

# “Ingeniería de tejidos”: contribución de los polímeros al desarrollo de los procesos de regeneración tisular

**Julio San Román<sup>1</sup>, Alberto Gallardo<sup>1</sup>, Blanca Vázquez<sup>1</sup>, Antonio López Bravo<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC. Juan de la Cierva, 3 - 28006 Madrid*

<sup>2</sup>*Hospital Provincial de Ávila. Jesús del Gran Poder. Ávila*

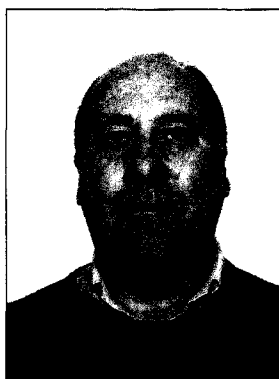
**L**a Ingeniería de Tejidos "Tissue Engineering" constituye una disciplina relativamente nueva y un campo de investigación y desarrollo interdisciplinario que aplica los conocimientos de la bioingeniería, ciencias de la vida, química, física y biología, para resolver problemas clínicos y quirúrgicos asociados a la pérdida de tejido o al fallo funcional de órganos (1). Aprovecha los principios de ingeniería de transporte, fenómenos de reacciones superficiales, así como métodos de análisis aplicados a los complejos procesos biológicos que se suceden en el desarrollo y reparación de tejidos biológicos. Para ello, es necesario el conocimiento de la estructura molecular de sustratos y su relación con las reacciones bioquímicas que se producen.

Las especies normalmente implicadas en la ingeniería de tejidos son células vivas, así como sus componen-

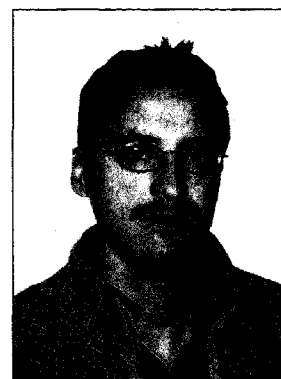
tes extracelulares que participan en el desarrollo de dispositivos que permitan y estimulen o favorezcan la reparación o restauración de un órgano o tejido dañado (2,3). La idea de utilización de sustitutos de componentes o tejidos biológicos para reparar o reemplazar elementos dañados es tan antigua como la historia misma. Existen referencias descritas en tratados de medicina con más de 4000 años de antigüedad, pues médicos especialistas de la antigua India ya describían el uso de diversos materiales para el tratamiento de diversas alteraciones faciales (1).

La regeneración y la sustitución de tejidos no funcionales se desarrollan en base a estrategias que emplean como medio algún sistema polimérico, ya sea de origen natural o artificial, siendo las de mayor importancia las siguientes (4):

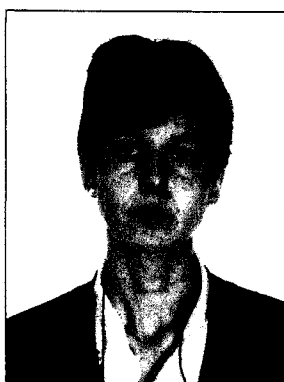
- Sustitución con materiales tanto bioestables como biodegradables, de origen natural o sintético. Algunos ejemplos con muchos años de aplicación son las válvulas cardíacas de disco oscilante recubiertas con una capa de



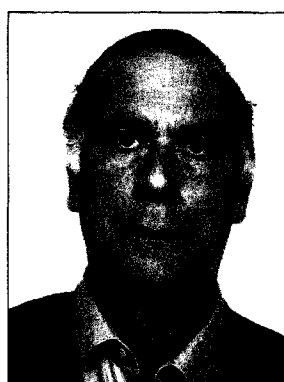
Julio San Román



Alberto Gallardo



Blanca Vázquez



Antonio López Bravo

grafito, que presentan una superficie perfectamente pulida en contacto con la sangre, o injertos vasculares de Goretex (politetrafluoretileno poroso) o de Dacron (polietileno tereftalato tejido o trenzado) que constituyen vasos sanguíneos artificiales y que sirven como soportes que, en circunstancias favorables, pueden proporcionar el medio adecuado para la formación de una capa íntima de células endoteliales y reproducir con ello la situación natural del tejido no dañado.

- Xenoinjertos obtenidos a partir de tejidos animales, que se tratan químicamente para estabilizarlos y evitar en lo posible las reacciones inmunológicas propias de cuerpos extraños. Un ejemplo claro de ello son las válvulas aórticas de tejido porcino tratadas con glutaraldehído.

- Encapsulación de células en cámaras de difusión, microcápsulas o sustra-

***En este artículo pretendemos presentar los principios de diseño y el desarrollo de sistemas poliméricos que en la mayoría de los casos han de utilizarse para conseguir una regeneración tisular, ya sea mediante el cultivo celular o mediante la aplicación de sistemas en el propio organismo humano, o la aplicación eficaz de estimulantes o factores de crecimiento, de enorme importancia en los procesos de regeneración tisular.***

tos reabsorbibles. Un ejemplo claro es el cultivo de condrocitos para reparar tejidos osteocondrales de articulaciones, o el cultivo de osteoblastos para regeneración de tejido óseo.

- Aplicación "in situ" de sustancias específicas conocidas como factores de crecimiento que en combinación con un soporte adecuado puedan utilizarse como sistemas de vectorización y de dosificación controlada en zonas del

factores de crecimiento, de enorme importancia en los procesos de regeneración tisular.

Desde un punto de vista puramente estructural, todo sistema que deba utilizarse como soporte para conseguir un crecimiento celular tridimensional y aprovechar los productos que las propias células generan para ir recomponiendo un entramado tisular, es decir la matriz extracelular, debe tener unas

características específicas que son esenciales para conseguir las funciones de nutrición celular, división y multiplicación, generación, ordenación y consolidación de tejido. Estas características son menos rígidas cuando se trata de aplicar "in vivo" sistemas que activen la regeneración tisular en el propio individuo, mediante el aporte de los factores de crecimiento. En cual-

quier caso, existe una premisa que se considera hoy día necesaria y es la dualidad Biocompatibilidad - Biodegradabilidad. Como muestra el esquema de la Figura 1, la biocompatibilidad está muy relacionada con la actividad superficial, pues de ello depende que el sistema polímero/células/matriz extracelular, o el sistema polímero/factor de crecimiento sea aceptado o rechazado por el receptor. Además de ello, cualquier diseño debe presentar buenas características biofuncionales pues como soporte debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener unas condiciones óptimas del proceso regenerativo, pero junto a ello debe poseer un carácter biodegradable de tal forma que cuando se ha logrado un entramado celular adecuado, es decir una vez cumplida su misión de soporte, debe desaparecer por biodegradación o por bioreabsorción. En este sentido es fundamental conocer los mecanismos biodegradativos que conducen a la desintegración del polímero soporte, así como la naturaleza de los productos que se generan como consecuencia del proceso degradativo junto con los efectos tanto a nivel local como a nivel sistémico que puedan provocar, y las vías de eliminación del medio en donde se aplican.

Históricamente, los biomateriales poliméricos utilizados como soportes, matrices o andamiajes, fueron obtenidos a partir de fuentes de origen natural, tales como colágeno, gelatina, seda, algodón y derivados de almidón. El desarrollo de la Química Macromolecular contribuyó a conseguir lo que se llamó primera generación de polímeros biomédicos. La utilización de materiales poliméricos tales como el polietileno, politetrafluoretileno, algunos polímeros acrílicos, poliésteres de la familia del politereftalato de etilenglicol, poliamidas, poliuretanos, o cauchos de silicona, fue consecuencia de una adaptación de materiales de uso muy generalizado en la década de los 50 y 60, más que producto del desarrollo de polímeros específicamente diseñados para aplicaciones quirúrgicas. Sin embargo, durante algún tiempo han demostrado su utilidad y sobre todo su necesidad como soportes en los procesos de regeneración tisular y en los de crecimiento

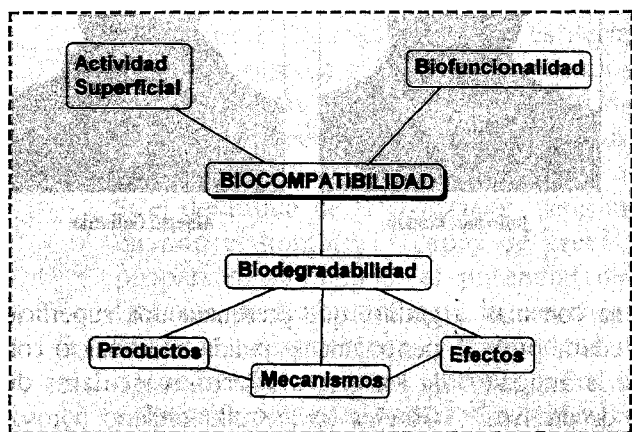


Figura 1: Factores mas importantes que afectan al carácter biocompatible de materiales.

organismo humano donde son necesarios. Existen muchos ejemplos de estos sistemas, como la aplicación del factor TGF-β en combinación con colágeno que estimula notablemente los procesos de cicatrización de heridas y quemaduras.

En este artículo pretendemos presentar los principios de diseño y el desarrollo de sistemas poliméricos que en la mayoría de los casos han de utilizarse para conseguir una regeneración tisular, ya sea mediante el cultivo celular o mediante la aplicación de sistemas en el propio organismo humano, o la aplicación eficaz de estimulantes o

quiere caso, existe una premisa que se considera hoy día necesaria y es la dualidad Biocompatibilidad - Biodegradabilidad. Como muestra el esquema de la Figura 1, la biocompatibilidad está muy relacionada con la actividad superficial, pues de ello depende que el sistema polímero/células/matriz extracelular, o el sistema polímero/factor de crecimiento sea aceptado o rechazado por el receptor. Además de ello, cualquier diseño debe presentar buenas características biofuncionales pues como soporte debe ofrecer la suficiente estabilidad e integridad para mantener unas condiciones óptimas

celular. Su carácter no biodegradable obligó a desarrollar nuevos sistemas que permitieran ofrecer esta cualidad, de tal forma que la investigación y desarrollo en este campo está en la actualidad muy dirigida hacia la preparación y utilización de sistemas biodegradables, teniendo en cuenta las características esenciales que se han mencionado anteriormente. El potencial de los materiales poliméricos biodegradables fue reconocido ya en la década de los 60 cuando diferentes sistemas de alto peso molecular preparados a base de poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y copolímeros, demostraron buenas propiedades y adecuada respuesta "in vivo" sobre todo en aplicaciones como hilos de sutura multifilamento reabsorbibles (5,6). Así mismo, varios materiales de origen natural como algunos tipos de colágeno y combinaciones de ellos con ácido hialurónico, y derivados de quitosano, están demostrando su eficacia en el diseño y desarrollo de sistemas soporte de pieles artificiales de excelente comportamiento en grandes quemados, así como en soportes para regeneración "in situ" de nervios periféricos (7,8). El potencial desarrollo de este apasionante campo es enorme, y con frecuencia se pueden encontrar espectaculares referencias en los medios de comunicación social, ya sea prensa escrita, radio o televisión, en donde es cada día más frecuente encontrar noticias relacionadas con la regeneración de tejidos y órganos humanos, ofreciendo esperanzas prometedoras a un buen número de pacientes y afectados cuya calidad de vida puede verse mejorada sensiblemente. No obstante, es necesario ser sensatos y considerar que estamos asistiendo a la infancia de la ingeniería tisular, y que al margen de las noticias espectaculares, es necesario desde un punto de vista científico ajustarse a los planteamientos razonados de un desarrollo congruente con el comportamiento de los nuevos biomateriales poliméricos.

Haciendo un breve repaso de los sistemas poliméricos más utilizados en la actualidad, podemos considerar dos

grandes grupos que describiremos a continuación: Polímeros de origen natural y sus modificaciones y sistemas poliméricos sintéticos. Aunque es difícil plantear una clasificación diferenciada de ambas familias, ya que en la actualidad se recurre a la utilización de mezclas, y sistemas compuestos de ambos tipos, consideraremos esta clasificación con objeto de conseguir una exposición organizada de esta revisión.

## MATERIALES POLIMÉRICOS DE ORIGEN NATURAL Y SUS MODIFICADOS

Polímeros naturales a base de proteínas como el colágeno, albúmina, seda o gelatina, se están modificando químicamente por diferentes vías para mejorar su resistencia mecánica o adecuar su velocidad de degradación y por lo tanto de reabsorción a los procesos de regeneración tisular, crecimiento celular, o dosificación controlada y dirigida. Una de las reacciones más tradicionales es el entrecruzamiento con dialdehidos, principalmente glutaraldehido, para conseguir sistemas débilmente entrecruzados que pueden ser moldeados con formas y perfiles adecuados a su aplicación. Además de ello, puede conseguirse un control de la densidad, o de la porosidad y textura de los materiales entrecruzados, para modular su velocidad de degradación, lo que ha proporcionado un medio adecuado y bien tolerado para el desarrollo de las denominadas "Pieles Artificiales" (7, 8). La Figura 2 muestra esquemáticamente las etapas de preparación de un sistema espumado a base de colágeno entrecruzado con glutaraldehido y sembrado "in vitro" con fibroblastos y queratinocitos, para conseguir una piel sintética a partir de las células de un

paciente que lo necesite. En unas pocas semanas, tres o cuatro, es posible disponer de una superficie de este sistema con multiplicación celular suficiente para conseguir una buena regeneración epidérmica. Los pasos que se necesitan no están exentos de riesgos, pues uno de los factores necesarios es la esterilidad, que garantiza unas condiciones asépticas apropiadas, lo que exige unos estrictos controles ya que los sistemas tienen que ser a menudo manipulados para seguir mantener un medio rico en nutrientes y conseguir el desarrollo celular necesario en el mínimo tiempo posible. El resultado de todo el proceso es una piel semisintética, con los ingredientes celulares adecuados a cada paciente, para conseguir una regeneración del tejido sin recurrir a injertos, como la que se muestra en la Figura 3. En este caso corresponde a un sistema al que además se le ha agregado ácido hialurónico, un polisacárido que en asociación con el colágeno forma sistemas de enorme importancia desde el punto de vista biológico (9,10). Los nutrientes que se indican en el esquema de la Figura 2 pueden proceder inicialmente de un medio de cultivo, pero cuando se ha alcanzado

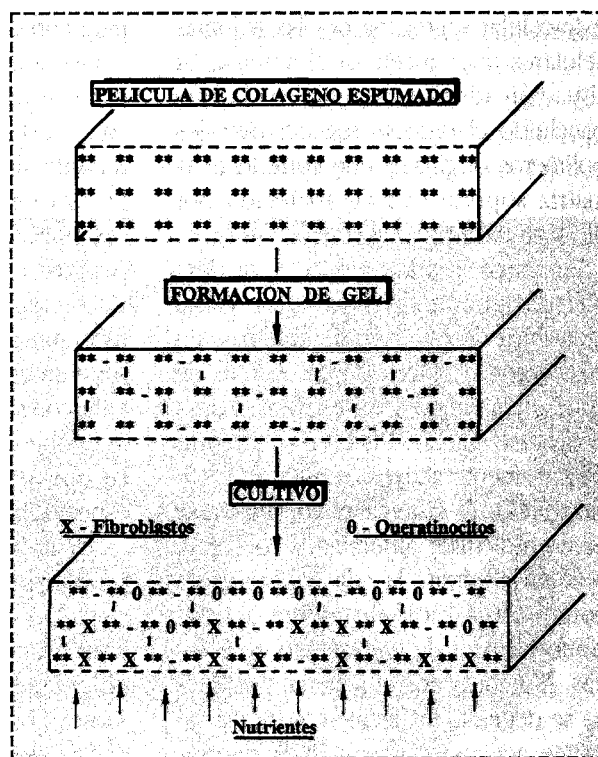


Figura 2: Esquema de diseño y preparación de membranas protectoras biodegradables utilizadas como "pieles artificiales".

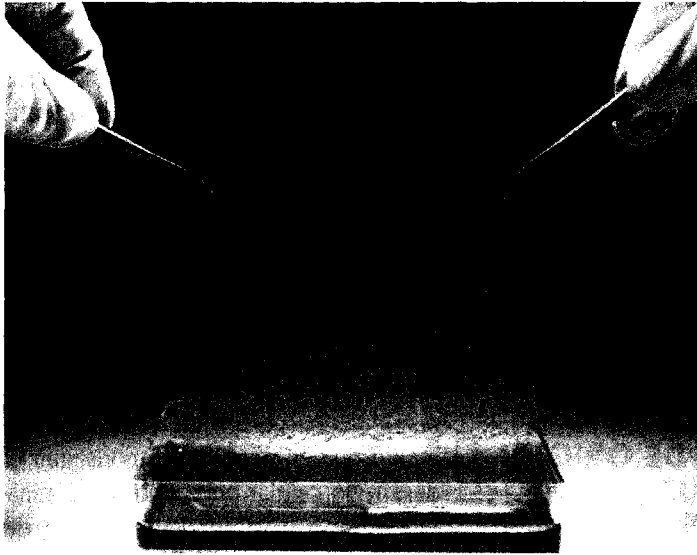


Figura 3: Piel artificial (Laser skin) preparada mediante siembra y cultivo de células epidérmicas humanas sobre soportes reabsorbibles de ácido hialurónico y colágeno.

un grado de multiplicación celular aceptable, puede ser implantado en contacto con el tejido epidérmico del paciente para que se culmine el proceso regenerativo con el desarrollo de vasos sanguíneos y finalmente de una verdadera piel. La utilización de los sistemas poliméricos biodegradables a base de colágeno-ácido hialurónico, proporciona el medio adecuado para que se vaya produciendo una sustitución de estos polímeros por matriz extracelular segregada por las colonias celulares que crecen en el sistema. La situación ideal es aquella en la que concluido el proceso regenerativo, los polímeros originales que constituían la matriz soporte han desaparecido por biodegradación y reabsorción.

En muchas ocasiones se considera necesario aumentar la estabilidad hidrolítica de este tipo de sistemas. En esos casos la utilización de agentes de entrecruzamiento más estables, como poli(etilen glicol), PEG, con extremos químicamente activos, resulta muy eficaz (9,11). El sistema puede utilizarse para entrecruzar albúmina o colágeno, y además admite la adición previa de compuestos biológicamente activos como factores de crecimiento o citokinas. A medida que el material polimérico se degrada, los elementos biológicamente activos se liberan para proporcionar la respuesta farmacológica adecuada. Algunas escuelas han diseñado

modificaciones de proteínas mediante reacción con agentes acilantes tales como cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo y anhídridos de ácidos carboxílicos portadores de grupos etilénicos, que una vez incorporados a las proteínas pueden ser entrecruzados por vía radicales libres con activación fotoquímica,

después de haberles adaptado a una geometría determinada. El sistema ha sido aplicado con bastante éxito en aplicaciones oftálmicas (12).

Mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética y de fermentación, se están produciendo proteínas del tipo de la seda expresando secuencias peptídicas bioactivas. Este tipo de materiales puede ser utilizado en forma de fibras, como recubrimientos o coextruidos con otros polímeros para conseguir sistemas de malla tejida o trenzada que pueden ser utilizados como soportes de regeneración tisular, con excelentes propiedades mecánicas, durante tiempos bastante largos (13). En esta misma línea, sistemas poliméricos biomiméticos a base de unidades peptídicas de elastina se han producido recientemente mediante técnicas recombinantes. Estas unidades pueden ser entrecruzadas bajo irradiación  $\beta$  o  $\gamma$  para conseguir películas mecánicamente estables y de naturaleza hidrofílica a las que se pueden incorporar células y especies bioactivas (14,15).

Los polisacáridos de carácter básico proporcionan sistemas muy utilizados por el organismo humano para diferentes funciones y pueden ser susceptibles de modificaciones muy interesantes. Los glucosaminoglicanos, en virtud de su elevada capacidad de hidratación y naturaleza ramificada, constituyen uno de los elementos tis-

lares principales para disipar cargas y proporcionar resistencia a la fricción. Por su gran importancia en los procesos biodinámicos, el propio ácido hialurónico, el sulfato de condroitina, la quitina y el quitosano se modifican químicamente para conseguir propiedades mecánicas aceptables y controlar su velocidad de degradación. Así, hidrogeles con un alto grado de hidratación pueden prepararse mediante el entrecruzamiento de glucosaminoglicanos con poli(etilen glicol) de medio o alto peso molecular (12). Las macromoléculas de glucosaminoglicanos se desacetilan para conseguir grupos amino libres que posteriormente se hacen reaccionar con cadenas de poli(etilen glicol) que contienen grupos terminales reactivos. En este sentido, nuestro grupo está desarrollando nuevos sistemas de quitosano obtenido a partir de caparazones de langosta, modificado por polimerización con ácido acrílico. El sistema polimérico formado es una red interpenetrada de poliácido acrílico en las macromoléculas de quitosano, en la que además se produce la formación de copolímeros de injerto, mediante reacciones de transferencia de las cadenas de poliácido acrílico en las unidades de glucopiranosas repetitivas del propio quitosano. En la Figura 4 se presenta una micrografía de una red interpenetrada de quitosano preparada mediante esta técnica. Estos sistemas se comportan como hidrogeles con un elevado poder de hidratación, pues llegan a grados de absorción superiores al 600 por cien, de tal manera que pueden dispersarse en forma de pequeñas partículas en un vehículo no acuoso, pero miscible con el agua, por ejemplo etanol y cuando se ponen en contacto con el medio fisiológico son capaces de captar un gran volumen de agua, con el consiguiente cambio de dimensiones, lo que puede ser utilizado para la formación de soportes biodegradables "in situ" que proporcionen un medio adecuado para la regeneración de tejido blando. Sistemas a base de ácido hialurónico modificado de forma parecida han sido descritos ampliamente en la bibliografía (16).

Polisacáridos de carácter ácido tales como la carboximetilcelulosa, carboximetilquitina, y carboximetilalmidón, han sido modificados por diferentes técnicas para aprovechar su carácter biodegradable y su excelente biocompatibilidad, y poder ser utilizados con eficacia como soportes de elementos biológicamente activos, ya sean factores de crecimiento o medicamentos específicos, así como soportes de multiplicación celular. Así, mezclas de estos polisacáridos con gelatina, a las que se les incorporan grupos acrilato o cinamato, permiten obtener hidrogeles entrecruzados por vía fotoquímica de excelentes propiedades (17).

El entrecruzamiento de polisacáridos puede realizarse con buen resultado

aprovechando interacciones de carácter iónico mediante la utilización de cadenas macromoleculares cargadas positiva o negativamente. En este sentido, resulta muy interesante la insolubilización de microcápsulas de alginato sódico cuando se ponen en contacto con soluciones que contienen iones divalentes. Cuando una solución de alginato sódico (un polisacárido de ácido manurónico y ácido glucurónico que se extrae de algas marinas) se pone en contacto con una solución que contiene sales cálcicas, de magnesio o de bario, se forma un complejo polimérico que precipita. Este mismo fenómeno se observa utilizando polímeros catiónicos como polilisina. Este fenómeno se está aprovechando efica-

zamente para conseguir la encapsulación de células con fines protectores desde el punto de vista inmunológico. La Figura 5 muestra la micrografía de islotes pancreáticos encapsulados en sistemas de alginato cálcico-polilisina. El sistema resulta muy eficaz para el mantenimiento activo de las células productoras de insulina, de tal forma que a estos

sistemas se les conoce como "páncreas artificial". El mismo protocolo puede ser aplicado a otras células como hepatocitos con buen resultado a corto o medio plazo. La enorme ventaja de estos sistemas es que pueden mantenerse en cualquier zona del organismo en contacto con el flujo sanguíneo. La cápsula de alginato-polilisina protege inmunológicamente el sistema y mantiene las condiciones adecuadas de nutrición y permeabilidad. No obstante, presentan una cierta rigidez, y su estabilidad a largo plazo resulta insuficiente, por lo que la vida media del sistema es bastante corta para pensar en su aplicación alternativa como productores de insulina en diabéticos (18, 19). No obstante la investigación en este campo es muy activa y se espera que en los próximos años se lleguen a plantear soluciones más eficaces.

Muy interesantes resultan los complejos poli-iónicos, PIC, que se forman por reacción de polielectrolitos con cargas opuestas como los representados en la Figura 6, que pueden formar cápsulas estables o fibras, dependiendo de la manipulación de las correspondientes soluciones. Ejemplos de ellos son los sistemas formados por polisacáridos de cargas opuestas como el gelano producido por *Pseudomonas Elodea*, cuya estructura química es la de un polímero aniónico formado por unidades de [(3)- $\beta$ -D-glucosa-(1,4)- $\beta$ -D-glucosa-(1,4)- $\alpha$ -L-ramnosa-(1)] con

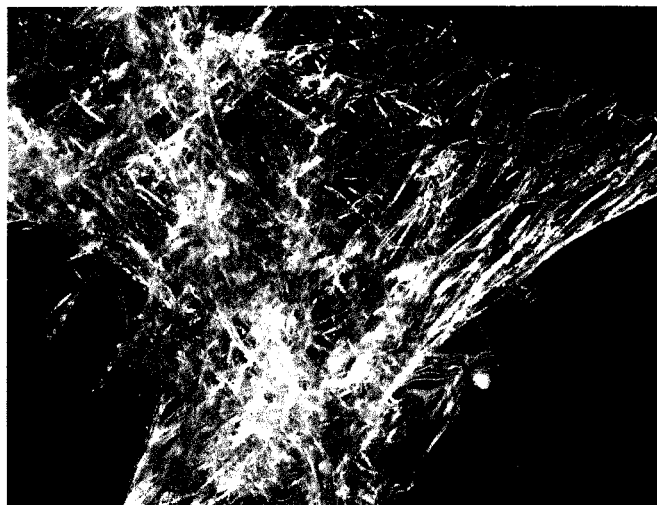


Figura 4: Sistema polimérico poroso altamente hidrofílico y biodegradable preparado por modificación de quitosano con poliácido acrílico.

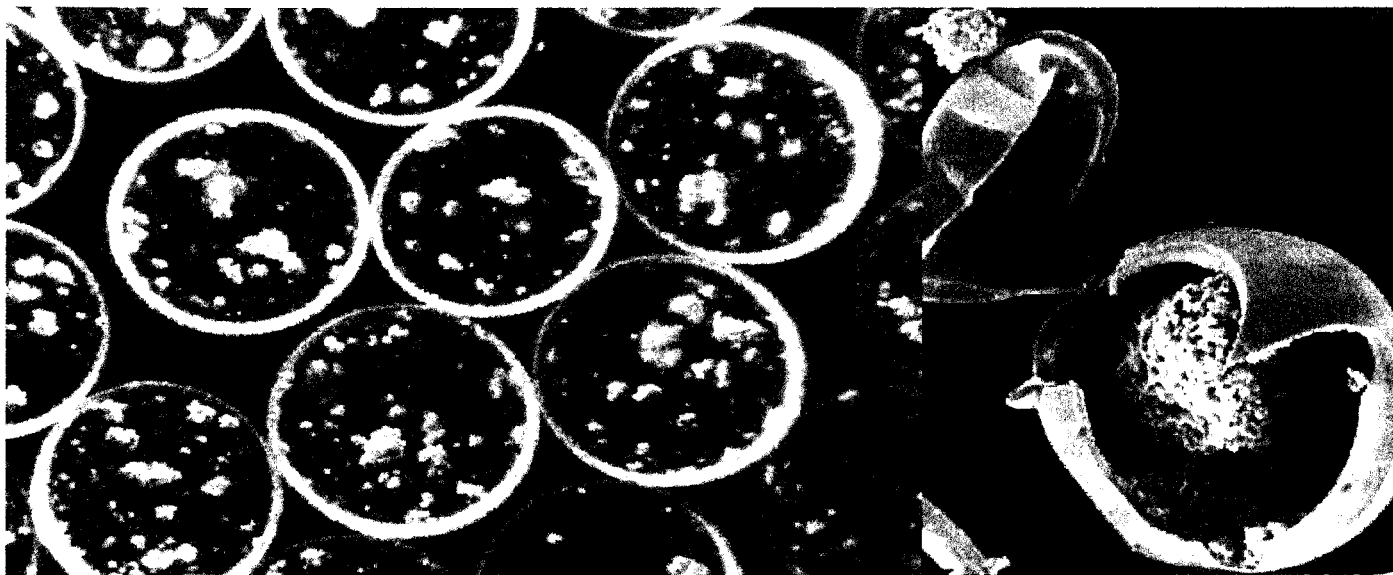


Figura 5: Encapsulación de islotes pancreáticos con alginato-polilisina.

quitosano [2-amino-2-deoxy-(1-4)-β-D-glucano]. El gelano nativo contiene grupos carboxílicos libres junto con un 3-6% de grupos O-acetilo, en forma de sales sódicas o potásicas, que interactúan eficazmente con los grupos amino libres de las cadenas de quitosano. Cuando una solución diluida de quitosano en ácido clorhídrico o en ácido acético, ajustando el pH entre 5 y 5,5, se agrega gota a gota sobre una solución de gelano a pH=6 y a una temperatura de 50°C con agitación moderada, se consiguen gotas estables dispersas en la solución de gelano. Su interior está constituido por quitosano, mientras que el exterior está formado por una película de gelano. Un tratamiento a 50°C durante el tiempo ade-

que puedan ofrecer un soporte para la regeneración tisular. El quitosano y derivados presentan una gran capacidad de formación de complejos poliiónicos con polímeros carboxílicos muy diversos. Recientemente hemos estudiado la formación de complejos iónicos entre polímeros acrílicos portadores de grupos tipo ácido salicílico como sustituyentes laterales, con quitosano de alto peso molecular. El sistema tiene una buena estabilidad y una capacidad de hinchamiento dependiente del pH pudiendo ofrecer buenas características no solo como soporte para regeneración y crecimiento celular, sino además como sistema bioactivo con propiedades farmacológicas asociadas al residuo de ácido salicílico.

entrecruzamiento covalente del polialcohol vinílico modificado y fotosensibilizado. De esta manera se consigue una excelente resistencia mecánica, estabilidad y propiedades permselectivas que no se podrían alcanzar por cualquiera de los dos métodos exclusivamente. El entrecruzamiento fotoquímico puede incluso realizarse cuando se aplica el sistema "in situ" (24).

## POLIMEROS SINTÉTICOS

El medio fisiológico humano reúne las condiciones apropiadas para que se puedan producir procesos hidrolíticos. Para ello los polímeros deben poseer enlaces hidrolíticamente inestables, y la reacción se debe poder realizar a pH fisiológico (entre 7,0 y 7,4) (25,26). Desde un punto de vista puramente químico, la reactividad hidrolítica a nivel molecular depende en primer lugar de la funcionalidad de los grupos orgánicos que forman la cadena principal de los sistemas poliméricos y que se repite de unas unidades a otras. La Figura 7 muestra un esquema en donde se representan las funciones más sensibles a los procesos hidrolíticos en condiciones fisiológicas. Grupos funcionales tales como carbonato o anhídridos de ácidos carboxílicos junto con enlaces tipo éster muestran una sensibilidad bastante alta a los procesos de hidrólisis, mientras que enlaces amida, ortoésteres o uretano son en principio menos sensibles. En el caso de sistemas macromoleculares, existen factores determinantes del proceso biodegradativo como son el carácter hidrofílico del sistema (polímeros hidrofílicos son siempre más sensibles que los hidrofóbicos), el grado de cristalinidad, ligado íntimamente con su morfología (los microdominios cristalinos son siempre menos sensibles que las fases amorfas, más accesibles), o incluso la forma y el tamaño del sistema soporte (sistemas porosos son más fácilmente degradables que los sistemas densos).

La familia de los poli(α-hidroxiácidos) y en particular poli(ácido D,L-láctico), PLA, poli(ácido glicólico), PGA, y sus copolímeros con composiciones

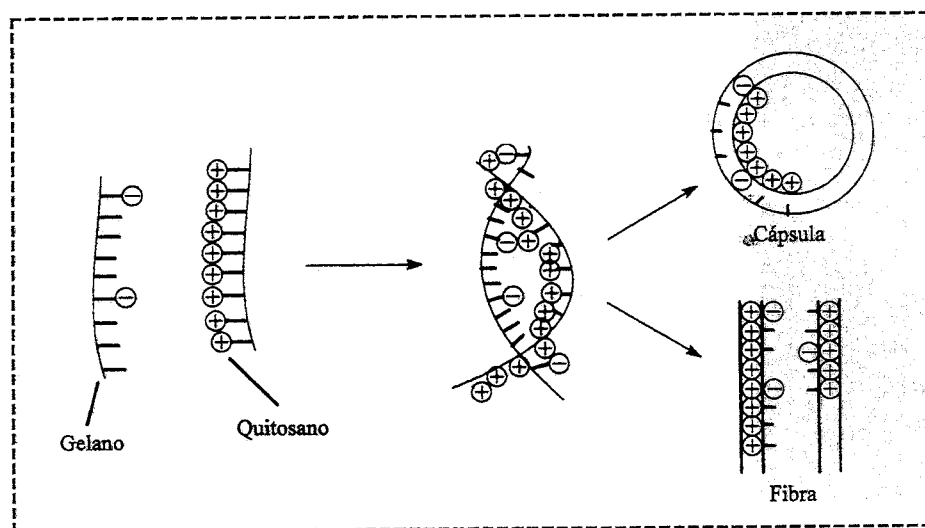


Figura 6: Formación de cápsulas y fibras con sistemas poliméricos cargados, con formación de complejos iónicos, PIC.

cuando proporciona perlas gelificadas, estables en el medio agitado y que incluso pueden ser manipuladas y lavadas, conservando una resistencia aceptable (20-22). Así mismo, la coextrusión de las soluciones y secado de las mismas proporciona fibras de PIC con buena resistencia mecánica, hidratables y por supuesto biodegradables. Ensayos mecánicos de tracción han dado valores de resistencia mecánica de nudos, mayores incluso que el algodón aunque menores que la seda (21). Estos sistemas por lo tanto pueden ofrecer buenas cualidades como encapsulantes celulares o de principios activos. A partir de las fibras se pueden fabricar mallas tejidas o trenzadas

Además de ello, el complejo polimérico se comporta como un sistema de liberación controlada de ácido salicílico en tiempos muy largos, lo que supone una propiedad interesante en muchas aplicaciones (23).

Algunos investigadores han comprobado que el entrecruzamiento combinado de cadenas poliméricas por vía de formación de complejos iónicos y enlaces covalentes, puede dar buen resultado en el diseño y aplicación de sistemas microencapsulados o de matrices hidrogeles de elevada capacidad de hidratación. Así, soluciones acuosas de alginato sódico/polialcohol vinílico pueden entrecruzarse por covalencia iónica del alginato y el



**Los sistemas poliméricos preparados a partir de los ácidos glicólico o láctico, ofrecen una interesante propiedad por la que se consideran materiales biodegradables y biocompatibles ya que el producto de biodegradación de sus polímeros y copolímeros son los correspondientes ácidos glicólico o láctico, que se eliminan del organismo a través del ciclo metabólico de Krebs como anhídrido carbónico y agua**

muy variadas, se están utilizando desde hace más de 10 años en ingeniería tisular como soportes o andamiajes para que se produzca una buena reproducción celular acompañada de la generación de matriz extracelular. Los sistemas poliméricos preparados a partir de los ácidos glicólico o láctico, ofrecen una interesante propiedad por la que se consideran materiales biodegradables y biocompatibles ya que el producto de biodegradación de sus polímeros y copolímeros son los correspondientes ácidos glicólico o láctico, que se eliminan del organismo

a través del ciclo metabólico de Krebs como anhídrido carbónico y agua (25).

Tanto el ácido láctico como el ácido glicólico conducen a polímeros de bajo peso molecular cuando se tratan de preparar por policondensación, pero sus propiedades mecánicas y su estabilidad hidrolítica depende en buena medida de su peso molecular, siendo necesario alcanzar pesos moleculares elevados para conseguir estabilidad hidrolítica y mecánica durante el tiempo necesario para obtener un buen proceso regenerativo. Por ello, como se muestra en el esquema I,

estos polímeros y sus correspondientes copolímeros se preparan por reacción de apertura de anillo del derivado cíclico hexagonal conocido como lactida o glicolida. La polimerización por apertura de anillo se consigue mediante la aplicación de catalizadores tales como trifluoruro de antimonio, cloruro de zinc, óxido de zinc, cloruro de estaño, aunque el más utilizado, aprobado hace bastantes

años por la FDA americana, es el octoato de estaño, 2-etil hexanoato de estaño, en proporciones de un 0,02 - 0,5% y a temperaturas de 130-150°C. Previamente, el correspondiente dímero cíclico puede obtenerse con bastante facilidad mediante la condensación de ácido glicólico o de ácido láctico. La copolimerización de lactida y glicolida proporciona copolímeros de variada composición y microestructura, desde sistemas tipo bloque hasta la distribución al azar de ambos tipos de unidades. Consecuentemente, las propiedades físico-químicas de los sistemas dependen de su microestructura, ya que tanto la flexibilidad o rigidez de las cadenas, como la morfología microcristalina (tamaño y distribución de cristalitas distribuidos en la matriz amorfa), dependen de ello. Estas propiedades han sido aprovechadas para el diseño de sistemas de porosidad controlada que han demostrado su eficacia como soportes para la regeneración tisular tanto de tejido conectivo como de tejido óseo, cartilaginoso o incluso como guías para la regeneración de nervios periféricos. La Figura 8 muestra la sección transversal de un tubo poroso confeccionado mediante una sencilla técnica de extrusión de una mezcla de copolímero L-GA con una composición 50/50, y cristales de sal común de tamaño seleccionado entre 200 y 300 µm. Los tubos extruidos con un diámetro exterior de 3 mm e interior de 1,5 mm se mantienen sumergidos en agua a temperatura ambiente durante 24 horas para solubilizar los cristales de sal consiguiendo una estructura con un 85% de porosidad (27). Resulta bastante interesante la aplicación de técnicas basadas en

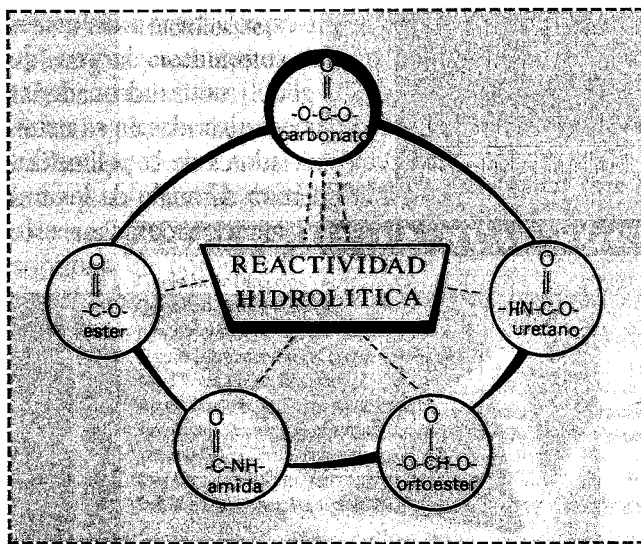
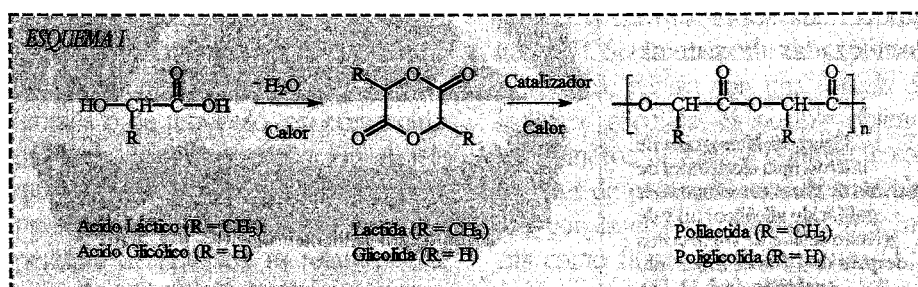


Figura 7: Sensibilidad hidrolítica de grupos funcionales orgánicos.



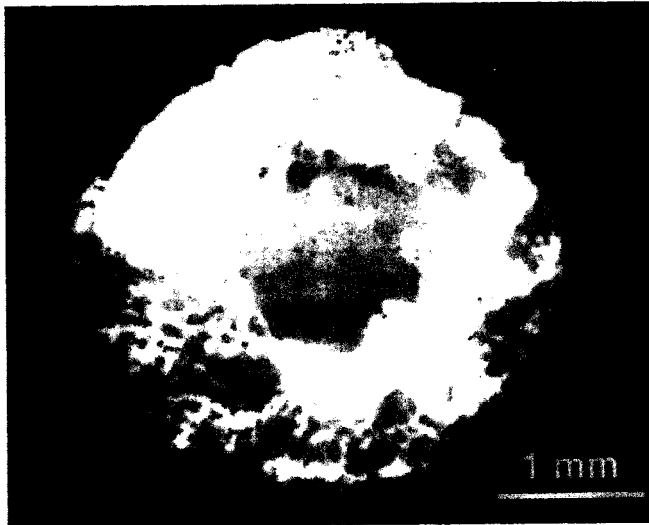
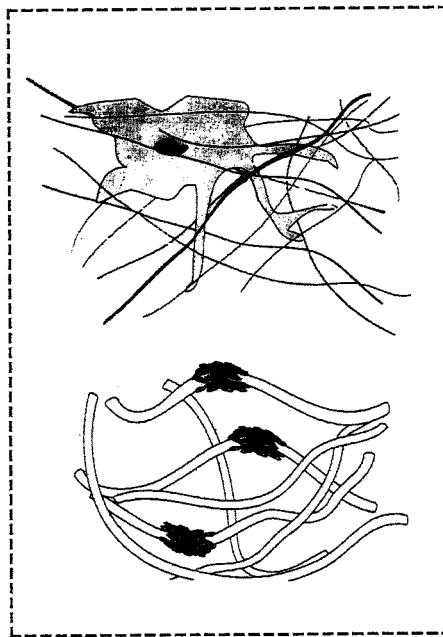


Figura 8: Tubos porosos de copolímeros (ácido láctico-ácido glicólico 50/50) preparados por extrusión y lavado de mezclas con cristales de sal común (ref. 27). Se aplican para la regeneración de nervios periféricos.

Figura 9: Redes en forma de malla de fibras biodegradables con superficie adecuada constituyen un soporte excelente para adhesión y proliferación (ref. 32)

tecnología de supercríticos para la preparación de sistemas porosos y encapsulados en ausencia de disolventes. La tecnología de supercríticos utiliza fundamentalmente anhídrido carbónico a altas presiones como disolvente, como dispersante o como eluyente. La despresurización proporciona sistemas porosos en forma de esponjas o láminas, microesferas o capsulas porosas, pudiendo controlar la porosidad mediante el método de despresurización utilizado. La gran ventaja de estos métodos frente a los disolventes o dispersantes clásicos, es la ausencia de toxicidad del anhídrido carbónico y la garantía de que no quedan restos de disolvente que puedan presentar efectos tóxicos en aplicaciones.

Un sistema polimérico clásico en el diseño de microesferas para dosificación controlada de medicamentos y factores de crecimiento es la poli( $\epsilon$ -caprolactona), interesante sistema por su carácter semicristalino (el polímero de alto peso molecular presenta una temperatura de fusión de 61°C y por su baja temperatura de transición vítrea, -60°C, confiere a la  $\epsilon$ -caprolactona una gran capacidad para preparar polímeros y copolímeros con propiedades muy diferentes, desde sistemas rígidos a muy flexibles tipo elastomérico, como son toda una extensa gama de copolímeros de  $\epsilon$ -caprolactona con (D,L)-lactida (29-31). La incorporación de segmentos largos de unidades de caprolactona en copolímeros con ácido láctico o ácido glicólico propor-



ciona un sensible aumento de la flexibilidad y de su capacidad para formar fibras con buenas características de adhesión y proliferación celular. En la Figura 9 se presentan de forma esquemática las funciones de adhesión y proliferación desarrolladas por células sobre fibras entrelazadas de sistemas

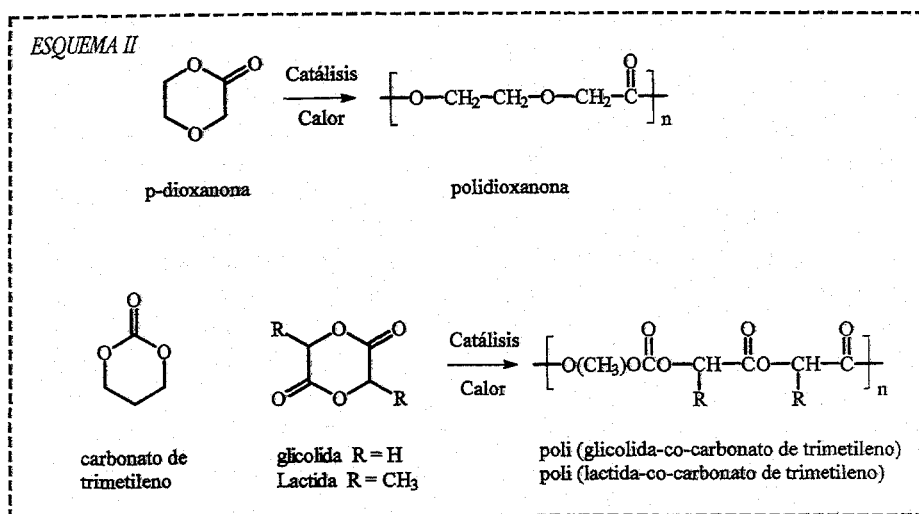
poliméricos biodegradables (32). La Figura 10 muestra las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de fibras biodegradables de poli(ácido glicólico) que también pueden ser preparadas a partir de copolímeros de la composición adecuada. Las fibras con un diámetro inicial de 13  $\mu\text{m}$  se recubren completamente de condrocitos después de 3 días de haber sido sembradas. La proliferación celular y la matriz extracelular que se genera en un espacio de tiempo razonable proporciona un tejido en el que va desapareciendo la red polimérica inicial por biodegradación (32, 33).

Existen muchas modificaciones de sistemas basados en ácido glicólico o ácido láctico preparados por copolimerización al azar o en bloque, introduciendo componentes hidrofílicos que modifican notablemente el comportamiento hidrolítico. Así, Cohn y Younes (34) han descrito con detalle la síntesis y caracterización de una amplia gama de copolímeros de etilen glicol - ácido láctico y Sawhney y Hubell (35) han preparado terpolímeros de D,L-lactida, glicolida y  $\epsilon$ -caprolactona a los cuales incorporan segmentos largos de poli(etilen glicol) utilizando cadenas de este polímero activadas en su extremo como iniciadores de la polimerización por apertura de anillo de los tres componentes mencionados. Para esos



Figura 10: Micrografía de microscopía electrónica de barrido de fibras entrelazadas de poli(ácido glicólico) (a) y de gránulo celular de condrocitos después de 3 días de haber sido sembradas (ref. 32, 33).





mismos fines han utilizado copolímeros tribloque a base de polietilén glicol-polipropilén glicol-polietilén glicol, conocidos comercialmente como "Pluronic", con los que se puede controlar o modular el carácter hidrofílico de los sistemas. Una variante interesante que se ha desarrollado como fibras monofilamento para aplicaciones quirúrgicas tales como hilos de sutura o clavos reabsorbibles, pero que también pueden utilizarse eficazmente como soportes de porosidad controlada, es la polidioxanona. Como se representa en el esquema II, la estructura química de la polidioxanona es la de un poliéster-

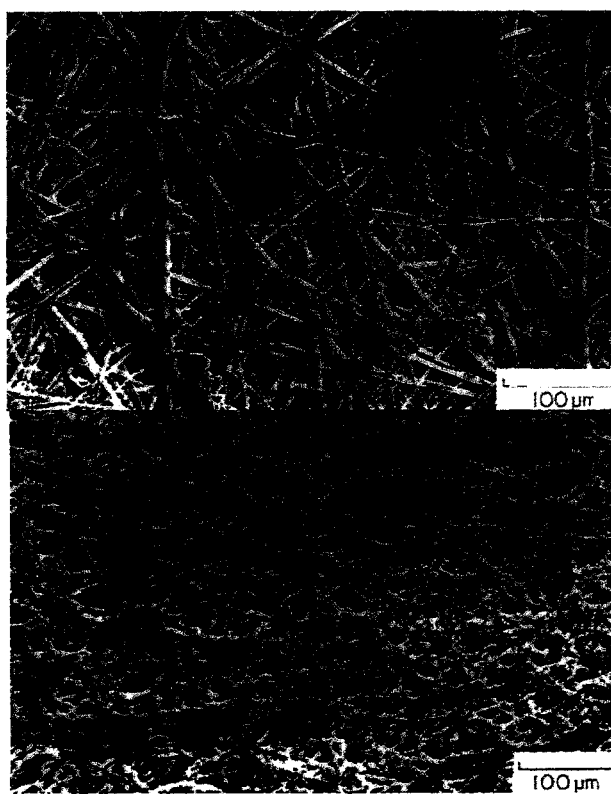


Figura 11: SEM de morfología superficial (a) y estructura de la pared (b) de tubos y placas porosas biodegradables a base de poli(ácido láctico) o de copolímeros de ácido láctico y ε-caprolactona.

éter alternante que resulta de la polimerización por apertura de anillo de p-dioxanona catalizada por octoato de estaño u otros catalizadores derivados organometálicos, a temperaturas moderadas con lo que se evitan las posibles reacciones de degradación térmica o de retroceso, así como otros procesos de transesterificación al azar que son frecuentes en este tipo de procesos de polimerización si la temperatura de reacción es relativamente elevada >150°C (36). Otros sistemas

muy flexibles se pueden preparar por copolimerización del carbonato de trimetileno con glicolida o lactida dando lugar a copolímeros que alternan uniones carbonato y uniones éster carboxílico (37). Si la reacción de copolimerización se realiza con una mezcla de lactida y glicolida, es posible obtener copolímeros al azar y completar con bloques de poli(carbonato de trimetileno) con buenas propiedades mecánicas como fibras monofilamento (12). Soluciones viscosas utilizando disol-

ventes volátiles como cloroformo o cloruro de metileno, con una concentración de copolímero de un 8-10%, pueden proyectarse a través de una boquilla de pequeño diámetro (200-300 μm) sobre un mandril o varilla giratoria que va formando una red porosa a medida que el disolvente se evapora con grados de porosidad de un 85-90%. La Figura 11 muestra macrografías obtenidas por SEM de la superficie externa (Figura 11a) y de la sección transversal (Figura 11b) en las que se observa la estructura de poros interconectados como consecuencia de la proyección y secado de los sistemas poliméricos mediante esta técnica. La técnica es aplicable a todo tipo de polímeros siempre que se pueda utilizar un disolvente volátil. La Figura 12 muestra la estructura y morfología de una fibra hueca preparada por esta técnica a partir de un terpolímero de ácido láctico/ácido glicólico/ε-caprolactona.

La preparación y aplicación de poli(anhidridos) de ácidos carboxílicos han resultado interesantes como sistemas de carácter hidrofílico controlado y resistencia hidrolítica relativamente reducida. Su estabilidad biodegradativa puede modularse combinando la longitud de cadena alifática que separa los grupos anhídridos. Si la longitud del segmento alifático es pequeña, los sistemas poliméricos resultan bastante hidrofílicos y polares, y su velocidad de biodegradación será relativamente elevada. Por el contrario, si se eligen derivados de ácidos de cadena larga, los polianhidridos resultan poco polares y de carácter sensiblemente hidrofóbico, siendo más resistentes a los procesos biodegradativos. En general la formación de enlaces tipo anhídrido se realiza por deshidro-acilación de dos grupos carboxílicos. Se preparan típicamente por reacciones de condensación en solución o en estado fundido a presión reducida, en dos fases. La primera consiste en la preparación de prepolímeros por reacción de diácidos tales como el ácido fumárico, el ácido succínico o el de cadena más larga, ácido sebáico, con anhídrido acético y una segunda fase de verdadera poli-

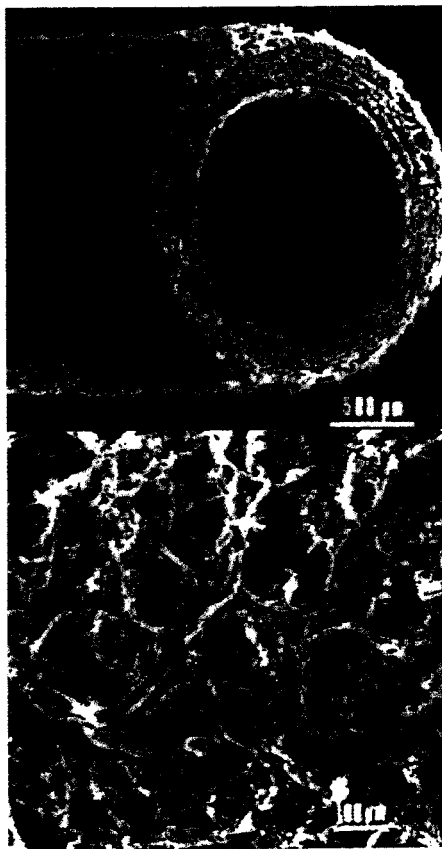


Figura 12: SEM de fibras huecas preparadas por proyección de soluciones concentradas de sistemas poliméricos biodegradables y morfología porosa abierta de una sección transversal de la pared de las fibras.

merización a vacío y temperaturas relativamente elevadas como muestra el esquema III (38-40). Algunos sistemas desarrollados por Langer y col. (38,40) como soportes para liberación controlada de agentes quimioterapéuticos como implantes en tumores cerebrales, han sido aprobados por la FDA americana y comercializados bajo la marca registrada "Gliadel".

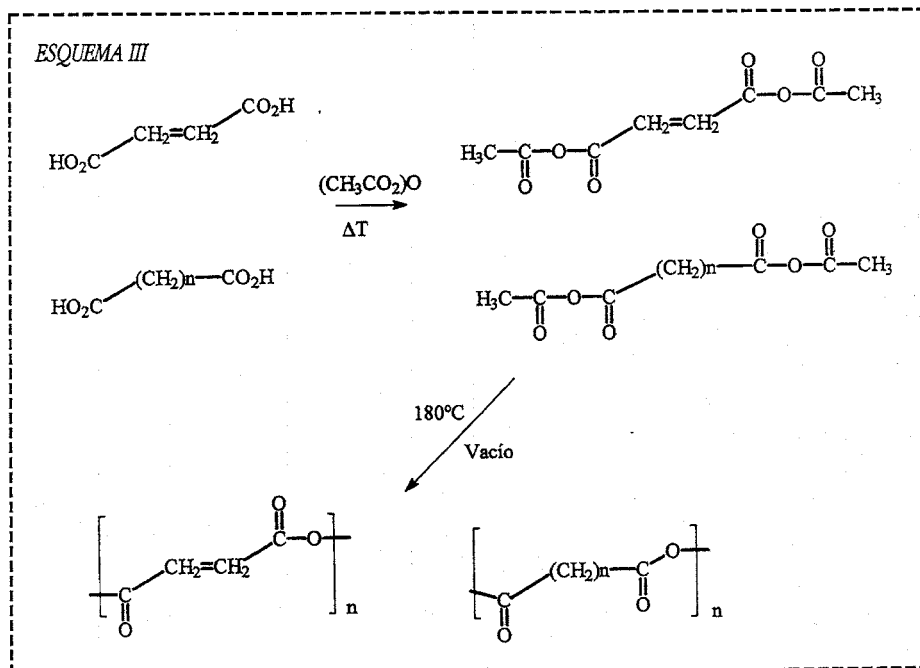
Albertsson y Lundmark (41) han descrito series de elastómeros termoplásticos biodegradables basados en copolímeros de bloque de polianhidridos y polietilén glicol, que presentan buenas propiedades como formadores de fibras con resistencia mecánica y flexibilidad y por su estructura molecular se biodegradan mediante procesos de erosión superficial, ya que resultan bastante hidrofóbicas y por lo tanto no permiten la penetración de moléculas de agua en el interior del material. Esta posibilidad, que también la ofrecen algunos poliortoésteres, es aprovechada para la preparación de sistemas de

liberación controlada de medicamentos y factores de crecimiento que permiten diseñar procesos de aplicación de larga duración sin que se observen efectos secundarios apreciables.

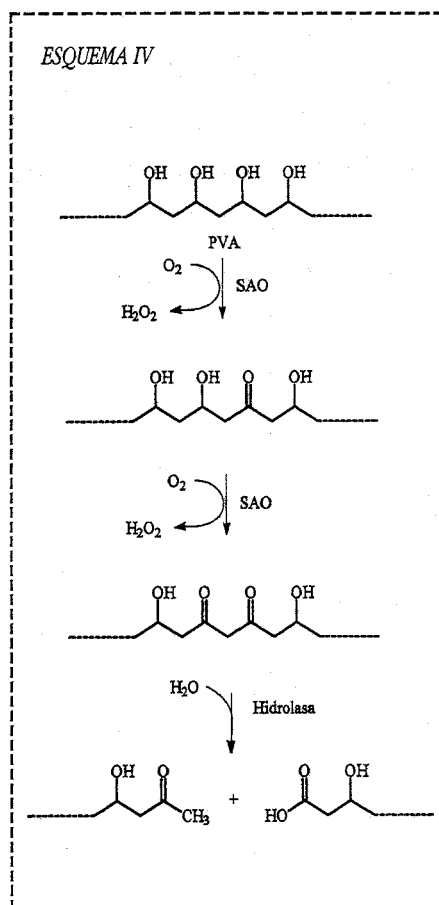
Recientemente, A. Mikos y col. (42-45) han puesto de manifiesto que es posible utilizar sistemas de polímeros de fumarato de propilén glicol, que contienen dobles enlaces polimerizables por vía radical en condiciones fisiológicas, para preparar y aplicar sistemas autocurables "in situ" o cementos a los que se agregan factores de crecimiento como hormona de crecimiento, GH, factor de crecimiento de fibroblastos, FGF, o proteína morfogenética, BMP, con objeto de estimular la regeneración tisular en cavidades óseas o incluso de tejido conectivo que necesiten ser regenerados. El sistema polimérico a base de fumarato de propilén glicol es biodegradable, y puede ser mezclado con monómeros vinílicos o acrílicos para dar lugar por procesos de polimerización radical activada a redes entrecruzadas de carácter hidrofílico o hidrofóbico. Así, la polimerización de sistemas a base de poli(fumarato de propilén glicol) con metacrilato de metilo al que se agregan cantidades adecuadas de factores de crecimiento, que se activa con un sistema clásico a base de peróxido/amina, proporciona sistemas de

curado "in situ" que pueden liberar el componente biológicamente activo durante tiempos muy largos. Finalmente, el sistema se biodegrada lentamente hasta conseguir o bien su total reabsorción o bien una integración tisular que garantiza la ausencia de reacciones a cuerpo extraño y de infecciones en el tejido donde ha sido aplicado. El sistema está dando excelentes resultados tanto en su fase de experimentación animal como en las fases preclínicas que se llevan a cabo en la Clínica Mayo. Por otra parte, si el metacrilato de metilo se sustituye por vinil pirrolidona, se consiguen sistemas hidrofílicos de liberación relativamente rápida y se garantiza su reabsorción total ya que los segmentos de cadena resultantes de la biodegradación a base de cadenas de poli(vinil pirrolidona) resultan solubles en el medio fisiológico, siendo eliminados por las vías habituales de excreción a través del riñón.

Finalmente, es necesario considerar una amplia familia de sistemas altamente hidrofílicos y con propiedades muy interesantes por su capacidad de asociación con compuestos polares y su respuesta frente a condiciones fisiológicas específicas. Se trata de los sistemas basados en poli(alcohol vinílico) y los desarrollados en base a poli(etilén glicol) y copolíme-



ros. El poli(alcohol vinílico) es posiblemente el único polímero de cadenas hidrocarbonadas con carácter biodegradable tanto en condiciones aerobias como anaerobias (46). El mecanismo de biodegradación enzimática de poli(alcohol vinílico) PVA utilizando cepas de *Pseudomonas* se describe en el esquema IV. Sakai y col. (47,48) han demostrado que se produce una reacción de oxidación catalizada enzimáticamente por alcohol oxidasa SAO vía  $\beta$ -hidroxi cetona, para dar lugar a  $\beta$ -dicetona que se escinde por acción de la  $\beta$ -dicetona hidrolasa, y recientemente Matsuura y col. (46) han propuesto un nuevo mecanismo biodegradativo utilizando cepas de *Alcaligenes faecalis* a través también de  $\beta$ -hidroxicetonas. La capacidad biodegradativa de derivados de PVA resulta interesante ya que permite el diseño y la preparación de una gran variedad de sistemas con propiedades muy diversas mediante la incorporación de cadenas de PVA en sistemas no biodegradables, reacciones de injerto en cadenas biodegradables con carácter hidrofóbico o incluso modificaciones estructurales de la propia cadena de PVA mediante reacción de algunos de sus grupos hidroxílicos. Con ello se consiguen sistemas sensibles a alteraciones de temperatura a nivel local, muy relacionado con el crecimiento de ciertos tumores, o frente a condiciones de hidratación determinada, o incluso el diseño de sistemas entrecruzados de gran capacidad de absorción de agua o fluidos fisiológicos, que además de mantener su carácter biodegradativo proporciona



una excelente biocompatibilidad. Hidrogeles a base de PVA y sistemas modificados han sido utilizados como dilatadores o separadores en vértebras cervicales (49) o sistemas porosos hidrofílicos reabsorbibles (50). Los sistemas a base de PVA pueden entrecruzarse o ser insolubilizados en agua mediante ciclos de congelación y descongelación o por vía química como es la acetalización con dialdehidos. Estos procesos se han aprovechado para conseguir la formación de microcápsulas para el aislamiento y mantenimiento celular.

Incluso es posible conseguir el entrecruzamiento mediante la formación de complejos a partir de soluciones de mezclas de PVA y polietilenglicol, con sulfato sódico/hidróxido potásico para formar membranas o sistemas de encapsulación celular (51).

Por otro lado, materiales basados en poli(etilenglicol), PEG, y derivados han sido ampliamente utilizados en multitud de dispositivos biomédicos y en sistemas de dosificación de medicamentos y principios activos, habiendo sido el propio PEG aprobado por la FDA como aditivo en alimentos y en productos farmacéuticos. Uno de los aspectos más interesantes es la posibilidad que ofrece para la preparación de sistemas con grupos reactivos en sus extremos que pueden intervenir en reacciones de curado "in situ" o que permiten el diseño de sistemas micro o macroporosos con excelente biocompatibilidad, carácter hidrofílico controlado y reabsorción con garantía, sin peligro de generación de productos tóxicos. Así, resulta interesante la preparación de macromonómeros que incorporan grupos vinílicos o acrílicos en sus extremos de cadena y pueden utilizarse en el diseño de sistemas autocurables por polimerización radical activada a temperatura fisiológica con peróxido/amina o fotoquímicamente. El esquema V muestra el mecanismo de reacción de macromonómeros acrílicos de sistemas de copolímeros de bloque preparados por copolimerización de polietilenglicol de bajo o medio peso molecular y lactida. La funcionalización de los extremos de cadena de los polí-

***La capacidad biodegradativa de derivados de PVA resulta interesante ya que permite el diseño y la preparación de una gran variedad de sistemas con propiedades muy diversas mediante la incorporación de cadenas de PVA en sistemas no biodegradables, reacciones de injerto en cadenas biodegradables con carácter hidrofóbico o incluso modificaciones estructurales de la propia cadena de PVA mediante reacción de algunos de sus grupos hidroxílicos.***

**Una de las propiedades más interesantes de estos sistemas es que a baja temperatura, 25-30°C, la disolución presenta baja viscosidad, mientras que cuando se eleva la temperatura a 35-37°C la viscosidad aumenta bruscamente, lo que puede ser aprovechado para administrar sistemas de liberación controlada por inyección parenteral.**

meros formados se consigue por reacción con cloruro de ácido acrílico o metacrílico, dando lugar a sistemas tetrafuncionales que conducen a la formación de redes tridimensionales. Gracias a ello no es fundamental la obtención de sistemas de alto peso molecular y pueden utilizarse sin problemas oligómeros o macromonómeros de relativamente bajo peso molecular, 1000 - 2000 Daltons (52).

Sistemas poliméricos que presentan una transición sol-gel en solución acuosa cuando se eleva la temperatura en un intervalo de valores próxi-

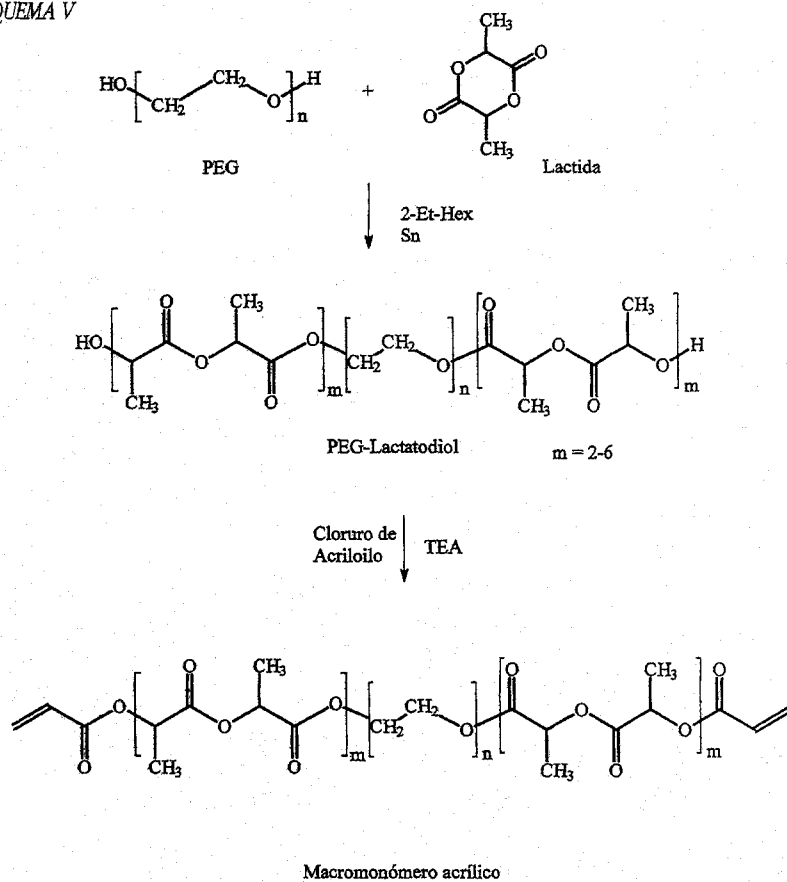
mos a la temperatura fisiológica están llamando mucho la atención como sistemas de dosificación de elementos bioactivos dependientes de la temperatura. Copolímeros de poli(etilen glicol) con poli(propilen glicol) "Pluronic", o bien copolímeros de bloque de PEG-poli(butilen glicol)-PEG así como de PEG-poli(láctico-co-glicólico)-PEG, presentan en solución acuosa transiciones muy interesantes desde un punto de vista aplicado, para diseñar y preparar soportes de crecimiento celular o sistemas adhesivos hidrosolubles

que puedan actuar como sistemas de dosificación controlada bajo estímulo térmico (53-55). Una de las propiedades más interesantes de estos sistemas es que a baja temperatura, 25-30°C, la disolución presenta baja viscosidad, mientras que cuando se eleva la temperatura a 35-37°C la viscosidad aumenta bruscamente, lo que puede ser aprovechado para administrar sistemas de liberación controlada por inyección parenteral. Esta transición está relacionada con la formación de una estructura tipo micelar de baja viscosidad, y la consiguiente ruptura de la misma asociada al incremento de temperatura (55).

En definitiva, el considerable progreso desarrollado en los últimos años en el diseño y preparación de sistemas poliméricos complejos con propiedades específicas, así como un buen aprovechamiento de sus interacciones con el medio biológico activo, tanto a nivel celular como a nivel estructural con proteínas, enzimas, etc., abre unas excelentes expectativas de desarrollo en un campo multidisciplinar de enorme repercusión social y económica. Puede considerarse que estamos siendo testigos de lo que pueden ser los primeros pasos de un revolucionario futuro en la conservación, crecimiento y regeneración tisular. Del esfuerzo cooperativo entre los diferentes especialistas en campos comprometidos de la ciencia de materiales y las ciencias médicas dependerá el progreso de la "Ingeniería de Tejidos" en los próximos años.



ESQUEMA V



## BIBLIOGRAFÍA

1. C. W. Patrick JR, A. Mikos, L. V. McIntire, Prospectus of Tissue Engineering, en "Frontiers in Tissue Engineering", Ed. C. W. Patrick, A. G. Mikos, L. V. McIntire, Elsevier Science Ltd., UK, 1998, p.3
2. F. G. Heineken, R. Skalak, Tissue engineering: a brief overview, *J. Biomechanical Engineering*, 113, 111-120 (1991)
3. Langer, J. P. Vacanti, Tissue engineering, *Science*, 260, 920-926 (1993)
4. M. E. Nimni, Polypeptide growth factors: targeted delivery systems, *Biomaterials*, 18, 1201-1225 (1997)
5. D. F. Williams, Challenges in materials for health care applications, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Adv. Mater.*, 28, 662-667 (1989)
6. G.G. Gebelein, F. F. Koblitz (Eds) "Biomedical and Dental Applications of Polymers", Plenum Press, New York, 1981
7. I. V. Yannas, Biologically active analogues of the extracellular matrix: artificial skin and nerves, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 20-35 (1990)
8. S. J. Archival, C. Krarup, J. Shefner, S. Li, R. A. Madison, A collagen-based nerve guide conduct for peripheral nerve repair: an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and non-human primates, *J. of Comparative Neurology*, 306, 685-696 (1991)
9. S. Zalipsky, C. Lee, Use of poly(ethylene glycols) for modification of polypeptides, en "Poly(ethylene glycol) Chemistry", Ed. J. M. Harris, Plenum Press, New York, 1992, p. 347-370.
10. A. Rastrelli, M. Beccaro, F. Biviano, G. Calderini, A. Pastorello, Hyaluronic acid esters, a new class of semisynthetic biopolymers: chemical and physicochemical properties, en "Clinical Implant Materials", Ed. G. Heimke, U. Soltesz, A.J.C. Lee, Advances in Biomaterials, Vol. 9, Elsevier Publ., Amsterdam, (1990), p. 199-206
11. S. W. Kim, J. Feijen, Surface modification of polymers for improved blood compatibility, *CRC Critical Reviews in Biocompatibility*, 1, 229-260 (1985)
12. A. S. Sawhney, P. D. Drumhefler, Polymer synthesis, en "Frontiers in Tissue Engineering" Eds. C. W. Patrick, A. G. Mikos, L. V. McIntire, Elsevier Science Ltd., UK, 1998, p 83-106
13. J. P. Anderson, J. Cappello, D. C. Martin, Morphology and primary crystal structure of a silk-like protein polymer synthesised by genetically engineered escherichia colibacteria, *Biopolymers*, 34, 1049-1058 (1994)
14. D. T. McPherson, C. Morrow, D.S. Minehan, J. G. Wu, E. Hunter, D. W. Urry, Production and purification of a recombinant elastomeric polypeptide from ischerichia coli, *Biotechnology Progress*, 8, 347-352 (1992)
15. L. H. Radzilowski, S.I. Strupp, Nanophase separation in monodisperse rodcoil diblock polymers, *Macromolecules*, 27, 7747-7753 (1994)
16. K. C. Sung, E. M. Topp, Swelling properties of hyaluronic acid ester membranes, *J. Membrane Science*, 92, 157-167 (1994)
17. T. Matsuda, M. J. Moyhaddam, H. Miwa, K. Sakurai, F. Iida, Photoinduced prevention of tissue adhesion, *ASAID J.*, 38, M154-M157 (1992)
18. A. G. Mikos, M. G. Papadaki, S. Louvroukoglou, S. L. Ishang, R. C. Thomson, Islet transplantation to create a bioartificial pancreas, *Bio-technology Bioengineering*, 43, 673-677 (1994)
19. H. A. Clayton, R. F. L. James, N. J. M. London, Islet microencapsulation, A review, *Acta Diabetologica*, 30, 181-189 (1993)
20. E. Ogawa, Conformational transition of polysaccharide sodium-gellan gum in aqueous solutions, *Macromolecules*, 29, 5178-5182 (1996)
21. H. Yamamoto, Y. Senoo, Polyion complex fibre and capsule formed by self-assembly of chitosan and gellan at solution interfaces, *Macromol. Chem. Phys.*, 201, 84-92 (2000)
22. E. A. Lysenko, T. K. Bronich, A. Eisenberg, K. A. Kabanov, A. V. Kabanov, Block ionomer complexes from polystyrene-block-polyacrylate anions and N-cetylpyridinium cations, *Macromolecules*, 31, 4511-4515 (1998)
23. C. Peniche, C. Elvira, J. San Román, Interpolymer complexes of chitosan and polymethacrylic derivatives of salicylic acid: Preparation, characterisation, and modification by thermal treatment, *Polymer*, 39, 6549-6554 (1998)
24. S. Hertzberg, E. Moen, C. Vogelsang, K. Ostgaard, Mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium alginate gels for cell entrapment, *Applied Microbial Biotechnology*, 43, 10-17 (1995)
25. J. Kopecek, K. Ulrich, Biodegradation of biomedical polymers, *Progr. Polym. Sci.*, 9, 1 (1983)
26. D. F. Williams, Polymer Degradation in Biological Environments, en "Comprehensive Polymer Science", vol. 6, Eds. G. C. Eastmond, A. Ledwith, S. Russo, P. Sigwalt, Pergamon Press, Oxford (1989)
27. M. S. Widmer, A.G. Mikos, Frabrication of biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, en "Frontiers in Tissue Engineering", Eds. C. W. Patrick, A. G. Mikos, L. V. McIntire, Elsevier Science Ltd., UK, 1998, p.107-120
28. M. Vert, S. M. Li, H. Garreau, Attempts to map the structure and degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 6, 639-649 (1994)

29. D. W. Grijpma, A. J. Pennings, Polymerization temperature effects on the properties of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone copolymers, *Polymer Bulletin*, 25, 335-341 (1991)
30. M.P. Hifjanen-Vainio, P. A. Orava, J. V. Seppälä, Properties of  $\epsilon$ -caprolactone/DL-Lactide copolymers with a minor  $\epsilon$ -caprolactone content, *J. Biomed. Mater. Res.*, 34, 39-46 (1997)
31. G. Perego, T. Vercellio, G. Balbontin, Copolymers of L and D,L-lactide with  $\epsilon$ -caprolactone: synthesis and characterization, *Macromol. Chem.*, 194, 2463-2469 (1993)
32. S. P. Baldwin, W. M. Saltzman, Polymers for tissue engineering, *Trends in Polym. Sci.*, 4, 177-182 (1996)
33. L. E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, R. J. Biron, D. B. Eagler, D. C. Lenog, S. K. Barlow, R. Langer, Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering, *BioTechnology*, 12, 689-93 (1994)
34. D. Cohn, H. Younes, Biodegradable PEO/PLA block copolymers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 22, 993-1009 (1988)
35. A. S. Sawhney, J. A. Hubbell, Rapidly degraded terpolymers of dl-lactide, glycolide and  $\epsilon$ -caprolactone with increased hydrophilicity by copolymerization with polyethers, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 1397-1411 (1990)
36. J. A. Ray, N. Doddi, D. Regula, J. A. Williams, A. Melvegar, Polydioxanone: a novel monofilament synthetic adsorbable suture, *Surgery, Gynaecology and Obstetrics*, 153, 497-507 (1981)
37. K. J. Zhu, R. W. Hendren, K. Jenson, C.G. Pitt, Synthesis, properties and biodegradation of poly(1,3-trimethylene carbonate), *Macromolecules*, 24, 1736-1740 (1991)
38. A. J. Domb, R. Langer, Polyanhydrides: preparation of high molecular weight polyanhydrides, *J. Polym. Sci. Chem. Ed.*, 25, 3373-3386 (1987)
39. K. W. Leong, V. Simonte, R. Langer, Synthetic polyanhydrides: melt-polycondensation, dehydrochlorination and dehydrative coupling, *Macromolecules*, 20, 705-712 (1987)
40. A. J. Domb, C. F. Gallardo, R. Langer, Poly(anhydrides) based on aliphatic-aromatic diacids, *Macromolecules*, 22, 3200-3204 (1989)
41. A. C. Albertsson, S. Lundmark, Synthesis, characterisation and degradation of aliphatic polyanhydrides, *British Polymer Journal*, 23, 205-212 (1990)
42. R. C. Thomson, M. C. Wake, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs, *Adv. Polym. Sci.*, 122, 245-274 (1995)
43. G. B. Kharas, M.Kamenetsky, J. Simantinakis, K. C. Beinlich, A. M. T. Rizzo, G. A. Caywood, K. Watson, Synthesis and characterisation of fumarate-based polyesters for use in bioresorbable bone cement composites, *J. Appl. Polym. Sci.*, 66, 1123-1137 (1997)
44. L. J. Suggs, R. G. Payne, M. J. Yaszemski, L. B. Alemany, A. G. Mikos, Synthesis and characterisation of a block copolymer consisting of poly(propylene fumarate) and poly(ethylene glycol), *Macromolecules*, 30, 4318-4323 (1997)
45. S. J. Peter, M. J. Yaszemski, L. J. Suggs, R. G. Payne, R. Langer, W.C. Hayes, M. R. Unroe, L. B. Alemany, P. S. Engel, A. G. Mikos, Characterisation of partially saturated poly(propylene fumarate) for orthopaedic applications, *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, 8, 893-904 (1997)
46. S. Matsumura, N. Tomizowa, A. Toki, K. Nishikawa, K. Toshima, Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism, *Macromolecules*, 32, 7753-7761 (1999)
47. K. Sakai, N. Hamada, Y. Watanabe, Studies on the poly(vinyl alcohol) degrading enzyme. Part V. Purification and properties of oxidized poly(vinyl alcohol) hydrolase with an acidic isoelectric point, *Agric. Biol. Chem.*, 49, 827-833 (1985)
48. K. Sakai, N. Hamada, Y. Watanabe, A new enzyme,  $\beta$ -diketone hydrolase: a component of a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme preparation, 49, 1901-1902 (1985)
49. B. J. Ficek, N. A. Peppas, Novel preparation of poly(vinyl alcohol) microparticles with crosslinking agent for controlled drug delivery, *Material Research Society Symposium Proceedings*, 331, 223-226 (1994)
50. G. R. Llanos, M. V. Sefton, Immobilisation of polyethylene glycol onto a polyvinyl alcohol hydrogel: evaluation of thrombogenicity, *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 1383-1391 (1993)
51. T. H. Young, N. Y. Yao, R. F. Chang, L. W. Chen, Evaluation of asymmetric poly(vinyl alcohol) membranes for use in artificial islets, *Bio-materials*, 17, 2139-2145 (1996)
52. A. S. Sawhney, C. P. Pathak, A. J. Hubbell, Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-co-poly( $\alpha$ -hydroxy acid) diacrylate macromers, *Macromolecules*, 26, 581-587 (1993)
53. K. Mortensen, S. Pedersen, Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution, *Macromolecules*, 26, 805-812 (1993)
54. S. Tanodekaev, N. J. Deng, S. Smith, Y. W. Yang, D. Attwood, C. Booth, Micellization and gelation of block-copoly(oxyethylene/oxybutylene) in aqueous solution, *J. Phys. Chem.*, 97, 11847-11852 (1993)
55. B. Jeong, Y. H. Ba, S. W. Kim, Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions, *Macromolecules*, 32, 7064-7069 (1999)