the ternary supramolecular gel, both without and with microspheres (250 mg/mL), was evaluated as freshly prepared and after incubation in aqueous medium for several weeks at 37 °C. SEM images (Figure 7) revealed that the freeze-dried gels have uniformly distributed empty spaces with a pore diameter of 4.36 μm (s.d. 1.36 μm). Interestingly total porosity of the gel containing microspheres was slightly lower (75 (s.d. 1) vs 81 (s.d. 1)), which may be related to the participation of the microspheres in the entanglements of the PPO blocks (Figure 8). The pore size and

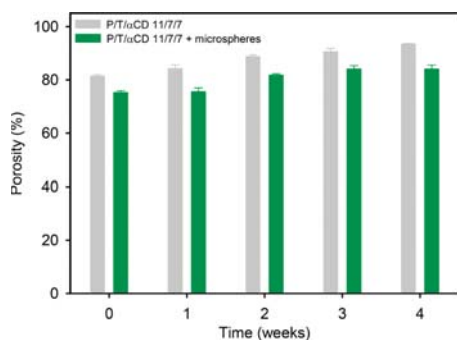


Figure 8. Evolution of the porosity of P/T/αCD 11/7/7 gel with and without microspheres (250 mg/mL) during incubation in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C for 4 weeks.

high porosity exhibited by gels with and without microspheres may be adequate for cell encapsulation allowing nutrient or signaling factors exchange. The porosity slowly evolved toward higher values during the 4 weeks of contact with the phosphate buffer medium, which is an index of the strength of the two reversible cross-linking mechanisms involved in the formation of the network. SEM images (Figure 7) also showed an increase in the number and size of pores with time. For the gel without microspheres, a change in the pores morphology was observed after 2 weeks of incubation. Differently than the more or less cylindrical and homogeneously distributed pores observed in the gel with microspheres, gels without microspheres showed small cracks in their structure.

rMSCs Seeding and Culture in the Ternary Gel. *Encapsulation and Cell Viability.* Bone marrow-derived mesenchymal

stem cells (rMSCs) were homogeneously distributed in P/T/αCD 11/7/7 gels at low temperature (Figure 9). The cytotoxicity and metabolic activity of rMSCs encapsulated in the gel were assessed applying a live/dead flow cytometry assay. The typical dot plots graph in log scale of green versus red fluorescence of rMSCs exposed to calcein-AM and propidium iodide (PI) is depicted in Figure 9. The left panel shows the forward-scattered light (FSC) and side-scattered light (SSC) plot with gating to avoid undesired noises from debris. The right panel shows the density plots with green fluorescence intensity (calcein AM) as the Y-axis and red fluorescence intensity (PI) as the X-axis. The population of live cells labeled by calcein-AM appears at the upper left corner in the plot, while the population of dead and unhealthy cells, which lose their membrane integrity (labeled PI), appears at the lower right part. The density plots obtained from the flow cytometry analysis indicate that 98% of the cells were alive after 5-day culture in the gel. Therefore, the ternary supramolecular gel shows adequate features for the growth, spreading, and proliferation of rMSCs, one of the most broadly investigated stem cells for their potential in regenerative medicine,^{39,40} opening the possibility of being used as a cell delivery system.

Osteogenic Differentiation in Vitro. The osteogenic differentiation of rMSCs (passage 2) encapsulated in the ternary gel was assessed in vitro after incubation in osteogenic differentiation media for 7, 14, or 21 days. Even only after 7 days of osteoblastic induction, some cells already showed positive alkaline phosphatase staining (Figure 10A). At day 14, a greater number of positive cells were observed (Figure 10B), while at day 21 an increase in the number of cells occurred, and most of them showed alkaline phosphatase activity (Figure 10 C, D). No differentiation was observed in the absence of differentiation stimuli.

CONCLUSION

Several techniques have been combined to shed light on the diffusional properties of the components involved in the formation of supramolecular gels for a better understanding of their behavior when intended for bone scaffold. The NMR diffusion study carried out with single, binary, and ternary systems of P, T, and αCD proves that the diffusion coefficients of these components substantially decrease and that changes in solvent accessibility occur when polypseudorotaxanes are formed, compared to the dispersions of each component separately. The mentioned decrease of the diffusion coefficients is mainly explained by aggregation phenomena that take place among the components of the

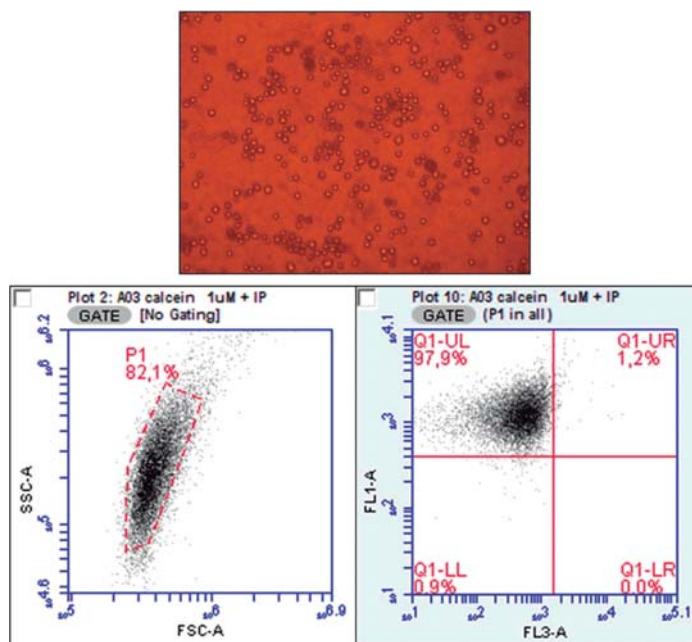


Figure 9. Encapsulation and viability of rMSCs in P/T/ α CD 11/7/7 gels. The rMSCs were homogeneously distributed in the system immediately after gel formation (top panel). After 5 days in culture, cells encapsulated in the gel were harvested, stained with both calcein-AM and propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. Dot blot representing unlabeled (left panel) and labeled rMSCs (right panel).

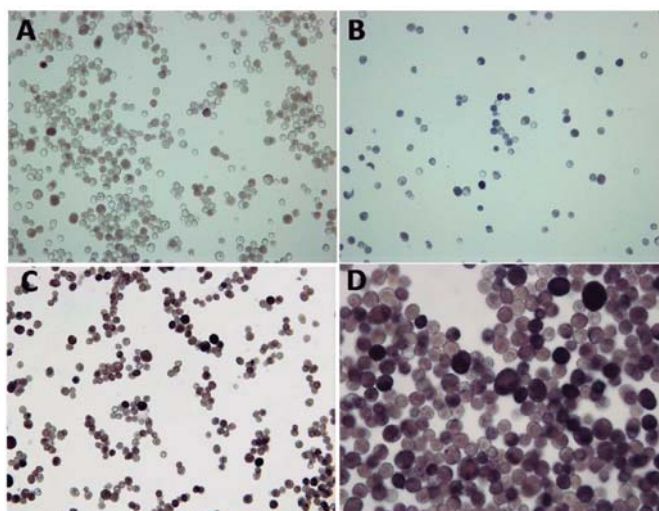


Figure 10. Alkaline phosphatase staining of rMSCs encapsulated in P/T/ α CD 11/7/7 gel. Cells expressing alkaline phosphatase were stained blue after 7 (A, 20 \times), 14 (B, 20 \times), and 21 (C, 20 \times and D, 40 \times) days of osteogenic differentiation. rMSCs encapsulated in the gel and grown in nondifferentiation medium (complete medium) as control showed no staining (data not shown).

supramolecular systems. Water accessibility to each component was studied by the WDE-DOSY methodology that was applied for the first time in this work and that allowed quantification of the fraction of water exchange (f_w). For dispersions of P or T solely the renewal of water molecules for the PPO units is much

higher (f_w 14–21%) than that recorded for the PEO units (f_w 0–0.01%). In the gels of P and/or T with α CD, PEO units are preferably inserted in the cavity of α CD releasing strongly bound-water molecules from the cavity and increasing the renewal of water for α CD (f_w 0.27) with respect to the pure α CD (f_w 0.04).

The NMR results are also in good agreement with the fact that the PPO blocks are still available to interact with each other (as occurs in the micelles) which explains the maintenance of the temperature-responsiveness in the ternary polypseudorotaxane systems, undergoing in situ gelling transitions. The ternary P/T/ α CD supramolecular gel prepared with the lowest possible content in copolymers to still show adequate rheological properties can also host quite large contents of drug microcarriers or stem cells while performing as a syringeable implant. Also relevantly from a practical point of view, the gel can be freeze-dried and reconstituted to the original system and withstand prolonged exposition in vitro to an aqueous environment with minor changes in internal porosity. These findings clearly indicate the advantages of preparing supramolecular gels that can simultaneously benefit from the assembly of polypseudorotaxanes (through adjacent α CDs) and of PPO blocks (through temperature-driven interactions). Moreover, we expect that the versatile WDE-DOSY methodology developed in this paper can be valuable to study the solvation properties of other large systems and to provide useful tools to the interdisciplinary community involved in the development of biomaterials.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. Pluronic F127 (P, Poloxamer 407), glycerol 2-phosphate disodium salt hydrate, ascorbic acid, dexamethasone, calcium-AM, propidium iodide, and nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP) substrate solution were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Tetronic 1307 (T) was obtained from BASF (New Jersey, USA), and α -cyclodextrin (α CD) was kindly provided by Wacker (Burghausen, Germany). Poly(D,L-lactide) (PLA-S) (Resomer RG203-S) was supplied by Evonic Industries (Germany). Dulbecco's Minimal Essential Medium high glucose (DMEM high glucose) was obtained from Biowest (France).

NMR Experiments. Gels Preparation. Single component dispersions of α CD, P, or T were prepared in phosphate buffer pH 7.4 (0.066 M) at concentrations ranging from 1 to 7% w/w. Binary and ternary polypseudorotaxane systems were prepared by dispersion of the components in phosphate buffer pH 7.4 (adding the components in different order) and subsequent freeze-drying. The samples were finally dissolved in H₂O:D₂O 90:10 v/v and transferred to standard 5 mm NMR tubes for the measurements.

NMR Spectra. NMR spectra of the prepared dispersions were acquired at 25 °C on a Varian Inova 17.6 T spectrometer (750 MHz proton resonance) equipped with a HCP probe and triax gradients. The spectra were processed and analyzed with MestreNova software v11.0 (Mestrelab Inc.).

¹D ¹H Proton NMR Spectra (1D ¹H). The experiment was measured with the 1D Water-Control experiment for strong suppression of the water peak.⁴⁰

1D Water-Logsy Spectra. The experiment^{23,24} was measured at a series of mixing times of 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.75, 1.0, 1.5, and 2.0 s.

Water-Diffusion-Exchanged DOSY (WDE-DOSY) Spectra. For each sample, several WDE-DOSY spectra were recorded with the pulse sequence indicated in Figure 1a. The first selective water pulse was a 2.4 ms Gaussian 180° shaped pulse covering a bandwidth of 375 Hz around the water peak. During the LED period the sequence incorporates a WET solvent suppression scheme for strong suppression of the water peak.^{41,42} The WET is based on four 90-degree E-BURP shaped pulses of 2 ms separated by the gradients g_w , g_b , g_c , and g_d of 2 ms and a strength of 22, 11, 5.5, and 2.5 G/cm, respectively. The other parameters

were optimized for the samples under study. The bipolar PFGs used to encode/decode diffusion had a rectangular shape and a total duration (δ) of either 2 or 5 ms for different spectra. The diffusion delay (Δ) was set to 500 ms. In every spectrum, rectangular shaped gradients were used. The strength of the bipolar gradients (G_i) was varied linearly between 11.2 and 39.2 G/cm to detect 32 points in the diffusion dimension. The interscan relaxation delay d_1 was set to 4 s, and the FID acquisition time was 1.3 s. Each signal corresponding to a component of the dispersion was analyzed by the Stejskal-Tanner equation (eq 1)³⁰

$$I_G = I_0 \cdot \exp\left[-K^2 D \cdot \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right] \quad (1)$$

where I_G is the peak intensity at a given gradient strength G , I_0 is the peak intensity at the lowest gradient strength of the series, and $K = \gamma \cdot G \cdot \delta$ where γ is the proton gyromagnetic constant. The fitting of the intensities of a given peak along the diffusion dimension to eq 1 provides the parameter D , which for the WDE-DOSY experiment corresponds to the apparent diffusion coefficient of the solute (D_p^{app}) as described below in the theory section. For comparison, a WDE-DOSY reference spectrum (WDE-DOSY^{ref}) was also measured for each sample with the pulse sequence of Figure 1b. The fitting of the intensities of a given peak of a component of the dispersion along the diffusion dimension to eq 1 provides the parameter D which in this experiment corresponds to the conventional self-diffusion coefficient of the solute (D_p).

DOSY Spectra. Conventional self-diffusion coefficients were measured for each component of the prepared samples with the pulse sequence Bipolar Gradients-Stimulated Echo-Longitudinal EDdy current compensated-Water-Taylor-Excitation (BPP-STE-LED-WET) of Figure 1c. The experiment is a straightforward modification of the original BPP-STE-LED pulse sequence.⁴³ It consists of the incorporation of the WET solvent suppression scheme^{41,42} during the LED period for strong suppression of the water peak. The parameters used for the WET part were those described above for the sequence WDE-DOSY. Other parameters were optimized for the dispersion samples under study. The duration of the bipolar PFG gradient pulses (δ) used to encode/decode diffusion was 5 ms, and the diffusion delay (Δ) was 500 ms. The bipolar PFG gradients used to encode/decode diffusion had a rectangular shape, and their gradient strength (G) was varied linearly between 11.2 and 39.2 G/cm to detect 32 points in the diffusion dimension. The interscan relaxation delay d_1 was set to 4 s, and the FID acquisition time was 1.3 s. The fitting of the intensities of a given peak along the diffusion dimension to the Stejskal-Tanner equation (eq 1) provides the parameter D , which in this experiment corresponds to the conventional self-diffusion coefficient of the solute (D_p).

DOSY-H₂O Experiments. The diffusion coefficient of the water solvent was measured in the samples under study with a version of DOSY based on the Slice-Selective-Stimulated Echo sequence (SL-STE).²² The excitation pulse in the experiment consists of a Hermitian $\pi/2$ pulse of 0.8 ms that is applied simultaneously with a gradient of 0.19 G/cm. The pulse selectively excites the ¹H water protons located in a small slice at the isocenter of the gradient coil. The diffusion delay (Δ) was 100 ms. The duration of the bipolar PFG gradient pulses (δ) used to encode/decode diffusion was 1 ms, and their gradient strength (G) was varied linearly between 3.1 and 39.2 G/cm to detect 30 points in the diffusion dimension. The interscan relaxation delay d_1 was set to 4 s, and the FID acquisition time was 1.3 s. The fitting of the intensities of the water signal along the diffusion dimension to eq 1

provides the parameter D which in this experiment corresponds to the self-diffusion coefficient of water (D_w).

Theory of WDE-DOSY Experiment. The pulse sequence of WDE-DOSY (Figure 1a) is based on the NOESY-PFG experiment proposed by Döstch et al.³⁰ to obtain exchange-enhanced diffusion. The dimensionality of the later experiment was reduced in WDE-DOSY by replacing the t_1 evolution dimension by an excitation-sculpting SPFGSE (Single-Pulse-Field-Gradient-Spin-Echo) scheme⁴⁴ that in the experiment is made selective to the signal of the water and therefore removes all the other peaks. This is followed by a period (Δ) during which the exchange of magnetization between the water and the protons of the solute take place. To determine diffusion coefficients, the later period occurs within a DOSY module based on the BPP-STE-LED scheme.⁴³ A WET module^{41,42} was introduced simultaneously with the final LED period for the strong suppression of the water peak.

The WDE-DOSY sequence of Figure 1a begins with a selective SPFGSE scheme that is applied at the frequency of the water peak to select the water magnetization and to dephase any other signal from the spectrum. As a consequence, the observation of any peak of the solute in the resulting spectrum requires the existence of some form of exchange of magnetization with the water during the period Δ . There are two possible mechanisms for this interaction that are represented in Figure 2. One is the chemical exchange reaction occurring between a labile proton of the solute and the water (e.g., an amide proton); this mechanism can be referred to as *water-EXSY*, where EXSY stands for Chemical EXchange Spectroscopy (Figure 2a). The other mechanism is the NOE interaction occurring due to the spatial proximity between any type of proton (labile or nonlabile) of the solute and the water protons, a mechanism that can be referred to as *water-NOESY* (Figure 2b).

In general, when any of these mechanisms significantly contribute to the intensities of a solute in a DOSY experiment, they result in water exchange-enhanced diffusion.^{29–31} The theory of exchange-enhanced diffusion has already been described for two analogue experiments named NOESY-PFG³⁰ and GEXSY,^{29,31} and therefore it will not be repeated here; only a brief description is given to highlight some specific aspects of WDE-DOSY. The GEXSY experiment^{29,31} considers two contributions to the peak intensity of the solute; one is the nonexchangeable part due to the original peak intensity, and the other is a water-exchangeable part due to the *water-EXSY* and/or *water-NOESY* mechanisms. For the WDE-DOSY experiment only the water-exchangeable part is relevant because the water selective SPFGSE part removes the magnetization for all the protons of the solute at the beginning of Δ . For a certain peak of the solute observed in the WDE-DOSY spectrum, a fit of its intensity along the diffusion dimension to the Stejskal-Tanner equation governing the experiment (eq 1) provides an apparent value of the diffusion coefficient for the solute (D_p^{app}). Under fast water to solute exchange conditions relative to the diffusion delay (Δ) of the experiment, D_p^{app} can be interpreted in terms of the fraction of the diffusion time which proton magnetization resides in the water before the magnetization exchange (f_w) and the fraction of the diffusion time in which the magnetization resides on the solute following a water-EXSY or water-NOE magnetization exchange (f_p)³¹ with $f_p + f_w = 1$

$$D_p^{\text{app}} = f_p \cdot D_p + f_w \cdot D_w \quad (2)$$

which finally gives

$$f_w = 1 - \frac{D_w - D_p^{\text{app}}}{D_w - D_p} \quad (3)$$

where D_w is the diffusion of the water which was measured here by a DOSY-H₂O experiment (described above), and D_p is the self-diffusion coefficient of the solute without the enhancement caused by the water-to solute exchange effects. D_p was determined here by a WDE-DOSY reference experiment (WDE-DOSY^{ref}).

The WDE-DOSY^{ref} sequence (Figure 1b) replaces the selective 180° water pulse by a nonselective hard 180°. Thus, the sequence is analogue to the conventional DOSY based on the Stimulated Echo (e.g., BPP-STE-LED-WET sequence of Figure 1c) and should provide the same results except for potential relaxation effects in fast relaxing systems. Different from WDE-DOSY, in the reference spectrum each signal of the solute is not dephased but active during the period Δ . For labile protons that are affected by the water-EXSY mechanism (Figure 2a), there are the two contributions of the nonexchangeable and the exchangeable part as in the GEXSY experiment.²⁹ The case of nonlabile protons has more interest for the present study. They are still affected by the water-NOESY mechanism (Figure 2b), but this contribution represents only a few percent of the original peak intensity (typically 0–3%) and can be safely neglected. Thus, the diffusion coefficients obtained for these protons with the sequence WDE-DOSY^{ref}, or with the conventional DOSY, can be considered in the absence of exchange with the water, which correspond to parameter D_p in eq 3.

To summarize this part, the WDE-DOSY and WDE-DOSY^{ref} spectra provide access to the fractional water residence lifetime (f_w) of water molecules in the bulk water solvent related to the time that water is attached to a specific proton of the solute.

Rheological Studies. Stock solutions of P and T (30% w/w) were prepared by dispersing each component in separate in phosphate buffer (0.066 M, pH 7.4) at 4 °C and mixing with vortex from time to time. α CD stock solution (30% w/w) was also prepared phosphate buffer (pH 7.4), under magnetic stirring at 55 °C. The above stock solutions were mixed (the α CD solution was the last in being added) in an ice bath and diluted with phosphate buffer (pH 7.4) to obtain different mass combinations as detailed in Table S1 (Supporting Information). The dispersions were stored at 4 °C. Gel formation of the different mixtures was first screened after incubation at 37 °C for 15 min by applying the inverted tube test. Viscosity was recorded at 20 and 37 °C in a flow assay, continuously increasing shear rate ramp from 0 to 30 s⁻¹, and returned in a total time of 16.5 min. The dependence of the viscosity with temperature was recorded at 10 s⁻¹ in the range of 0–80 °C.

Viscoelastic behavior was recorded for P/T 11/7 and P/T/ α -CD 11/7/7% w/w dispersions prepared as reported above. To some aliquots of P/T/ α -CD 11/7/7 dispersions, a mixture of blank PLA and PLGA (50:50% w/w) microspheres was added at a ratio of 250 mg per mL of gel in order to resemble a syringeable depot containing drug-encapsulated microspheres for bone regeneration of critical defects.⁴⁵ The PLA (Resomer R-203S, Evonik, Germany) microspheres were prepared by emulsion and a solvent evaporation method. Briefly, 0.5 mL of PLA (200 mg) solution in DCM was emulsified with 4 mL of 1% PVA aqueous solution using vortex (Genie2, position 10) for 1 min and poured into 100 mL of 0.15% PVA solution and left under magnetic stirring for 1 h. The PLGA microspheres (Resomer RG504, PLGA 50:50, Evonik, Germany) were prepared using a double emulsion (water/oil/water) procedure. Briefly, 115 mg of PLGA was dissolved in 2 mL of DCM. This organic phase was emulsified with 200 μ L of 0.2% PVA aqueous solution during 1 min using vortex (Genie2, position 10). Then it was mixed with 10 mL of 0.2% PVA solution during 15 s and poured into a 0.1% PVA solution

under constant stirring (1 h). Both types of microspheres were collected by filtration (Supor-450 filters, Pall Corporation, 47 mm) and freeze-dried.

The experiments were carried out using a Bohlin CVOD 100 rheometer equipped with a Peltier temperature control system and using a cone–plate geometry (diameter 40 mm, angle 4°) with a gap of 1 mm. The storage or elastic (G') and the loss or viscous (G'') moduli were recorded at 0.2387 Pa in the angular frequency interval of 0–100 rad/s, at 20 and 37 °C. The evolution of G' and G'' moduli with the temperature was measured at 1 rad/s and 0.2387 Pa.

Internal Structure and Porosity. Internal structure and porosity of the gel, with and without microspheres (as indicated above), were evaluated as freshly prepared and after incubation in aqueous medium. Aliquots (2 mL) of each dispersion were placed in a graduated cylindrical mold and kept at 37 °C until gelling. Afterward phosphate buffer (pH 7.4; 5 mL) was carefully poured onto the gels, which were incubated for 1, 2, 3, and 4 weeks at 37 °C. At these time points, the gels were frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. Each assay was carried out in triplicate.

Porosity of the freeze-dried gels was estimated from the true density (ρ_{true}) determined using helium pycnometry (Micromeritics, AccuPyc 1330), and the apparent density (ρ_{app}) was calculated from the total mass divided by its total geometric volume, as follows

$$\text{Porosity (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{app}}}{\rho_{\text{true}}}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

Freeze-dried gels were also cut with a sharp blade to expose the internal microstructure and sputter coated with silver for scanning electron microscopy imaging (SEM, Jeol JSM-6300).

Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Seeding and Culture. *Cell Isolation.* Mesenchymal stem cells from femur and tibia bone marrow of 6 week-old male Sprague–Dawley rats (rMSC) were obtained by centrifugal isolation as previously described⁴⁶ in conformity with the EC directive on Care and Use of Animals in Experimental Procedures (2010/63/UE). The protocol was also approved by the Ethical Committee of the University of La Laguna. Briefly, the whole bone marrow was pooled and resuspended in DMEM high glucose supplemented with 10% of fetal bovine serum (Biowest), 2 mM L-glutamine (Sigma), and 1% penicillin-streptomycin (Sigma) (culture medium, CM), seeded on cell culture plastic, and incubated (37 °C and 5% CO₂) until confluence. Nonadhered cells were removed during medium change every 3 days. Cells were cultured in 75 cm² flasks and subcultured to obtain enough cells (passage 2).

Culture of rMSC in the Gel. Freeze-dried gel was reconstituted in complete cell culture medium (CM) (as described above) or in osteoblastic differentiation media (DM) containing CM plus 10⁻⁸ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, and 50 μ g/mL ascorbic acid. The gel was kept in a liquid state when manipulated for reconstitution and cell seeding by using an ice bath. Aliquots of 1.25 \times 10⁶ rMSCs were dispersed by vortex in 5 mL of CM or DM gel at 4 °C. 200 μ L of the cell-gel mixture was transferred to 48-well plates (50,000 cells/well) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 5 min to induce gel formation and cell adhesion. Then, 500 μ L of the respective medium was added to each well, and homogeneous cell encapsulation distribution was confirmed by light microscopy. Plates were incubated, and the medium was changed every 3 days.

Cell Viability. Cell viability of rMSCs seeded in the gel was assessed by flow cytometry after cell staining with calcein-AM

(live cells) and propidium iodide (PI; dead cells). After 5 days of culturing in 48-well plates, cells encapsulated in the gel were harvested, washed 1X in Hank's balanced salt solution (HBSS), and resuspended in 500 μ L of HBSS. Calcein-AM was added to achieve a final concentration of 1 μ M, and samples were incubated in a water bath at 37 °C in the dark for 30 min. Then, cells were centrifuged 5 min at 400g and washed once with HBSS and 5 min before fluorescence probe PI in HBSS was added to achieve a final concentration of 0.75 μ M. Cell viability was assessed by determining intracellular red and green fluorescence using the Accuri C6 Flow Cytometer System (BD Biosciences). An argon laser (488 nm) beam was used for dual color fluorescence analysis, with a 625/35 nm filter to collect red (PI) fluorescence in FL3 and a 530/30 nm filter for green fluorescence in FL1. Viable cells were identified as those with green fluorescence, while red fluorescent cells corresponded to dead cells. 10,000 cells were measured for each sample.

In Vitro Osteogenic Differentiation. To study the osteogenic differentiation capacity of rMSCs in the gel, alkaline phosphatase (ALP) activity was assessed in wells of cells cultured in differentiation media (DM) after 7, 14, or 21 days. Cells cultured in the gel with complete medium (CM) were used as control. Cells were harvested and washed twice with 10 mL of PBS without Ca²⁺ or Mg²⁺, and the final cell pellet was resuspended in 100 μ L of PBS. Cells were then placed on a glass slide using cytospin. After drying, cells were fixed in 10% of neutral buffered formalin during 60 s, washed with 2 mL of washing buffer (PBS containing 0.05% Tween 20), and incubated with NBT/BCIP substrate solution at room temperature in the dark for 20 min. Cells were then washed with 2 mL of washing buffer, mounted in buffered glycerol, and immediately observed using light microscopy. The assays were carried out in duplicate.

■ ASSOCIATED CONTENT

5 Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.7b00823.

Composition of the different Pluronic-Tetronic- α CD combinations prepared and their appearance at 4 and 37 °C (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: carmen.alvarez.lorenzo@usc.es. Phone: +34881815239 (C.A.-L.).

*E-mail: adelgado@ull.es. Phone: +34 922 318507 (A.D.).

ORCID

Angel Concheiro: 0000-0003-0507-049X

Carmen Alvarez-Lorenzo: 0000-0002-8546-7085

Araceli Delgado: 0000-0001-7045-6933

Author Contributions

A.S.-M. and M.M.-P. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by MINECO (MAT2014-55657-R; SAF2017-83118-R), Agencia Estatal de Investigación (AEI) Spain, Xunta de Galicia (ED431C 2016/008) and FEDER. The authors thank Dr. Acosta from U. La Laguna for her support with the cell culture.

REFERENCES

- (1) Li, J. J., Zhao, F., and Li, J. (2011) Polyrotaxanes for applications in life science and biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 427–443.
- (2) Arunachalam, M., and Gibson, H. W. (2014) Recent developments in polypseudorotaxanes and polyrotaxanes. *Prog. Polym. Sci.* 39, 1043–1073.
- (3) Loethen, S., Kim, J. M., and Thompson, D. H. (2007) Biomedical applications of cyclodextrin based polyrotaxanes. *Polym. Rev.* 47, 383–418.
- (4) del Rosario, C., Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Simões, S., Concheiro, A., Évora, C., Alvarez-Lorenzo, C., and Delgado, A. (2015) Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels. *Int. J. Pharm.* 495, 463–473.
- (5) Alvarez-Lorenzo, C., García-González, C. A., and Concheiro, A. (2017) Cyclodextrins as versatile building blocks for regenerative medicine. *J. Controlled Release* 268, 269–281.
- (6) Rey-Rico, A., Babicz, H., Madry, H., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., and Cucchiari, M. (2017) Supramolecular polypseudorotaxane gels for controlled delivery of rAAV vectors in human mesenchymal stem cells for regenerative medicine. *Int. J. Pharm.* 531, 492–503.
- (7) Zhao, S. P., Zhang, L. M., Ma, D., Yang, C., and Yan, L. (2006) Fabrication of novel supramolecular hydrogels with high mechanical strength and adjustable thermosensitivity. *J. Phys. Chem. B* 110, 16503–16507.
- (8) Pradal, C., Grondahl, L., and Cooper-White, J. J. (2015) Hydrolytically degradable polyrotaxane hydrogels for drug and cell delivery applications. *Biomacromolecules* 16, 389–403.
- (9) Tran, N. Q., Joung, Y. K., Lih, E., Park, K. M., and Park, K. D. (2011) RGD-conjugated in situ forming hydrogels as cell-adhesive injectable scaffolds. *Macromol. Res.* 19, 300–306.
- (10) Bai, X., Lu, S. Y., Cao, Z., Gao, C. M., Duan, H. G., Xu, X. B., Sun, L., Gao, N. N., Feng, C., and Liu, M. Z. (2016) Self-reinforcing injectable hydrogel with both high water content and mechanical strength for bone repair. *Chem. Eng. J.* 288, 546–556.
- (11) Liu, S., Xie, R. J., Cai, J., Wang, L., Shi, X. T., Ren, L., and Wang, Y. J. (2015) Crosslinking of collagen using a controlled molecular weight bio-crosslinker: beta-cyclodextrin polyrotaxane multi-aldehydes. *RSC Adv.* 5, 46088–46094.
- (12) Zhao, X., Song, W. J., Li, W. C., Liu, S., Wang, L., and Ren, L. (2017) Collagen membranes crosslinked by beta-cyclodextrin polyrotaxane monoaldehyde with good biocompatibilities and repair capabilities for cornea repair. *RSC Adv.* 7, 28865–28875.
- (13) Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Baharvand, H., Kiani, S., Al-Deyab, S. S., and Ramakrishna, S. (2011) Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 5, e17–e35.
- (14) Zhao, S. P., and Xu, W. L. (2010) Thermo-sensitive hydrogels formed from the photocrosslinkable polypseudorotaxanes consisting of beta-cyclodextrin and Pluronic F68/PCL macromere. *J. Polym. Res.* 17, 503–510.
- (15) Simões, S. M. N., Veiga, F., Torres-Labandeira, J. J., Ribeiro, A. C. F., Sandez-Macho, M. I., Concheiro, A., and Alvarez-Lorenzo, C. (2012) Syringeable pluronic- α -cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 103–112.
- (16) Simões, S. M. N., Veiga, F., Torres-Labandeira, J. J., Ribeiro, A. C. F., Concheiro, A., and Alvarez-Lorenzo, C. (2013) Poloxamine-cyclodextrin-simvastatin supramolecular systems promote osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromol. Biosci.* 13, 723–734.
- (17) Valero, M., Castiglione, F., Mele, A., da Silva, M. A., Grillo, I., Gonzalez-Gaitano, G., and Dreiss, C. A. (2016) Competitive and synergistic interactions between polymer micelles, drugs, and cyclodextrins: the importance of drug solubilization locus. *Langmuir* 32, 13174–13186.
- (18) Shvartzman-Cohen, R., Florent, M., Goldfarb, D., Szeleifer, I., and Yerushalmi-Rozen, R. (2008) Aggregation and self-assembly of amphiphilic block copolymers in aqueous dispersions of carbon nanotubes. *Langmuir* 24, 4625–4632.
- (19) Campanella, C., Lopez-Fontal, E., Milanesi, L., and Tomas, S. (2017) Modulation of the cooperativity in the assembly of multi-stranded supramolecular polymers. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19, 9617–9624.
- (20) Rey-Rico, A., Silva, M., Couceiro, J., Concheiro, A., and Alvarez-Lorenzo, C. (2011) Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenic protein-2. *Eur. Cells Mater.* 21, 317–340.
- (21) Pelta, M. D., Morris, G. A., Stchedroff, M. J., and Hammond, S. J. (2002) A one-shot sequence for high-resolution diffusion-ordered spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 40, S147–S152.
- (22) Park, K. D., and Lee, Y. J. (2006) Slice-selected LED and BPLED: application of slice selection to DOSY. *Magn. Reson. Chem.* 44, 887–891.
- (23) Dalvit, C., Fogliatti, G., Stewart, A., Veronesi, M., and Stockman, B. (2001) Water LOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *J. Biomol. NMR* 21, 349–359.
- (24) Ludwig, C., Michiels, P. J., Wu, X., Kavanagh, K. L., Pilka, E., Jansson, A., Oppermann, U., and Günther, U. L. (2008) SALMON: solvent accessibility, ligand binding, and mapping of ligand orientation by NMR spectroscopy. *J. Med. Chem.* 51, 1–3.
- (25) Sui, K., Shan, X., Gao, S., Xia, Y., Zheng, Q., and Xie, D. (2010) Dual-responsive supramolecular inclusion complexes of block copolymer poly(ethylene glycol)-block-poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] with α -cyclodextrin. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 48, 2143–2153.
- (26) Gonzalez-Gaitano, G., da Silva, M. A., Radulescu, A., and Dreiss, C. A. (2015) Selective tuning of the self-assembly and gelation of a hydrophilic poloxamine by cyclodextrins. *Langmuir* 31, 5645–5655.
- (27) Ryzhakov, A., Thi, T. D., Stappaerts, J., Bertolotti, L., Kimpe, K., Rodrigues Sa Couto, A., Saokham, P., van den Mooter, G., Augustijns, P., Somsen, G. W., et al. (2016) Self-assembly of cyclodextrins and their complexes in aqueous solutions. *J. Pharm. Sci.* 105, 2556–2569.
- (28) Gonzalez-Lopez, J., Alvarez-Lorenzo, C., Taboada, P., Sosnik, A., Sandez-Macho, I., and Concheiro, A. (2008) Self-associative behavior and drug-solubilizing ability of poloxamine (Tetronic) block copolymers. *Langmuir* 24, 10688–10697.
- (29) Moonen, C. T. W., van Gelderen, P., Vuister, G. W., and van Zijl, P. C. M. (1992) Gradient-enhanced exchange Spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 97, 419–425.
- (30) Dötsch, V., and Wider, G. (1995) Exchange rates of internal water molecules in proteins measured using pulsed field gradients. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 6064–6070.
- (31) Liu, M., Harold, T. C., Hawkes, G. E., Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (1999) Determination of the relative NH proton lifetimes of the peptide analogue viomycin in aqueous solution by NMR-based diffusion measurement. *J. Biomol. NMR* 13, 25–30.
- (32) Seba, H. B., Thureau, P., Ancian, B., and Thévand, A. (2006) Combined use of Overhauser spectroscopy and NMR diffusion experiments for mapping the hydration structure of nucleosides: structure and dynamics of uridine in water. *Magn. Reson. Chem.* 44, 1109–1117.
- (33) Brand, T., Cabrita, E. J., Morris, G. A., Günther, R., Hofmann, H. J., and Berger, S. (2007) Residue-specific NH exchange rates studied by NMR diffusion experiments. *J. Magn. Reson.* 187, 97–104.
- (34) Neuhaus, D., and Williamson, M. P. (2000) *The nuclear overhauser effect in structural and conformational analysis*, 2nd ed., Wiley-VCH, New York.
- (35) Simões, S. M., Veiga, F., Torres-Labandeira, J. J., Ribeiro, A. C. F., Concheiro, A., and Alvarez-Lorenzo, C. (2014) Syringeable self-assembled cyclodextrin gels for drug delivery. *Curr. Top. Med. Chem.* 14, 494–509.
- (36) Dunn, S. E., Coombes, A. G. A., Garnett, M. C., Davis, S. S., Davies, M. C., and Illm, L. (1997) In vitro cell interaction and in vivo biodistribution of poly(lactide-co-glycolide) nanospheres surface modified by poloxamer and poloxamine copolymers. *J. Controlled Release* 44, 65–76.

- (37) Shubhra, Q. T. H., Toth, J., Gyenis, J., and Feczko, T. (2014) Poloxamers for surface modification of hydrophobic drug carriers and their effects on drug delivery. *Polym. Rev.* *54*, 112–138.
- (38) Polymeri, A., Giannobile, W. V., and Kaigler, D. (2016) Bone marrow stromal stem cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Horm. Metab. Res.* *48*, 700–713.
- (39) Squillaro, T., Peluso, G., and Galderisi, U. (2016) Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplantation* *25*, 829–848.
- (40) Zheng, G., Torres, A. M., and Price, W. S. (2017) Water control: self-diffusion based solvent signal suppression enhanced by selective inversion. *Magn. Reson. Chem.* *55*, 447–451.
- (41) Smallcombe, S. H., Patt, S. L., and Keifer, P. A. (1995) WET solvent suppression and its application to LC NMR and high-resolution NMR spectroscopy. *J. Magn. Reson., Ser. A* *117*, 295–303.
- (42) Mo, H., and Raftery, D. (2008) Improved residual water suppression: WET180. *J. Biomol. NMR* *41*, 105–111.
- (43) Johnson, C. S., Jr (1999) Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* *34*, 203–256.
- (44) Hwang, T. L., and Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *J. Magn. Reson., Ser. A* *112*, 275–279.
- (45) Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Delgado, A., and Évora, C. (2014) Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J. Biomed. Nanotechnol.* *10*, 959–969.
- (46) Dobson, K. R., Reading, L., Haberey, M., Marine, X., and Scutt, A. (1999) Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femuræ. *Calcif. Tissue Int.* *65*, 411–413.



In situ gel-forming system for dual BMP-2 and 17 β -estradiol controlled release for bone regeneration in osteoporotic rats

Elisabet Segredo-Morales¹ · Ricardo Reyes^{2,4} · María Rosa Arnau³ · Araceli Delgado^{1,4} · Carmen Évora^{1,4}

Published online: 13 August 2018
© Controlled Release Society 2018

Abstract

The aim of this study was to evaluate the bone regeneration capacity of a Pluronic® F127 (P)-Tetronic®1307 (T) and α -cyclodextrin (CD) supramolecular gel (P-T-CD) in a 11/7/7 ratio containing BMP-2 and 17 β -estradiol pre-encapsulated in poly-lactide-co-glycolide (PLGA) and poly-lactic acid (PLA-S) microspheres, respectively. Ovariectomy combined with dexamethasone treatment was used to induce an osteoporotic (OP) animal model of calvaria critical size defect in female rats to test the system. The two active substances showed a biphasic in vitro release profile characterized by an initial fast phase followed by a slow and prolonged release. The bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in vivo release was faster than in vitro. The in vivo experimental design included four groups of sham rats and other four groups of OP rats treated with the blank system, BMP-2, and one or two doses of BMP-2 combined with 17 β -estradiol. After 12 weeks, histological and histomorphometric analyses showed that the combined treatment with BMP-2 and 17 β -estradiol did not improve the repair response in sham, whereas in OP animals, a significant increase in the repair rate was observed with respect to the group treated with BMP-2 alone. However, the low values of osteocalcin, showed an immature and poorly mineralized new bone in OP animals. The second dose of the system with BMP-2 and 17 β -estradiol did not improve the repair response in any case.

Keywords BMP-2 · 17 β -estradiol · Supramolecular gel · Controlled release · Osteoporosis · Bone repair

Introduction

Osteoporosis is predominantly a disease of aging, affecting post-menopausal women and older men, or a secondary one caused by long glucocorticoid treatment. As the life expectancy of the population increases, higher incidence of osteoporosis, higher risk of fractures, and an increase of the cost of health systems in the coming decades are expected.

Analysis of a large number of OP fractures from both animal studies and clinical reports supports that osteoporosis is associated with delayed fracture healing [1–4]. In general, the fracture patterns in the OP bones are complex, making it difficult for osteosynthetic fixation [5]. The scenario can be even more complicated when a great loss of bone mass occurs, generating a critical bone defect because of reduced self-repair capacity in OP bones [2].

The mesenchymal stem cells (MSCs) of OP patients may present some alterations such as reduced proliferation capacity and osteogenic differentiation as well as a certain tendency to adipogenic differentiation [6–8]. Moreover, a decrease in the expression of bone morphogenetic proteins (BMPs) [9] and a reduced response to stimulation with BMP-2 and BMP-7 [10, 11] have been detected. In contrast, other authors have shown that both MSCs from healthy and osteoporotic patients responded similarly to BMP-2. On the other hand, the role of estrogens in bone remodeling and the consequences of its lack in post-menopausal osteoporosis are well documented. The 17 β -estradiol induces osteoclast apoptosis but reduces osteoblast apoptosis [12, 13]. Moreover 17 β -estradiol regulates the differentiation of the osteoblast through the alkaline

✉ Carmen Évora
cevora@ull.es

¹ Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

² Department of Biochemistry, Microbiology, Cell Biology and Genetics, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

³ Servicio de Estabulario, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

⁴ Institute of Biomedical Technologies (ITB), Center for Biomedical Research of the Canary Islands (CIBICAN), Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

phosphatase and BMP-2 [14]. Likewise, glucocorticoid treatments are associated with OP by suppression of osteoblast-mediated osteogenesis [15], because a reduction of the BMP and Wnt pathways takes place [16]. However, glucocorticoids also increase receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and decrease osteoprotegerin which consequently increases the osteoclastic activity. Glucocorticoids also induce marrow adipogenesis [17].

Given the delayed healing in osteoporosis, the supply of exogenous BMPs might enhance OP fracture healing and regeneration of bone defects. The regenerative effect of BMP-2 or BMP-7 formulated in different delivery systems has been deeply studied in healthy conditions [18]. Surprisingly, poor attention has been paid to the design and development of BMP control release systems for bone regeneration in the special OP conditions [18].

Focusing on the publications of the two approved proteins for human use, BMP-2 and BMP-7 in OP, the results generally indicated that BMP-2 improved osteointegration of titanium implants [19–21]. The BMP-2 and BMP-7 included in delivery systems fabricated with different biomaterials and applied to different defects in a wide range of doses enhanced vertebral defects [22–24] in ovariectomized (OVX) animals. However, the studies including a non-OP control group showed that BMP-7 [25] and BMP-2 [26, 27] enhanced the regeneration of bone defects in different rat models but a better response was observed in the non-OP group. By contrast, BMP-7 and BMP-7 combined with zoledronate in a collagen putty was more efficient in OP rats than in non-OP ones [28].

In view of the few and varied studies on models of bone defects, sampling times, osteoporosis models, types of scaffolds, protein doses, or protein release profile, our objective was to regenerate a critical defect in osteoporotic rats. We hypothesize that to regenerate bone in OP rats, the process of bone formation should be stimulated and resorption by osteoclasts should be avoided or reduced to balance both processes.

Therefore, in this study, we propose the local and sustained release of the combination of BMP-2 and 17 β -estradiol included in an injectable in situ gelling hydrogel as scaffold to regenerate an 8 mm defect in calvaria of both osteoporotic and healthy rats. To this end, BMP-2 was encapsulated in PLGA microspheres whereas 17 β -estradiol was in PLA-S microspheres. The system, formed by both types of microspheres dispersed in a Pluronic® F127, Tetriconic® 1307, and α -cyclodextrin hydrogel (P-T-CD), had been previously optimized and in vitro characterized to make it syringeable in order to be locally administrated [29]. BMP-2 and 17 β -estradiol release kinetics were determined. The synergistic effect of 17 β -estradiol on the osteogenic BMP-2 effect was evaluated and the effect of a second dose of both agents was also evaluated in OP vs non-OP rats.

Materials and methods

Hydrogel fabrication, microsphere preparation, and surgical procedures were carried out under aseptic conditions. Except for the active substances, all liquid components, polymers, and lab instruments were sterilized. BMP-2 with ED₅₀ of 0.85 μ g/mL, measured by its ability to induce alkaline phosphatase production by C2C12 cells, was purchased from GenScript (Piscataway, USA). Pluronic® F127 (P, Poloxamer 407) and 17 β -estradiol were from Sigma-Aldrich (St Luis, MO, USA). Tetriconic® 1307 (T) was from BASF (NJ, USA) and α -cyclodextrin (CD) was kindly provided by Wacker (Burghausen, Germany).

System preparation and characterization

The P-T-CD in the 11/7/7 ratio was prepared as described [29]. Briefly, 11% (w/w) P and 7% (w/w) T phosphate buffer solutions (pH 7.4) and CD (7% w/w) in phosphate buffer were mixed by vortexing in an ice bath to maintain a liquid state and stored at 4 °C.

The system consisted of a mix of 200 μ g of 17 β -estradiol in microspheres (11 mg) and 4 μ g of BMP-2 in microspheres (5 mg) suspended in 100 μ L of the P-T-CD (11/7/7) hydrogel. The mixture of the different components was made in an ice bath, to maintain the rheological properties of the system that gels from approximately 30 °C.

To check the syringeability of the hydrogel system, a dose uniformity assay was carried out. Briefly, two syringes of 1 mL were loaded with a suspension of 17 β -estradiol microsphere in the P-T-CD hydrogel. Then, five doses of 100 μ L of each syringe were unloaded through a 20-G needle, washed twice with phosphate buffer, centrifuged at 10,000 rpm, and freeze-dried. The amount of 17 β -estradiol in each dose was determined by a spectrophotometric method.

Microspheres preparation and characterization

The microspheres of BMP-2 were prepared by a double emulsion (w/o/w) method [30]. Briefly, 200 μ L of a BMP-2 (0.66 μ g/ μ L) 0.2% poly-vinyl alcohol (PVA) solution was stirred in vortex for 1 min (Genie@2, position 10) with 2 mL of a 50-mg/mL PLGA (Resomer® RG504, Evonik, Germany) methylene chloride solution (DCM). Afterwards, 10 mL of the external phase of PVA 0.2% (w/v) was added and stirred in vortex for 15 s (Genie@2, position 10) to be poured into 100 mL of a 0.1% PVA solution and left under magnetic stirring for 1 h. For later characterization, some batches of microspheres were prepared using ¹²⁵I-BMP-2 as described [30].

The microspheres of 17 β -estradiol were prepared with PLA-S (Resomer® R-203S, Evonik, Germany) by the solvent evaporation method. Briefly, 0.5 mL of 17 β -estradiol (4 mg)

and PLA-S (200 mg) solution in methanol (MeOH)/DCM (20:80) was emulsified with 4 mL of 1% PVA aqueous solution using vortex (Genie®2, position 10) for 1 min and poured into 100 mL of 0.15% PVA solution and left under magnetic stirring for 1 h [29].

Both types of microspheres were collected by filtration (Supor®-450 filters, Pall Corporation, 0.47 microns) and lyophilized.

Microspheres were characterized in terms of morphology, size, and encapsulation efficiency. Shape was observed by scanning electron microscope (SEM, Jeol JSM-6300) and the size was determined by laser diffractometry (Mastersizer 2000, Malvern Instruments).

Encapsulation efficiency was determined in three aliquots of each microspheres batch. Encapsulation efficiency of BMP-2 microspheres was determined in ^{125}I -BMP-2 batches, while the 17β -estradiol was determined spectrophotometrically at $\lambda = 280$ nm previously dissolved in a mix of MeOH/DCM (20:80).

Release assays

In vitro release assays were carried out in triplicate (37 °C), using polypropylene tubes and 5 mL of the release medium to maintain the sink conditions. To study the influence of the hydrogel in the drug release kinetics, two assays were carried out. In the first one, microspheres were dispersed in the medium and in the second one, the microspheres were included in the hydrogel. At pre-determined time intervals, samples of the supernatant medium were withdrawn for measurement and replaced by fresh medium. Supernatant samples from microsphere assays were previously centrifuged.

Briefly, 20 mg of microspheres containing 360 μg of 17β -estradiol were incubated in a mixture of phosphate buffer (PB, pH 7.4) and MeOH (50:50) or 5 mg of microspheres containing 4 μg of BMP-2/ ^{125}I -BMP in PB. The amount of 17β -estradiol released was determined by spectrophotometric method at 280 nm and the ^{125}I -BMP-2 released using a gamma counter (Cobra® II, Packard).

The remaining amount of ^{125}I -BMP-2 at the bone defect after implantation of the system was periodically monitored using an external gamma counter (Captus®; Nuclear Iberica), as described [30–32]. Briefly, the detector was placed onto the defect site of the anesthetized rats and the remaining radioactivity was measured at ^{125}I emission peak. These experiments were carried out on five rats. Reading at time point 0 was considered the given dose (100%).

Animal model

The protocol was approved by the Ethical Committee of the University of La Laguna. The animal experiments were

carried out in conformity with the EC directive on Care and Use of Animals in Experimental Procedures (2010/63/UE).

Forty female Sprague-Dawley rats weighing 200–250 g were used in the study. The experimental osteoporosis was induced in a group of 20 rats following anesthesia by inhalation with isoflurane by bilateral ovariectomy (OVX), via a dorsal approach. In addition, 2 weeks post-OVX, the OP group received a dose of 0.3 mg/kg body weight of dexamethasone-21-isonicotinate (DEX) (Deyanil retard, Fatro Ibérica, Spain) administered subcutaneously once every 2 weeks [33] for up to 4 months. The remaining 20 rats were used as sham healthy or non-OP controls. Like the OP rats, the sham group underwent the same surgical process except the ovariectomy to avoid differences due to the surgery. Four months post-OVX, critically sized circular (8 mm) cranial defect was created surgically with a trephine burr in the 40 rats under isoflurane anesthesia as previously described [30]. The system was injected into these defects, and the skin was closed and stapled. Then, the animals were allowed free movement and food and water uptake. Analgesia consisted in buprenorphine administered subcutaneously (0.05 mg/kg) before surgery and paracetamol (70 mg/100 mL) in water, for 3 days post-surgery. The animals were sacrificed 12 weeks post-surgery and defect enclosing segments were extracted from the calvariae to analyze the new bone.

Histology and histomorphometrical evaluation

To determine the bone regenerative effect of the released BMP-2 and the combination of BMP-2 with 17β -estradiol, samples of the eight groups of five rats each were examined 12 weeks post-implantation. Four groups of OP rats and other four groups of non-OP rats were treated with blank P-T-CD (blank group), with 4 μg of BMP-2 in microspheres dispersed in the P-T-CD hydrogel (BMP group); the BMP- βE group received 4 μg of BMP-2 in microspheres combined with 200 μg of 17β -estradiol pre-encapsulated in microspheres dispersed in the P-T-CD hydrogel; and the BMP- $\beta\text{Ex}2$ group consists of rats that were treated with a second dose of T-P-CD with microspheres of BMP-2 and 17β -estradiol 6 weeks after the first dose.

Samples were fixed (4% paraformaldehyde solution) and decalcified in Histofix® Decalcifier (Panreac, Barcelona, Spain) and prepared for histological analysis as previously described [30]. New bone formation was identified by hematoxylin-erythrosin staining. The degree of new bone mineralization was assessed with VOF trichrome stain, in which red and brown staining indicates advanced mineralization, whereas less mineralized, newly formed bone stains blue [34]. Sections were analyzed by light microscopy (LEICA DM 4000B). A computer-based image analysis software (Leica Q-win V3 Pro-image Analysis System, Barcelona, Spain) was used to histomorphometrically evaluate all

sections per specimen. A region of interest (ROI) for quantitative evaluation of new bone formation was defined as the area of the tissue within the defect. The ROI consisted of a circular region of 50 mm², the center of which coincided with that of the defect site. New bone formation was expressed as a percentage of repair, applying Eq. 1

$$\% \text{repair} = \frac{\text{new bone area}}{\text{original defect area within the ROI}} \times 100 \quad (1)$$

The osteoporosis-like condition was confirmed by histological and histomorphometrical analysis, determining the cortical bone thickness as well as the thickness of the intercortical zone occupied by trabecular bone in cross sections of calvaria.

From the total repaired bone, the areas of mature bone (MB) and immature bone (IB) were determined and the relationship between them was calculated, being expressed as ratio MB/IB for each experimental group, as well as between sham and osteoporotic-like animals.

For immunohistochemical analysis, sections were deparaffinized and rehydrated in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4, 0.01 M Trizma base, 0.04 M Tris hydrochloride, 0.15 M NaCl), which was used for all further incubations and rinse steps. Sections were incubated in citrate buffer (pH 6) at 90 °C for antigen retrieval, followed by incubation in 0.3% hydrogen peroxide in TBS buffer for 20 min. After a rinse step, sections were blocked with 2% FBS in TBS–0.2% Triton X-100 (blocking buffer). The indirect immunohistochemical procedure was carried out by incubating the sections with collagen type I and osteocalcin antiserum (1/100) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer overnight at 4 °C. Sections were rinsed three times, then incubated with biotin-SP-conjugated donkey anti-rabbit F(ab0) fragment (1/200) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer for 1 h followed, after another rinse step, by incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (1/300) (Millipore, Barcelona, Spain) for 1 h. Peroxidase activity was revealed in Tris–HCl buffer (0.05 M, pH 7.6) containing 0.04% of 4-chloro-1-naphtol

(Sigma, Poole, UK) and 0.01% hydrogen peroxide. Reaction specificity was confirmed by replacing the specific antiserum with normal serum or following pre-absorption of the antiserum with the corresponding antigen.

Collagen type I and osteocalcin staining was evaluated using a computer-based image analysis software (ImageJ, NIH, Bethesda, MD). Collagen type I and osteocalcin staining was measured by applying a fixed threshold to select for positive staining within the ROI. Positive pixel areas were divided by the total surface size (mm²) of the ROI. Values were normalized to those measured from blank scaffolds and are reported as relative staining intensities.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with the SPSS.21 software. We compared the distinct treatments by means of a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey multiple comparison post-test. Significance was set at $p < 0.05$. Results are expressed as means \pm SD.

Results

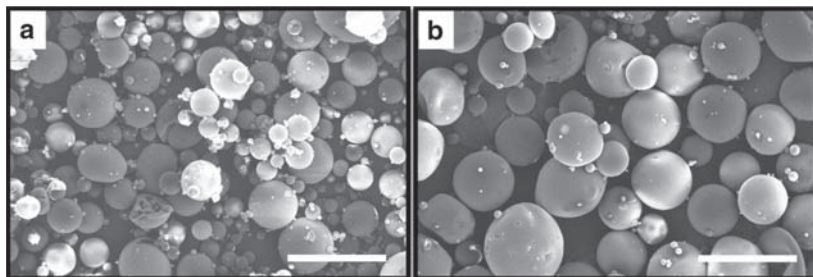
System characteristics

The elaborated microspheres showed a spherical shape, smooth surface, and no pores or very little pores in the case of BMP-2-loaded PLGA microspheres (Fig. 1). The mean volume diameter of the 17 β -estradiol microspheres was 78.87 μ m, (10% < 27.9 μ m and 90% < 124.4 μ m) and the mean volume diameter of the BMP-2 microspheres was 108.1 μ m, (10% < 70.2 μ m and 90% < 149.4 μ m). The encapsulation efficiency was 90.6 \pm 4% and 60 \pm 7% for 17 β -estradiol and BMP-2, respectively.

The uniformity of the dose and the injectability tested using the 1-mL syringe (20 G) was 90.2% \pm 5% of the calculated dose.

The viscoelastic behavior was slightly modified by the addition of the microspheres, and the range of gel-forming

Fig. 1 SEM images of the microspheres lots: **a** 17 β -estradiol-loaded PLA-S and **b** BMP-2-loaded PLGA. Scale bar = 200 μ m



temperature was moved from 35 to 45 °C to lower temperatures of 25–40 °C [29]. In addition, the hydrogel modulated the *in vitro* release of the 17 β -estradiol and of the BMP-2 (Fig. 2). A similar biphasic *in vitro* release profile of both drugs was observed, approximately 50% of the amount of 17 β -estradiol or the BMP-2 was released in 1 week and 60–65% of the drugs in 4 weeks. The effect of the hydrogel was more noticeable on the burst effect and after 4 weeks incubation. By contrast, the results of the *in vivo* BMP-2 release assay showed that more than 90% of the protein was delivered in 1 week. The total amount of BMP-2 was cleared up from the defect in 2 weeks (Fig. 2). However, an *in vivo-in vitro* correlation between both BMP-2 release profiles was found (Fig. 2).

Histological, histomorphometrical, and immunohistochemical analysis

The histological analysis of the calvaria samples in the non-OP and OP animals showed significant differences in the cortical and intercortical bone thickness of the calvaria (Fig. 3a). The cortical bone and the intercortical zone were 38% and 49% thicker, respectively, in the non-OP than in the OP rats (Fig. 3b, c). The intercortical zone of the OP calvaria bones

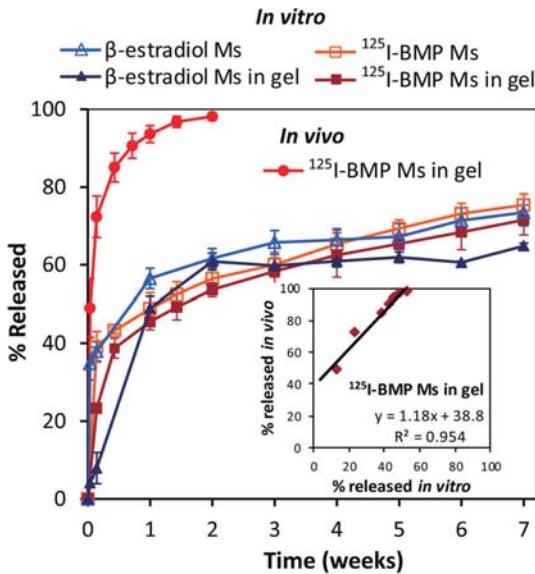


Fig. 2 Release kinetics. Percentages of ¹²⁵I-BMP-2 released at the rat calvarial bone defect after implantation of the P-T-CD system with ¹²⁵I-BMP-2 pre-encapsulated in microspheres (ms) (n = 5). Cumulative ¹²⁵I-BMP-2 and 17 β -estradiol release profiles obtained from formulations incubated in phosphate buffer pH 7.4 (PB) and PB/MeOH (1:1) respectively, at 37 °C (n = 3). The *in vivo-in vitro* ¹²⁵I-BMP-2 release profiles correlation obtained from microspheres dispersed in the hydrogel is also shown

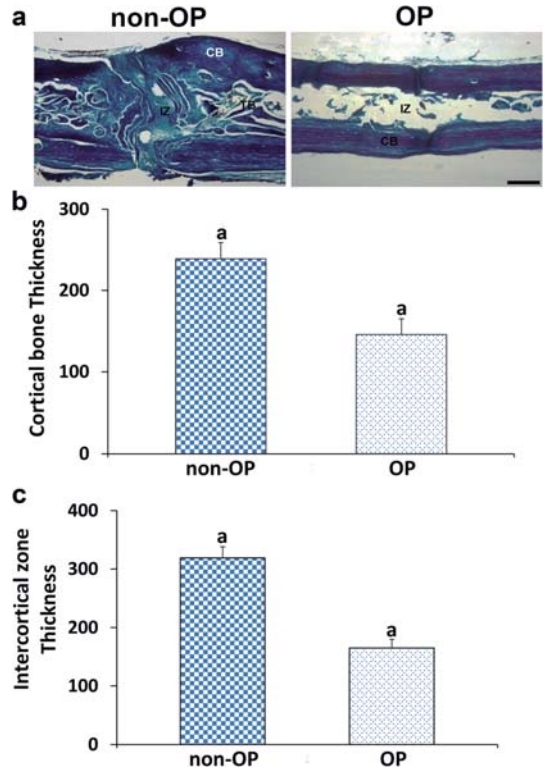


Fig. 3 Representative images in transversal section of calvarial bone in non-OP and OP rats showing the differences in bone microarchitecture (a). Histomorphometrical analysis comparing the thickness of cortical bone (b) and the thickness of intercortical zone (c) between non-OP and OP rats. Observe the absence of trabecular bone in OP rats (VOF staining). Bars represent means \pm SD (n = 3), p < 0.05. The identical letter on different bars indicates significant differences. CB, compact bone; IZ, intercortical zone; TB, trabecular bone. Scale bar = 150 μ m

showed a non-compact and porous appearance without trabeculae (Fig. 3a).

Analysis of the samples 3 months after implantation of the systems with the different treatments revealed no repair in blank groups non-OP and OP, with little new bone formation at the margins of the defect (Fig. 3). Connective tissue occupied most of the defect area in both blank groups (Fig. 3).

The BMP groups showed a big repair rate with respect to the blank groups (Fig. 4). The BMP group of non-OP animals presented a higher repair rate than the BMP group of OP animals, with percentages of repair of 50.4 and 46.3 respectively (Fig. 4).

The combined treatment with BMP-2 and 17 β -estradiol did not improve the repair response in the case of non-OP animals, whereas in OP animals, a significant increase in the repair rate was observed with respect to the

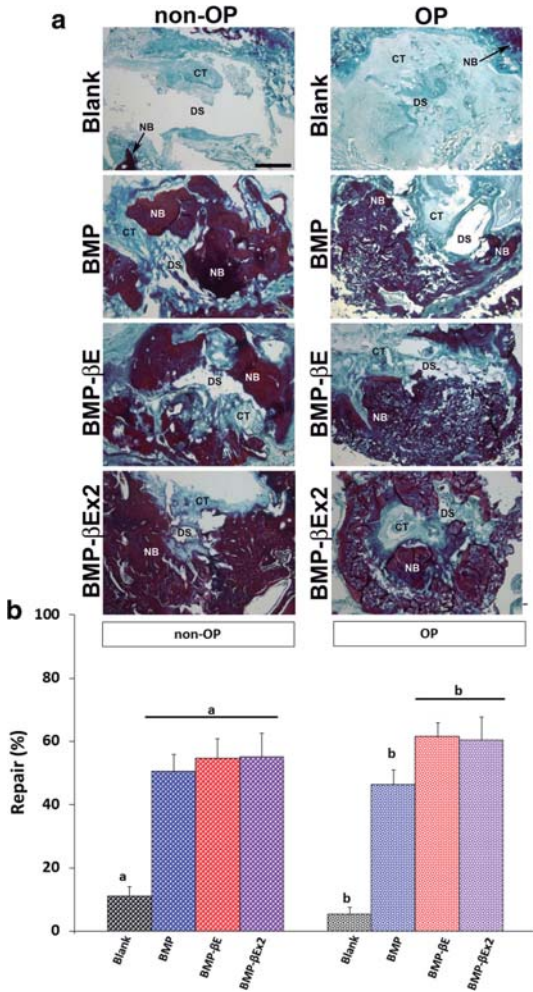


Fig. 4 Bone repair. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing the repair response at the defect level in the different experimental groups 12 weeks post-implantation (a). Histomorphometrical analysis comparing of the degrees of repair (%) among the different experimental groups in non-OP and OP rats 12 weeks post-implantation (b). Bars represent means \pm SD ($n = 3$), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. CT, connective tissue; NB, newly formed bone; DS, defect site. Scale bar = 1.5 mm

BMP group, with a repair percentage of 61.5 (Fig. 4). The BMP-βEx2 groups did not show improvement in the repair response in any case, neither in non-OP nor in OP animals (Fig. 4).

The analysis of the newly formed bone presented significant differences between OP and non-OP animals with respect to mature bone area (more mineralized bone) and immature bone area (less mineralized bone). The

estimated ratio between mature bone and immature bone (MB/IB) showed significant differences in each treatment between non-OP and OP animals, as well as between non-OP and OP animals globally (Fig. 5).

The detection of collagen type I immunoreactivity, a marker of early osteogenesis, in the newly formed bone, showed differences in relative staining intensities between blank groups and treated groups in both non-OP and OP animals. Significant differences were also observed in OP animals, between the BMP group and the BMP-βE groups (Fig. 6). However, no differences between non-OP and OP animals were observed (Fig. 6).

The detection of osteocalcin immunoreactivity, a marker of late osteogenesis and mineralization, showed differences in relative staining intensity between blank and treated groups in both non-OP and OP animals. In this case, no differences between treated groups in non-OP and OP animals were detected (Fig. 7). However, significant differences in relative staining intensity per group, between non-OP and OP animals, were observed (Fig. 7).

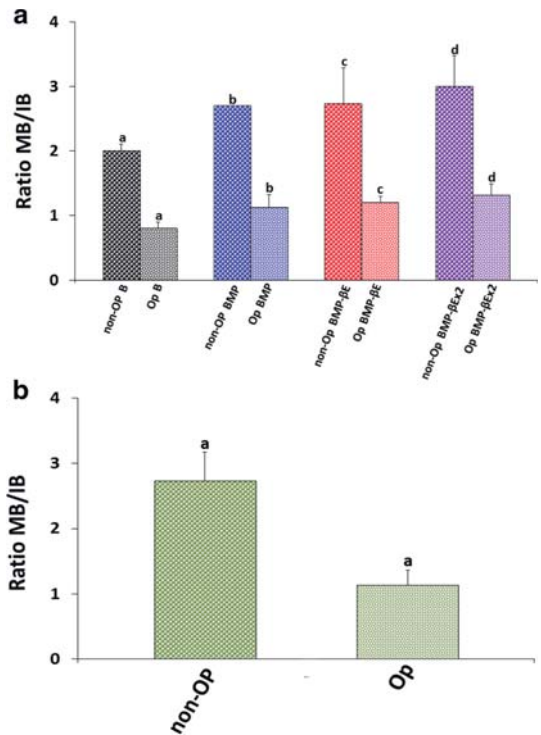


Fig. 5 Histomorphometric analysis showing the ratio between mature bone and immature bone (MB/IB) among the different experimental groups (a) and between non-OP and OP rats (b), estimated using VOF staining. ($n = 3$), $p < 0.001$

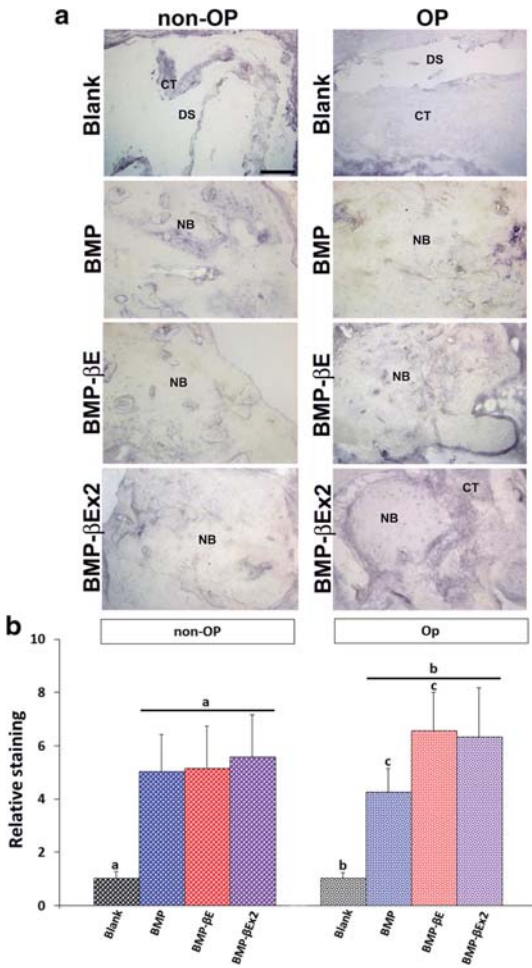


Fig. 6 Collagen type I. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing collagen type I immunoreactivity (ir) at the defect level in the different experimental groups 12 weeks post-implantation (a). Histomorphometric analysis showing the relative staining values for collagen type I-ir (b). Bars represent means \pm SD ($n = 3$), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. CT, connective tissue; NB, newly formed bone; DS, defect site. Scale bar = 300 μ m

Discussion

As osteoporosis is a widely extended disease in the world population, it has been the objective of an important number of scientific articles. However, very few publications are dedicated to the effect of osteoporosis on the regeneration of critical bone defects. Having in mind that reduced osteogenesis and increased bone resorption take place in osteoporosis, bone repair should be carried out focusing on both processes at the same time. According to the reference sources, the present study is the first one proposing a therapeutic strategy for the

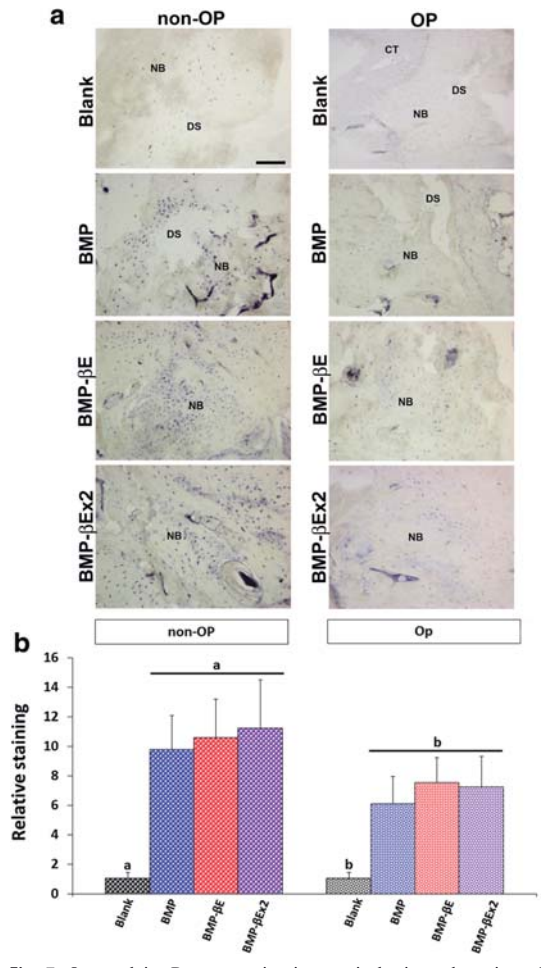


Fig. 7 Osteocalcin. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing osteocalcin immunoreactivity (ir) at the defect level in the different experimental groups 12 weeks post-implantation (a). Histomorphometric analysis showing the relative staining values for osteocalcin-ir (b). Bars represent means \pm SD ($n = 3$), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. CT, connective tissue; NB, newly formed bone; DS, defect site. Scale bar = 300 μ m

regeneration of a critical bone defect including stimulation of bone formation and reduction of osteoclastogenesis by local sustained release of both BMP-2 and 17 β -estradiol.

Although the microspheres governed the release of the active substances, hydrogel contributed to modulate the in vitro release of both drugs. This effect was more pronounced on the release profile of 17 β -estradiol, as the burst effect and the drug release rate during the second phase were reduced. By contrast, the BMP-2 release profiles were practically superimposed and only a slight reduction of burst release was observed with the hydrogel. Previous characterization of the P-T-CD (11/7/7)

[29] showed a supramolecular hydrogel with a network structure where the polypseudorotaxanes assembled through crystalline arrangements of α CDs and the PPO blocks through hydrophobic temperature-driven interactions. At 37 °C, the hydrogel exhibited the maximum viscosity which was shifted toward lower temperatures (~29°C) by the incorporation of the microspheres. The high viscosity and the hydrophobic interaction of non-polar drugs with certain components of gel structure [29, 35] led to a lower drug diffusion coefficient in the hydrogel compared to that in water. In addition, the maximum viscosity obtained at temperature near 29 °C facilitated the adaptation of the system to the shape of the defect and reduced the time of surgery.

The BMP-2 was released faster *in vivo* than *in vitro*. Despite a slope of 1.18, obtained from the *in vivo*-*in vitro* correlation, the interception was far from zero. The difference in the BMP-2 release rate was probably due to physiological factors such as blood flow rate, inflammatory reactions, and cellular activity, which enhance the drug diffusion gradient by convection and accelerate the system degradation rate. Unfortunately, a gamma emitter of the 17β -estradiol was not available for recording the *in vivo* release profile of this drug. However, due to the mentioned physiological conditions, we expect the 17β -estradiol release rate will also be increased *in vivo*.

First of all, regarding the calvaria animal model for bone regenerative, most of the authors that used the same model established the condition of osteoporosis by histomorphometric or densitometric analyses of long bones such as tibia or femur. However, in this study, the osteoporosis characteristics were determined by direct histological analysis of the calvaria. The calvaria histological findings at the time of implantation of the systems showed significant differences in bone characteristics of non-OP and OP animals (those previously OVX and undergoing treatment with DEX for 4 months). A thinner, more porous and unstructured bone was observed in OP animals in comparison with non-OP. Practically, total absence of trabeculae and spongy bone were also observed in OP animals. In this way, we confirmed that the OP treatment used in this study affected the bone area to be regenerated. These results coincide with those reported by other authors in long bones [36–38]. After 12 weeks of implantation, the osteoporotic-like conditions continued being evident in animals previously subjected to a combined treatment with OVX and DEX. All these data validated our OP model.

The regenerative effect of BMP-2 in bone critical size defects has been revealed during the last two decades of research. However, the paucity of works and the complex nature of the regeneration of critical bone defects in osteoporotic conditions [18] may face specific challenges, which should be addressed and implemented when developing strategies for osteoporotic bone regeneration. Consequently, we compared the effect of BMP-2 microspheres against BMP-2

microspheres combined with 17β -estradiol microspheres in both healthy and OP rats.

Although the reparative effect of the blank scaffolds was not enough to be considered useful, the results indicated that the regeneration of the bone defect was lower in the OP group than in the non-OP rats. With regard to the effect of BMP-2, although the differences were not statistically significant in terms of repaired area, there was a tendency toward a lower response in the OP group. Both observations support a delay in bone formation in OP animals. The addition of 17β -estradiol, as expected, only increased the reparative response in the OP groups. The results regarding the presence of type I collagen confirmed the repair data. Type I collagen, a marker of early osteogenesis, showed higher relative staining values in OP animals treated with BMP-2 + 17β -estradiol, indicating an increase in osteosynthesis. Estrogen deficit causes OP because estrogens affect bone remodeling by modulation of both osteoclasts and osteoblasts. In fact, the *hormone replacement therapy* (HRT) is indicated as a relief of menopause symptoms and to treat post-menopausal osteoporosis. Moreover, the fracture healing delay and impaired callus biomechanics consequence of estrogen deficiency can be countered by HRT [15]. Concretely, the subcutaneous administration of 17β -estradiol improved bone healing, increased the repair percentage, and reduced the number of osteoclasts, in an 8 mm calvarial critical size defects treated with bovine bone graft in estrogen deficiency OVX rats [39]. However, the well-known adverse effects associated with the estrogen systemic administration do not justify its use in many cases. On the contrary, in the present study, the 17β -estradiol was locally injected and given the small amounts of 17β -estradiol released from the microspheres, these risks were not run.

With the same objective, other authors have evaluated the regenerative effect of the combined treatment of intravenous zoledronic acid (ZA) and local implantation of BMP-2 (5 μ g) embedded in a collagen sponge in a similar calvarial defect in OP rats. The results have revealed that the combination with ZA did not improve the response of the BMP-2 treatment after 8 weeks [40]. Despite the positive effect of bisphosphonates in the treatment of OP, the results reported by the above-mentioned authors do not justify the addition of ZA to the BMP-2. In comparison with the present study, using a similar dose of BMP-2, the addition of 17β -estradiol improved the response and the refilled bone area increased.

By contrast, the analysis of osteocalcin, a marker of late osteogenesis and mineralization, showed low values in OP animals, indicating that the newly formed bone presents immature characteristics. The mineralization effects of osteocalcin were demonstrated *in vitro* using cultures of osteocalcin-knocked down MSCs [41]. Actually, the determination of the ratio of mature bone to immature bone showed highly significant differences in all groups between

non-OP and OP animals. In addition to the decrease in calcium absorption due to OVX, glucocorticoids also reduce intestinal calcium absorption and inhibit renal tubular reabsorption. Moreover, they also reduce the synthesis of calcium binding proteins [42]. The sum of the effects due to OVX along with the administration of DEX on the calcium metabolism would explain the slow mineralization observed in the bone formed in the defect of OP rat groups. Added 17β -estradiol increased bone formation in the defect because it replaces the lack of estrogen in OVX rats but the chronic administration of DEX reduced mineralization and consequently the bone matured more slowly than in the corresponding non-OP group.

The weak mineralization of the new bone tissue observed in the OP groups may be due to the delay of the bone healing process previously documented. In addition, the *in vivo* release assays showed a fast BMP-2 release rate. Taking into account these facts and that the hydrogel prepared in this study was injectable, 6 weeks later, a second booster dose was locally administered. However, contrary to expectations, this second dose of the combination of BMP-2 and 17β -estradiol did not modify the observed effects with only one dose. This failed result may be due to a non-optimized injection time, perhaps an earlier administration would improve the results or simply once the process is started the addition of a new dose is not worth it.

It is important to note that the reported tendency of adipogenic differentiation was not observed in the analyzed samples of new tissue that fills the defect in both non-OP and OP groups. Neither the osteoporosis condition nor the components of the injected hydrogel have induced adipogenesis during the 12-week experimental period.

Although it is difficult to compare our results because of different OP animal models, treatment, sampling times, and parameters used to evaluate the response, generally the local administration of BMP-2 enhances the regeneration of bone defects in OP animals. In addition, most studies do not include healthy animal control groups [26, 43]. Therefore, it is not easy to answer whether the response to treatment is affected by the OP condition. In general, when a healthy control group is included, and even taking into account differences in the experimental designs of the different study, our results coincide with those of other authors indicating that BMP-2 in a carrier locally applied in a bone defect enhances the regenerative process in OP animals with respect to their own control group. However, some authors have observed a better healing of the defect in the non-OP group than in the OP group [22, 44] and exceptionally others have reported 100% spinal fusion in both groups treated with BMP-2 in a collagen sponge [23]. Our results are likely to be comparable to those observed in a model of rat osteoporosis induced by mixed treatment of DEX and OVX similar to the one used in the present study [27].

Although they did not use the combination with 17β -estradiol, they injected BMP-2 in a hyaluronic gel to regenerate a 5-mm defect in fibular mid-shafts in OP and non-OP rats. As in the current study, the authors indicated that the OP group treated with BMP-2 responded better than the blank hydrogel. However, with regard to new bone quantities, qualities, and remodeling, BMP-2 was less effective than in the non-OP group.

Conclusion

The injectable system P-T-CD, facilitates the administration of BMP-2 and 17β -estradiol in microspheres because it is an *in situ* gel-forming system, and also because it adapts to the defect and facilitates contact with the edges of the defect. The controlled release of the active substances is governed by its pre-encapsulation in microspheres, but the hydrogel helps to modulate the burst effect. Our results signaled that the combination of BMP-2 and 17β -estradiol increases the percentage of non-mineralized immature bone in the OP rats. However, the ovariectomy and corticosteroid-induced osteoporosis significantly undermines BMP-2 activity. The mineralization process is much delayed and requires strengthening the system with a mineralization inductor.

Funding This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MAT2014-55657-R).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics statement All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed.

References

1. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001;28(1):80–6.
2. Nikolaou VS, Efsthathopoulos N, Kontakis G, Kanakaris NK, Giannoudis PV. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury*. 2009;40(6):663–8.
3. Giannoudis P, Tzioupi C, Almalki T, Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury*. 2007;38(Supplement 1):0–9.
4. Hao YJ, Zhang G, Wang YS, Qin L, Hung WY, Leung K, et al. Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats. *Bone*. 2007;41(4):631–8.
5. Giannoudis PV, Schneider E. Principles of fixation of osteoporotic fractures. *J Bone Jt Surg Br*. 2006;88-B(10):1272–8.

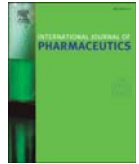
6. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007;38(Supplement 1):S11–25.
7. Rodríguez JP, Ríos S, Fernández M, Santibañez JF. Differential activation of ERK1,2 MAP kinase signaling pathway in mesenchymal stem cell from control and osteoporotic postmenopausal women. *J Cell Biochem*. 2004;92(4):745–54.
8. Rodríguez JP, Montecinos L, Ríos S, Reyes P, Martínez J. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J Cell Biochem*. 2000;79(4):557–65.
9. Van Lieshout EMM, Alt V. Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: what is the evidence? *Injury*. 2016;47(Supplement 1):S43–6.
10. Haasters F, Prall WC, Westphal I, Böcker W, Padula D, Mutschler W, et al. Overexpression of dnfKK in mesenchymal stem cells leads to increased migration and decreased invasion upon TNF α stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;436(2):265–70.
11. Song B, Estrada KD, Lyons KM. Smad signaling in skeletal development and regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5–6):379–88.
12. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 2001;104(5):719–30.
13. Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J*. 2008;27(3):535–45.
14. Krum SA. Direct transcriptional targets of sex steroid hormones in bone. *J Cell Biochem*. 2011;112(2):401–8.
15. Cortet B. Bone repair in osteoporotic bone: postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011;22(6):2007–10.
16. Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, et al. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(2):261–6.
17. Ko JY, Chuang PC, Ke HJ, Chen YS, Sun YC, Wang FS. MicroRNA-29a mitigates glucocorticoid induction of bone loss and fatty marrow by rescuing Runx2 acetylation. *Bone*. 2015;81:80–8.
18. Segredo-Morales E, García-García P, Évora C, Delgado A. BMP delivery systems for bone regeneration: healthy vs osteoporotic population. *Review*. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2017;42:107–18.
19. Sachse A, Wagner O, Wagner A, Keller M, Wetzel WD, Layher F, et al. Osteointegration of hydroxyapatite-titanium implants coated with nonglycosylated recombinant human bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) in aged sheep. *Bone*. 2005;37(5):699–710.
20. Wölfle JV, Fiedler J, Dürselen L, Reichert J, Scharnweber D, Förster A, et al. Improved anchorage of Ti6Al4V orthopaedic bone implants through oligonucleotide mediated immobilization of BMP-2 in osteoporotic rats. *PLoS One*. 2014;9(1):e86151.
21. Huang L, Luo Z, Hu Y, Shen X, Li M, Li L, et al. Enhancement of local bone remodeling in osteoporotic rabbits by biomimic multilayered structures on Ti6Al4V implants. *J Biomed Mater Res Part A*. 2016;104A(6):1437–51.
22. Park SB, Park SH, Kim NH, Chung CK. BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporosis model. *Spine J*. 2013;13(10):1273–80.
23. Ghodasra JH, Nickoli MS, Hashmi SZ, Nelson JT, Mendoza M, Nicolas JD, et al. Ovariectomy-induced osteoporosis does not impact fusion rates in a recombinant human bone morphogenetic protein-2-dependent rat posterolateral arthrodesis model. *Glob Spine*. 2016;6(1):60–8.
24. Phillips FM, Turner AS, Seim HB, MacLeay J, Toth CA, Pierce AR, et al. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. *Spine J*. 2006;6(5):500–6.
25. Moazzaz P, Gupta MC, Gilotra MM, Gilotra MN, Maitra S, Theerajunyaporn T, et al. Estrogen-dependent actions of bone morphogenetic protein-7 on spine fusion in rats. *Spine*. 2005;30(15):1706–11.
26. Yamaji K, Kawanami M, Matsumoto A, Odajima T, Nishitani Y, Iwasaka K, et al. Effects of dose of recombinant human BMP-2 on bone formation at palatal sites in young and old rats. *Dent Mater J*. 2007;26(4):481–6.
27. Lee JH, Baek HR, Lee KM, Zheng GB, Shin SJ, Shim HJ. Effects of ovariectomy and corticosteroid-induced osteoporosis on the osteoinductivity of rhBMP-2 in a segmental long-bone defect model. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(15–16):2262–71.
28. Mathavan N, Tägil M, Isaksson H. Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model. *Osteoporos Int*. 2017;28(2):697–707.
29. Segredo-Morales E, Martin-Pastor M, Salas A, Évora C, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C, et al. Mobility of water and polymer species and rheological properties of supramolecular polipseudorotaxanes gels suitable for bone regeneration. *Bioconjug Chem*. 2018;29(2):503–16.
30. Rodríguez-Évora M, Delgado A, Reyes R, Hernández-Daranas A, Soriano I, San Román J, et al. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur J Pharm Sci*. 2013;49(5):873–84.
31. Del Rosario C, Rodríguez-Évora M, Reyes R, Delgado A, Évora C. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous beta-TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomed Mater*. 2015;10(4):45008.
32. Rodríguez-Évora M, Reyes R, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Delgado A, Évora C. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(6):959–69.
33. Govindarajan P, Khassawna T, Kampschulte M, Böcker W, Huerter B, Dürselen L, et al. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int J Exp Pathol*. 2013;94(6):387–98.
34. Martínez-Sanz E, Ossipov DA, Hilborn J, Larsson S, Jonsson KB, Varghese OP. Bone reservoir: injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J Control Release*. 2011;152(2):232–40.
35. Suh H, Jun HW. Physicochemical and release studies of naproxen in poloxamer gels. *Int J Pharm*. 1996;129(1):13–20.
36. Durão SF, Gomes PS, Silva-Marques JM, Fonseca HRM, Carvalho JFC, Duarte JAR, et al. Bone regeneration in osteoporotic conditions: healing of subcritical-size calvarial defects in the ovariectomized rat. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(6):1400–8.
37. Durão SF, Gomes PS, Colaco BJ, Silva JC, Fonseca HM, Duarte JR, et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. *Osteoporos Int*. 2014;25(5):1535–45.
38. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: part 1, histology findings. *Clin Oral Implants Res*. 2017;28(9):e101–10.
39. de Almeida JM, Bosco AF, Faleiros PL, Pazmiño VF, Murakawa AC, Bonfante S, et al. Effects of oestrogen deficiency and 17beta-estradiol therapy on bone healing in calvarial critical size defects treated with bovine bone graft. *Arch Oral Biol*. 2015;60(4):631–41.

40. Lee JH, Baek HR, Lee KM, Zheng GB, Shin SJ, Jin YZ. The inhibitory effect of zoledronate on early-stage osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein 2 in an osteoporosis model. *Growth Factors*. 2015;33(3):220–8.
41. Tsao YT, Huang YJ, Wu HH, Liu YA, Liu YS, Lee OK. Osteocalcin mediates biomineralization during osteogenic maturation in human mesenchymal stromal cells. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1):159.
42. Donatti TL, Koch VH, Takayama L, Pereira RM. Effects of glucocorticoids on growth and bone mineralization. *J Pediatr (Rio. J)*. 2011;87(1):4–12.
43. Li M, Liu X, Liu X, Ge B. Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(7):1978–85.
44. Sarban S, Senkoylu A, Isikan UE, Korkusuz P, Korkusuz F. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats?: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res*. 2009;467(12):3113–20.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Bone regeneration in osteoporosis by delivery BMP-2 and PRGF from tetronic–alginate composite thermogel

Elisabet Segredo-Morales^a, Patricia García-García^a, Ricardo Reyes^{b,c}, Edgar Pérez-Herrero^{a,c}, Araceli Delgado^{a,c,*}, Carmen Évora^{a,c,*}

^a Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

^b Department of Biochemistry, Microbiology, Cell Biology and Genetics, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

^c Institute of Biomedical Technologies (ITB), Center for Biomedical Research of the Canary Islands (CIBICAN), Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Hydrogel
Tetronic–alginate
Sustained release
BMP–estradiol
Osteoporosis

ABSTRACT

As the life expectancy of the world population increases, osteoporotic (OP) fracture risk increase. Therefore in the present study a novel injectable thermo-responsive hydrogel loaded with microspheres of 17 β -estradiol, microspheres of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and plasma rich in growth factors (PRGF) was applied locally to regenerate a calvaria critical bone defect in OP female rats. Three systems were characterized: Tetronic® 1307 (T-1307) reinforced with alginate (T-A), T-A with PRGF and T-A-PRGF with microspheres. The addition of the microspheres increased the viscosity but the temperature for the maximum viscosity did not change (22–24 °C). The drugs were released during 6 weeks in one fast phase (three days) followed by a long slow phase. In vivo evaluation was made in non-OP and OP rats treated with T-A, T-A with microspheres of 17 β -estradiol (T-A- β E), T-A- β E prepared with PRGF (T-A-PRGF- β E), T-A- β E with microspheres of BMP-2 (T-A- β E-BMP-2) and the combination of the three (T-A-PRGF- β E-BMP). After 12 weeks, histological and histomorphometric analyzes showed a synergic effect due to the addition of BMP-2 to the T-A- β E formulation. The PRGF did not increased the bone repair. The new bone filling the OP defect was less mineralized than in the non-OP groups.

1. Introduction

Alginate is a natural polymer widely studied for pharmaceutical preparations as a drug delivery system (Jain and Bar-Shalom, 2014) and for cell encapsulation (Martín del Valle et al., 2009; Orive et al., 2009; Wang et al., 2009). In addition, alginate sponges and hydrogels have been proposed as scaffolds for in vitro cell proliferation and differentiation and in vivo tissue regeneration and at the same time, as delivery systems for different active substances (De la Riva et al., 2009). Poloxamines, marketed as Tetronics, are X-shaped copolymers with four poly(ethylene oxide)- poly(propylene oxide) (PEO-PPO) arms that form gel structures depending of the concentration, pH and temperature. Poloxamine-based hydrogels have been studied for bone regeneration purposes because of their in vitro intrinsic osteogenic activity (Rey-Rico et al., 2011). Despite that the observed in vitro osteogenic capacity of Tetronic 908 (T-908) and Tetronic 1307 (T-1307) was not evident in vivo, their physico-chemical properties made them very interesting biomaterials for bone scaffolds and as carriers for active microparticles (Del Rosario et al., 2015b; Rodríguez-Évora et al.,

2014). The sol-to-gel transition of T dispersions occurs as previously determined approximately at 26 °C (Rodríguez-Évora et al., 2014) and the viscosity increased when the temperature was raised to 37 °C. However, the blends of these poloxamines and alginates have not been studied yet. By contrast, preparation and optimization of blends of alginates with other in situ gelling polymers such as Pluronic® have been reported (Barba et al., 2014; Grassi et al., 2006). Pluronic-alginate blends were proposed as drug delivery carriers of some drugs by different routes of administration including pilocarpine for ophthalmic application (Lin et al., 2004) nucleic acid based drugs for injectable arterial endoluminal delivery (Abrami et al., 2014) and as a controlled release transdermal system for selegiline (Chen et al., 2011).

On the other hand, many traumas and diseases (tumors, osteomyelitis, osteoarthritis) may lead to large bone defects requiring surgery. As the size of these defects exceed the auto-repair capacity of the bone, new approaches that stimulate osteogenesis are needed. The filling of the defect with autologous bone is the gold standard, but in the case of the regeneration of bone defects in the osteoporotic (OP) population it is necessary to add to the limitations of this technique, those

* Corresponding authors at: Department of Chemical Engineering and Pharmaceutical Technology, Universidad de La Laguna, 38200 La Laguna, Spain.
E-mail addresses: adelgado@ull.edu.es (A. Delgado), cevora@ull.es (C. Évora).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.034>

Received 7 February 2018; Received in revised form 9 March 2018; Accepted 17 March 2018

Available online 19 March 2018

0378-5173/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

of the osteoporotic bone. In general, most of the studies in ovariectomized (OVX) animals supported that the healing time in fractures of osteoporotic bones is delayed, the risk of non-union and failure of implant fixation are higher than in healthy bones (Kubo et al., 1999; Namkung-Matthai et al., 2001; Oliver et al., 2013). All stages of the repair process are impaired in osteoporotic bone: during the early phase, progenitor cell recruitment, differentiation, and proliferation; angiogenesis and vasculogenesis and the expression of estrogen receptor; during the mid-phase, the capacity of extracellular matrix production and callus formation; and at later phase the callus remodeling capacity (Cheung et al., 2016). All these facts show that it is necessary to activate the process to repair the OP bone successfully. Many growth factors (GFs) are involved in the bone healing cascade including bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factor (FGF), platelet derived growth factor (PDGF-AB), and insulin-like growth factor (IGF) among others.

A natural source of human-based proteins and growth factors is blood and more specifically human plasma and platelets. In fact, it is well reported that human platelets contain several growth factors and cytokines stores in their alpha-granules. Just by using a standardized technique known as plasma rich in growth factors (PRGF), it is possible to prepare from each patient a small volume of plasma enriched in a wide range of biologically active mediators (Anitua et al., 2015). The latter has been successfully applied in the repair and regeneration of different types of injuries in many medical fields including dentistry, traumatology, ophthalmology and dermatology, among others (Anitua et al., 2008, Anitua et al., 2012, Anitua et al., 2013). On the other hand, BMP-2 has the capacity to stimulate fracture healing and to promote bone formation. In fact, many studies are dedicated to the formulation and evaluation of BMP-2 to repair bone defects in healthy animals (Del Rosario et al., 2015a,b; Rodríguez-Évora et al., 2014, 2013). Despite the BMP-2 potential application, this GF has not been widely studied in OP. The few studies reported have been developed in different animals and BMP-2 has been incorporated in different carriers, which makes it difficult to obtain solid conclusions (Segredo-Morales et al., 2017). In general, the doses are varied and the release kinetics is not determined or is not an objective to be optimized. Overall, the limited reports on animal experiments suggest that the local administration of BMP-2 stimulated fracture healing and improved the repair of certain bone defects in OP animals (Kyllönen et al., 2015; Li et al., 2010; Park et al., 2013; Wu et al., 2011; Zarrinkalam et al., 2013). Assuming this, the present study aims to prepare and characterize a novel injectable thermo-responsive hydrogel as local drug delivery system and apply it in the context of regeneration of an osteoporotic bone defect. The hydrogel system is composed of a poloxamine, (T-1307) reinforced with alginate crosslinked with calcium chloride. PRGF and BMP-2 in microspheres of poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 (PLGA) combined with poly(D,L-lactide) (PLA-S) microspheres of 17 β -estradiol were selected as bone active substances for local delivery in the defect. The impaired bone repair process in OP might improve by a sustained supply of 17 β -estradiol that lack in post-menopausal OP, combined with an osteogenic inductor such as PRGF containing a GFs cocktail or with the BMP-2 alone. The synergism of the PRGF and BMP-2 combination was also investigated. These combinations with a suitable delivery strategy might be a good approach suited for the clinical management of osteoporotic fractures. Local drug delivery would significantly reduce the risk of adverse effects and increase the efficiency of osteoporotic fractures healing.

2. Materials and methods

The materials were processed under aseptic conditions. All lab instruments and liquid components, except BMP-2 (GenScript, Piscataway, USA) with ED50 of 0.85 μ g/mL, measured by its ability to induce alkaline phosphatase production by C2C12 cells and 17 β -

estradiol (β E, Sigma-Aldrich), were autoclaved (121 $^{\circ}$ C, 30 min, Auster Selecta, Spain). Poloxamine, T-1307, was provided by BASF Corporation, (Ludwigshafen, Germany). Sodium alginate, Pronova[®] UP MVG, was supplied by Novamatrix (Sandvika, Norway) and calcium chloride (Merck, Germany) was used as alginate crosslinker. PLA-S (Resomer[®] R 203 S) and PLGA (Resomer[®] RG 504) were purchase from Evonic Industries (Darmstadt, Germany).

2.1. Evaluated systems and preparation conditions

Five types of Tetriconic-alginate hydrogel systems were prepared under aseptic conditions: a) plain Tetriconic-alginate gel (T-A), b) Tetriconic-alginate gel with PLA-S microspheres containing 17 β -estradiol (T-A- β E), c) Tetriconic-alginate-PRGF gel with PLA-S microspheres containing 17 β -estradiol (T-A-PRGF- β E) d) Tetriconic-alginate gel with a combination of PLA-S microspheres containing 17 β -estradiol and PLGA microspheres containing BMP-2 (T-A- β E-BMP) and e) Tetriconic-alginate-PRGF gel with a combination of PLA-S microspheres containing 17 β -estradiol and PLGA microspheres containing BMP-2 (T-A-PRGF- β E-BMP).

2.1.1. PRGF preparation and characterization

PRGF preparation was carried out as described (Anitua et al., 2015), blood samples were voluntarily taken from the authors of this study and divided into tubes containing 3.8% (w/v) sodium citrate. Then, the pool of blood was centrifuged at 580g for 8 min and the plasma column was divided into fraction 1 (F1) and fraction 2 (F2). F1, platelet poor fraction, was discarded and F2, defined as the 2 cm³ platelet rich plasma just above the leukocyte buffy coat, was used in the study. The release of growth factors and morphogens was provoked by the addition of a PRGF activator (calcium chloride) to the platelet concentrate. In order to characterize the PRGF, platelet enrichment and growth factors content of the PRGF were determined. Platelet count in peripheral blood and in F2 fraction was measured with a hematology analyzer (Micros 60, Horiba ABX, Montpellier, France). Additionally, the supernatant released after platelet activation was collected by centrifugation at 1000g for 10 min. The following growth factor levels were measured by commercially available Enzyme-linked immunosorbent assay kits (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN): TGF β 1, PDGF-AB, IGF and VEGF (Okada et al., 2016).

2.1.2. Microspheres preparation and characterization

The microspheres of BMP-2 were prepared by a double emulsion (w/o/w) method. Briefly, 200 μ L of a BMP-2 (900 μ g/mL) aqueous solution in 0.2% poly-vinyl alcohol (PVA) was stirred in vortex for 30 s (Genie[®]2, position 10) with 1 mL of a 150 mg/mL solution of PLGA in methylene chloride (DCM). Afterwards, 10 mL of PVA 0.2% (w/v) was added and vortexed for 15 s (Genie[®]2, position 10) to be poured into 100 mL of a 0.1% PVA aqueous solution and left under magnetic stirring for 1 h. For later characterization some batches of microspheres were prepared using ¹²⁵I-BMP-2. BMP-2 was labeled with ¹²⁵I-Na (Perkin-Elmer) according to the iodogen method (Fraker and Speck, 1978), as described (Del Rosario et al., 2015b).

The microspheres of 17 β -estradiol were prepared with PLA-S by the solvent evaporation method. Briefly, 0.5 mL of 17 β -estradiol (4 mg) and PLA-S (150 mg) solution in methanol (MeOH) MeOH:DCM 20:80, was emulsified with 4 mL of 1% PVA aqueous solution using vortex stirring (Genie[®]2, position 10) for 1 min and poured into 100 mL of 0.15% PVA aqueous solution and left under magnetic stirring for 1 h (Segredo-Morales et al., 2018a).

Both types of microspheres were collected by filtration (Supor[®]-450 filters, Pall Corporation, 47 mm) and lyophilized. Microspheres were characterized in terms of morphology by Scanning Electron Microscopy (SEM, Jeol JSM-6300) and size by laser diffractometry (Mastersizer 2000, Malvern Instruments). Encapsulation efficiency was determined in three aliquots of each microspheres batch. Encapsulation efficiency

of BMP-2 microspheres was determined in ^{125}I -BMP-2 batches with a gamma counter (Cobra® II, Packard) (Rodríguez-Évora et al., 2014), while the content of 17β -estradiol in the microspheres was determined spectrophotometrically at $\lambda = 280$ nm previously dissolved in a mix of MeOH:DCM (20:80).

2.1.3. Preparation and characterization of the hydrogel systems

Solutions of T-1307 at 30% (w/w), alginate UP at 6% (w/w) and CaCl_2 at 26.5% (w/w) were made in sterilized water (Mili-Q). T-1307 and alginate solutions were prepared by magnetic stirring overnight at 4°C and RT respectively and were kept at 4°C until use. To prepare the T-A hydrogel, the solutions were mixed in an ice bath to maintain a liquid state and diluted to lead a final concentration of 21% of T-1307, 1.5% of alginate and 1% of CaCl_2 . Briefly, T-1307 solution was mixed with the alginate solution stirring in vortex (position 10) for 3 min. The mix was maintained cold in the ice bath for 5 min. Then the CaCl_2 solution was added and stirred in vortex (position 10) for 3 min. Lastly the final particulate system was extemporaneously prepared by mixing the hydrogel with the microspheres (18 mg/100 μL).

The systems containing PRGF were prepared as above and, after the addition of the CaCl_2 , the gel was lyophilized and reconstituted with the PRGF at 0.77 g/g of gel.

To check the gel formation the system was kept in the oven at 37°C during 15 min, after which the tilting test was applied. Furthermore, the dose uniformity was also tested using ^{125}I -BMP-2 microspheres. Briefly, a 1 mL syringe was loaded with the T-A-PRGF- βE - ^{125}I -BMP system in cold, after 10 min at RT the radioactivity of 5 doses of 100 μL was measured in the gamma counter.

Surface morphology and porous structure of the hydrogel were analyzed by scanning electron microscopy (SEM, Jeol JSM-6300) of the freeze-dried formulations. Chemical elements on the surface were analyzed by SEM-EDX (Energy Dispersive X-ray spectroscopy).

The porosity of the hydrogel was calculated as Eq. (1).

$$\text{Porosity (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{app}}}{\rho_{\text{true}}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

where ρ_{true} (measured with a helium pycnometer, AccuPyc 1330, Micromeritics) and ρ_{app} (calculated by dividing mass by external geometrical volume) are the real and apparent densities of the lyophilized hydrogel.

The viscoelastic characteristics of the T-A, T-A-PRGF and T-A-PRGF-blank microspheres were tested in triplicate using a Bohlin CVOD 100 rheometer equipped with a Peltier temperature control system and using a cone-plate geometry (diameter 40 mm, angle 4°) leaving a gap of 1 mm. The dependence of the viscosity with temperature was recorded at 10 s^{-1} in the range of 0 – 80°C .

To check the hydrogel stability 100 μL of the T-A was placed in a cylindrical mold of approximately 8 mm (internal diameter) \times 1.5 mm (high) that simulate the calvarial bone defect. The hydrogel in the mold was incubated in a 50 mL flask with 25 mL of water (milli-Q) at 37°C during 4 weeks. The samples were withdrawal at 1, 2, 3 and 4 weeks and lyophilized. Then the surface morphology and porous structure of the samples were visualized and photographed with a stereo microscope (Leica M205 C, Leica LAS, v3 software) and with the SEM.

The in vitro 17β -estradiol release was assayed in triplicate (37°C). The 17β -estradiol is a poorly soluble drug and to maintain the sink conditions the release assays were carried using a release medium of water:MeOH (50:50), as previously reported (Birnbaum et al., 2000, Wischke and Schwendeman, 2008). To study the influence of the PRGF on the 17β -estradiol release kinetics, the release profiles were assayed by dispersing the microspheres in the hydrogel with and without PRGF (T-A-PRGF- βE and T-A- βE). The amount of 17β -estradiol released was determined by the spectrophotometric method.

2.2. In vivo experiments

The protocol was approved by the Ethical Committee of the University of La Laguna. The animal experiments were carried out in conformity with the EC directive on Care and Use of Animals in Experimental Procedures (2010/63/UE). All the surgical procedures were carried out under aseptic conditions.

2.3. Animal model

50 Female Sprague-Dawley rats weighing 225–250 g divided in two groups of 25 each, were used in the study. The experimental osteoporosis was induced in one group (OP) by bilateral ovariectomy (OVX) under isoflurane anesthesia, via a dorsal approach. In addition, two weeks post-ovariectomy, 0.3 mg/kg body weight of dexamethasone-21-isonicotinate (Deyanil retard, Fatro Ibérica, Spain) were administered subcutaneously once in two weeks (Govindarajan et al., 2013) for up to the time of sacrifice. The remaining 25 rats were used as sham healthy controls. As the OVX rats, the sham group, underwent to the same surgical process except the ovariectomy to avoid differences due to the surgery.

Five different systems of thermogel (100 μL) with a mixture of PLA-S/PLGA microspheres and containing 200 μg of 17β -estradiol, 4 μg of BMP-2, 730 μL of PRGF or a combination of these active substances, as described in the evaluated systems section, were assayed. 4 months post-OVX, critically sized circular (8 mm) cranial defect was surgically created with a trephine burr in the rats under isoflurane as previously described (Rodríguez-Évora et al., 2013). The five systems were injected into the defects of 10 groups of rats, 5 groups of sham and others 5 groups of OP, the wound was closed and sutured. Then, the animals were allowed free movement and food and water uptake. Analgesia consisted in buprenorphine administered subcutaneously (0.05 mg/kg) before surgery and paracetamol (70 mg/100 mL) in the water, during 3 days post-surgery. The animals were sacrificed 12 weeks post-surgery and defect enclosing segments were resected from the calvariae to analyze the bone refilled.

2.3.1. In vivo BMP-2 release assay

The BMP-2 release experiments were carried out in two groups of 5 rats each. One group was implanted with 100 μL of Tetricon-alginate gel with a combination of PLA-S microspheres containing 17β -estradiol and PLGA microspheres containing ^{125}I -BMP-2 (T-A- βE -BMP) and the other group was implanted with the same hydrogel system but now lyophilized and reconstituted with the PRGF (T-A-PRGF- βE -BMP). The remaining ^{125}I -BMP-2 at the bone defect was measured periodically using an external probe-type gamma counter (Captus®, Nuclear Iberica) as previously described and validated (Delgado et al., 2006).

2.3.2. Histology and histomorphometrical evaluation

To determine the capacity of the bone active substances to regenerate the critical size defect practiced in the calvaria of the rats, samples of the 10 groups of 5 rats each were examined.

Samples were fixed (4% paraformaldehyde solution), decalcified in Histofix® Decalcifier (Panreac, Barcelona, Spain) and prepared for histological analysis as previously described (Hernández et al., 2012). New bone formation was identified by hematoxylin-erythrosin staining. Bone mineralization was assessed with VOF trichrome stain, in which red and brown staining indicates advanced mineralization, whereas less mineralized, newly formed bone stains blue (Martínez-Sanz et al., 2011). Sections were analyzed by light microscopy (LEICA DM 4000B). Computer based image analysis software (Leica Q-win V3 Pro-image Analysis System, Barcelona, Spain) was used to evaluate all sections. A region of interest (ROI) within the defect (50 mm²) for quantitative evaluation of new bone formation was defined. New bone formation was expressed as a percentage of repair with respect to the original defect area within the ROI. The osteoporosis-like condition was

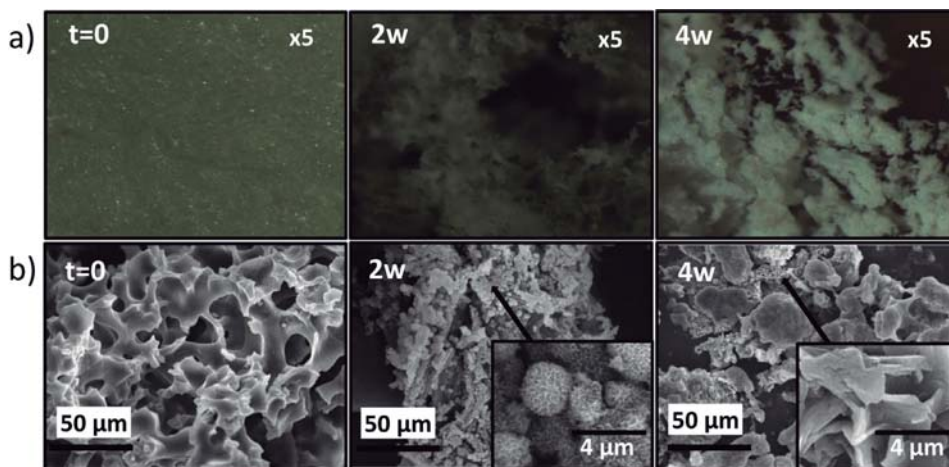


Fig. 1. System evolution. Images of the Tetrone-alginate and its evolution throughout 4 weeks of incubation in water at 37 °C. a) Images from the stereomicroscope at 5x magnification; b) SEM images showing the internal structure of the hydrogel. The inserts display details of the structure at higher magnification.

confirmed histologically by determining the bone thickness and studying the bone microarchitecture in cross sections of calvaria. From the total bone repair, the areas of mature bone (MB) and immature bone (IB) were determined and the MB/IB ratio for each experimental group as well as between sham and osteoporotic-like animals, was calculated.

For immunohistochemical analysis, sections were deparaffined and rehydrated in Tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4, 0.01 M Trizma base, 0.04 M Tris hydrochloride, 0.15 M NaCl), which was used for all further incubations and rinse steps. Sections were incubated in citrate buffer (pH 6) at 90 °C for antigen retrieval, followed by incubation in 0.3% hydrogen peroxide in TBS buffer for 20 min. After a rinse step, sections were blocked with 2% FBS in TBS–0.2% Triton X-100 (blocking buffer). The indirect immunohistochemical procedure was carried out by incubating the sections with collagen type I and osteocalcin antiserum (1/100) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer overnight at 4 °C. Sections were rinsed three times, then incubated with biotin-SP-conjugated donkey anti-rabbit F(ab0) fragment (1/200) (Millipore, Barcelona, Spain) in blocking buffer for 1 h followed, after another rinse step, by incubation in peroxidase-conjugated streptavidin (1/300) (Millipore, Barcelona, Spain) for 1 h. Peroxidase activity was revealed in Tris–HCl buffer (0.05 M, pH 7.6) containing 0.04% of 4-chloro-1-naphtol (Sigma, Poole, UK) and 0.01% hydrogen peroxide. Reaction specificity was confirmed by replacing the specific antiserum with normal serum or by pre-adsorption of the specific antiserum with the corresponding antigen.

Collagen type I and osteocalcin staining was evaluated using computer-based image analysis software (ImageJ, NIH, Bethesda, MD). Collagen type I and osteocalcin staining was measured by applying a fixed threshold to select for positive staining within the ROI. Positive pixel areas were divided by the total surface size (mm²) of the ROI. Values were normalized to those measured from blank scaffolds and are reported as relative staining intensities.

Statistical analysis was performed with SPSS.21 software. We compared the distinct treatments by means of a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey multiple comparison post-test. Significance was set at $p < 0.05$. Results are expressed as means \pm SD.

3. Results

3.1. System characteristics

The mean volume diameter of the microspheres of PLGA containing BMP-2 was 108.9 μ m, (10% < 54.8 μ m and 90% < 139.3 μ m) and 83.2 μ m, (10% < 32.6 μ m and 90% < 117.8 μ m) for the PLA-S microspheres containing 17 β -estradiol. The encapsulation efficiency was 70% and 81% for BMP-2 and 17 β -estradiol, respectively. The porosity of the hydrogel was 78% \pm 1.35. Micrographs of the hydrogel systems, obtained with the stereo microscopy and with the SEM, showed that the T-A hydrogel has a porous surface. The hydrogel was formed by a regular porous structure of a network of polymer with pores interconnected that evolves to a less uniform and more porous structure after its incubation in water (Fig. 1). The T was lost by dilution in the medium and the skeleton of the alginate increased its porosity by erosion (Fig. 1). The EDX analysis indicated calcium located on the surface of the hydrogel, after 4 weeks incubation the atomic% of calcium was reduced 7-fold.

Temperature dependence of the viscoelastic behavior of T-A dispersions alone and reconstituted with PRGF (T-A-PRGF) together with the final injectable system (T-A-PRGF with blank microspheres) is shown in Fig. 2. The maximum viscosity of the three hydrogels was detected in the range of 22–24 °C. The T-A and T-A-PRGF profiles were similar, the value of maximum viscosity was in the range of 30–40 Pa.s. By contrast the addition of the microspheres prompted an important increase in the viscosity of the hydrogel system up to 50–60 Pa.s. Although the temperature of the maximum viscosity was approximately the same, the presence of PRGF, but above all, the addition of microspheres, shifted the curves to lower temperatures. Mean values (\pm sd) of the parameters that defined the PRGF characteristics are reflected in Table 1.

3.2. 17 β -estradiol and BMP-2 release kinetics

The in vitro 17 β -estradiol release profiles reflected that the PRGF did not affect the release kinetics of the 17 β -estradiol from the microspheres (Fig. 3). Only the first day the percent of 17 β -estradiol was slightly reduced by the PRGF, 12% against 18%. After the 6 weeks that the assay lasted, 80% of the drug was released. On the other hand, BMP-2 release from the gel, with and without PRGF, was assessed at the defect site (Fig. 3). No difference between both of the ¹²⁵I-BMP-2

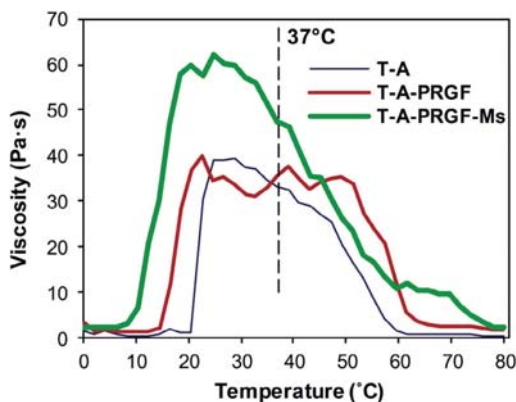


Fig. 2. System evolution. Evolution of the viscosity with the temperature of the Tetriconic-alginate hydrogel (T-A) freshly prepared and after freeze-drying and reconstitution with PRGF (0.77 g/g of gel) (T-A-PRGF) and containing a mixture of PLA-S/PLGA microspheres (180 mg/mL of gel) (T-A-PRGF-Ms).

profiles was detected. Again, the effect of the PRGF only showed during the first day, increasing the BMP-2 released from 34% to 41%. Ultimately, 90% of the encapsulated BMP-2 was delivered during the 6 weeks.

3.3. Histological, histomorphometrical and immunohistochemical analysis

The histological analysis of the calvaria samples in the non-OP and OP animals four months after ovariectomy and the treatment with dexamethasone showed clear differences in the thickness of the bone, the calvaria bone being between 30% and 40% thicker in the non OP animals (Fig. 4).

The analysis of the samples twelve weeks after the implantation of the systems with the different treatments, revealed no repair in blank groups non-OP and OP, with a poor bone formation at the margins of the defect (Fig. 5A). Connective tissue occupied a great part of the defect area in some animals of both blank groups (Fig. 5A). However, higher proportion of adipose tissue mixed with connective tissue was observed in OP animals (Fig. 5A).

In the groups treated with 17β -estradiol (T-A- β E) and with the combination with PRGF (T-A- β E-PRGF), the repair rate was between 24% and 32%, being slightly higher in OP animals than in non-OP. The new bone was irregularly distributed, little at the edges and somewhat more at the center of the defect. In OP groups, a high proportion of connective tissue was observed as well as some adipose tissue. (Fig. 5A and B).

The highest repair rates, between 50% and 58%, were detected in the groups treated with BMP-2, both in combination with 17β -estradiol and in combination with 17β -estradiol and PRGF. Both groups showed significant differences with respect to the blank groups in OP and non-OP animals (Fig. 5A and B). The groups treated with both BMP-2 combinations showed better repair responses than the groups without BMP-2. However, only the non-OP groups treated with the combinations of BMP-2, T-A- β E-BMP and T-A- β E-PRGF-BMP showed significant differences with the non-BMP-2 groups (T-A- β E and T-A- β E-PRGF)

Table 1

Platelet number (Plt) in blood and in the platelet rich plasma fraction from six donors. Concentration of each growth factor in the PRGF. Doses of the growth factors (pg) injected in 100 μ L of the hydrogel system.

Plt/ μ L $\times 10^3$ (blood)	Plt/ μ L $\times 10^3$ (plasma)	Plt enrichment	PDGF-AB (pg/mL)	IGF (pg/mL)	TGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)
191 \pm 56	384 \pm 81	2.1 \pm 0.5	24456 \pm 7175	122784 \pm 36027	25 \pm 7.5	293 \pm 86
Dose of GFs injected in the defect (pg/100 μ L gel)			1883 \pm 94.2	9454 \pm 472.7	1.99 \pm 0.10	22.5 \pm 1.1

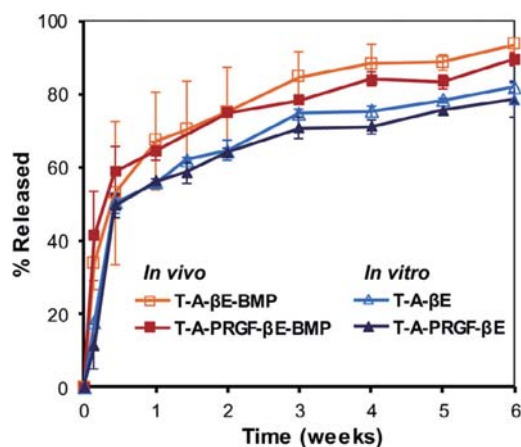


Fig. 3. Release assay. Release profile of 125 I-BMP-2 from PLGA microspheres included in T-A- β E-BMP and T-A-PRGF- β E-BMP systems, after implantation in the rat calvaria defect ($n = 5$) and release profile of 17β -estradiol from PLA-S microspheres incorporated in the T-A- β E and T-A-PRGF- β E systems ($n = 3$) in a mixture of Water:MeOH (50:50) at 37 °C.

(Fig. 5A and B).

In summary, no significant differences were observed between non-OP and OP animals for any of the treatments tested. Furthermore, PRGF did not improve the response induced by 17β -estradiol alone or by the combination of 17β -estradiol and BMP-2 (Fig. 5A and B)

By contrast, the estimated ratio (MB/IB) between mature bone (more mineralized bone) and immature bone (less mineralized bone) was significantly higher in non-OP against OP groups, independently of the treatment. The ratio MB/IB in the OP groups treated with the BMP-2 combinations was slightly better than the other groups (Fig. 6).

The detection of collagen type I immunoreactivity, a marker of early osteogenesis, in the newly formed bone, showed significant differences in relative staining intensities only between blank groups and BMP-2 groups in both non-OP and OP animals (Fig. 7).

Also, significant differences in osteocalcin relative staining intensity between blank and treated groups in both non-OP and OP animals, were detected (Fig. 8). In addition, in non-OP, BMP-2 induced a significant increase of the osteocalcin relative staining intensity (Fig. 8). High variability was observed in the OP groups treated with BMP-2.

For both markers studied, no differences were observed in any of the treatments between non-OP and OP rats (Fig. 8).

4. Discussion

T-1307 is a gel-forming poloxamine at above room temperature, near to body temperature, which was previously studied as an injectable system for bone regeneration (Rodríguez-Évora et al., 2014). The T-1307, once exposed to physiological temperatures, formed a soft gel, the addition of the alginate, once crosslinked, reinforced the structure and formed a hard gel at lower temperature. The alginate increased the viscosity of the T-1307 and reduced its transition sol-to-

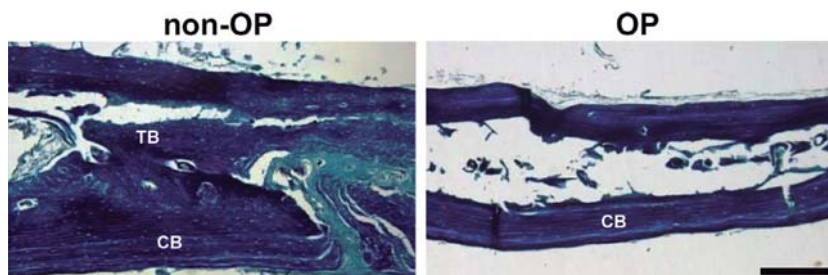


Fig. 4. Osteoporosis model. Representative images in transversal section of calvarial bone in non-OP and OP rats showing the differences in bone microarchitecture. Observe the difference in bone thickness, as well as the absence of trabecular bone in OP rats (VOF staining). CB: compact bone, TB: trabecular bone. Scale bar = 180 μ m.

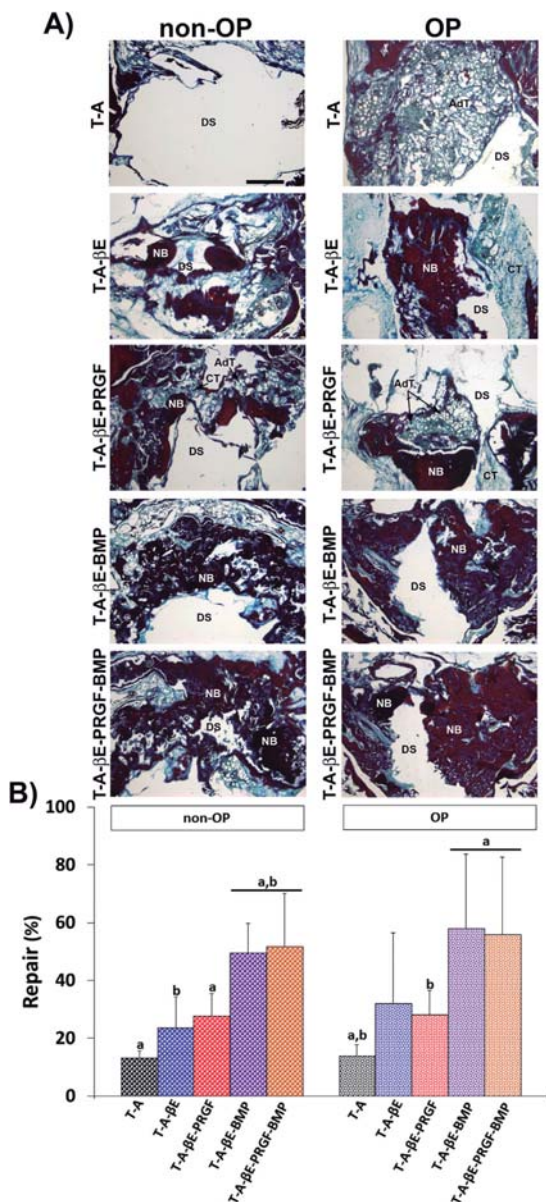


Fig. 5. Bone repair. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing the repair response at the defect level in the different experimental groups 12 weeks postimplantation A). Histomorphometrical analysis comparing the degrees of repair (%) among the different experimental groups in non-OP and OP rats 12 weeks post-implantation B). Bars represent means \pm SD (n = 3), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. AdT: Adipose tissue, CT: connective tissue, NB: newly formed bone, DS: defect site. Scale bar = 1.5 mm.

gel temperature. The systems used in this study were prepared and stored in cold to keep flowing because of the transition sol-to-gel temperatures were lower than RT. However, the gel was easy to handle and did not pose any problem when injecting. In fact, the dose content

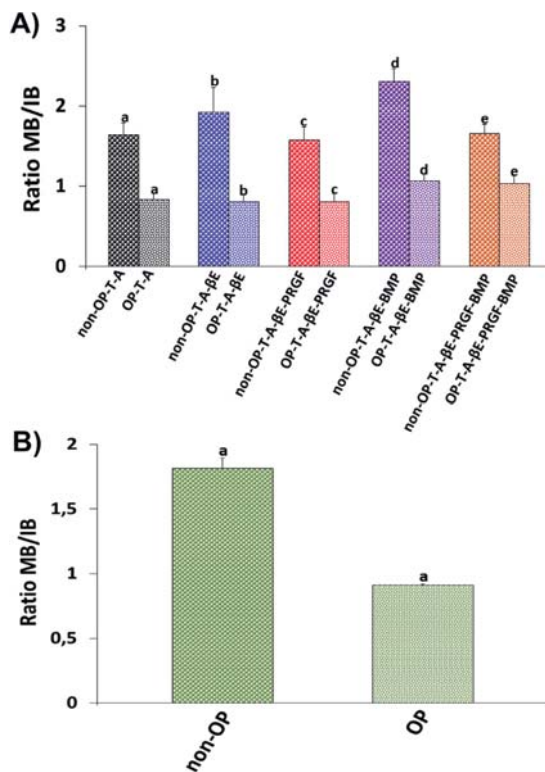


Fig. 6. Ratios MB/IB. Histomorphometric analysis showing the ratio between mature bone and immature bone (MB/IB) among the different experimental groups A) and between non-OP and OP rats B), estimated using VOF staining. (n = 3), $p < 0.001$.

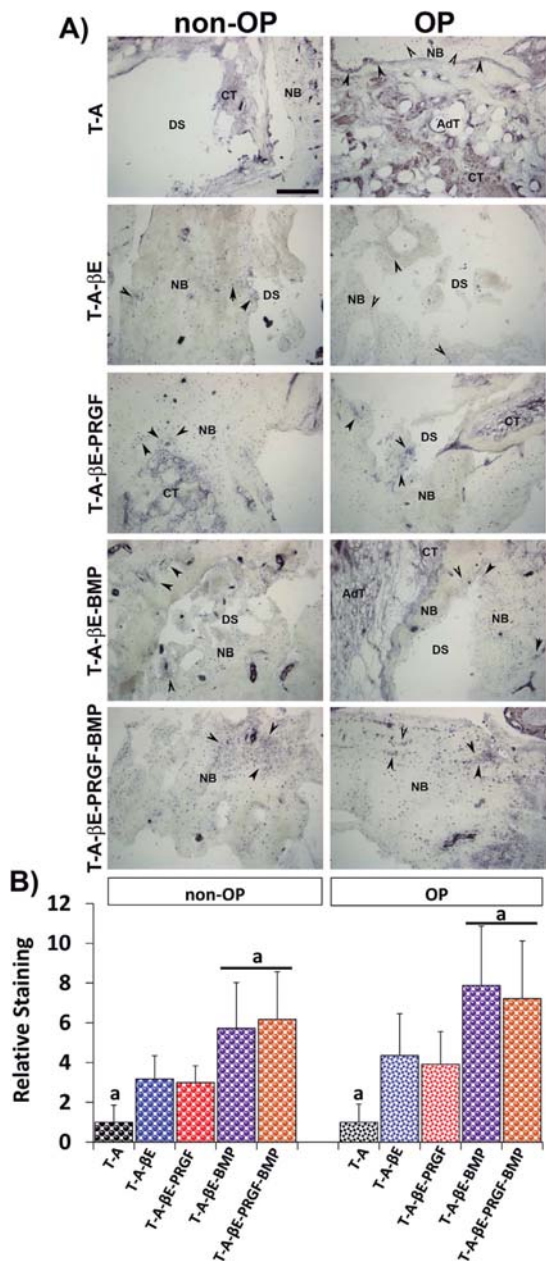


Fig. 7. Collagen type I. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing collagen type I immunoreactivity (ir) at the defect level in the different experimental groups 12 weeks postimplantation A). Histomorphometric analysis showing the relative staining values for collagen type I-ir B). Arrowheads indicate immunolabeling in osteoblasts, osteocytes, and areas of the extracellular matrix of new bone. Bars represent means \pm SD (n = 3), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. AdT: Adipose tissue, CT: connective tissue, NB: newly formed bone, DS: defect site. Scale bar = 300 μ m.

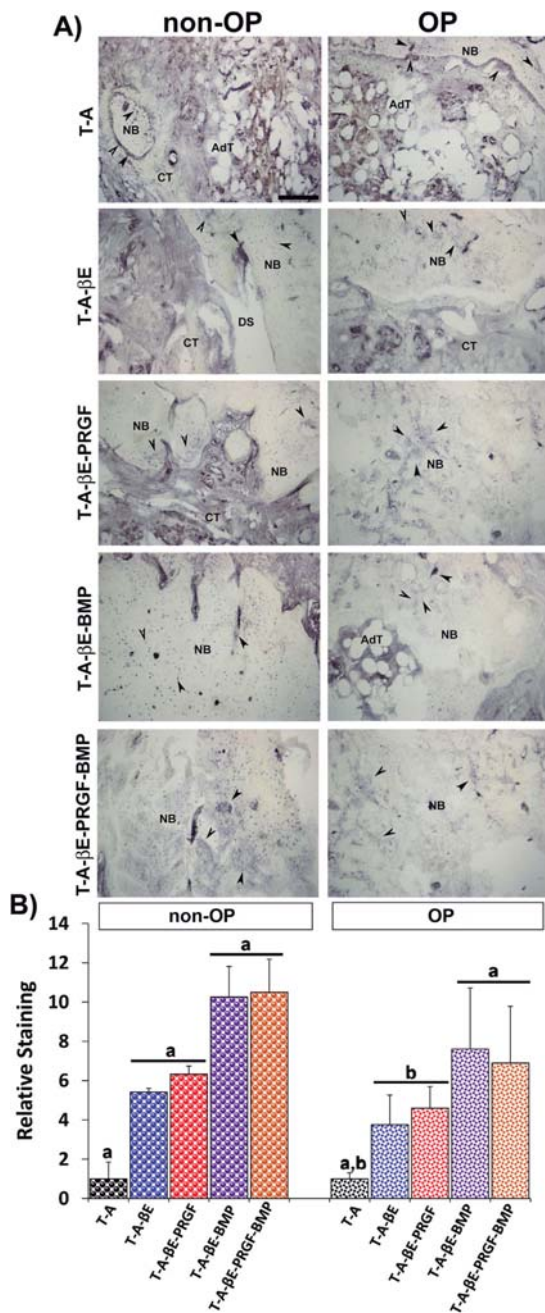


Fig. 8. Osteocalcin. Representative images in horizontal section of calvarial critical size defects in non-OP and OP rats showing osteocalcin immunoreactivity (ir) at the defect level in the different experimental groups 12 weeks postimplantation A). Histomorphometric analysis showing the relative staining values for osteocalcin-ir B). Arrowheads indicate immunolabeling in osteoblasts, osteocytes, and areas of the extracellular matrix of new bone. Bars represent means \pm SD (n = 3), $p < 0.05$. The identical letter on different bars indicates significant differences. AdT: Adipose tissue, CT: connective tissue, NB: newly formed bone, DS: defect site. Scale bar = 300 μ m.

was approximately 90% of the calculated dose after 10 min at RT, which supports its syringeability. In addition, the formation of the gel at temperatures below 37 °C was an advantage for implantation and reduced the time of surgery. Moreover, as was expected during incubation, the Tetriconic was cleared up while the hard alginate structure remained and eroded, slowly increasing the porosity. In fact, taking into account that the process of regeneration of the bone defect in OP seems to be slower than in non-OP, the addition of the alginate was aimed to prolong the permanence of the scaffold in the defect, to act as an anchor and guide to improve the new tissue formation. The active ingredients as PRGF and the microspheres of the two drugs modified the rheological properties. Although an increase of the maximum viscosity by the addition of the PRGF to the system preparation (T-A-PRGF) was expected, the maximum viscosity was similar to the T-A prepared with water. The PRGF provoked a reduction of the transition sol-to-gel temperature. By contrast, the addition of the microspheres led to an increase of the viscosity and a further decrease of the transition temperature due to the hydrophobic interaction of the PLA-S and PLGA with the PPO blocks of the T-1307 as was previously observed in a Tetriconic-pluronic- α -cyclodextrine hydrogel (Segredo-Morales et al., 2018a). Once the injectable system was characterized, the next objective was to validate that the local administration of 17 β -estradiol and its combinations with PRGF or with BMP or the combination of the three agents can accelerate the regeneration process in a calvaria critical size defect in an OP rat model. Local delivery is appealing to avoid adverse effects of the systemic administration and to reduce the required dose of drugs. This study showed that the effect of 17 β -estradiol alone or 17 β -estradiol combined with PRGF slightly improved the defect repair process in both non-OP and OP animals, inducing minimal bone formation at the margins of the defect, with respect to the blank groups. The addition of BMP-2, a potent osteoinductor, to both combinations (T-A- β E-BMP and T-A- β E-PRGF-BMP), greatly improved the repair effect, the percentage of repair more than doubled with respect to the combinations without BMP-2. In this case, the formation of new bone was observed not only in the margins of the defect, but intramembranous ossification zones were observed inside it.

The histological and histomorphometrical analysis showed that new bone in non-OP rats was more mineralized than in OP groups, independently of the treatment. In fact, 17 β -estradiol alone and its combination with PRGF and BMP-2, improved the repair percentage in a variable degree in both, non-OP and OP groups, with respect to the blank groups, but did not improve the mineralization as demonstrated the MB/IM ratio. The main actions of 17 β -estradiol in bone through the estrogen receptor β , involves gene expression and synthesis of new proteins related to osteosynthesis and mineralization (Alhodhodi et al., 2017; Liao et al., 2016; Qiu et al., 2014; Wang et al., 2016). The effects of 17 β -estradiol not only increase the bone matrix production by enhancing the transcription and translation of bone sialoprotein and Runx2, but also promoted the calcium deposition (Li et al., 2014; Liao et al., 2016). For all this, the addition of 17 β -estradiol aimed to restore the local hormonal state in OP rats to balance bone synthesis/resorption and consequently improve the processes of regeneration and mineralization.

However, as in a previous study (Segredo-Morales et al., 2018b), the combination of 17 β -estradiol with BMP-2 significantly improved the percentage of bone repair in OP rats, but did not improved the mineralization of the new bone. The explanation for the low mineralization observed in the newly formed bone in OP rats may be due to an ineffective action of 17 β -estradiol as a consequence of a low concentration in the defect site. In this sense, the importance of the concentration levels of 17 β -estradiol on the differentiation of other cell types, as chondrocytes, has been shown (Shi et al., 2017). Predicting the concentration of 17 β -estradiol in the defect is difficult because 17 β -estradiol is very poorly soluble in water and the release medium for in vitro tests is composed of 50% MeOH. In addition, as the PRGF did not affect the release kinetics of both 17 β -estradiol and BMP-2, it was expected

that 17 β -estradiol release rate in vivo was slower than in vitro, in contrast to the release of BMP-2 (Segredo-Morales et al., 2018b). Therefore, in order to improve the previously observed 17 β -estradiol release profile and increase the speed in the second phase in the present study, the polymer concentration, in the preparation of the microspheres, was slightly reduced. In contrast, the polymer concentration was doubled in the BMP-2 microspheres preparation to prolong the release of the protein (Segredo-Morales et al., 2018b). In this way it was intended to supply BMP-2 during or at least in the first stage of the regenerative process, which is delayed in the OP. Although the PRGF exerts its action in the first stages of the regeneration process, when incorporated into the hydrogel it was expected to increase the residence time in the defect and favour its action. However, in this study, PRGF did not produce any improvement in the regeneration of the defect and did not even potentiate the effect of 17 β -estradiol or BMP-2, probably, because the dose of the GFs from the PRGF in the volume of the injected system in the defect was much lower than the BMP-2 in the microspheres. In any case, the conditions present in the environment of the defect are probably not the most appropriate. The cells at the edge of the defect would be the only ones available to interact with the agents included in the system and probably much of the amount released at short times was wasted because it cannot be used by them. Even, the 17 β -estradiol might act through another subtype of receptor such as α ER or GPR130 leading to a different cellular response. At last, as was reported, the efficacy of plasma fractions as PRGF depend on several factors, and the outcome of therapy is variable and unpredictable in orthopedic patients. The PRGF has been used successfully in different injuries (Anitua et al., 2012; Rodríguez-Agirretxe et al., 2017; Vaquerizo et al., 2017). However, even accepting its contribution in the repair of some tissue defects, its role in complicated bone injuries is not proven (Oryan et al., 2015). The present study, carried out in an OP rat model by combination of ovariectomy and treatment with steroids, demonstrated its lack of efficacy in compromised bone lesions.

5. Conclusions

The addition of alginate to Tetriconic reinforced the structure of the thermoresponsive gel increasing the scaffold stability. The gel-forming temperature of the T-A system below the body temperature reduced the surgery time. Moreover, this formulation maintained the gelling properties when reconstituted with water or PRGF after being freeze-dried. The bone repair induced by the different treatment in OP and non-OP groups were not significantly different. The addition of BMP-2 increased the response to 17 β -estradiol but no change was observed with the PRGF. However, the mineralization of the new bone formed in OP groups was notably inferior than in non-OP groups.

Acknowledgment

This work was supported by the Ministry of Science and Technology, Spain (MAT2014-55657-R).

Declarations of interest:

None.

References

- Abrami, M., D'Agostino, I., Milcovich, G., Fiorentino, S., Farra, R., Asaro, F., Lapasin, R., Grassi, G., Grassi, M., 2014. Physical characterization of alginate-Pluronic F127 gel for endoluminal NABDs delivery. *Soft Matter* 10, 729–737.
- Alhodhodi, A., Alkharobi, H., Humphries, M., Alkharaji, H., El-Gendy, R., Feichtinger, G., Speirs, V., Beattie, J., 2017. Oestrogen receptor β (ER β) regulates osteogenic differentiation of human dental pulp cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 174, 296–302.
- Anitua, E., Orive, G., Aguirre, J.J., Andía, I., 2008. Clinical outcome of immediately loaded dental implants bioactivated with plasma rich in growth factors: a 5 year retrospective study. *J. Periodontol.* 79, 1168–1176.
- Anitua, E., Alkhrasat, M.H., Orive, G., 2012. Perspectives and challenges in regenerative

- medicine using plasma rich in growth factors. *J. Control. Release* 157, 29–38.
- Anitua, E., Muruzabal, F., Alcalde, I., Merayo-Lloves, J., Orive, G., 2013. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp. Eye Res.* 115, 153–161.
- Anitua, E., Zaldueño, M.M., Prado, R., Alkhraisat, M.H., Orive, G., 2015. Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 103, 1011–1020.
- Barba, A.A., Lamberti, G., Rabbia, L., Grassi, M., Larobina, D., Grassi, G., 2014. Modeling of the reticulation kinetics of alginate/pluronic blends for biomedical applications. *Mater. Sci. Eng. C* 37, 327–331.
- Chen, C.C., Fang, C.L., Al-Suwayeh, S.A., Leu, Y.L., Fang, J.Y., 2011. Transdermal delivery of selegiline from alginate–pluronic composite thermogels. *Int. J. Pharm.* 415, 119–128.
- Cheung, W.H., Miclau, T., Chow, S.K.H., Yang, F.F., Alt, V., 2016. Fracture healing in osteoporotic bone. *Injury* 47, S21–S26.
- De la Riva, B., Nowak, C., Sánchez, E., Hernández, A., Schulz-Siegmund, M., Pec, M.K., Delgado, A., Évora, C., 2009. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73, 50–58.
- Del Rosario, C., Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Delgado, A., Évora, C., 2015a. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous beta-TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats. *Biomed. Mater.* 10, 45008.
- Del Rosario, C., Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Simões, S., Concheiro, A., Évora, C., Alvarez-Lorenzo, C., Delgado, A., 2015b. Bone critical defect repair with poloxamine-cyclodextrin supramolecular gels. *Int. J. Pharm.* 495, 463–473.
- Delgado, J.J., Évora, C., Sánchez, E., Baro, M., Delgado, A., 2006. Validation of a method for non-invasive in vivo measurement of growth factor release from a local delivery system in bone. *J. Control. Release* 114, 223–229.
- Birnbaum, D.T., Kosmala, J.D., Henthorn, D.B., Brannon-Peppas, L., 2000. Controlled release of β -estradiol from PLAGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J. Control. Release* 3, 375–387.
- Wischke, C., Schwendeman, S.P., 2008. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364, 298–327.
- Fraker, P.J., Speck, J.C., 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849–857.
- Govindarajan, P., Khassawna, T., Kampschulte, M., Böcker, W., Huertler, B., Dürselen, L., Faulenbach, M., Heiss, C., 2013. Implications of combined ovariectomy and glucocorticoid (dexamethasone) treatment on mineral, microarchitectural, biomechanical and matrix properties of rat bone. *Int. J. Exp. Pathol.* 94, 387–398.
- Grassi, G., Crevatin, A., Farra, R., Guarnieri, G., Pascotto, A., Rehmers, B., Lapasin, R., Grassi, M., 2006. Rheological properties of aqueous pluronic-alginate systems containing liposomes. *J. Colloid Interface Sci.* 301, 282–290.
- Hernández, A., Sánchez, E., Soriano, I., Reyes, R., Delgado, A., Évora, C., 2012. Material-related effects of BMP-2 delivery systems on bone regeneration. *Acta Biomater.* 8, 781–791.
- Jain, D., Bar-Shalom, D., 2014. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 40, 1576–1584.
- Kubo, T., Shiga, T., Hashimoto, J., Yoshioka, M., Honjo, H., Urabe, M., Kitajima, I., Semba, I., Hirasawa, Y., 1999. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 68, 197–202.
- Kyllönen, L., D'Este, M., Alini, M., Eglin, D., 2015. Local drug delivery for enhancing fracture healing in osteoporotic bone. *Acta Biomater.* 11, 412–434.
- Li, M., Liu, X., Liu, X., Ge, B., 2010. Calcium phosphate cement with BMP-2-loaded gelatin microspheres enhances bone healing in osteoporosis: a pilot study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468, 1978–1985.
- Li, Y., Yan, M., Wang, Z., Zheng, Y., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yu, J., 2014. 17 β -estradiol promotes the odontogenic/osteogenic differentiation of stem cells from apical papilla via mitogen-activated protein kinase pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 125.
- Liao, J., Zhou, Z., Huang, L., Li, Y., Li, J., Zou, S., 2016. 17 β -estradiol regulates the differentiation of cementoblasts via Notch signaling cascade. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 477, 109–114.
- Lin, H.R., Sung, K.C., Vong, W.J., 2004. In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. *Biomacromolecules* 5, 2358–2365.
- Martín del Valle, E.M., Herrero, E.P., Martins, D.A.O., Galán, M.A., 2009. Immobilisation of cells in biocompatible films to cell therapy. *Open Tissue Eng. Regen. Med. J.* 2, 14–19.
- Martínez-Sanz, E., Ossipov, D.A., Hilborn, J., Larsson, S., Jonsson, K.B., Varghese, O.P., 2011. Bone reservoir: injectable hyaluronic acid hydrogel for minimal invasive bone augmentation. *J. Control. Release* 152, 232–240.
- Namkung-Matthai, H., Appleyard, R., Jansen, J., Hao Lin, J., Maastricht, S., Swain, M., Mason, R.S., Murrell, G.A.C., Diwan, A.D., Diamond, T., 2001. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 28, 80–86.
- Okada, H., Takahashi, K., Ogura, N., Tomoki, R., Ito, K., Kondoh, T., 2016. Plasma rich in growth factors stimulates proliferation, migration, and gene expression associated with bone formation in human dental follicle cells. *J. Dent. Sci.* 11, 245–252.
- Oliver, R.A., Yu, Y., Yee, G., Low, A.K., Diwan, A.D., Walsh, W.R., 2013. Poor histological healing of a femoral fracture following 12 months of oestrogen deficiency in rats. *Osteoporos. Int.* 24, 2581–2589.
- Orive, G., De Castro, M., Kong, H.-J., Hernández, R.M., Ponce, S., Mooney, D.J., Pedraz, J.L., 2009. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. *J. Control. Release* 135, 203–210.
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., 2015. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* 16, 213–232.
- Park, S.B., Park, S.H., Kim, N.H., Chung, C.K., 2013. BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporosis model. *Spine J.* 13, 1273–1280.
- Qiu, X., Jin, X., Shao, Z., Zhao, X., 2014. 17 β -Estradiol induces the proliferation of hematopoietic stem cells by promoting the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tohoku J. Exp. Med.* 233, 141–148.
- Rey-Rico, A., Silva, M., Couceiro, J., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., 2011. Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. *Eur. Cells Mater.* 21, 317–340.
- Rodríguez-Agírrete, I., Freire, V., Muruzabal, F., Orive, G., Anitua, E., Díez-Feijóo, E., Acera, A., 2017. Subconjunctival PRGF fibrin membrane as an adjuvant to non-penetrating deep sclerectomy: a 2-year pilot study. *Ophthalmic Res.* 59, 45–52.
- Rodríguez-Évora, M., Delgado, A., Reyes, R., Hernández-Daranas, A., Soriano, I., San Román, J., Évora, C., 2013. Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 873–884.
- Rodríguez-Évora, M., Reyes, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A., Delgado, A., Évora, C., 2014. Bone regeneration induced by an in situ gel-forming poloxamine, bone morphogenetic protein-2 system. *J. Biomed. Nanotechnol.* 10, 959–969.
- Segredo-Morales, E., García-García, P., Évora, C., Delgado, A., 2017. BMP delivery systems for bone regeneration: healthy vs osteoporotic population. *Rev. J. Drug Deliv. Sci.* 42, 107–118.
- Segredo-Morales, E., Martín-Pastor, M., Salas, A., Évora, C., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., Delgado, A., 2018a. Mobility of water and polymer species and rheological properties of supramolecular polypseudorotaxane gels suitable for bone regeneration. *Bioconj. Chem.* 29, 503–516.
- Segredo-Morales, E., Reyes, R., Arnau, M.R., Delgado, A., Évora, C., 2018b. In situ gel-forming system for dual BMP-2 and 17 β -estradiol controlled release for bone regeneration in osteoporotic rats. (Manuscript under revision).
- Shi, S., Zheng, S., Li, X.F., Liu, Z.D., 2017. The effect of estradiol on the growth plate chondrocytes of limb and spine from postnatal mice in vitro: the role of estrogen-receptor and estradiol concentration. *Int. J. Biol. Sci.* 13, 100–109.
- Vaquero, V., Padilla, S., Aguirre, J.J., Begoña, L., Orive, G., Anitua, E., 2017. Two cycles of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) intra-articular injections improve stiffness and activities of daily living but not pain compared to one cycle on patients with symptomatic knee osteoarthritis. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* 1–7.
- Wang, N., Adams, G., Buttery, L., Falcone, F.H., Stolnik, S., 2009. Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. *J. Biotechnol.* 144, 304–312.
- Wang, Y., Li, M., Zhang, H., Tang, M., Guo, C., Deng, A., Chen, Y., Xiao, L., 2016. Opposite Function of ER α and ER β in controlling 17 β -Estradiol-mediated osteogenesis in osteoblasts. *Arch. Med. Res.* 47, 255–261.
- Wu, Z.X., Liu, D., Wan, S.Y., Zhang, Y., Lei, W., Cui, G., 2011. Sustained-release rhBMP-2 increased bone mass and bone strength in an ovine model of postmenopausal osteoporosis. *J. Orthop. Sci.* 16, 99–104.
- Zarrinkalam, M.R., Schultz, C.G., Arderm, D.W., Vernon-Roberts, B., Moore, R.J., 2013. Recombinant human bone morphogenetic protein-type 2 (rhBMP-2) enhances local bone formation in the lumbar spine of osteoporotic sheep. *J. Orthop. Res.* 31, 1390–1397.