

Uso de nanopartículas de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) como sistema de liberación sostenida del factor de crecimiento transformante $\beta 3$ en la regeneración del cartílago.

Ana I. Rodríguez Cendal^{1,2,3}, María Piñeiro Ramil^{1,2,3}, José Señarís Rodríguez^{1,2,3,4}, Tania María Sampayo Roca^{1,2,3}, Loreto Cabarcos Mouzo⁵, María D. Veiga Barbazán⁵, Francisco J. De Toro Santos^{1,2,6,7}, Isaac M. Fuentes Boquete^{1,2,3,7}, Silvia M. Díaz Prado^{1,2,3,7,*}

1. Universidade da Coruña, Grupo de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, 15071 A Coruña, España. **2.** Fundación Pública Galega de Investigación Biomédica, Grupo de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Instituto de Investigación Biomédica A Coruña (INIBIC), Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Servizo Galego de Saúde (SERGAS), 15071 A Coruña, España. **3.** Universidade da Coruña, Grupo de Investigación en Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Centro Interdisciplinar de Química e Bioloxía (CICA), 15071 A Coruña, España. **4.** Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Servizo Galego de Saúde (SERGAS), 15071 A Coruña, España. **5.** Universidade da Coruña, Grupo de Investigación en Bioingeniería Ambiental y Control de Calidad (BIOENGIN), Centro Interdisciplinar de Química y Biología (CICA), 15071 A Coruña, España. **6.** Servicio de Reumatología. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), Servizo Galego de Saúde (SERGAS), 15071 A Coruña, España. **7.** Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), 28029 Madrid, España. * s.diaz1@udc.es.



INTRODUCCIÓN

El uso de nanopartículas (NPs) de polihidroxialcanoato (PHA) como sistema de encapsulación y liberación de fármacos proporciona una mejor estabilidad física y química, protección de la molécula encapsulada, mayor biodisponibilidad, reducción de las fluctuaciones en la concentración sanguínea del principio activo, liberación controlada y penetración en tejidos y barreras específicas en comparación con los métodos actuales. Las características de estos materiales los hacen adecuados para su uso en biomedicina (biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad) y pueden proceder de subproductos industriales, contribuyendo así a abordar problemas medioambientales. En este estudio, la molécula encapsulada fue el factor de crecimiento transformante $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$), que participa en la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales (CMMs).

OBJETIVO Y METODOLOGÍA

Evaluar la utilidad de las NPs de PHA como sistema de liberación sostenida de TGF- $\beta 3$. Se evaluó la **citotoxicidad de extractos** de PHA en queratinocitos humanos (HaCaT) mediante ensayo MTT, siguiendo la norma ISO 10993-12:2021, con controles positivos y negativos. La **liberación de TGF- $\beta 3$** a través de las NPs de PHA se estudió en medio de diferenciación condrogénico sin células durante 28 días y se analizó mediante ELISA. La eficacia biológica se analizó en **estudios de diferenciación celular de CMMs a condrocitos en cultivos 2D y 3D** mediante inmunofluorescencia para detectar colágenos tipo I (COL I) y II (COL II) y tinciones histológicas con Safranina O (SO) y Tricrómico de Masson (TM), respectivamente. Se **generaron constructos condrogénicos** en andamios de colágeno tipo I con CMMs y se aplicaron a un **modelo *in vitro* de reparación de cartílago humano** donde se evaluó la reparación mediante histoquímica (SO, TM), inmunohistoquímica (COL I, COL II, agrecano (ACAN), antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA)) y la escala modificada ICRS II.

RESULTADOS

En el **estudio de citotoxicidad**, el biomaterial purificado con cloroformo y etanol, ya sea por precipitación simple (85,69% \pm 14,17%) o segunda precipitación (87,71% \pm 3,58%), no mostró citotoxicidad (**figura 1**).

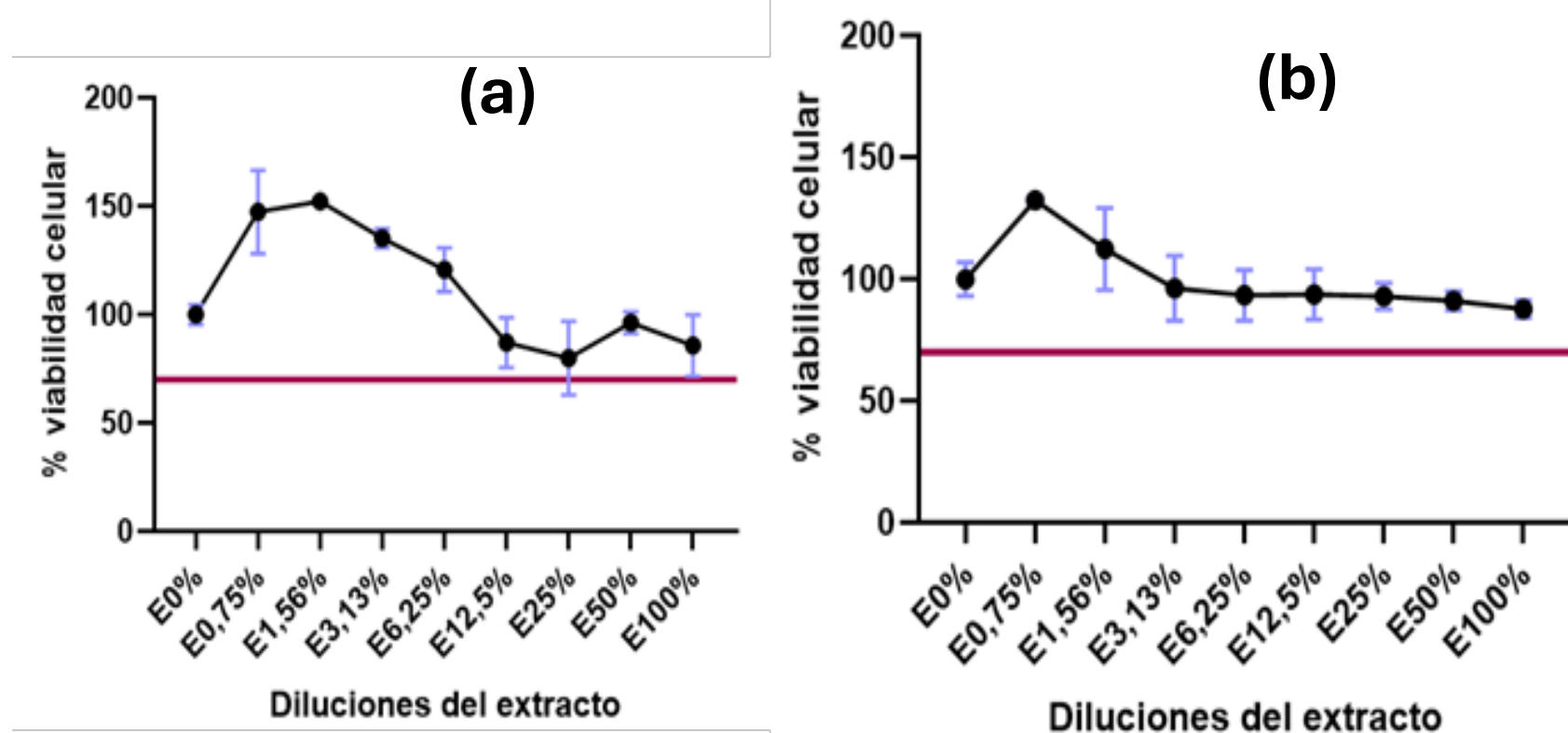


Figura 1. Viabilidad celular (%). **(a)** Biomaterial purificado por precipitación única con cloroformo y etanol al 86%; **(b)** Biomaterial purificado por una segunda precipitación con cloroformo y etanol al 86%.

La **liberación de TGF- $\beta 3$** muestra un pico máximo de 235 pg/ml en el día 4, seguido de una disminución progresiva hasta el día 16 y una liberación fluctuante posterior, con una media diaria de 143,21 \pm 41,07 pg/ml (**figura 2**).

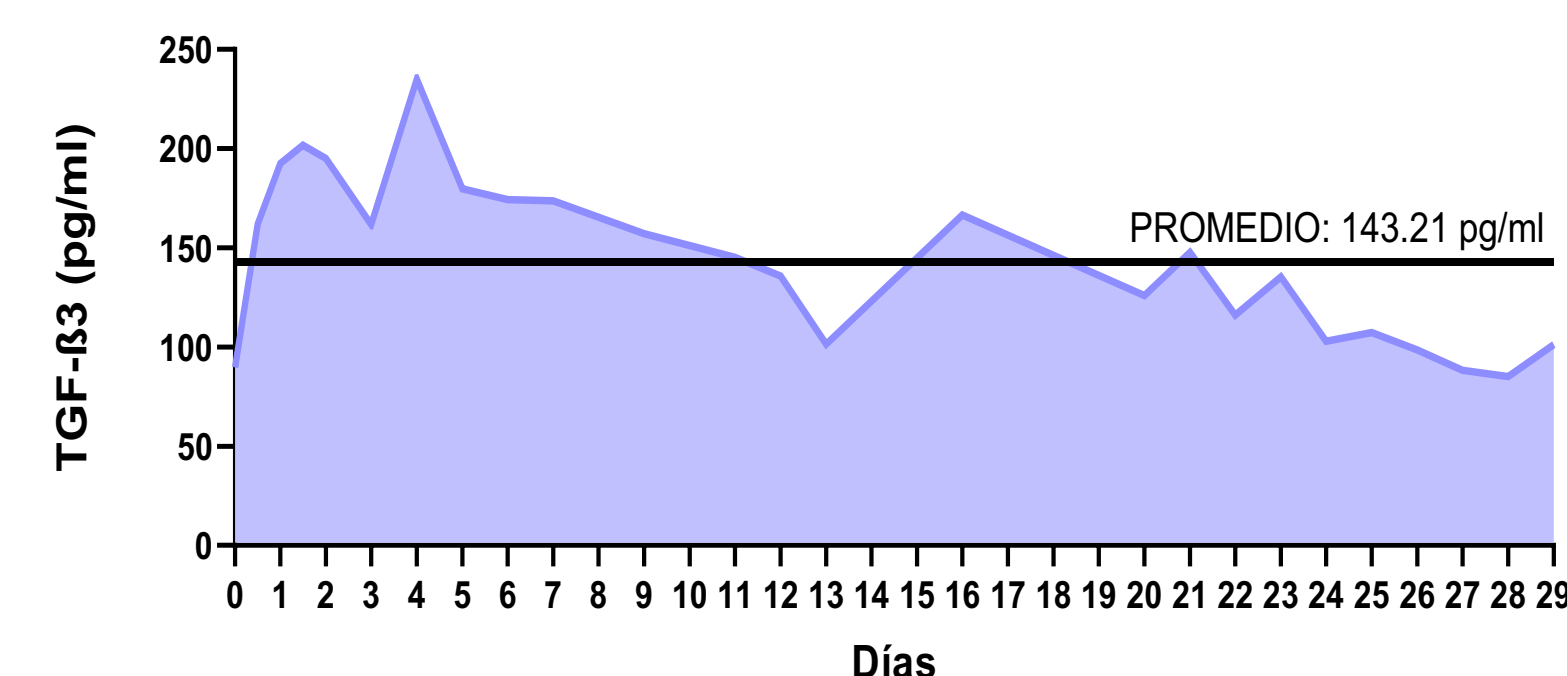


Figura 2. Perfil de liberación del TGF- $\beta 3$ durante 29 días.

En la **diferenciación en 2D** el análisis de inmunofluorescencia mostró que las células tratadas con NPs de TGF- $\beta 3$ tuvieron mayor intensidad integrada normalizada en unidades arbitrarias (a.u.) para COL II (3,07 \pm 0,33 u.a.) frente al control positivo con TGF- $\beta 3$ libre (1,38 \pm 0,07 u.a.). Para COL I, el control positivo mostró valores mayores (1,38 \pm 0,20 u.a.) comparado con las NPs de TGF- $\beta 3$ (0,77 \pm 0,07 u.a.) (**figura 3**).

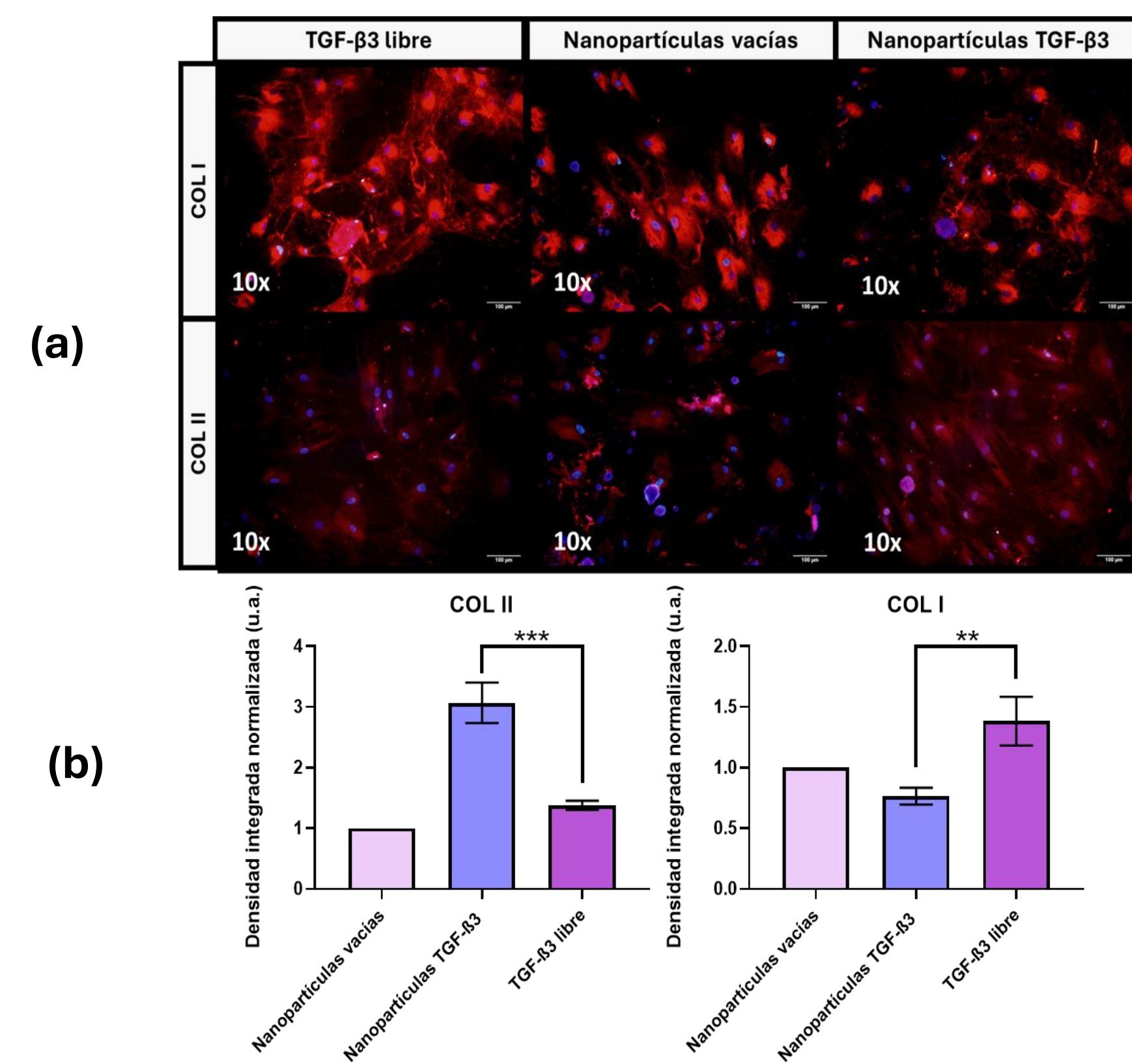


Figura 3. **(a)** Inmunofluorescencia en diferentes condiciones: tratamiento con TGF- $\beta 3$ libre, NPs vacías y NPs cargadas con TGF- $\beta 3$; **(b)** Densidad integrada normalizada a NPs vacías para las diferentes condiciones: tratamiento con TGF- $\beta 3$ libre y NPs cargadas con TGF- $\beta 3$.

En la **diferenciación en 3D** la tinción con TM indicó más áreas teñidas con colágeno en micromasas tratadas con NPs de TGF- $\beta 3$ (36,20 \pm 4,01%) frente a las NPs vacías (10,54 \pm 2,83%), mientras que la safranina SO evidenció una mayor producción de proteoglicanos con NPs de TGF- $\beta 3$ (45,66 \pm 3,70%) frente a NPs vacías (10,40 \pm 0,61%) (**figura 4a**). Además, se observaron lagunas pericelulares (**Figura 4b**).

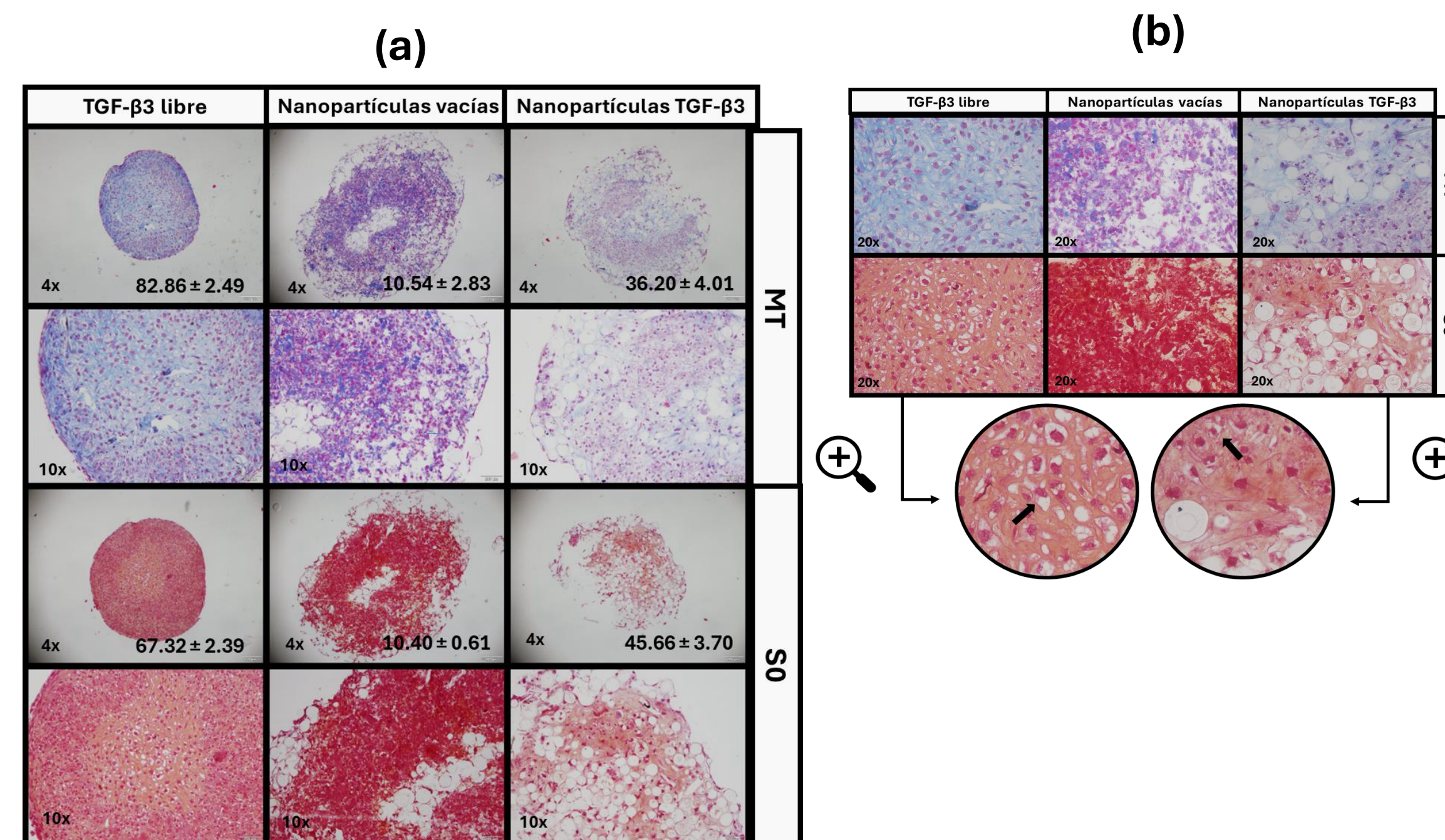


Figura 4. **(a)** Tinción histológica de TM y SO de micromasas cultivadas en diferentes condiciones: tratamiento con TGF- $\beta 3$ libre, NPs vacías y NPs cargadas con TGF- $\beta 3$. Todos los datos mostrados en las imágenes son en % de área coloreada; **(b)** laguna pericelular del grupo TGF- $\beta 3$ libre y NPs cargadas con TGF- $\beta 3$.

En el **modelo *in vitro* de reparación de cartílago humano** se observó en el grupo NPs de TGF- $\beta 3$ mayor presencia de proteoglicanos y colágeno (**figura 5a**) y mayor cantidad de COL II, ACAN, igual de PCNA y menor de COL I asociado a la formación de fibrocartílago (**figura 5c**). En el modelo *in vitro*, la puntuación ICRS II fue superior en lesiones tratadas con NPs de TGF- $\beta 3$ (61%) frente al control positivo (54%) y las NPs vacías (53%) (**figura 5b**).

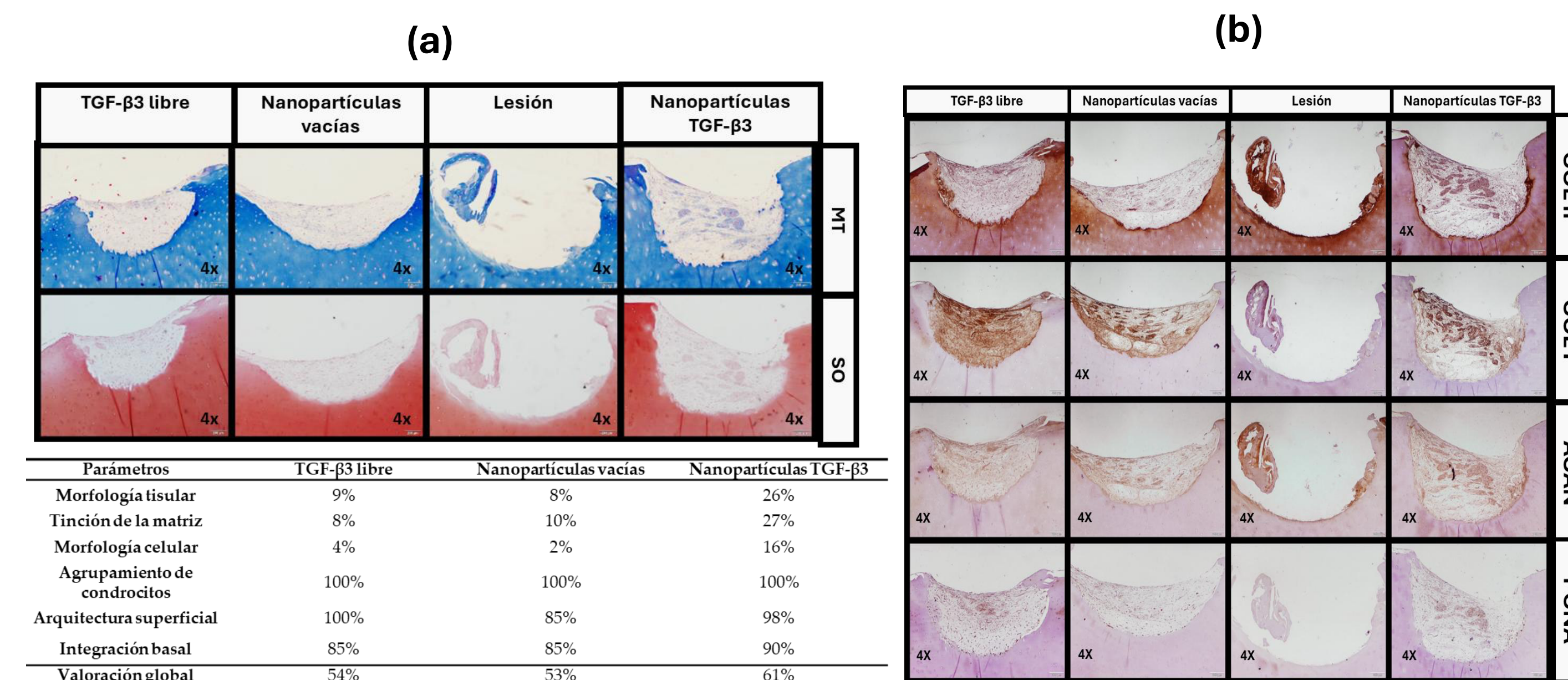


Figura 5. **(a)** Tinción histológica de TM y SO realizada en el modelo de reparación *in vitro* cultivado en diferentes condiciones: lesión de control, tratamiento con TGF- $\beta 3$ libre, NPs vacías y NPs cargadas con TGF- $\beta 3$; **(b)** Evaluación obtenida en el modelo de reparación *in vitro* basado en la escala ICRS II modificada; **(c)** Tinción inmunohistoquímica para COL I, COL II, ACAN y PCNA para las mismas condiciones que las tinciones histológicas.

CONCLUSIONES

Las NPs purificadas con cloroformo y etanol al 86% no fueron citotóxicas y permitieron una liberación sostenida del factor. Las CMMs mantuvieron su viabilidad, proliferaron y se diferenciaron a condrocitos en presencia de las NPs, sintetizando matriz rica en proteoglicanos y colágeno. En un modelo *in vitro* de reparación de cartílago humano, una sola dosis encapsulada fue igual o más eficaz que múltiples dosis libres, promoviendo COL II y ACAN, y reduciendo COL I asociado a fibrosis.

AGRADECIMIENTOS

Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) “Una manera de hacer Europa” (PI20/00933), ayudas para proyectos Semilla-Disruptivos entre grupos del CICA 2021 (POLIBIOMED) de la Universidade de A Coruña, Grupos con Potencial de Crecimiento, Xunta de Galicia (ED431B 2020/55 y ED431B 2023/58) y Fundación Pública Galega de Investigación Biomédica (INIBIC), proyectos de Desarrollo y Transferencia 2022 y 2024. También queremos agradecer al Biobanco de A Coruña por la cesión de las muestras, así como a Sara Paniagua Barro por su colaboración en la realización de algunos de los cortes utilizados para las tinciones.

