



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional



iberos

Instituto de Bioingeniería en Red
para el Envejecimiento Saludable

AVANCES DE LA BIOINGENIERÍA PARA EL ENVEJECIMIENTO SALUDABLE

Pío González (Coord.)

AVANCES DE LA BIOINGENIERÍA PARA EL ENVEJECIMIENTO SALUDABLE

Edición: IBEROS

Coordinación: Pío González

Coordinación técnica: Javier M. González Costas

Diseño y maquetación: María José Villar Alonso

© 2020 autoría: las personas que firman cada capítulo incluido en este libro

© 2020 del prólogo: Pío González

ISBN: 978-84-8158-832-3

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3958933>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra sólo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley.

Prólogo

El Instituto de Bioingeniería en Red para el Envejecimiento Saludable (IBEROS) surge como un instrumento dinamizador del I+D en ingeniería biomédica para crear sinergias y aportar soluciones en el ámbito del envejecimiento saludable en la Eurorregión Galicia-Norte de Portugal. Así, se establece una red de grupos de investigación que mantienen colaboraciones fluidas, facilitadas por la afinidad de los idiomas y la cercanía territorial, con la finalidad de aunar esfuerzos y crear masa crítica para alcanzar cotas más altas de excelencia científica y un mayor nivel de desarrollo tecnológico que sea transferible al sector biomédico y con aplicación clínica en patologías asociadas al envejecimiento.

IBEROS inicia su andadura en junio de 2017 con el apoyo del programa Interreg España-Portugal (POCTEP) de la Unión Europea con la visión de consolidarse como una región de referencia para el desarrollo de la bioingeniería orientada al envejecimiento. En la red se integran 13 grupos de investigación de las Universidades de Vigo, Santiago de Compostela, Minho y Católica Portuguesa-Centro Rexional do Porto; del Instituto de Investigaciones Marinas (IIM) del CSIC; del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC); del Instituto de Engenharia Biomédica y del Instituto Superior de Engenharia de Porto. Este consorcio aglutina los esfuerzos de más de 150 investigadores e investigadoras que comparten conocimiento y desarrollan proyectos de investigación conjuntos con el objetivo de implementar soluciones con aplicación clínica basadas en la bioingeniería.

En este libro se refleja la estrategia y el espíritu de IBEROS basado en la cooperación e interdisciplinariedad de las capacidades de sus grupos de investigación para aportar soluciones tecnológicas concentradas en tres áreas científicas; desde el área de biomateriales se diseñan abordajes innovadores para solucionar problemas relacionados con el aparato locomotor y se proponen tecnologías emergentes para la medicina regenerativa, los expertos en nanotecnología orientan sus investigaciones a nuevas terapias y métodos de diagnóstico del cáncer y las enfermedades neurodegenerativas y, por último, el área de biosensores se centra en desarrollar estrategias innovadoras en instrumentación biomédica para el diagnóstico precoz.

Nuestro agradecimiento muy especial a todos los autores y autoras de los capítulos de este volumen que, con esfuerzo y dedicación, han sabido plasmar los resultados más relevantes del fructífero trabajo llevado a cabo en proyectos colaborativos y en las jornadas científicas, y que ahora se condensan en este libro, aportando una visión actualizada y enriquecedora de los últimos *Avances de la Bioingeniería para el Envejecimiento Saludable* desarrollado en la Eurorregión. Por último, deseamos expresar nuestro cálido reconocimiento al Programa Operativo de Cooperación Transfronteriza Interreg España-Portugal 2014-2020 (POCTEP) por la financiación del proyecto IBEROS.

Pío M. González Fernández
Coordinador IBEROS

Índice

Pág

1. Andamios porosos de origen marino basados en alginato y biocerámica para la regeneración del tejido óseo.

E. López-Senra, M. López-Álvarez, G.S. Diogo, T.H. Silva, R.L. Reis, P. González, J. Serra 1

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

R. Martínez-Borrajo, P. Díaz-Rodríguez, V. Santos-Rosales, C. López-Iglesias, A. Iglesias Mejuto, J.L. Gómez-Amoza, C.A. García-González, M. Landin 10

3. Compósitos de colagénio/apatite de origem marinha para aplicação em engenharia de tecidos mineralizados.

G.S. Diogo, M. Almeida, E. López-Senra, R.P. Pirraco, R.I. Pérez-Martín, C.G. Sotelo, J. Serra, P. González, T.H. Silva and R.L. Reis 21

4. Innovative sensors for age-related diseases

M.F. Frasco, F.T.C. Moreira, G. Martins, Y. Castaño-Guerrero, M.C.C.G. Carneiro, L. da Rocha, R. Pereira-Cameselle, A. Ozcelik, S. Bolaño, J.L. Alonso-Gómez, A. Riveiro, S. Chiussi, A.L. Oliveira, A. Sousa-Castillo, M.A. Correa-Duarte, M.G.F. Sales 33

5. Raman spectroscopy for cartilage damage severity, degradation and repair assessment.

P. Casal-Beiroa, F.J. Blanco, J. Magalhães 43

6. Síntese de um alginato fluorescente para aplicações biomédicas.

M. Araújo, S.J. Bidarra, P.M. Alves, J. Valcarcel, J. A. Vázquez, C.C. Barrias 55

7. Valorización de biopolímeros marinos para aplicaciones en medicina regenerativa.

J. Valcarcel, L. Fernández-Sampayo, P. Salgado, R. Riveiro, U. Ramos, R.I. Pérez-Martín, C.G. Sotelo, J.A. Vázquez 66

1. Andamios porosos de origen marino basados en alginato y biocerámica para la regeneración del tejido óseo.

E. López-Senra¹, M. López-Álvarez¹, G.S. Diogo^{2,3}, T.H. Silva^{2,3}, R.L. Reis^{2,3,4}, P. González¹, J. Serra¹.

¹Grupo Novos Materiais – Departamento de Física Aplicada, MTI, Universidade de Vigo.

²3B's Research Group, I3Bs – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Guimarães, Portugal.

³ICVS/3B's – PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

⁴The Discoveries Centre for Regenerative and Precision Medicine, Headquarters at University of Minho, Guimarães, Portugal.

eslopez@uvigo.es

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3958995>

En el presente estudio se han desarrollado andamios porosos de origen marino basados en la combinación de alginato y biocerámica. La evaluación de los mismos se realizó en base a su estabilidad, bioactividad, porosidad, propiedades mecánicas y respuesta biológica in vitro. Se demostró la viabilidad para fabricar andamios con una estructura polimérica de alginato de sodio en la cual se encuentra distribuida de forma homogénea la biocerámica. En este capítulo se detallan las formulaciones óptimas para obtener

estructuras con buen comportamiento mecánico y adecuada bioactividad. Los ensayos biológicos confirmaron la ausencia de citotoxicidad y un aumento óptimo de la densidad celular.

1. Introducción

Hoy en día la ingeniería biomédica se encuentra inmersa en una intensa actividad investigadora para contribuir, entre otros objetivos, al cambio de paradigma en el que se encuentra la medicina actual: pasar de la reparación o sustitución de un tejido u órgano dañado a su regeneración. En este contexto es donde se ubica la reciente disciplina denominada ingeniería de tejidos, la cual pretende promover la regeneración de tejidos mediante la utilización de tres elementos básicos: andamiajes porosos que repliquen la matriz extracelular, cultivo de células sobre estas estructuras e incorporar biomoléculas o factores de crecimiento que promuevan la diferenciación de esas células hacia el tejido que se pretende regenerar (Kasper, 2016).

En el caso particular del hueso, uno de los retos para la ingeniería de tejidos está en desarrollar andamios que, además de tener propiedades osteoinductoras y mecánicas adecuadas, resuelvan el gran problema de promover la vascularización (Amini et al., 2013, Roseti et al., 2017). Para el diseño y fabricación de los andamios porosos se utilizan diferentes biomateriales como polímeros, cerámicas, vidrios o incluso metales. En el caso particular de los polímeros destacan los de origen sintético como el ácido poliláctico y el ácido poliglicólico; aunque cada vez más se van incorporando los de origen biológico como el colágeno de origen bovino, el quitosano y el ácido hialurónico, entre otros. Si hablamos de cerámicas las más ampliamente utilizadas son los fosfatos de calcio, destacando la hidroxiapatita (HA) o el beta-tricalcio fosfato (β -TCP), ya sean de origen biológico o sintético, con un grado mayor o menor de cristalinidad según la resorción deseada.

En cuanto a los biomateriales de origen biológico es importante destacar el gran potencial de la biodiversidad marina. En el caso particular de los subproductos pesqueros su aprovechamiento se encuentra centrado en tres líneas fundamentales: (1) valorización de subproductos para uso alimentario, (2) valorización biotecnológica de subproductos marinos y (3) obtención de compuestos de interés para la industria farmacológica y biomédica (Balboa, 2013). Fruto de estas investigaciones se han desarrollado productos entre los que destacan, harinas y aceites de pescado, colágeno, ácidos grasos, ácido hialurónico, fosfatos cálcicos, carbonato cálcico y quitosano, entre otros (Balboa, 2013).

Así, el objetivo de este trabajo de investigación se centra en el desarrollo de nuevos andamios que permitan replicar la matriz extracelular de los tejidos que componen el sistema osteoarticular y utilizando para ello biomateriales de origen marino. En particular se propone la fabricación, caracterización y evaluación biológica *in vitro* de andamios porosos basados en la combinación de un polímero y una cerámica: alginato de sodio y fosfato de calcio, ambos de origen marino, en determinadas proporciones y empleando un reticulante que refuerce la estructura del polímero sin afectar a la viabilidad celular.

2. Obtención de andamios

La fabricación de los andamios porosos de origen marino se basó en la combinación de alginato comercial obtenido de algas pardas (Sigma-Aldrich SL) y una biocerámica obtenida a partir de dientes de tiburón de la especie *Prionace glauca* (López-Álvarez et al., 2016, López-Álvarez et al., 2017). El agente reticulante utilizado fue cloruro de calcio (CaCl_2). La proporción de alginato:biocerámica (Alg:CaP) utilizada correspondió a 70:30 y se fabricaron 6 formulaciones distintas variando la razón peso/volumen de alginato + CaP respecto al agua empleada (3%, 6% y 9%) y el porcentaje de reticulación de la mezcla (1.6 % y 12.5%) (López, 2019).

3. Caracterización fisicoquímica

3.1. Estabilidad

La estabilidad de los andamios se evaluó mediante inmersión en medio de cultivo celular en condiciones estáticas a 37°C durante 28 días. Los resultados demostraron que todas las formulaciones permanecen estables, independientemente del porcentaje de reticulación alcanzado. También es interesante destacar que la presencia de la biocerámica incrementa la estabilidad de los andamios, siendo especialmente crítico en los andamios fabricados para el menor porcentaje de p/v (López, 2019).

3.2. Bioactividad

Para el estudio de la respuesta bioactiva de los andamios se utilizó el tampón fosfato DPBS (Dubelcco's phosphate buffer saline, Sigma Aldrich) enriquecido con calcio y magnesio. El procedimiento seguido corresponde al propuesto por Kokubo y colaboradores (Kokubo y Takadama, 2006). Tal y como se aprecia en la Fig. 1.1, tras 14 días de inmersión se observó la formación de estructuras típicas del crecimiento de cristales de CaP, un comportamiento que se reproduce en todas las condiciones estudiadas y que, además, se incrementa con el porcentaje

p/v empleado en la fabricación. Un aumento en la proporción p/v conlleva un aumento en la cantidad de alginato y también en la cantidad de CaP (manteniéndose la proporción entre ellos de 70:30) resultando en una mayor cantidad de puntos de nucleación que incrementan el proceso de biomineralización (López, 2019).

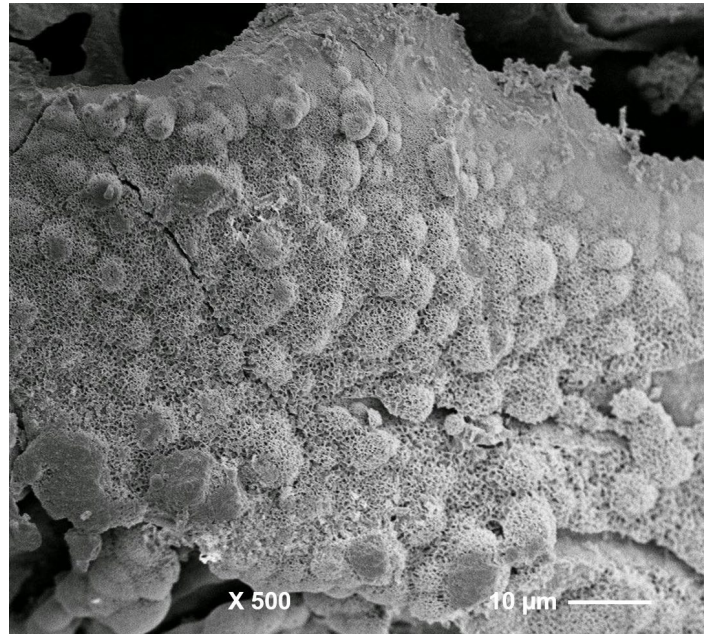


Fig. 1.1. Micrografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para el andamio Alg/CaP 70:30 9% p/v reticulado con CaCl_2 12.5%, tras 28 días de incubación en DPBS.

3.3. Parámetros estructurales

Los parámetros estructurales como porcentaje de porosidad, tamaño de poro, interconectividad y espesor trabecular fueron estudiados mediante microtomografía computarizada (μCT). De manera cualitativa y como se observa en la Fig. 1.2, se ha observado una distribución homogénea de los granos biocerámicos en la matriz polimérica de alginato y la porosidad del andamio disminuye a medida que aumenta la proporción p/v, mostrándose cada vez más apelmazados. No se apreciaron cambios a nivel morfológico al incrementar la reticulación del 1.6 al 12.5%. Por otro lado, se detectó una cierta tendencia al alineamiento de los poros en todas las formulaciones. Este comportamiento se encuentra descrito en la literatura, siendo una propiedad que presenta el alginato en función de los parámetros de fabricación utilizados: temperatura/tiempo de congelación y tiempo de liofilización (Zhang et al., 2017).

A partir de estas imágenes μCT se obtuvieron los valores cuantitativos de los parámetros microestructurales. En cuanto al tamaño de poro se observó una cierta tendencia a que éste disminuya a medida que aumenta la proporción p/v, situándose en torno a 100 μm para

prácticamente todas las formulaciones estudiadas, que es el establecido en la literatura como el tamaño mínimo requerido para asegurar el crecimiento celular (Karageorgiou y Kaplan, 2005). En cuanto al porcentaje total de porosidad e interconectividad, según la formulación empleada podemos encontrar valores muy variables, en el caso de la porosidad entre 70%-30% y para la interconectividad entre 90%-20%. De forma general ambos parámetros disminuyen a medida que se aumenta el porcentaje p/v y el porcentaje de reticulación. En cuanto al espesor trabecular, éste aumenta a medida que se incrementa el % p/v. Todas estas tendencias sólo se ven interrumpidas para aquellos andamios fabricados con una proporción del 9% p/v y reticulados al 12.5% CaCl₂ (López, 2019).

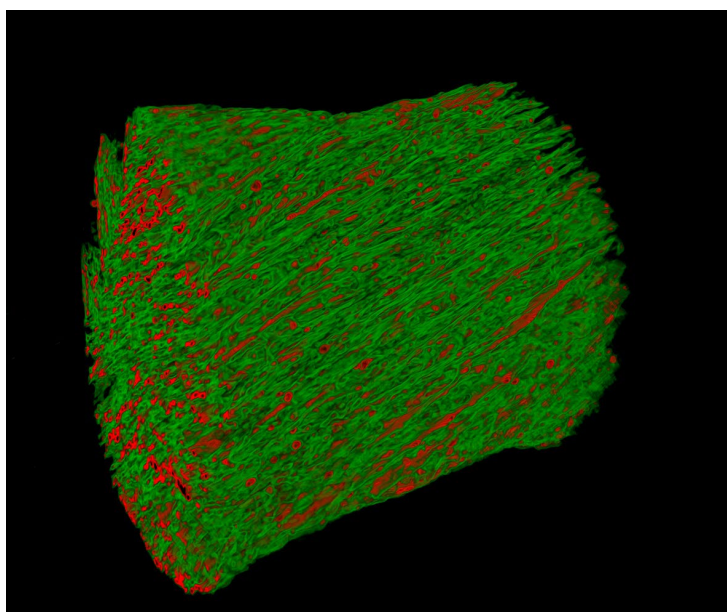


Fig. 1.2. Imagen obtenida mediante reconstrucción 3D realizada por microtomografía computarizada del andamio Alg/CaP 6% p/v reticulado al 12.5% con CaCl₂. En verde la matriz polimérica de alginato y en rojo los granos biocerámicos.

3.4. Comportamiento mecánico

El estudio del comportamiento mecánico de los andamios se realizó en modo compresión para todas las formulaciones anteriormente comentadas y también se incluyeron como andamios de referencia los fabricados con un 100% de alginato. Tal y como se puede observar en la Fig.1.3, en general las propiedades mecánicas se ven influidas por los parámetros estudiados. Respecto al porcentaje p/v empleado, se observa que el módulo de compresión aumenta a medida que este porcentaje es mayor; siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para los andamios fabricados a un 6% y 9% p/v respecto a los del 3% p/v, independientemente del porcentaje de reticulación empleado. Estos resultados indican que al disponer de mayor cantidad de material

(alginato y CaP) damos origen a andamios con parámetros estructurales que le aportan mayor rigidez, donde un aumento del % p/v origina que el tamaño de poro y porosidad disminuyan mientras el espesor trabecular aumenta (López, 2019).

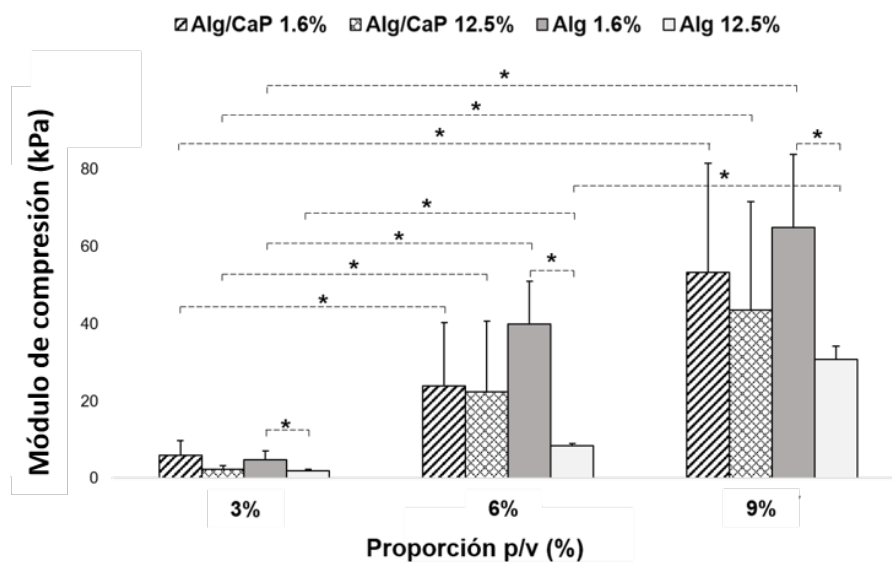


Fig. 1.3. Ensayos mecánicos para los andamios Alg/CaP en las diferentes proporciones peso/volumen y reticulados en diferentes porcentajes con CaCl_2 . Se han incluido los resultados para andamios con un 100% de alginato. Se muestran las diferencias estadísticas para $p < 0.05$ (Test no paramétrico de Mann-Whitney).

Atendiendo a la presencia de CaP, los valores encontrados arrojan unos márgenes de error muy elevados y estadísticamente no significativos. Sólo señalar que como cabría esperar para los andamios fabricados al 6 y 9 % p/v con 12.5% CaCl_2 e incorporando CaP en la mezcla, presentan un módulo de compresión mayor que los fabricados en las mismas condiciones, pero sólo con alginato. Estos resultados están en buen acuerdo con los de otros autores (Lin et al., 2004) demostrando que el empleo de una biocerámica mejora el comportamiento mecánico de los andamios fabricados en base a alginato. Cabe destacar que este comportamiento también ha sido observado en andamios fabricados utilizando colágeno y CaP, con la diferencia que la utilización de alginato incrementa el módulo de compresión en comparación con el colágeno (Diogo et al., 2018). En cuanto a la influencia del porcentaje de reticulación empleado, los andamios fabricados a 12.5 % CaCl_2 presentan un módulo de compresión menor que los 1.6 % CaCl_2 . Aunque este comportamiento sólo es estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto a los andamios fabricados exclusivamente con alginato, llama la atención que la tendencia es la misma para todos los casos. Los resultados obtenidos mediante microtomografía computarizada no nos permiten aclarar este comportamiento (López, 2019).

De todas las formulaciones estudiadas destacan por su estabilidad, estructura y respuesta mecánica los andamios fabricados al 6% p/v (1.6% reticulación CaCl₂) y al 9% p/v (12.5% reticulación CaCl₂). Por esta razón son los seleccionados para realizar los ensayos *in vitro*.

3.5. Caracterización biológica

La caracterización biológica de los andamios se realizó siguiendo la norma ISO 10993 que regula la evaluación biológica de productos sanitarios, con la línea celular MG-63 evaluando, en primer lugar, la viabilidad de la monocapa de células al situar los distintos andamios sobre la misma y, posteriormente, la proliferación celular tras la siembra directa de células sobre ellos. Además de los andamios con propiedades fisicoquímicas óptimas también se han incluido en el ensayo andamios fabricados 6% p/v – 12.5% reticulación CaCl₂ y andamios puros de alginato como material de referencia.

Como se puede observar en la Fig. 1.4, los resultados obtenidos confirmaron la viabilidad celular, aumento de la densidad celular tras 7 días de incubación y con ello la ausencia de citotoxicidad producida por potencial liberación al medio de partículas/moléculas nocivas o por contacto directo con los andamios. Además se confirma que la presencia de CaP en los andamios poliméricos, sea cual sea la formulación empleada para fabricar el andamio, no afecta a la viabilidad celular (López, 2019).

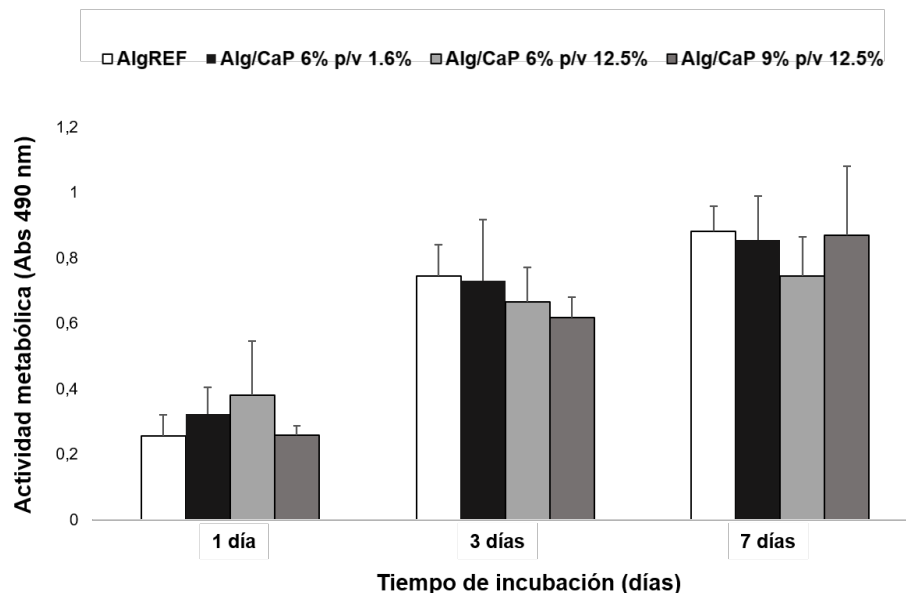


Fig. 1.4. Viabilidad celular (ensayo MTS) de la línea MG-63 tras 1, 3 y 7 días de incubación al contacto directo en fondo de pocillo con los andamios Alg/CaP 6% p/v reticulados al 1.6% y 12.5% y 9% p/v al 12.5%. Se incorpora un andamio sin CaP (AlgREF) como control.

4. Conclusiones

Se demuestra la viabilidad para fabricar andamios porosos de origen marino basados en la combinación de alginato de sodio y biocerámica de fosfato cálcico, siendo el agente reticulante el cloruro de calcio. Estos andamios presentan una distribución homogénea del granulado biocerámico en la matriz polimérica, siendo estables tras 28 días de incubación y con propiedades bioactivas en condiciones fisiológicas. En cuanto a las propiedades estructurales y mecánicas, las formulaciones óptimas corresponden a los andamios fabricados al 6% p/v (1.6% reticulación CaCl_2) y 9% p/v (12.5% reticulación CaCl_2). Los ensayos biológicos confirmaron la ausencia de citotoxicidad de todos los andamios ensayados y la presencia de CaP parece favorecer la adhesión celular respecto a andamios fabricados únicamente con alginato.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido parcialmente financiada por los proyectos: 0245_IBEROS_1_E, “Instituto de Bioingeniería en Red para el Envejecimiento Saludable”; 0302_CVMAR_I_1_P 2017-2019- Industrial innovation through specific collaborations between companies and research centres in the field of marine biotechnology valorization; BLUEHUMAN_Interreg_Atlantic Area; “BLUE biotechnology as a road for innovation on HUMAN’s health aiming Smart growth in Atlantic Area” y REDE GALEGA DE BIOMATERIAIS (ED 431D 2017/13).

Referencias bibliográficas

Amini A.R. Laurencin C.T. Nukavarapu S.P. (2013) Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40(5): 363–408.

Balboa Franco M. E. (2013) Valorización de recursos naturales en la producción de materiales cerámicos con aplicaciones biomédicas. Trabajo Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Minas de Vigo.

Diogo G.S. Senra E.L. Pirraco R.P. Canadas R.F. Fernandes E.M. Serra J. Pérez-Martín R.I. Sotelo C.G. Marques A.P. González P. Moreira-Silva J. Silva T.H. Reis R.L. (2018) Marine Collagen/Apatite Composite Scaffolds Envisaging Hard Tissue Applications. *Mar Drug*, 16(8): 269.

Estrada C. (2006) Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Revista EIA*, 5: 93-100.

Karageorgiou V. Kaplan D. (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26: 5474–5491.

Kasper D, Fauci A, Hauser S, Dan Longo, Jameson JL, Loscalzo J. (2016) Ingeniería de tejidos. En: *Harrison Principios de Medicina interna 19e*. McGRAW-HILL INTERAMERICANA.

Kokubo T. Takadama H. (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27: 2907–2915.

Life iSEAS (IIM-CSIC). Soluciones innovadoras basadas en el conocimiento para mejorar los mecanismos de valor añadido con vistas a una pesca sana y sostenible en la UE.

Lin H.R. (2004) Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*, 71 (1): 52–65.

López-Álvarez M. Pérez-Davila S. Rodríguez-Valencia C. González P. Serra J. (2016) The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts. *Biomed. Mater*, 11 (3): 1-13.

López-Álvarez M. Vigo E. Rodríguez-Valencia C. Outeiriño-Iglesias V. González P. Serra J. (2017) In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. *Clin Oral Implants Res*, 28 (9): e91–100.

López E. (2019) Andamios y biomoléculas de origen marino para regeneración tisular del sistema osteoarticular. Tesis Doctoral Universidad de Vigo, Galicia, España.

Roseti L. Parisi V. Petretta M. Cavallo C. Desando G. Bartolotti I. Grigolo B. (2017) Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C*, 78: 1246–1262.

Zhang Y. (2017) Influence of Stage Cooling Method on Pore Architecture of Biomimetic Alginate Scaffolds. *Scientific Reports*, 7 (1): 1–8.

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

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

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

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

m.landin@usc.es

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3959003>

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

1. Introducción

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

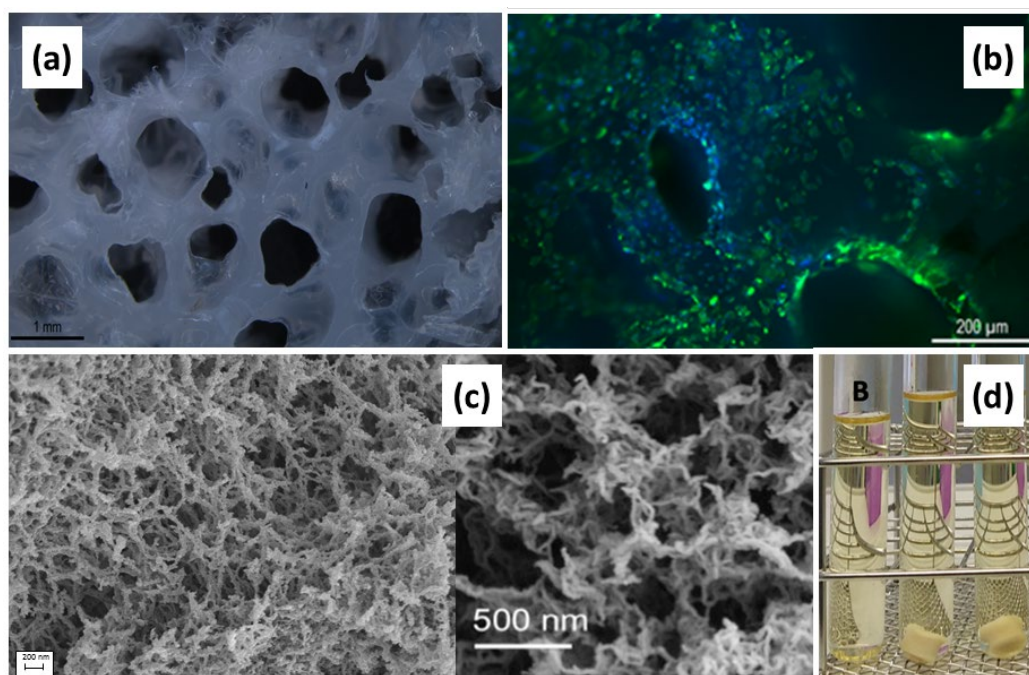


FIGURA. 2.1. Procesado de biomateriales con tecnología de CO₂ supercrítico: (a) andamios porosos medicados para regeneración ósea con alta porosidad (Reproducida con permiso de García-González et al., 2018); (b) alta integración tisular (CAM tests) (Reproducida con permiso de García-González et al.,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

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

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

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

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

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

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

3.1. Preparación y caracterización de las formulaciones obtenidas

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 2.1. Características de las formulaciones blancas y cargadas.

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

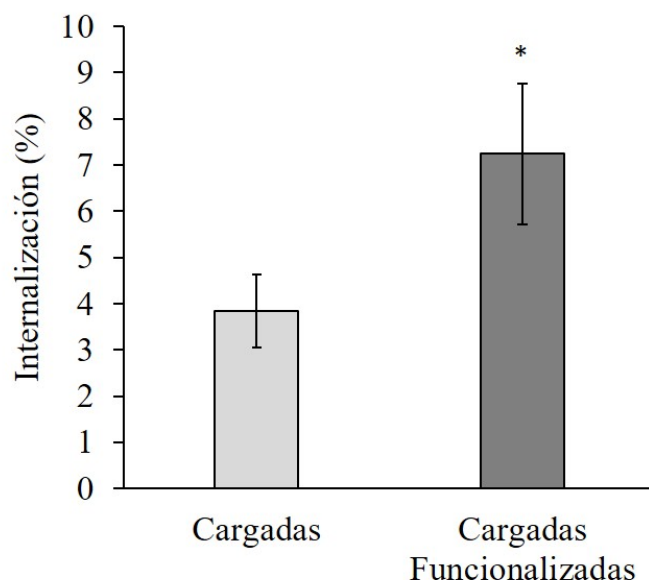


FIGURA. 2.2. Porcentaje de internalización celular en macrófagos (* $p < 0,05$).

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

Agradecimientos

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

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

Referencias bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Compósitos de colagénio/apatite de origem marinha para aplicação em engenharia de tecidos mineralizados.

G.S. Diogo^{1,2}, M. Almeida^{1,2}, E. López-Senra³, R.P. Pirraco^{1,2}, R.I. Pérez-Martín⁴, C.G. Sotelo⁴, J. Serra³, P. González³, T.H. Silva^{1,2} and R.L. Reis^{1,2,5}

¹3B's Research Group, I3B's – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics of University of Minho, Guimarães, Portugal.

²ICVS/3B's—PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

³New Materials Group, Department of Applied Physics, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur IISGS, University of Vigo, Vigo, Spain.

⁴Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Vigo, Spain.

⁵The Discoveries Centre for Regenerative and Precision Medicine, University of Minho, Guimarães, Portugal.

gabriela.carlos@i3bs.uminho.pt
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961355>

Devido ao aumento de lesões associadas ao envelhecimento da população, a regeneração do tecido ósseo tem sido alvo de estudo. Apesar da vasta investigação neste sentido, os auto-enxertos continuam a prevalecer como tratamento de primeira linha, apesar das suas limitações.

A extração de compostos de recursos marinhos para uso em abordagens de engenharia de tecidos emerge como uma alternativa promissora para regeneração de lesões ósseas. Neste capítulo apresenta-se um biomaterial promissor para aplicação em engenharia de tecidos duros tendo como base uma estratégia de valorização de sub-produtos marinhos, nomeadamente pele e dentes de tubarão.

1. Introdução

O aumento da esperança média de vida e o conseqüente aumento da incidência de lesões associadas ao tecido ósseo tem motivado a procura por estratégias mais eficazes para este desafio terapêutico. Apesar de existirem diversas abordagens na reparação destas lesões, como os enxertos, estas apresentam-se associadas a um elevado risco de rejeição, infeção e dor, sendo por isso necessário encontrar alternativas (Lichte et al., 2011).

A engenharia de tecidos e o desenvolvimento de matrizes tridimensionais (3D), biocompatíveis e biodegradáveis, emergem como alternativas promissoras uma vez que conferem propriedades mecânicas e biológicas capazes de mimetizar a composição e estrutura nativa do tecido ósseo, promovendo a adesão e proliferação celular necessárias para a regeneração do mesmo. Apesar dos progressos atingidos, não existe ainda uma abordagem que garanta completamente a complexidade necessária para essa regeneração e que permita ultrapassar as várias dificuldades até à transição para a prática clínica. Neste sentido, existe uma procura cada vez maior por novos materiais e técnicas de processamento no sentido de desenvolver estruturas com elevado nível de complexidade e aplicabilidade (Maia et al., 2019).

Diversos polímeros e cerâmicos naturais ou sintéticos têm sido amplamente explorados para produzir estas estruturas. No entanto, a reduzida biocompatibilidade de compostos de origem sintética e o risco de imunogenicidade associado aos compostos extraídos de mamíferos têm levantado questões de sustentabilidade.

Assim, os recursos marinhos surgem como uma alternativa promissora para obtenção destes compostos, apresentando várias vantagens. Não estão associados a doenças de origem mamífera (como a BSE) ou, até ao momento, à transmissão de outro tipo de doenças, ao mesmo tempo não apresentam restrições religiosas (Silva et al., 2012). Além disso, alguns dos materiais de origem marinha mais relevantes para a área biomédica podem ser isolados de sub-produtos de pesca, a baixo custo, criando valor a produtos considerados resíduos para a indústria de

transformação de peixe, representando uma oportunidade com enorme potencial tríplice – tecnológico, económico e ambiental – e, ao mesmo tempo, contribuindo para uma exploração sustentável dos recursos marinhos. Por exemplo, materiais provenientes de peixe têm uma grande quantidade de compostos bioativos com potencial para ser usado em aplicações na área da saúde. Entre estes, o colagénio e fosfatos de cálcio obtidos de pele e osso (“espinha”) de peixe, respectivamente, representam os compostos mais abundantes e dos mais explorados (Kim e Mendis, 2006).

O colagénio é uma das principais proteínas estruturais encontrada em tecidos animais, como estruturas ósseas e cartilagíneas, sendo um dos polímeros mais utilizados em engenharia de tecidos, tendo sido já demonstradas diversas aplicações do colagénio marinho no desenvolvimento de materiais biomédicos (Silva et al., 2014). Por exemplo, colagénio isolado de pele de salmão foi mineralizado e utilizado para a produção de compósitos 3D e colagénio extraído de tubarão foi usado na preparação de hidrogéis, tendo sido demonstrada a capacidade destas estruturas para regeneração de tecido ósseo e cartilagem, respectivamente (Hoyer et al., 2012, Fernandes-Silva et al., 2013).

Os fosfatos de cálcio de origem marinha têm excelentes propriedades para aplicação em tecidos duros, dada a sua semelhança à composição mineral do tecido ósseo humano. Este é maioritariamente composto por fosfatos de cálcio sob a forma de hidroxiapatite, 60 a 70% do peso do osso, e a parte restante maioritariamente colagénio, sendo que ambos são importantes para conferir flexibilidade e resistência à compressão (Reznikov et al., 2014). Recentemente demonstrou-se que fosfatos de cálcio obtidos de dentes de tubarão azul apresentam propriedades interessantes dado que são compostos por hidroxiapatite, o cerâmico mais utilizado em regeneração de tecido duro, mas também têm fluorapatite. A presença de flúor, bem como de outros elementos como magnésio e estrôncio, conferem pistas químicas que estimulam a atividade de células osteoblásticas (López-Álvarez et al., 2016).

A presença de íões destes elementos em partículas de bioapatite marinha, e a incorporação destas partículas numa matriz de colagénio marinho tipo I, a proteína mais abundante em tecidos duros, obtidos do mesmo recurso marinho, pode ser uma combinação ideal para produção de estruturas com bom desempenho na regeneração de tecidos duros, sendo relevante proceder a esta avaliação.

2. Desenvolvimento de compósitos de colagénio e bioapatite de origem marinha

2.1. Obtenção e caracterização de materiais de subprodutos da pesca de tubarão

Numa perspetiva de valorização de subprodutos marinhos sugeriu-se a preparação de estruturas 3D combinando colagénio extraído da pele de tubarão (*Prionace glauca*) e bioapatite extraída de dentes de tubarão (*Prionace glauca* e *Isurus oxyrinchus*).

Resumidamente, iniciou-se o processo de extração de colagénio com um pré-tratamento das peles de tubarão com uma solução alcalina de hidróxido de sódio para garantir uma maior purificação da amostra (remoção de proteínas não colagenosas). Seguidamente, extraiu-se o colagénio por solubilização numa solução de ácido acético e prosseguiu-se com a diálise da solução resultante, finalizando-se o processo com liofilização. Para determinar o tipo de colagénio obtido foi realizada uma análise do perfil proteico confirmando-se que o colagénio extraído é maioritariamente colagénio tipo I, o mais abundante na pele de organismos marinhos (Sotelo et al., 2015).

Para a obtenção da bioapatite utilizaram-se dentes provenientes de duas espécies de tubarão, *Isurus oxyrinchus* e *Prionace glauca*; a sua caracterização foi efetuada em estudos anteriores a este trabalho por López-Álvarez *et al.* (López-Álvarez et al., 2016, 2017). O processo consistiu na limpeza manual dos dentes para eliminação de restos de tecidos orgânicos, seguindo-se trituração para redução de tamanho das amostras, calcinação (a 950 °C) para remoção da parte orgânica e finalmente peneiração para obtenção de partículas com dimensão controlada. Estas foram então analisadas recorrendo a uma combinação de diferentes técnicas de caracterização (difração de raios-X (XRD), microscopia electrónica de varrimento (SEM) e espectrometria de emissão ótica por plasma (ICP-OES)). As partículas resultantes apresentaram um tamanho médio de poro de 50 µm, constituído por duas fases: fase apatítica (65-70%, hidroxiapatite e fluorapatite) e não apatítica (25-30% de whitlockite e fosfato tricálcico (TCP)) e compostas por cálcio (Ca), fósforo (P) na forma de fosfato, seguido por flúor (F), sódio (Na) e magnésio (Mg). Esta composição revelou elevada semelhança com fosfatos de cálcio extraídos de outros organismos marinhos, como espinhas de bacalhau (Piccirillo et al., 2013). Comparando a composição elementar dos dentes de tubarão com a do osso humano, pode-se observar uma maior concentração dos elementos Ca, P, F e Na nas apatites de origem marinha (Kokubo et al., 2003).

2.2. Combinação de colagénio e bioapatite de origem marinha para produção de compósitos

Para a produção das estruturas tridimensionais solubilizou-se o colagénio extraído (mCol) e adicionou-se à solução as partículas de bioapatite provenientes de dentes de tubarão (mBAp), testando-se diferentes concentrações destes dois compostos (mCol:mBAp; 100:0; 70:30; 50:50 e 30:70). Analisou-se a influência de dois reticulantes, a diferentes concentrações, na formação e estabilidade das misturas: etil(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) (12,5 e 25%) e hexametilenodiisocianato (HMDI) (1 e 5%). Os compósitos de colagénio e bioapatite foram produzidos por congelamento e liofilização obtendo-se esponjas porosas (Fig. 3.1). Esta técnica permite a formação de cristais durante o congelamento das misturas, com o tamanho e forma previamente definida, que por sublimação durante a liofilização dão origem a poros, originando assim uma estrutura porosa.



FIGURA 3.1. Compósitos de colagénio e bioapatite.

2.2.1 Avaliação da estabilidade e desempenho biológico

De forma a analisar a viabilidade das estruturas produzidas para abordagens em engenharia de tecidos duros, efetuou-se XRD, SEM e microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT) para analisar a morfologia do material. Foram também efetuados testes para avaliar a sua resistência à compressão.

A estabilidade das estruturas, que permite inferir sobre a eficácia dos agentes reticulantes na reação de reticulação, foi medida macroscopicamente após incubação durante 14 dias a 37 °C

em meio de cultura, método que permite simular as condições de cultura a que estas estruturas serão sujeitas. Verificou-se que as estruturas beneficiaram da presença de partículas de bioapatite, em concordância com estudos anteriores que demonstraram que a incorporação de apatite na matriz de colagénio diminui a degradação das estruturas e aumenta as propriedades mecânicas, em comparação com estruturas apenas de colagénio (Johnson et al., 2011). Estes resultados foram confirmados também pelos ensaios de compressão que demonstraram o aumento das propriedades mecânicas com a incorporação de bioapatite (valores entre 75 a 400 Pa), embora abaixo das descritas para o osso humano (100–1000 MPa). No entanto, os ensaios de tensão-deformação mostraram materiais dúcteis, sugerindo propriedades interessantes para manuseamento em cirurgia e fixação no local do defeito (Kane et al., 2015). Verificou-se uma estabilidade semelhante para as estruturas reticuladas com as duas formulações de EDC/NHS e apenas para a estrutura reticulada com 5% HDMI. No entanto, observou-se perda da integridade estrutural com o aumento da concentração do reticulante EDC/NHS, confirmado por SEM como perda de porosidade.

A reconstrução tridimensional das estruturas revelou uma distribuição homogénea das partículas de bioapatite na matriz de colagénio, mostrando a viabilidade da metodologia usada para a produção dos compósitos e confirmou que o aumento da concentração dos agentes reticulantes diminui o tamanho do poro, porosidade e interconectividade. Esta análise evidenciou também estruturas mais compactas com o reticulante EDC/NHS, sendo este mais eficaz na reticulação de estruturas com colagénio.

Assim, considerando os resultados da estabilidade e reconstrução tridimensional, prosseguiu-se para a análise do desempenho biológico com as estruturas reticuladas com 12,5% EDC/NHS e com 5% HDMI. Estas mostraram um tamanho de poro adequado ($>100\mu\text{m}$) para promover a adesão, migração e proliferação celular e porosidade próxima da porosidade do osso (cerca de 80%) (Jones et al., 2009).

Seguiu-se a avaliação biológica para determinar a natureza bioactiva das estruturas produzidas, após incubação em fluido corporal simulado (SBF). Imagens obtidas por SEM dos compósitos reticulados com 12,5% EDC/NHS e 5% HDMI, após 14 dias de incubação em SBF, mostram deposição de minerais nas estruturas que combinam colagénio e bioapatite, revelando a natureza bioactiva das estruturas produzidas com a incorporação deste cerâmico (Johnson et al., 2011) (Fig. 3.2).

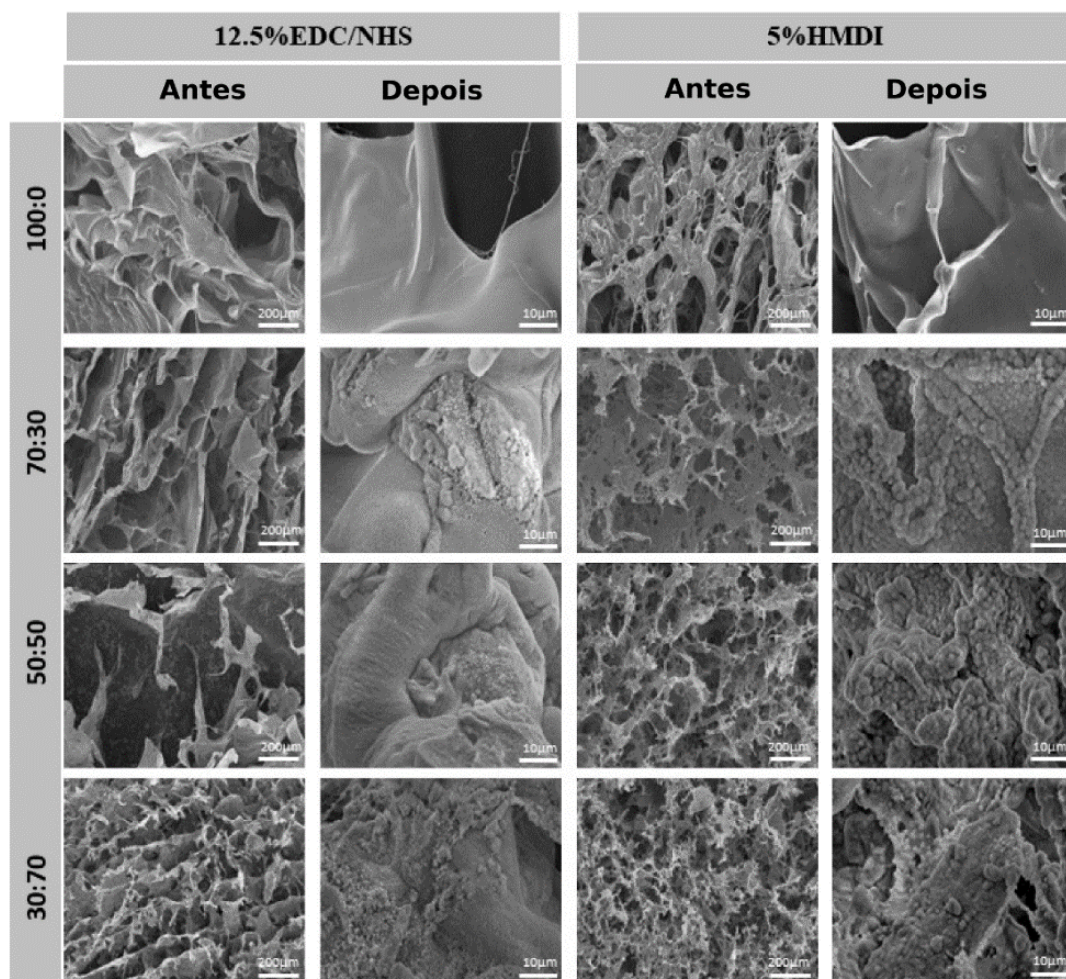


FIGURA 3.2. Imagens obtidas por microscopia electrónica (SEM) dos compósitos produzidos com diferentes rácios de colagénio e bioapatite e reticulados com formulações diferentes de EDC/NHS e HMDI antes e após 14 dias de incubação em fluido corporal simulado (SBF).

Para avaliar a citotoxicidade e desempenho biológico selecionou-se uma linha celular de osteoblastos, Saos-2, e colocou-se em contacto com as estruturas produzidas. A análise mostrou maior atividade metabólica nas misturas reticuladas com 12,5% EDC/NHS, com resultados semelhantes para as diferentes formulações testadas (Fig. 1.3) e células viáveis após 72 horas em contacto com estas estruturas.

Sumariando, das várias formulações testadas considerando os dois agentes reticulantes e os dois materiais, a avaliação conjunta da integridade estrutural e da actividade metabólica das células demonstrou que os compósitos beneficiaram com a incorporação de bioapatite, e que os sistemas reticulados com 12,5% EDC/NHS foram os que apresentaram melhores propriedades estruturais e biológicas, nomeadamente estruturas coesas, com maior porosidade, tamanho do poro e interconectividade. A maior área disponível promove a adesão e migração de

osteoblastos, facilitando o crescimento e proliferação das células e a capacidade de induzir a mineralização, ao mesmo tempo que uma estrutura coesa exibe maior resistência à compressão.

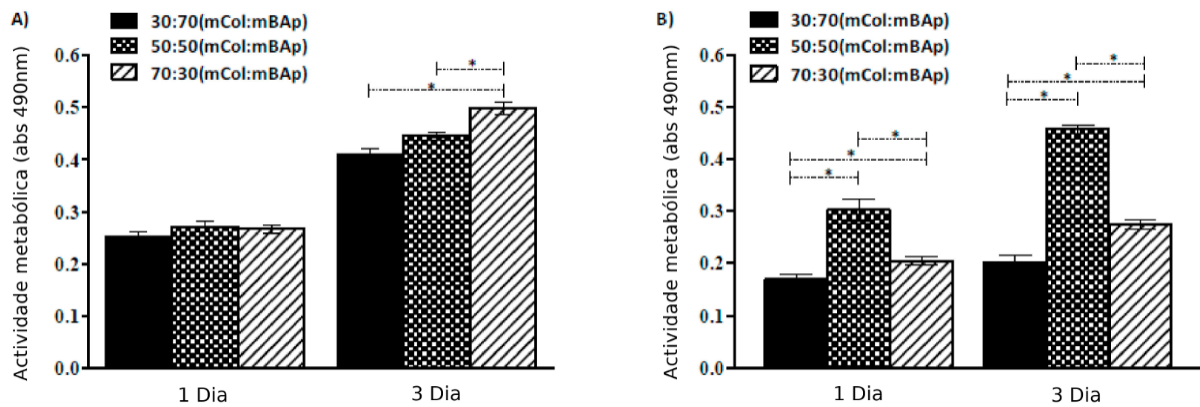


FIGURA 3.3. Actividade metabólica de linhas celulares osteoblásticas humanas (Saos-2) avaliada após contacto com os compósitos de colagénio (Col) e bioapatite (BAp) reticulados com A)12,5% EDC/NHS e B)5%HDMI.

2.2.2 Ensaios *in vivo*

Apesar do aumento de estudos que reportam o desenvolvimento de estruturas com colagénio de origem marinha, são poucos os que apresentam resultados *in vivo* da avaliação do seu desempenho em modelos animais. Geralmente, o colagénio extraído de organismos marinhos, nomeadamente de peixes, é caracterizado por uma temperatura de desnaturação baixa relativamente ao extraído de outras fontes, o que tem vindo a limitar o seu uso em experiências *in vivo* devido à grande probabilidade de desnaturação à temperatura fisiológica do modelo animal seleccionado (Alves et al., 2017; Miki et al., 2015). Contudo, diferentes técnicas de processamento têm vindo a ser exploradas de modo a aumentar a sua estabilidade térmica. Hassanbhai e colaboradores (2017) demonstraram que o uso do reticulante glutaraldeído influenciou a estabilidade das membranas criadas por electrofiação, nomeadamente na temperatura de desnaturação que foi consideravelmente maior quando comparada com o produto Bio-Gide® (membranas de colagénio com origem porcina, comercializadas pela empresa Suíça Geistlich Pharma). As membranas não apresentaram citotoxicidade, ainda que *in vivo* tenham sofrido uma degradação mais rápida (Hassanbhai et al., 2017).

Prosseguiu-se com a avaliação *in vivo* das estruturas desenvolvidas com colagénio e bioapatite de tubarão, para avaliar a sua capacidade de promover a regeneração de tecido ósseo. Para tal, estruturas preparadas com diferentes formulações de colagénio e bioapatite foram produzidas e

implantadas em animais com defeitos induzidos nos joelhos direito e esquerdo durante 12 semanas. As estruturas foram preparadas com tamanho adequado aos defeitos induzidos nos animais, utilizando as seguintes formulações: colagénio extraído da pele de tubarão e fosfatos de cálcio extraídos dos dentes (mCol:mBap (30:70), Grupo I)), colagénio extraído de pele de bovino com hidroxiapatite obtida comercialmente (bCol:cAp (30:70), Grupo II)), apenas colagénio marinho (mCol, Grupo III) e um grupo que serviu de controlo (animais com defeito mas sem implantação de estruturas, Grupo IV).

A regeneração do defeito foi analisada recorrendo à técnica de μ -CT e os resultados preliminares mostram diferenças entre os diferentes grupos testados, sendo de realçar que a região sem tecido ósseo (onde tinha sido criado o defeito) nos animais pareceu diminuir de tamanho para as condições que combinam colagénio com fosfatos de cálcio, independentemente da fonte (grupos I e II) (Fig. 3.4), o que poderá ser indicativo da capacidade dos referidos biomateriais para estimular a regeneração dos tecidos nessa região. O trabalho prossegue com a análise histológica para avaliar a resposta inflamatória, a formação de novo osso e a produção de colagénio, no sentido de propor um novo biomaterial para regeneração de osso, perspetivando a sua utilização em estratégias de engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

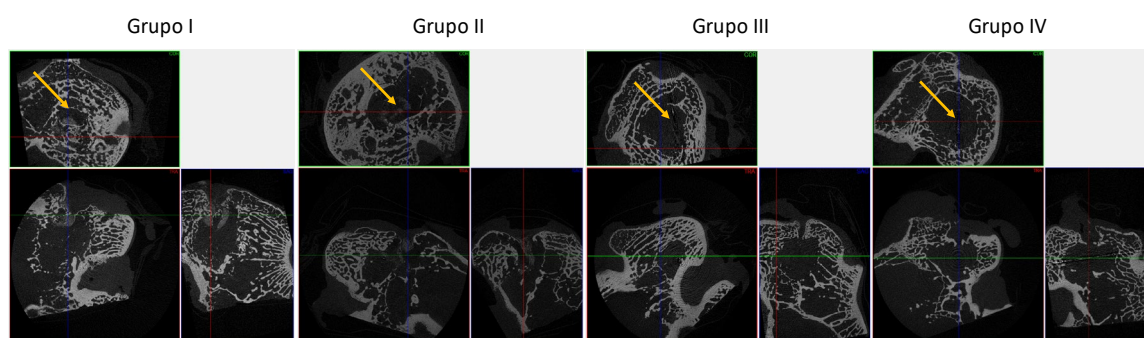


FIGURA 3.4. Imagens 2D obtidas por microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT). Grupo I (mCol:mBap), Grupo II (bCol:cAp), Grupo III (mCol) e Grupo IV (defeito vazio). Seta de cor amarela realça a área do defeito.

3. Conclusão

Os organismos marinhos emergem como uma fonte atrativa para obtenção de compostos bioativos, apesar do processamento destes compostos com elevado grau de pureza e a baixo custo constituir atualmente um desafio. Neste trabalho conseguiu-se produzir estruturas estáveis e bioativas com capacidade de suportar a cultura de osteoblastos e promover a regeneração de

tecido ósseo. O desenvolvimento de compósitos de colagénio/bioapatite a partir de subprodutos da indústria pesqueira, com viabilidade para abordagens terapêuticas em engenharia de tecidos duros é aqui sugerida, possibilitando ainda a combinação com células estaminais, perspetivando-se novos biomateriais e medicamentos de terapia avançada (*ATMP – Advanced Therapy Medicinal Products*) para aplicação clínica num novo paradigma de Medicina Regenerativa.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da União Europeia através do Programa INTERREG—POCTEP, no âmbito dos Projetos 0687_NOVOMAR_1_P e 0245_IBEROS_1_E, através do Programa de cooperação transnacional Espaço Atlântico, no âmbito do Projeto MARMED (2011-1/164) e através do 7º Programa-Quadro de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico (FP7), através do Projeto POLARIS (REGPOT-CT2012-316331). Os autores gostariam de agradecer também ao Centro Tecnológico del Mar (CETMAR, Vigo, Espanha) e COPEMAR SA (Espanha) pelo fornecimento dos subprodutos de tubarão. G.S.D agradece ao Programa Norte2020 (Portugal2020) pela bolsa de doutoramento (NORTE-08-5369-F SE-000044) e R.P. agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo contrato IF/00347/2015.

Referências bibliográficas

Alves A., Marques A.L.P., Martins E., Silva T.H., Reis R.L. (2017) Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics*, 4: 39.

Fernandes-Silva S., Moreira-Silva J., Silva T.H., Perez-Martin R.I., Sotelo C.G., Mano J.F., Duarte A.R.C., Reis R.L. (2013) Porous hydrogels from shark skin collagen crosslinked under dense carbon dioxide atmosphere. *Macromol. Biosci.*, 13: 1621–1631.

Hassanbhai A.M., Lau C.S., Wen F., Jayaraman P., Goh B.T., Yu N., Teoh S.H. (2017) In Vivo Immune Responses of Cross-Linked Electrospun *Tilapia* Collagen Membrane<sup/>. *Tissue Eng. Part A*, 23 (19-20): 1110-1119.

Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M., Gelinsky M. (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13: 1059–1066.

Johnson A.J.W., Herschler B.A. (2011) A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater.*, 7: 16–3.

Jones A.C., Arns C.H., Hutmacher D.W., Milthorpe B.K., Sheppard A.P., Knackstedt M.A. (2009) The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*, 30: 1440–1451.

Kane R.J., Weiss-Bilka H.E., Meagher M.J., Liu Y., Gargac J.A., Niebur G.L., Wagner D.R., Roeder, R.K. (2015) Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater.*, 17: 16–25.

Kim S.-K., Mendis E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts—Review. *Food Res. Int.*, 39: 383–393.

Kokubo T., Kim H.-M., Kawashita M. (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24: 2161–2175.

Lichte P., Pape H., Pufe T., Kobbe P., Fischer H. (2011) Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*, 42: 569–573.

López-Álvarez M., Pérez-Davila S., Rodríguez-Valencia C., González P., Serra J. (2016) The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts. *Biomed. Mater.*, 11: 035011.

López-Álvarez M., Vigo E., Rodríguez-Valencia C., Outeiriño-Iglesias V., González P., Serra J. (2017) In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. *Clin. Oral Implants Res.*, 28: e91–e100.

Maia R.F., Correlo V.M., Oliveira, J.M., Reis, R.L. (2019) Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering. In: *Principles of Regenerative Medicine*. Atala A, Lanza R., Mikos A.G, Nerem R. (Eds), Academic Press, pp. 535-558.

Miki A., Inaba S., Baba T., Kihira K., Fukada H., Oda M. (2015) Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79(10):1603-7.

Piccirillo C., Silva M., Pullar R., da Cruz I.B, Jorge R., Pintado M., Castro P.M. (2013)

Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Mater. Sci. Eng. C*, 33: 103–110.

Reznikov N., Shahar R., Weiner S. (2014) Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.*, 10 (9): 3815-3826

Silva T.H., Alves A., Ferreira B., Oliveira J.M., Reys L., Ferreira R., Sousa R., Silva S., Mano J., Reis R.L. (2012) Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int. Mater. Rev.*, 57: 276–306.

Silva T.H., Moreira-Silva J., Marques A.L., Domingues A., Bayon Y., Reis R.L. (2014) Marine origin collagens and its potential applications. *Mar. Drugs*, 12: 5881–5901.

Sotelo C.G., Blanco Comesaña M., Ramos Ariza P., Pérez-Martín R.I. (2015) Characterization of collagen from different discarded fish species of the West coast of the Iberian Peninsula. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 25, 388–399.

4. Innovative sensors for age-related diseases

M.F. Frasco^{1,2,3}, F.T.C. Moreira^{2,3}, G. Martins^{2,3}, Y. Castaño-Guerrero^{2,3},
M.C.C.G. Carneiro^{2,3}, L. da Rocha^{2,3}, R. Pereira-Cameselle⁴, A. Ozcelik⁴, S. Bolaño⁵,
J.L. Alonso-Gómez⁴, A. Riveiro⁶, S. Chiussi⁶, A.L. Oliveira⁷, A. Sousa-Castillo^{8,9},
M.A. Correa-Duarte^{8,9}, M.G.F. Sales^{*1,2,3}

¹ BioMark/UC, Faculty of Sciences and Technology, Coimbra University, Coimbra, Portugal

² BioMark/ISEP, School of Engineering, Polytechnic Institute of Porto, Porto, Portugal

³ CEB, Centre of Biological Engineering, Minho University, Braga, Portugal

⁴ Organic Chemistry Department, University of Vigo, Vigo, Spain

⁵ Inorganic Chemistry Department, University of Vigo, Vigo, Spain

⁶ Applied Physics Department, University of Vigo, Vigo, Spain

⁷ Universidade Católica Portuguesa, CBQF - Centro de Biotecnologia e Química Fina –
Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Porto, Portugal

⁸ Department of Physical Chemistry, Center for Biomedical Research (CINBIO), University of
Vigo, Vigo, Spain

⁹ Southern Galicia Institute of Health Research (IISGS) and Biomedical Research Networking
Center for Mental Health (CIBERSAM), Spain

goreti.sales@eq.uc.pt

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961372>

Point-of-care diagnosis is evolving together with the fast development in terms of detection and quantification ability of the sensing techniques. This chapter covers 5 different topics of innovative (bio)sensors that were designed with the aim of giving new insights to overcome many of the hurdles that still impair the widespread use of portable sensing technology. Novelty was achieved by applying inexpensive materials with tuned functions and refined recognition towards biomarkers of various age-related pathologies. Diverse strategies were followed in order to attain improved properties on relevant parameters of sensor performance such as selectivity, sensitivity, biocompatibility and autonomy. Thus, the foreseen biomedical applications are vast.

1. Raman SERS for detecting cancer biomarkers

One spectroscopic method that has become highly valuable in biosensors field is surface-enhanced Raman scattering (SERS) (Li et al., 2020). Among the many advantages, SERS provides high sensitivity at the single molecule level, with fingerprint molecular information and requiring low amount of sample (Carneiro et al., 2019). The enhancement of Raman signal is achieved by using plasmonic surfaces like metals or dielectrics where the analyte is deposited. The optical excitation of surface adsorbed molecules enhances the Raman scattering due to localized surface plasmons (Akkilic et al., 2020). Despite these excellent features, when the aim is to analyse a complex biological matrix in search for disease markers such as cancer protein biomarkers, it is necessary to introduce a biorecognition element into the metal surface, which will separate the target analyte from the remaining sample components (Carneiro et al., 2019). Antibodies are the most common molecules used to capture the target biomolecule, but molecularly imprinted polymers (MIPs) can also be coupled to SERS-based detection. The use of gold nanoparticles in SERS is highly attractive due to their unique properties and because they can be easily tuned in shape, size and functionalization (Sousa-Castillo et al., 2017).

To this end, novel sensing platforms have been designed to detect cancer biomarkers. As an example, a gold surface was modified with a MIP produced by electropolymerization (Carneiro et al., 2019) or with antibodies. These sensing elements are able to recognize the carcinoembryonic antigen (CEA). The recognition probe is composed by gold nanostars as signal enhancer loaded with 4-aminothiophenol as Raman reporter and functionalized with

antibodies against CEA. All the steps of system construction were optimized. As proof-of-concept, the approach using the MIP film showed a sensitive response within clinical levels (Carneiro et al., 2019). Overall, the analytical features of the strategy employed, including the pre-concentration step for the selective capture of the target molecule, are very promising and can be extended to other biomolecules.

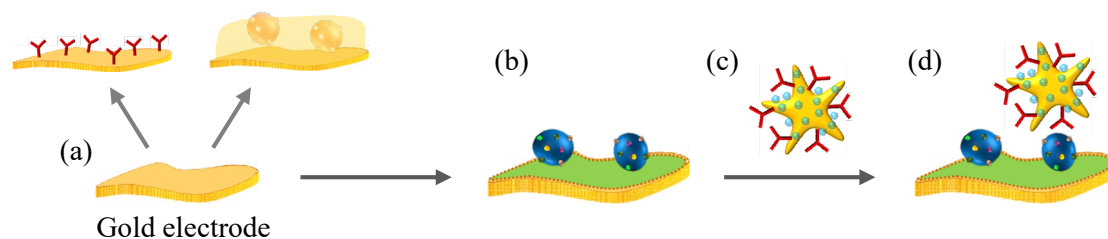


FIGURE 4.1. Scheme of the SERS sandwich-like approach. The procedure consisted in: (a) modifying a gold electrode with a recognition layer of antibodies or MIPs, (b) followed by incubation with the sample for target molecule binding, (c) washing with buffer and incubation with the Raman tag and (d) proceed with the analytical measurements by SERS.

2. NovSPE: Novel approaches for the production of SPEs

In recent years, screen-printed electrodes (SPEs) have increased in popularity due to a low-cost and easy mass production. The main advantage of developing these novel electrochemical substrates is related to miniaturization, improved performance and reproducibility issues. In addition, the required sample volume is highly reduced and the surface of the SPE is easily functionalized. This versatility enables the production of affordable, reproducible and flexible SPEs and fits the purpose of more advanced biosensing platforms for point-of-care diagnosis and wearable devices.

Innovation at this level can be achieved by using different substrates, which include flexible materials like paper (Martins et al., 2017) and polymer-based sheets. Other features that are investigated concern the methods used in the process of producing thin-films, electrode materials (metals thickness and roughness) and patterns design. In particular, gold-based electrodes have been widely used due to their good conductivity properties and their easy functionalization (Ozcelik et al., 2018).

As proof-of-concept, flexible transparent polymeric substrates modified with a single

conducting layer of gold were employed for the design of a molecular imprinting-based sensor to detect an oxidative stress biomarker. Several critical parameters of the new SPEs were first determined, such as adherence, roughness and gold thickness.

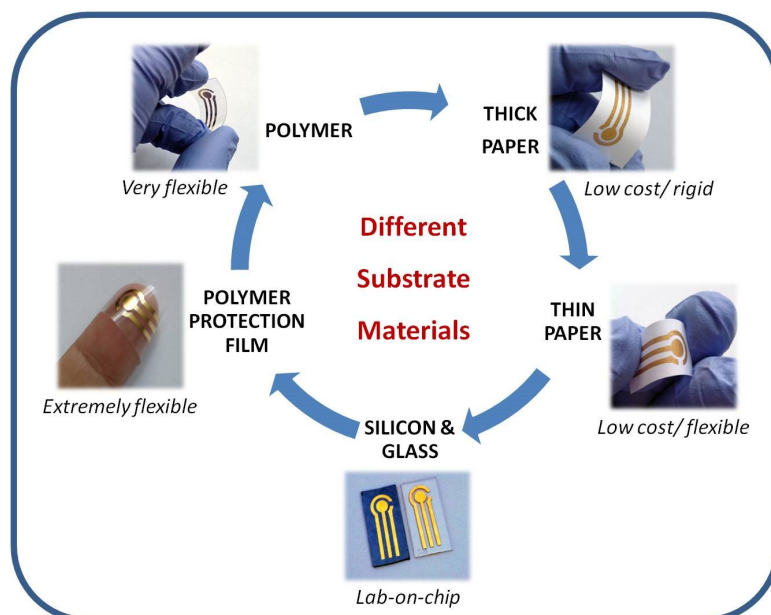


FIGURE 4.2. Scheme of the different substrates used for SPE production.

The performance of the obtained SPEs was evaluated electrochemically in order to optimize the approach in terms of pattern and material. These results were compared with the standard performance achieved by using commercial SPEs. Overall, the developed SPEs coated with the designed MIP demonstrated to be stable, highly reproducible and inexpensive, and may become a potential disposable sensing device in a wide range of applications.

3. CIGluSens: Chiroptical-Imprinted Glucose Sensors

Chirality is a fundamental property present in a variety of biological systems. The lack of mirror-image symmetry, i.e., the existence of two molecules called enantiomers that have opposite-handed-shapes often have distinct pharmacological profiles. The high sensitivity of chiroptical signals is thus very interesting for many applications including chirality-based biosensors (Ozcelik et al., 2020, Ma et al., 2019).

Chiroptical-based molecularly imprinted materials can be employed in the development of non-expensive but still highly sensitive and specific sensors. Molecular imprinting is a cost-effective method that enables obtaining polymeric matrices with specific binding sites for the target biomarker (Frasco et al., 2017). Overall, this innovative approach aims a selective recognition

of the analyte noninvasively in biological fluids. In this context, the monitoring of biomolecules related with the pathogenesis of diabetes is very promising.

A novel strategy is followed by incorporating tailored chiral fragments when producing the MIP. The imprinted polymer film is deposited on an electrode substrate with suitable conductivity and optical properties. The MIP is produced by electropolymerization of a monomer mixture that includes axially chiral fragments. The enantioselective interaction between the chiral surface and the biomolecule can then be followed both electrochemically and through circular dichroism. A wider application of chiroptical sensing in diagnosis is still hindered due to the usual weak signals. Nevertheless, the advances in materials science and sensor development are very appealing as the desired selectivity and specificity can be achieved.

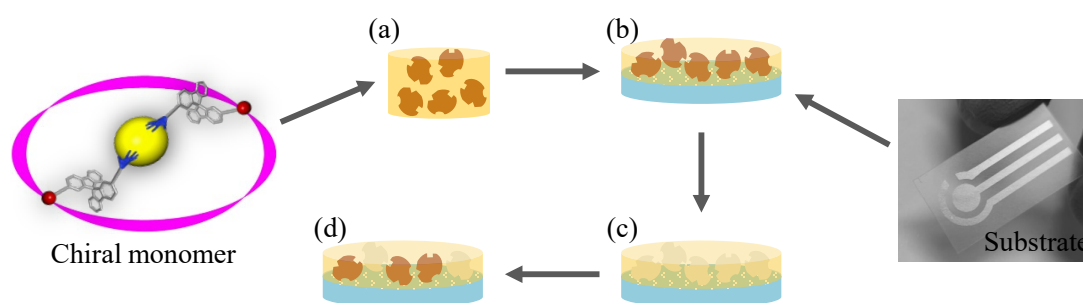


FIGURE 4.3. Scheme of chiroptical-MIP sensor construction, which includes the pre-incubation of template molecule with chiral monomer (a), followed by electropolymerization on proper substrate (b), template removal (c) and finally the assessment of biomarker recognition (d).

4. Enzymatic autonomous biosensing device for neurological biomarkers detection

Recent progress in diagnosis is related to the ability of producing autonomous low-cost devices, as is the case of enzymatic biofuel cells (EBFCs). Self-powered biosensors using EBFCs rely on oxidoreductase enzymes as the biocatalyst, to catalyse the oxidation of (bio)fuel at the anode and/or the reduction of the final electron acceptor at the cathode, for conversion of chemical energy into electricity (Moreira et al., 2019). Thus, EBFCs are biocompatible, operate at mild temperatures and neutral pH, and provide selective catalytic activity, resulting in a renewable technology that gained considerable interest namely as power source for implantable and microscale biomedical devices (Barton et al., 2004, Rasmussen et al., 2016).

Different strategies can be followed to fabricate EBFC supports, using materials like polyethylene naphthalate or flexible Kapton strips. The design of the device is then chosen and defined to cast a conductive material (gold or other metals). A subsequent step includes the modification of the conductive working electrodes with various composite materials for the assembly of enzymes and biorecognition elements. The EBFC is adapted to operate with a (bio)sensing material in the cathode/anode, leading to reproducible/efficient electrical output within time. The electrical features of the obtained patterned conductive materials are evaluated electrochemically in order to optimize the design and to evaluate the best material/pattern approach. This device can be used for timely diagnostic of neurodegenerative diseases (Moreira et al., 2017).

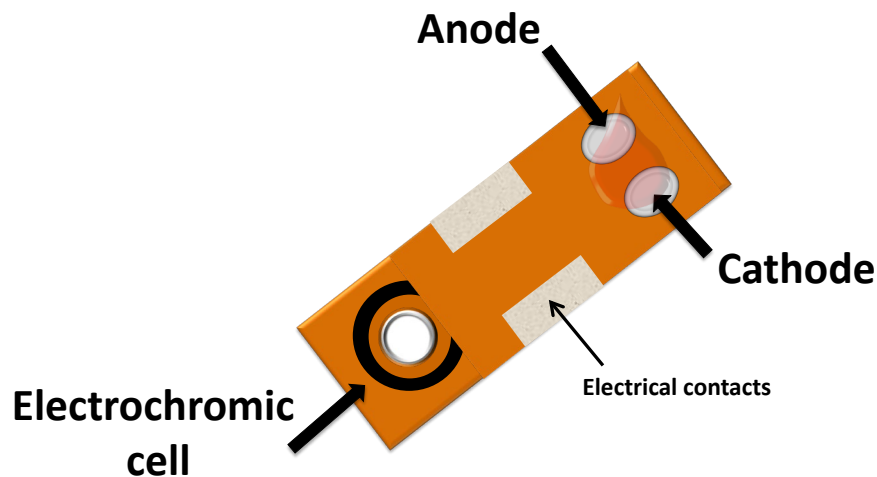


FIGURE 4.4. Enzymatic biofuel cell setup.

Despite the above-mentioned advantages, practical applications of EBFCs have been hindered mainly by their relatively low power output. Nonetheless, significant progress has been achieved in terms of enzyme stability, response time and power autonomy, which will lead to the foreseen widespread use of these devices.

5. Silk fibroin membranes for sensing infection in chronic wounds

The burden of chronic wounds, with a particularly high risk of infection, urge for innovative sensing dressings for an early detection, wound therapy and management. Biopolymer substrates made of silk fibroin are highly promising as membrane dressings due to its mechanical, optical, biocompatibility and biodegradability properties (Geão et al., 2019, Serôdio et al., 2019). At the same time, colorimetric sensing of infection is advantageous. In

the development of optical sensors, the traditional use of chromophores and fluorophores can be surpassed by structural colour-based materials. Photonic crystals can be made of spatially arranged periodic dielectric structures that either allow or block individual wavelengths of light, leading to a selective reflection (Diao et al., 2013). The sensing system can be modulated by using colloidal spheres of specific sizes and with proper surface functionalization.

The well-known polydopamine properties enable to construct a specific recognition element, a MIP, as part of the photonic structure, while simultaneously improving the colour contrast of the assembled films (Kawamura et al., 2016). In addition, complying with the need to use eco-friendly, biocompatible materials, the imprinted core-shell particles can be assembled on a silk membrane.

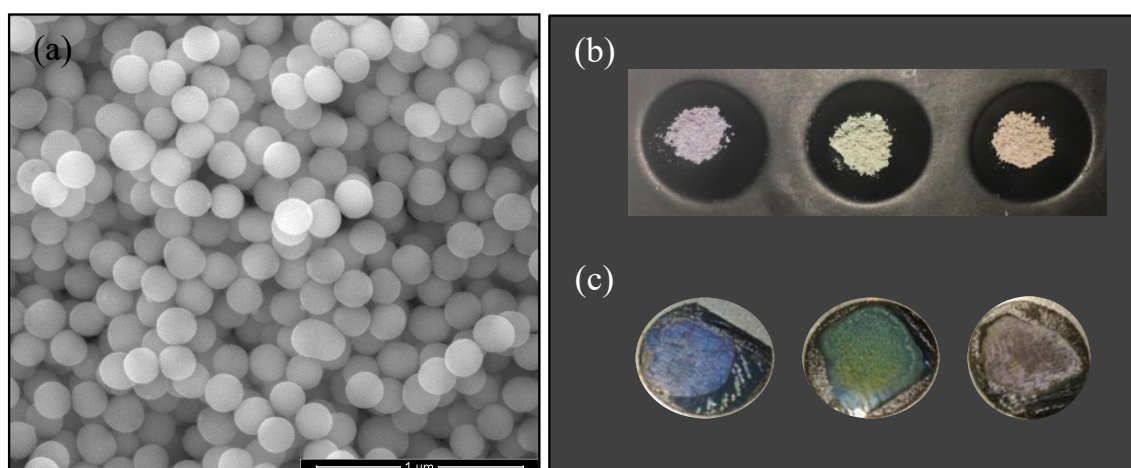


FIGURE 4.5. Representative scanning electron microscopy image of MIP nanoparticles (a), with photographs of coloured powders of nanoparticles having various sizes (b) and after film assembly (c).

Such particles can be used to sense biomarkers of wound infection but also for drug delivery, taking advantage of polymer tailoring (Luliński 2017). Overall, the aim is to observe optical changes in the structural colours upon sensing a specific biomarker, either analysed spectroscopically or followed semi-quantitatively by eye.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from IBEROS project (Instituto de Bioingeniería en Red para el Envejecimiento Saludable, INTERREG POCTEP/0245_IBEROS_1_E) supported by FEDER, also within the cooperation region of Galicia/Spain and North of Portugal. CBQF also acknowledges the scientific collaboration under the FCT project UID/Multi/50016/2019.

References

- Akkilic N., Geschwindner S., Höök F. (2020) Single-molecule biosensors: Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 151: 111944.
- Barton S. C., Gallaway J., Atanassov P. (2004) Enzymatic biofuel cells for implantable and microscale devices. *Chemical Reviews*, 104: 4867-4886.
- Carneiro M. C. C. G., Sousa-Castillo A., Correa-Duarte M. A., Sales M. G. F. (2019) Dual biorecognition by combining molecularly-imprinted polymer and antibody in SERS detection. Application to carcinoembryonic antigen. *Biosensors and Bioelectronics*, 146: 111761.
- Diao Y. Y., Liu X. Y., Toh G. W., Shi L., Zi J. (2013) Multiple structural coloring of silk-fibroin photonic crystals and humidity-responsive color sensing. *Advanced Functional Materials*, 23: 5373-5380.
- Frasco M. F., Truta L. A. A. N. A., Sales M. G. F., Moreira F. T. C. (2017) Imprinting technology in electrochemical biomimetic sensors. *Sensors*, 17: 523.
- Geão C., Costa-Pinto A. R., Cunha-Reis C., Ribeiro V. P., Vieira S., Oliveira J. M., Reis R. L., Oliveira A. L. (2019) Thermal annealed silk fibroin membranes for periodontal guided tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 30(2): 27.
- Kawamura A., Kohri M., Morimoto G., Nannichi Y., Taniguchi T., Kishikawa K. (2016) Full-Color Biomimetic Photonic Materials with Iridescent and Non-Iridescent Structural Colors. *Scientific Reports*, 6: 33984.
- Li P., Long F., Chen W., Chen J., Chu P. K., Wang H. (2020) Fundamentals and applications of surface-enhanced Raman spectroscopy-based biosensors. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 13: 51-59.
- Luliński P. (2017) Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review. *Materials Science and Engineering: C*, 76: 1344-1353.
- Ma W., Xu L., Wang L., Xu C., Kuang H. (2019) Chirality-based biosensors. *Advanced Functional Materials*, 29: 1805512.

Martins G. V., Tavares A. P. M., Fortunato E., Sales M. G. F. (2017) Paper-based sensing device for electrochemical detection of oxidative stress biomarker 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in point-of-care. *Scientific Reports*, 7: 14558.

Moreira F. T. C., Frasco M. F., Barbosa S. G., Peixoto L., Alves M. M., Sales M. G. F. (2019) Enzymatic self-powered biosensing devices. In: *Bioelectrochemical Interface Engineering*, John Wiley & Sons, Inc., pp. 505-519.

Moreira F. T. C., Sales M. G. F., Di Lorenzo M. (2017) Towards timely Alzheimer diagnosis: A self-powered amperometric biosensor for the neurotransmitter acetylcholine. *Biosensors and Bioelectronics*, 87: 607-614.

Ozcelik A., Pereira-Cameselle R., Ulrih N. P., Petrovic A. G., Alonso-Gómez J. L. (2020) Chiroptical sensing: A conceptual introduction. *Sensors*, 20(4): 974.

Ozcelik A., Pereira-Cameselle R., von Weber A., Paszkiewicz M., Carlotti M., Paintner T., Zhang L., Lin T., Zhang Y.-Q., Barth J. V., van den Nobelen T., Chiechi R. C., Jakob M., Heiz U., Chiussi S., Kartouzian A., Klappenberger F., Alonso-Gómez J. L. (2018) Device-compatible chiroptical surfaces through self-assembly of enantiopure allenes. *Langmuir*, 34: 4548–4553.

Rasmussen M., Abdellaoui S., Minter S. D. (2016) Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors and Bioelectronics*, 76: 91-102.

Serôdio R., Schickert S. L., Costa-Pinto A. R., Dias J. R., Granja P. L., Yang F., Oliveira A. L. (2019) Ultrasound sonication prior to electrospinning tailors silk fibroin/PEO membranes for periodontal regeneration. *Materials Science & Engineering C*, 98: 969-981.

Sousa-Castillo A., Ameneiro-Prieto Ó., Comesaña-Hermo M., Yu R., Vila-Fungueiriño J. M., Pérez-Lorenzo M., Rivadulla F., García de Abajo F. J., Correa-Duarte M. A. (2017) Hybrid plasmonic nanoresonators as efficient solar heat shields. *Nano Energy*, 37: 118-125.

5. Raman spectroscopy for cartilage damage severity, degradation and repair assessment.

P. Casal-Beiroa^{1, 2}, F.J. Blanco^{1, 2, 3}, J. Magalhães^{1, 2, 4}

¹Unidad de Medicina Regenerativa. Grupo de Reumatología (GIR). Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

²Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), Universidade da Coruña (UDC).

³Departamento de Medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Campus de Oza, Universidade da Coruña (UDC).

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER). Madrid, España

joana.cristina.silva.magalhaes@sergas.es

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961420>

Osteoarthritis (OA) is the most common rheumatic disease, characterized by progressive cartilage degradation. Current gold-standard diagnosis present limitations for detecting early stages of the disease, apart from being subjective to the reader. Raman spectroscopy (RS) has been recently described as a label-free, non-invasive tool to detect chemical and molecular changes in cartilage, producing a unique fingerprint of the tissue. This technique presents high potential as early diagnosis tool, promoting the discovery of optical biomarkers. Moreover, due to its specificity, RS could also be applied as a tool to monitor clinical outcomes as well as preconditioning of cell- or scaffold-based regenerative medicine therapies for cartilage repair and OA.

Introduction

Chronic pathologies that affect the joint tissues represent one of the major causes of disabilities in the elder population, being osteoarthritis (OA) one of the most common musculoskeletal diseases, affecting the hip, knees, hands, feet and spine (Blanco, 2014, Musumeci et al., 2015). Even though there are several clinical therapies currently being applied to patients, there are still several unmet needs for successful diagnosis and treatment, such as, biomarkers discovery and validation, patient phenotype definition and more efficient early diagnosis and/or follow-up tools (van der Kraan et al., 2016, Karsdal et al., 2016, Deveza et al., 2017).

OA severity is generally determined by the widely accepted gold standard Kellgren-Lawrence (K-L) radiographic score albeit it presents limitations for OA early-stage diagnosis (Kellgren and Lawrence, 1957, Altman et al., 1986). MRI whole joint-based assessment of knee OA has also been proposed (Hunter et al., 2011), however MRIs' high cost and incompatibility for some patients, limits its application as a regular medical care practice. On the other hand, assessment systems such as Mankin Histological-Histochemical Grading System (Mankin et al., 1971) and others (Pearson et al., 2011, Pascual Garrido et al., 2009), commonly used for cartilage degradation assessment during different stages of OA development, are time consuming, complex and subjective to the reader (Pauli et al., 2012) (Fig. 5.1).

Raman Spectroscopy (RS), a type of vibrational spectroscopy based on the inelastic scattering of photons, is a non-destructive technique that provides a chemical specific signature, commonly referred to as “molecular fingerprint” of a given sample. Different authors have extensively reviewed the advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnosis and biological tissues characterization, such as cartilage (Eberhardt et al., 2015, Butler et al., 2016).

One of the advantages of RS is the possibility to irradiate *in vitro* or *in vivo* human samples without damaging the tissues. After irradiation, Raman spectra acquisition are usually displayed at different intensities with corresponding wavelength shifts (cm^{-1}) specific to vibrations of molecular bonds (Aguiar et al., 2015) measured in arbitrary units. Raw data will be typically pre-processed in order to avoid unwanted baseline interference and processing may involve peak normalization; thereafter, data can be classified according to unsupervised or supervised statistical methods, allowing sample classification (biomarkers) or diagnostic analysis, respectively, where the latest involves the use of additional information obtained from gold

standards, such as histopathology or radiography scores. Moreover cross-validation against biochemical tools is frequently included (Eberhardt et al., 2015).

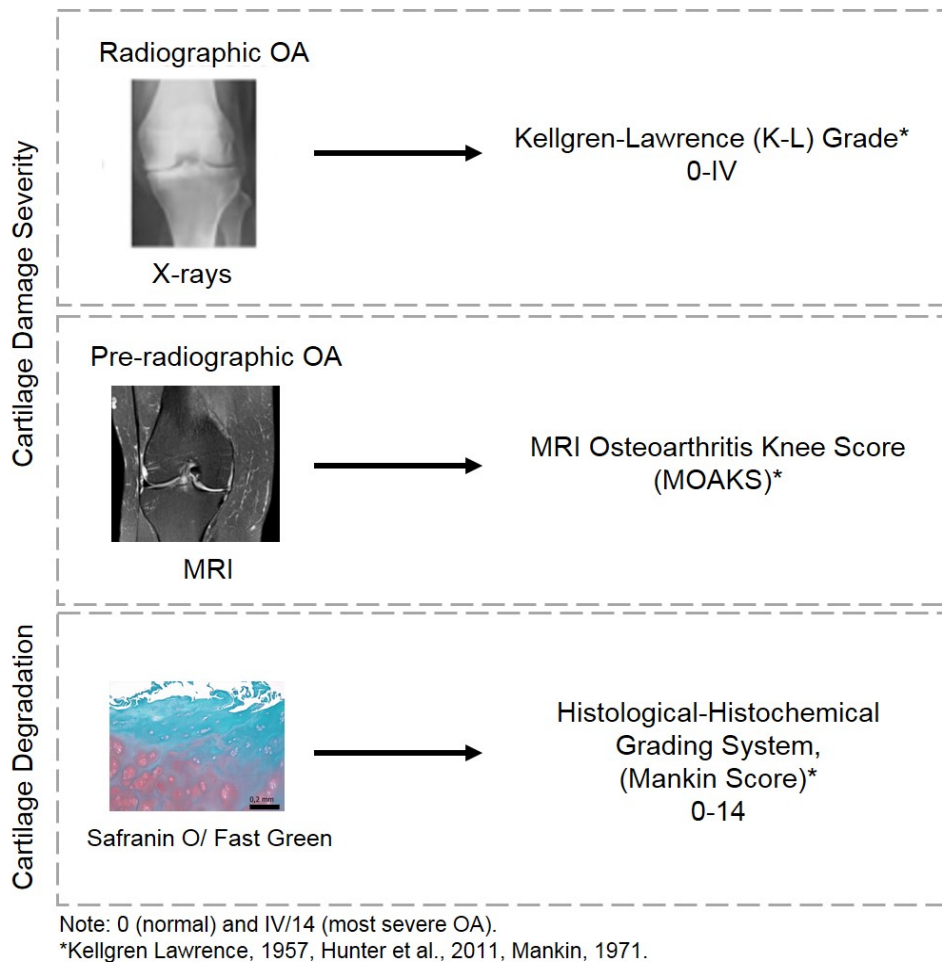


FIGURE 5.1. Commonly used semi-quantitative techniques for cartilage damage severity and degradation assessment.

Due to alternative processing pathways, data is not always suitable for direct comparison. Although quantitative comparison of results obtained from different studies may not be possible, mean Raman spectra and corresponding algorithm-based extracted data can be interpreted and discussed in the context of Raman shifts corresponding to biological and/or biochemical assignments in cartilage or surrounding tissues. Protocol standardization is thus fundamental in order to overcome limitations of RS for cartilage tissue analysis, such as high fluorescence or weak signal strength inherent to most biological samples that influence the spectral quality and detection accuracy (Querido et al., 2017).

Nonetheless, RS application in cartilage severity, degradation and repair assessment offers great potential as it can be performed *in situ* providing chemical and compositional high-quality data

without labeling, together with the fact this technique is minimally invasive, affordable and fast.

Raman spectroscopy application in OA diagnosis

Human cartilage molecular fingerprint by RS was first described by Esmonde-White (Esmonde-White et al., 2011a). Ever since, cartilage composition through spectral assignments from other joint tissues, such as tibial plateau, femoral condyle or femoral head, during OA, have been reported (Kumar et al., 2015, Takahashi et al., 2014, Gamsjaeger et al., 2014, Casal Beiroa et al., 2018a). As cartilage articular tissue is mainly constituted by collagens – with prevalent type-II (Col-II) – and glycosaminoglycans (GAGs) – being chondroitin sulfate (CS) the predominant sulfated GAG –, key alterations detected by RS involve vibrational and rotational shifts in these spectra components that can be associated with specific molecular events that occur during OA progression (Kumar et al., 2015).

Main changes described in the fingerprint range spectra ($800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$) have been recently reviewed and, as aforementioned, involve members of the collagen family, the proline/hydroxyproline distribution (doublet at $856\text{-}880\text{ cm}^{-1}$) and amide III vibration (doublet at $1245\text{-}1270\text{ cm}^{-1}$), associated to the secondary structure of proteins and their relative distribution; GAGs, the pyranose ring (band at $1039\text{-}52\text{ cm}^{-1}$) and as representative of proteoglycans (PG) the peaks at $\sim 1063\text{ cm}^{-1}$ and 1375 cm^{-1} ; lipids, the 1441 cm^{-1} displacement; and a mineral phase in overdamaged tissues, attributed to hydroxyapatite (960 cm^{-1}), have been summarized in Fig. 5.2 (Casal-Beiroa et al., 2019b).

Moreover, different ratios for cartilage tissue degradation, such as cartilage-to-bone ratio ($1063/960\text{ cm}^{-1}$), mineralization ratio ($960/920\text{ cm}^{-1}$) and carbonate substitution ratio ($1071/960\text{ cm}^{-1}$), could also have predictive potential, as alterations were observed already in early stages of the disease (Hosu et al., 2019).

RS analysis, depending on the desired output, can be used both as exploratory analysis for pattern finding and biomarker extraction, and diagnostic analysis for spectral classification (Butler et al., 2016). In the case of OA some examples can be given, for example, Takahashi et al., were able to correlate microstructural information regarding amide III with surface morphological classifications based on Collins pathological scale, used for grading cartilage and bone changes (Takahashi et al., 2014).

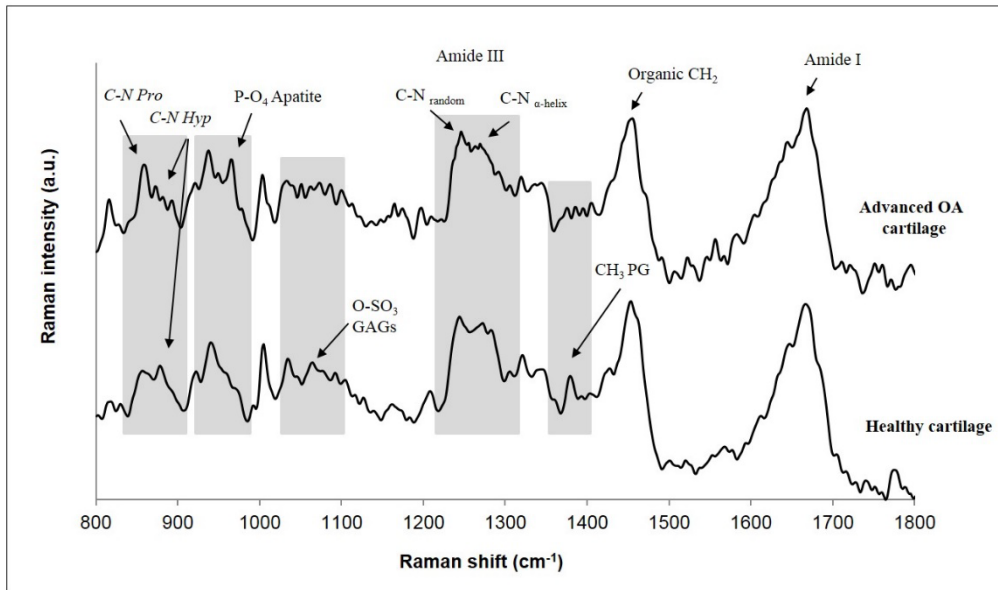


FIGURE 5.2. Human cartilage molecular fingerprint obtained from a healthy donor and an advanced OA donor. The analysis was performed *ex vivo* at a 1064 nm laser excitation and pre-processed with MagicPlot software for baseline correction

Later, multivariate principal component analysis (PCA) unsupervised approach was used for analyzing cartilage with different grades of OA (according to the International Cartilage Repair Society – ICRS – system), supporting previous findings as well as other alterations in PG specific band and an 85% efficiency in predicting the ICRS grade (Kumar et al., 2015).

Moreover, and beyond RS diagnostic potential for pathological articular cartilage damage during OA it may also be applied to other rheumatologic diseases (Hosu et al., 2019) or rare diseases affecting cartilaginous tissues (Taylor et al., 2019).

Raman spectroscopy pre-clinical applications: regenerative medicine

Beyond its potential for OA diagnosis and cartilage degradation monitoring, Raman spectroscopy could also be applied for the evaluation of other remodeling processes such as the ones that occur during cartilage repair and regeneration events. Thus, its usefulness could be extended to monitor clinical outcomes for specific interventions such as the ones addressed to treat pre-OA, focal lesions, or even to monitor *in vitro* expansion and pre-chondrogenic differentiation of either cells-only or cell-biomaterial constructs before implantation (Table 5.1) (Ember et al., 2017, von Erlach et al., 2015).

Jones et al. (Jones et al., 2005) were the first to apply Raman spectroscopy to monitor chondrocytes cellular response in macroporous bioactive glass foam scaffolds in real time. The

main bands found (amide I and III) correspond with allocations of extracellular matrix components and their intensity increased with culture time, being suggested as a measure of cartilage formation. Although no differences were established regarding the type of collagen synthesized, complementary studies on isolated collagens reported a displacement in amide I band maximum from $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$ (Col-II) to $\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ (Col-I) that could be used for validating Col-II synthesis during chondrogenesis (Dehring et al., 2006).

Monitoring during chondrogenic differentiation of other major components like proteoglycans, was studied using Raman microspectroscopy in cell cultures of both human and porcine chondrocytes, showing that this technique can differentiate tissue layers based on their composition, detecting an increase in 1064 cm^{-1} band (sulfated GAGs content) from superficial to middle and deep zones. Authors also found differences in bands at 817 and 921 cm^{-1} (proline vibrations) presenting higher intensities in the superficial zone. Chondrogenesis was further explored by other authors to establish neoformed cartilage reliability in comparison to native tissue (Bergholt et al., 2017a). Lately, other parameters like variation in collagen secondary structure, fibril orientation and relative gradients of components among tissue structure, have been described by Raman mapping and imaging (Albro et al., 2018, Bergholt et al., 2016b).

In order to allow effective real-time monitoring and encourage translation potential of RS based techniques to cell monitoring, Moura et al. demonstrated the non-invasiveness of live-imaging techniques in a dynamic follow-up of neo-formed tissue, by establishing a correlation between the lack of “morphological damage” with “molecular damage” and “growth impairment” in the chondrogenesis of fetal femur-derived skeletal cells, in a three-dimensional pellet culture system (Moura et al., 2018).

Other authors have focused on Raman application together with PCA to monitor chondrocytes' proliferation, in monolayer conditions, in real time. This study suggested the relevance of tracking bands at 1065 , 1079 and 1300 cm^{-1} (sulfated GAGs and lipids) and their association with des-differentiation processes, indicating a decrease in PG and lipid content with culture time (Pudlas et al., 2013).

Moreover, a recent work has also shown the potential of RS as a sensitive and reproducible tool to routinely perform characterization of mesenchymal stromal cells (MSC)-derived extracellular vesicles (EVs). In this study, Raman spectra allowed the automatic distinction with a 93.7% accuracy among vesicles from three cytotypes (bone marrow-, adipose tissue-derived

MSCs and dermal fibroblasts) which can accelerate the translation of EVs clinical application as one of the next generation cell-free therapies (Gualerzi et al., 2017) for cartilage repair and osteoarthritis (Miyaki et al., 2018, Malda et al., 2016).

TABLE 5.1. Raman spectroscopy applications in cartilage development.

Cell type or tissue	Culture System	Main findings	References
Chondrocytes	3D scaffold	RS allows non-invasive motorization of collagen-like formation in real time	Jones et al., 2005
Bovine articular cartilage and chondrocytes	Agarose	RS imaging provides highly accurate and spatial resolution semi-quantitative data of ECM components' distribution in native and tissue engineered cartilage	Albro et al., 2018
Bovine articular cartilage and chondrocytes	Agarose	Fiber-optic RS allows non-destructive quantitative biochemical analysis of the ECM in live cell constructs	Bergholt et al., 2017a
Bovine articular cartilage and chondrocytes	Agarose	RS imaging identifies six differentiated zones in articular cartilage and detects changes in ECM components distribution over time	Bergholt et al., 2016b
Human fetal femur cartilage	-	Definition of zonal fetal femur cartilage molecular fingerprint. Dendrograms and PCA usefulness for tissue differentiation analysis by Raman microspectroscopy	Kunstar et al., 2012
Human fetal femur-derived skeletal cells	Monolayer or suspension	Multimodal microscopy system allows monitoring chondrogenic differentiation of fetal cells and elucidates temporal changes in cartilage development	Moura et al., 2018
Porcine/human chondrocytes, SW-1353 cell line and human cartilage	Monolayer	Raman microspectroscopy monitoring shows phenotypic changes of PG-related ECM components in chondrocytes after prolonged <i>in vitro</i> culture	Pudlas et al., 2013
Human MSCs derived-EVs and dermal fibroblasts	Suspension	RS distinguishes EVs derived from different cytotypes and discriminates main EVs' constituents in solution	Gualerzi et al., 2017
Commercial human MSCs (PromoCell)	Micropattern arrays	RS mapping combined with micro-engineering stem cell platform allows obtaining quantitative data from intracellular molecules such as proteins, lipids and other metabolites within cells	von Erlach et al., 2015

Raman spectroscopy can thus be presented as a label-free non-destructive alternative to conventional analytical methods that require previous sample preparation and/or tissue homogenization (Esmonde-White, 2014b).

Final Remarks

Raman spectroscopy is a non-invasive, label-free, highly sensitive technique for the detection and assessment of cartilage chemical and molecular composition with clinical translation potential for OA early diagnosis. Future steps include further standardization in processing methodologies, defining and validating optical biomarkers and fine-tuning laser equipment for clinical implementation. Furthermore, RS has also the potential to monitor *in vitro* cell expansion and differentiation processes prior to cell or cell-biomaterial implantation as well as an *in situ* follow up.

Acknowledgments

This work was financially supported by Interreg V-A POCTEP Programme through European FEDER funds (0245_IBEROS_1_E), the Biomedical Research Network Center (CIBER), an initiative from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and AE CICA-INIBIC (AGRUP 2015/05), Consellería de Cultura e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia.

References

- Aguiar H., Rodríguez-Domínguez M., Coello B., Caeiro-Rey J. R., Stefanov S., Rodríguez-Valencia C., López E., López-Álvarez M., Chiussi S., Serra J., González P. (2015) Espectroscopia Raman para el análisis de tejido vivo y biocerámicas de origen biológico y sintético. In: Biomateriales. Diseño, producción y caracterización (ed.), Red Gallega de Biomateriales, Vigo, Spain, pp. 33-52.
- Albro M. B., Bergholt M. S., St-Pierre J. P., et al. (2018) Raman spectroscopic imaging for quantification of depth-dependent and local heterogeneities in native and engineered cartilage. *NPJ Regen Med*, 3(1): 3.
- Altman R., Asch E., Bloch D., et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum*, 29(8): 1039-1049.

Bergholt M. S., Albro M. B., Stevens M. M. (2017) Online quantitative monitoring of live cell engineered cartilage growth using diffuse fiber-optic Raman spectroscopy. *Biomaterials*, 140: 128-137.

Bergholt M.S., St-Pierre J.P., Offeddu G.S., et al. (2016) Raman Spectroscopy Reveals New Insights into the Zonal Organization of Native and Tissue-Engineered Articular Cartilage. *ACS Cent Sci*, 2(12): 885-895.

Blanco F.J. (2014) Osteoarthritis: Something is moving. *Reumatol Clinica*, 10(1): 4-5.

Butler H.J., Ashton L., Bird B., Cinque G., Curtis K., Dorney J., Esmonde-White K., Fullwood N.J., Gardner B., Martin-Hirsch P.L., Walsh M.J., McAinsh M.R., Stone N., Martin F.L. (2016) Using Raman spectroscopy to characterize biological materials. *Nature Protocols*, 11(4): 664-87.

Casal Beiroa P., Burguera E.F., Hermida-Gómez T., Goyanes N., Oreiro Villar N., Blanco F.J., González P., Magalhães J. (2018) Optical biomarkers for the early diagnosis of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage*, 26(1): S191.

Casal-Beiroa P., Balboa-Barreiro V., Goyanes N., Filgueira P., González P., Pertega-Díaz S., Blanco F.J., Magalhães J. (2019) Correlations between cartilage molecular composition by Raman spectroscopy and Mankin score: impact of inter- and intra-variability. *Ann Rheum Dis*, 78(Suppl 2): 947.2-948.

Dehring K.A., Crane N.J., Smukler A.R., McHugh J.B., Roessler B.J., Morris M.D. (2006) Identifying chemical changes in subchondral bone taken from murine knee joints using raman spectroscopy. *Appl Spectrosc*, 60(10): 1134-1141.

Deveza L.A., Melo L., Yamato T.P., Mills K., Ravi V., Hunter D.J. (2017) Knee osteoarthritis phenotypes and their relevance for outcomes: a systematic review. *Osteoarthr Cartilage*, 25(12): 1926-1941.

Eberhardt K., Stiebing C., Matthäus C., Schmitt M., Popp J. (2015) Advantages and limitations of Raman spectroscopy for molecular diagnostics: an update. *Expert Rev Mol Diagn*, 15(6): 773-87.

Ember K.J.I., Hoeve M.A., McAughtrie S.L., Bergholt M.S., Dwyer B.J., Stevens M.M., Faulds

K., Forbes S.J., Campbell C.J. (2017) Raman spectroscopy and regenerative medicine: a review. *NPJ Regen Med*, 2: 12.

Esmonde-White K.A., Esmonde-White F.W.L., Morris M.D., Roessler B.J. (2011) Fiber-optic Raman spectroscopy of joint tissues. *Analyst*, 136(8): 1675-1685.

Esmonde-White K.A. (2014) Raman spectroscopy of soft musculoskeletal tissues. *Appl Spectrosc*, 68(11): 1203-1218.

Gamsjaeger S., Klaushofer K., Paschalis E.P. (2014) Raman analysis of proteoglycans simultaneously in bone and cartilage. *J Raman Spectrosc*, 45(9): 794-800.

Gualerzi A., Niada S., Giannasi C., Picciolini S., Morasso C., Vanna R., Rossella V., Masserini M., Bedoni M., Ciceri F., Bernardo M.E., Brini A.T., Gramatica F. (2017) Raman spectroscopy uncovers biochemical tissue-related features of extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*, 7(1): 9820.

Hosu C.D., Moisiu V., Stefancu A., Antonescu E., Leopold L.F., Leopold N., Fodor D. (2019) Raman spectroscopy applications in rheumatology. *Lasers Med Sci*, 34(4): 827-834.

Hunter D.J., Guermazi A., Lo G.H., Grainger A.J., Conaghan P.G., Boudreau R.M., Roemer F.W. (2011) Evolution of semiquantitative whole joint assessment of knee OA: MOAKS (MRI Osteoarthritis Knee Score). *Osteoarthr Cartilage*, 19(8): 990–1002.

Jones J.R., Vats A., Notingher I., et al. (2005) In Situ Monitoring of Chondrocyte Response to Bioactive Scaffolds Using Raman Spectroscopy. *Key Eng Mater*, 284-286: 623-626.

Karsdal M.A., Michaelis M., Ladel C., et al. (2016) Disease-modifying treatments for osteoarthritis (DMOADs) of the knee and hip: lessons learned from failures and opportunities for the future. *Osteoarthr Cartilage*, 24(12): 2013-2021.

Kellgren J.H., and Lawrence J.S. (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis*, 16(4): 494-502.

Kumar R., Grønhaug K.M., Afseth N.K., Isaksen V., de Lange Davies C., Drogset J.O., Lilledahl M.B. (2015) Optical investigation of osteoarthritic human cartilage (ICRS grade) by confocal Raman spectroscopy: a pilot study. *Anal Bioanal Chem*, 407(26): 8067-77.

Mankin H.J., Dorfman H., Lippiello L., Zarins A. (1971) Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*, 53(3): 523-37.

Malda J., Boere J., van de Lest C.H., van Weeren P., Wauben M.H. (2016) Extracellular vesicles — new tool for joint repair and regeneration. *Nat Rev Rheumatol*, 12(4): 243-9.

Miyaki S. and Lotz M.K. (2018) Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 30(1): 129-135.

Moura C.C., Lanham, S.A., Monfort, T., Bourdakos K. N., Tare, R. S., Oreffo, R. O. C., Mahajan, S. (2018) Quantitative temporal interrogation in 3D of bioengineered human cartilage using multimodal label-free imaging. *Integr Biol*, 10(10): 635-645.

Musumeci G., Aiello F.C., Szychlińska M.A., Di Rosa M., Castrogiovanni P., Mobasheri A. (2015) Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci*, 16(3): 6093-6112.

Pauli C., Whiteside R., Heras F.L., Nesic D., Koziol J., Grogan S.P., Matyas J., Pritzker K.P., D'Lima D.D., Lotz M.K. (2012) Comparison of cartilage histopathology assessment systems on human knee joints at all stages of osteoarthritis development. *Osteoarthr Cartilage*, 20(6): 476-85.

Pascual Garrido C., Hakimiyan A.A., Rappoport L., Oegema T.R., Wimmer M.A., Chubinskaya S. (2009) Anti-apoptotic treatments prevent cartilage degradation after acute trauma to human ankle cartilage. *Osteoarthr Cartilage*, 17(9): 1244-51.

Pearson R.G., Kurien T., Shu K.S., Scammell B.E. (2011) Histopathology grading systems for characterization of human knee osteoarthritis--reproducibility, variability, reliability, correlation, and validity. *Osteoarthr Cartilage*, 19(3): 324-31.

Pudlas M., Brauchle E., Klein T.J., Hutmacher D.W., Schenke-Layland K. (2013) Non-invasive identification of proteoglycans and chondrocyte differentiation state by Raman microspectroscopy. *J Biophotonics*, 6(2): 205-211.

Querido W., Falcon J.M., Kandel S., Pleshko N. (2017) Vibrational spectroscopy and imaging: applications for tissue engineering. *Analyst*, 142(21): 4005-4017.

Takahashi Y., Sugano N., Takao M., Sakai T., Nishii T., Pezzotti G. (2014) Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: Preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis. *J Mech Behav Biomed Mater*, 31: 77-85.

Taylor A.M., Jenks D.D., Kammath V.D., et al. (2019) Raman Spectroscopy identifies differences in ochronotic and non-ochronotic cartilage; a potential novel technique for monitoring ochronosis. *Osteoarthr Cartilage*, 27(8): 1244-1251.

van der Kraan P.M., Berenbaum F., Blanco F.J., et al. (2016) Translation of clinical problems in osteoarthritis into pathophysiological research goals. *RMD Open*, 26;2(1): e000224.

von Erlach T.C., Hedegaard M.A., Stevens M.M. (2015) High resolution Raman spectroscopy mapping of stem cell micropatterns. *Analyst*, 140(6): 1798-803.

6. Síntese de um alginato fluorescente para aplicações biomédicas.

M. Araújo^{1,2}, S.J. Bidarra^{1,2,3}, P.M. Alves^{1,2}, J. Valcarcel⁴, J.A. Vázquez⁴, C.C. Barrias^{1,2,3}

¹i3S - Instituto de Inovação e Investigação em Saúde, Porto, Portugal

²INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Universidade do Porto, Portugal

³ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal

⁴Group of Recycling and Valorisation of Waste Materials (REVAL), IIM-CSIC, Vigo, Spain

marco.araujo@i3s.up.pt

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961427>

Neste capítulo descrevemos a síntese de um alginato fluorescente com potenciais aplicações biomédicas. O alginato foi funcionalizado por um método reacional simples, envolvendo carbodiimida seguida de uma reacção 'click', ambas realizadas em meio aquoso. Após funcionalização, foi possível obter hidrogéis de alginato por reticulação iónica, os quais mantiveram cerca de 80% da sua fluorescência inicial após longos períodos de incubação em condições fisiológicas. O hidrogel fluorescente demonstrou ser citocompatível na presença de células epiteliais, suportando a sua viabilidade, actividade metabólica, proliferação e morfogénese. Este hidrogel foi também utilizado com sucesso na bioimpressão de padrões ordenados de células encapsuladas em microgéis.

Marcação de polímeros com fluorescência e bioimagem

Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, os polímeros naturais têm sido amplamente utilizados na preparação de hidrogéis para aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Zhang et al. 2015). Os hidrogéis constituem matrizes tridimensionais (3D) bastante apelativas, uma vez que apresentam características estruturais semelhantes às da matriz extracelular dos tecidos nativos. De entre os vários biomateriais de origem natural, o alginato, um polissacárido extraído da alga castanha, tem sido bastante utilizado não só como veículo de fármacos e/ou células, mas também como matriz 3D para engenharia de tecidos (Maiti et al. 2009; Maia et al. 2014; Fonseca et al. 2011). Com a utilização crescente de alginato e outros polissacáridos no campo biomédico, torna-se urgente encontrar metodologias para rastrear este tipo de biomateriais, tanto *in vitro* como *in vivo*. Deste modo, a marcação de polímeros com fluorescência poderá ser uma opção interessante, uma vez que poderá não só fornecer informação importante durante estudos *in vitro* como, por exemplo, ao nível das interações célula-polissacáridos, clarificando processos de remodelação, transporte ou captação celular, mas poderá também permitir o rastreio de materiais implantados e a análise dos seus perfis de biodegradação/bioreabsorção (Wang et al. 2017; de la Fuente, Seijo, and Alonso 2008; Araki, Sugihara, and Hattori 2006; Berdichevski et al. 2015). A imagem por fluorescência tem demonstrado grande potencial para aplicações clínicas, uma vez que é não invasiva, apresenta grande sensibilidade e baixa radiação. Várias técnicas de bioimagem por fluorescência foram já aplicadas em modelo de murganho para investigar a degradação *in vivo* e libertação de constituintes bioativos. Foram também aplicadas em humanos, nomeadamente na deteção de cancro da mama, artrite reumatoide e em neuroimagem (Berdichevski et al. 2015; Piper et al. 2013; Taruttis and Ntziachristos 2012). Por outro lado, as técnicas de imagem por fluorescência foram também aplicadas em estudos *ex vivo*. Neste campo, a análise direta de tecidos explantados utilizando microscopia confocal de fluorescência constitui uma metodologia simples e rápida para avaliar a performance do biomaterial em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, principalmente na investigação de perfis de degradação/remodelação, adesividade/infiltração do material e possíveis variações estruturais associadas. No entanto, devido à escassez de grupos fluorescentes em polissacáridos de origem natural, torna-se importante proceder a uma marcação química visando a obtenção de materiais detetáveis por fluorescência. A estratégia de síntese mais comum para marcar polissacáridos com fluorescência consiste numa aminação redutiva utilizando fluoróforos como a 5-aminofluoresceína, o-2-[aminoetil]-fluoresceína, rodamina, 8-aminonaftaleno-1,3,6-

trisulfonato e 3-amino-9-etil-carbazato, entre outros (Zhang et al. 2011). No entanto, esta reação é efetuada em ambiente ácido e na presença de agentes redutores tóxicos, tais como o borohidreto de sódio ou cianoborohidreto de sódio. Numa abordagem diferente, *Hori et al.* conjugou 6-aminofluoresceína a alginato por meio de uma reação de carbodiimida. O material fluorescente resultante foi usado para estudar a estrutura e distribuição de formulações de alginato injetadas subcutaneamente em modelo de rato. Os autores conseguiram detetar o polímero em tecidos explantados utilizando o alginato funcionalizado ($\lambda_{exc}= 490$ nm; $\lambda_{em}= 520$ nm). Embora os fluoróforos derivados de fluoresceínas sejam os mais utilizados para a marcação de polímeros, os produtos resultantes revelam estabilidade limitada em condições fisiológicas e grande sensibilidade a diferentes parâmetros, tais como o pH e a polaridade do solvente (Brelje, Wessendorf, and Sorenson 2002). Tendo em atenção as excelentes propriedades das coumarinas, entre elas a biocompatibilidade, facilidade de síntese e, mais importante, a possibilidade de modelação das zonas de absorção/emissão por variação dos substituintes, estas têm sido amplamente utilizadas como fluoróforos na síntese de quimiosensores, em alternativa à fluoresceína (Araújo and Escuder 2017; Ngororabanga, Du Plessis, and Mama 2017). Mais interessante ainda, as cumarinas poderão também atuar como neutralizadoras de radicais livres, possuindo também atividade anticancerígena, antifúngica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (Riveiro et al. 2010). Considerando todas estas características, decidiu-se neste trabalho utilizar um derivado de cumarina (3-azido-7-hidroxycoumarina) para produzir um polímero com fluorescência estável, passível de ser usado em aplicações de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Araujo et al. 2020).

Desenvolvimento de matrizes de alginato com fluorescência prolongada para aplicações biomédicas

Neste trabalho, sintetizou-se um alginato marcado com a 3-azido-7-hidroxycoumarina (AzOH) utilizando estratégias de funcionalização em meio aquoso. Para isso, funcionalizou-se o alginato (AlgHMW) com propargilamina por carbodiimida (AlgPa), seguida de uma reação de cicloadição alquino-azida catalizada por cobre(I) (AlgFL), normalmente designada por reação ‘click’ (Fig. 6.1.A). Este tipo de reação tem sido amplamente utilizada para efeitos de bioconjugação em virtude das suas condições amenas e bio-ortogonalidade, característica dos grupos azida e alquino, que tornam atrativa a sua aplicação em bioconjugação *in situ* de marcadores fluorescentes (Zheng et al. 2012; Araújo, Díaz-Oltra, and Escuder 2016). Foi

possível produzir alginatos com diferentes graus de funcionalização, AlgFL5, AlgFL10, AlgFL25 e AlgFL50, resultantes da reação dos precursores AlgPa10 e AlgPa25 com diferentes quantidades de AzOH (Araujo et al. 2020). No entanto, o composto AlgFL50 não se revelou solúvel em soluções aquosas, devido ao carácter hidrofóbico associado a uma maior incorporação de cumarina. Na Fig. 6.1. B1 pode-se observar que as soluções contendo os compostos AlgFL5 e AlgFL10 apresentam fluorescência, em contraste com as soluções de alginato ou de fluoróforo. Por outro lado, verificou-se também um grande aumento de fluorescência do próprio fluoróforo AzOH quando conjugado ao alginato. Após a modificação, procedeu-se à análise do peso molecular dos alginatos solúveis AlgFL5, AlgFL10, AlgFL25 e respetivos precursores, recorrendo à técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). Embora não se tenha conseguido avaliar o peso molecular do composto AlgFL25, devido à presença de agregados, observou-se uma diminuição progressiva do peso molecular nos compostos fluorescentes com o aumento da incorporação de fluoróforo. Assim, para as amostras AlgFL5 e AlgFL10 registou-se um $M_w = 101$ kDa e $M_w = 64$ kDa, respetivamente, sendo este valor muito menor que o correspondente ao precursor AlgPa10 ($M_w = 165$ kDa). Esta quebra no peso molecular poderá estar relacionada com a utilização de ácido ascórbico como agente redutor durante a reação ‘click’, o qual está demonstrado na literatura que contribui para a degradação das cadeias de alginato (Smidsrod, Haug, and Larsen 1963). Ainda assim, foi possível obter hidrogéis por reticulação iónica na presença de glucono-delta lactona/ $CaCO_3$, os quais se revelaram fluorescentes depois de excitados na zona dos ultra-violeta (UV), emitindo radiação na zona do azul do espectro eletromagnético (Fig. 6.1 B2-3).

A quantidade de fluoróforo incorporada em cada uma das formulações de alginato solúveis (AlgFL5, AlgFL10, AlgFL25) foi determinada por espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis) recorrendo a uma reta de calibração com AzOH ($\lambda_{abs,max} = 335$ nm). Conforme esperado, a formulação AlgFL25 apresentou uma maior quantidade de cumarina, seguida da formulação AlgFL10 e finalmente AlgFL5 (Fig. 6.2A). A fluorescência das soluções de AzOH, num intervalo de concentrações de fluoróforo semelhante ao determinado por espectroscopia UV-Vis para os alginatos fluorescentes, foi investigada por espectroscopia de fluorescência (Fig. 6.2B). Neste caso, observou-se um aumento de fluorescência com aumento de concentração de fluoróforo, de acordo com a lei de Lambert Beer. Do mesmo modo, foi também avaliada a fluorescência em soluções de 0.025 mM AlgFL5, AlgFL10 e AlgFL25 (Fig. 6.2C). Observou-se um aumento da fluorescência do AzOH quando incorporado no alginato ($\lambda_{em} = 474$ nm), acompanhado de um desvio do seu máximo de excitação de $\lambda_{exc} = 341$ nm para $\lambda_{exc} = 355$ nm, o

que é indicativo da conjugação de fluoróforo ao polímero. Este aumento de fluorescência está relacionado com a formação do anel de triazole, o qual contribui para a extensão da deslocalização eletrónica (Sivakumar et al. 2004).

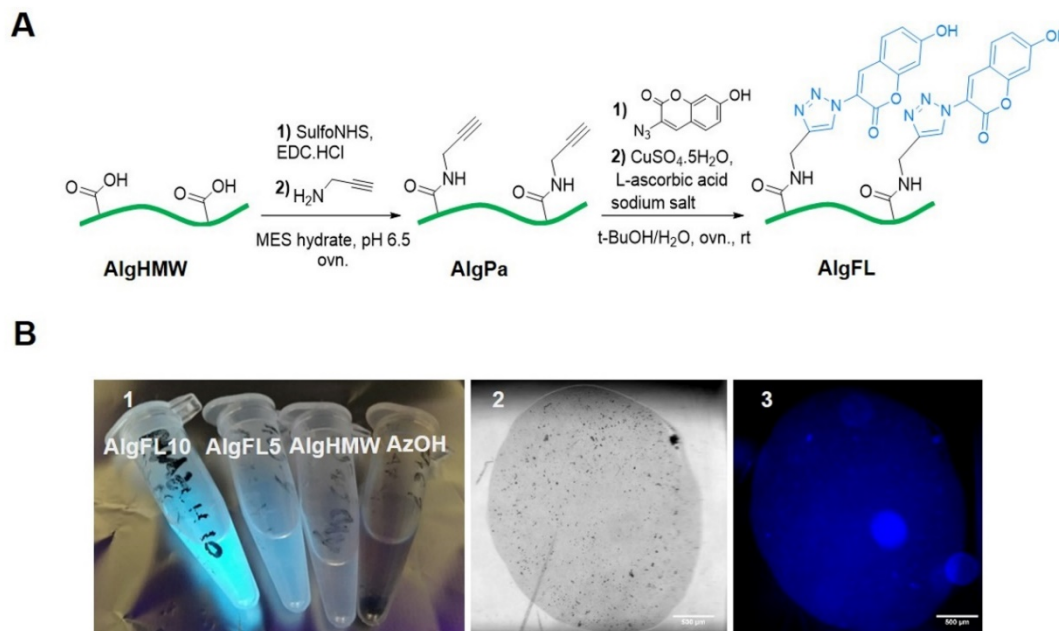


FIGURA. 6.1. Esquema de síntese do alginato fluorescente (A). Aspecto macroscópico (B) de soluções aquosas de AzOH, AlgHMW, AlgFL5, AlgFL10 (B1) e de um disco de AlgFL10 observado numa lupa sem (B2) e com filtro uv (B3).

No entanto, ao contrário do que se esperava tendo em conta a quantidade de fluoróforo incorporado (Fig. 6.2A), verificou-se que a formulação AlgFL10 possuía maior fluorescência, seguida da formulação AlgFL25 e, finalmente, a formulação AlgFL5 (Fig. 6.2C). Tal comportamento poderá dever-se a uma extinção parcial da fluorescência, a qual poderá resultar de interações intramoleculares entre unidades adjacentes de cumarina no composto com maior incorporação (Danko, Szabo, and Hrdlovic 2011).

Tendo em conta este resultado, decidiu-se seleccionar a formulação o AlgFL10 para prosseguir os estudos, pelo facto de apresentar maior fluorescência que as restantes. A partir dessa formulação, foram produzidos hidrogéis por reticulação iónica e a estabilidade da sua fluorescência ao longo do tempo foi monitorizada utilizando um leitor de placas em modo de fluorescência. Neste ensaio, foram realizadas medições a $\lambda_{exc}= 355$ nm, $\lambda_{em}= 474$ nm em vários pontos do disco de alginato fluorescente, incubado por diferentes períodos de tempo numa solução 3:1 H₂O:t-BuOH a 37 °C, de modo a assegurar a solubilidade do cromóforo não conjugado. A fluorescência foi determinada através da média dos valores obtidos (Fig. 6.2D).

Verificou-se que o alginato funcionalizado com AzOH manteve cerca de 75% da sua fluorescência inicial ao fim de 28 dias de incubação em condições fisiológicas. Por outro lado, observou-se que a fluorescência da respetiva solução de incubação, ao final do mesmo período de tempo, se situou nos 9%, um valor menor que o da fluorescência perdida no hidrogel de alginato.

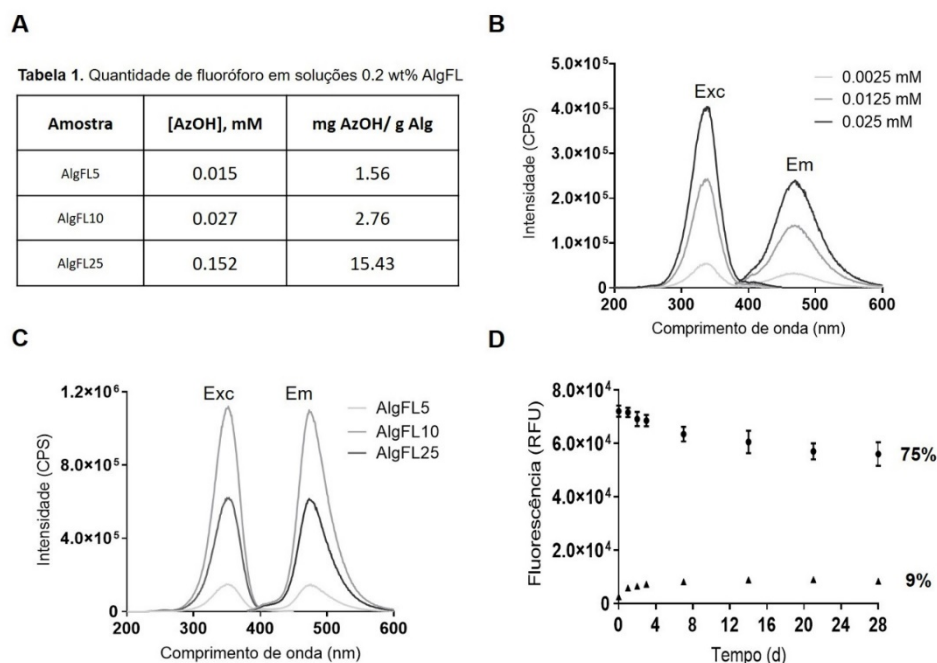


FIGURA. 6.2. Quantidade de fluoróforo incorporada em cada um dos alginatos produzidos (A); fluorescência de soluções num intervalo de concentrações de 2.5×10^{-3} a 2.5×10^{-2} mM AzOH (B) e de 2.5×10^{-2} mM alginato fluorescente (C) em 3:1 H₂O:t-BuOH; Fluorescência dos discos de AlgFL10 (círculos) e respetiva solução de incubação (triângulos) 3:1 H₂O:t-BuOH, medida ao longo de 28 dias a 37 °C (D).

Assim, pode-se considerar a ocorrência de um fenómeno de extinção parcial da fluorescência, embora não muito pronunciado. De uma forma geral, é importante realçar que o alginato fluorescente produzido mantém grande parte da sua fluorescência inicial, mostrando-se adequado a ensaios prolongados de rastreio do polímero.

Estudos *in vitro* do alginato fluorescente

O comportamento *in vitro* da formulação AlgFL10 foi investigado na presença de células epiteliais mamárias (EpH4) de modo a avaliar a sua citocompatibilidade e a sua possível utilização como matrizes 3D para cultura celular. Estes estudos foram realizados em amostras contendo proporções adequadas da formulação AlgHMW (controlo, designado por Alg) ou

AlgFL10 (amostra), e de alginato funcionalizado com um fragmento bioativo contendo a sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), de modo a promover interações célula-material. A concentração deste alginato foi ajustada por forma a obter uma concentração de RGD (200 μM) equivalente à tipicamente encontrada em amostras biológicas derivadas de matriz extracelular nativa (Huebsch et al. 2010).

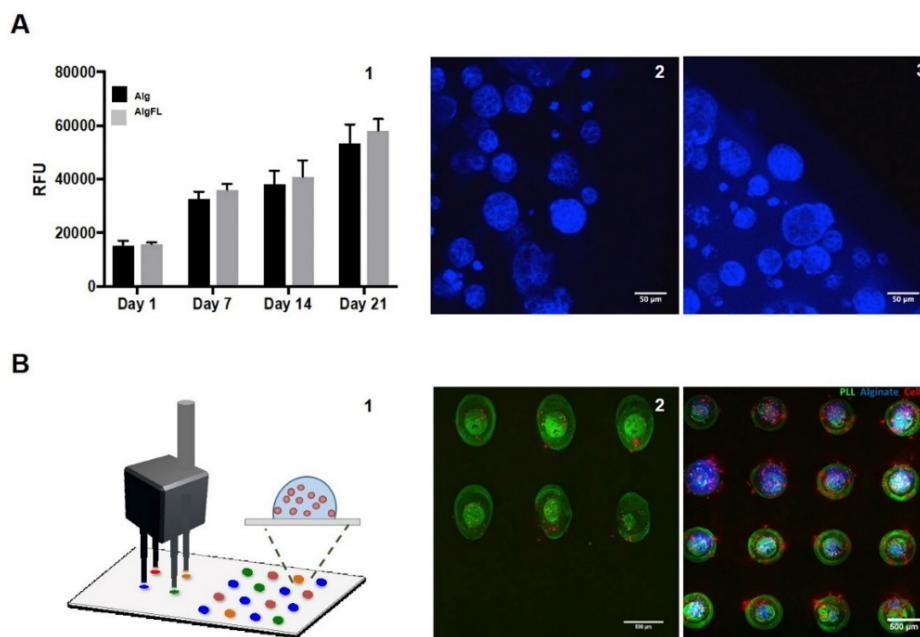


FIGURA 6.3. Actividade metabólica das células EpH4 ao longo dos 14 dias nas formulações Alg e AlgFL10 (A1); células EpH4 cultivadas em hidrogéis 1.5 wt% Alg (A2) e AlgFL10 (A3) na presença de idêntica concentração da sequência RGD; Representação esquemática de bioimpressão de células encapsuladas em matrizes 3D de hidrogéis (B1), Microimpressão de hidrogéis de Alg (B2, incolor) e AlgFL10 (B3, azul) contendo células EpH4, sobre poly-L-lisina marcada com fluoresceína (PLL-FITC, verde) e previamente impressa numa lamela de vidro funcionalizada com um recobrimento de poliestireno-co-anidrido maleico. A1-3 reproduzido de (Araujo et al. 2020) com permissão de The Royal Society of Chemistry.

Verificou-se que tanto no controlo como no alginato fluorescente, as células EpH4 conseguiram proliferar e organizarem-se em esferoides, aumentando a atividade metabólica ao longo dos 21 dias de cultura (Fig. 6.3.A1-3). Este resultado comprova que o novo alginato fluorescente é citocompatível, podendo ser utilizado para cultura celular em 3D. A vantagem da utilização deste novo material prende-se com o facto de se conseguir visualizar a matriz polimérica, em virtude da sua fluorescência, como se vê na Fig. 6.3.A3, onde é possível distinguir claramente os limites do disco de AlgFL10.

A formulação AlgFL10 foi também utilizada para otimizar o processo de bioimpressão de micropadrões ordenados de hidrogéis de alginato carregados com células (Fig. 6.3.B1). A

impressão foi realizada utilizando uma impressora SpotBot 4[®] equipada com uma cabeça de impressão e 4 pins de contacto, capaz de imprimir micropadrões ordenados a temperatura e humidade controladas. Estes micropadrões de alginato com células foram impressos sobre uma lamela de vidro, na qual se realizou uma pré-impressão de micropadrões de poli-L-lisina marcada com fluoresceína (PLL-FITC). Neste caso, a poli-L-lisina funciona como um suporte para o alginato, retendo-o na lamela de vidro através de interações eletrostáticas, já que os dois polímeros possuem carga oposta. Por sua vez, a PLL-FITC mantém-se quimicamente ligada à lamela de vidro por reação nucleofílica entre a amina da cadeia lateral dos fragmentos de lisina que compõem a poli-L-lisina e o anidrido pertencente ao poliestireno-co-anidrido maleico, utilizado no pré-tratamento da lamela de vidro. Ao realizar a impressão de microgéis utilizando o Alg carregado com células EpH4, observou-se um desalinhamento entre as células e a PLL-FITC (Fig. 6.3.B2), o que poderia indicar tanto um desalinhamento na impressão como uma migração das células para fora da matriz de alginato. No entanto, torna-se difícil comprovar a causa deste desalinhamento devido ao facto de não se conseguir visualizar o polímero. Assim, a utilização do alginato fluorescente revelou-se um instrumento indispensável à otimização do processo, já que permitiu fazer o correto ajustamento dos micropadrões, ou seja, impressão de microgéis de AlgFL10 (azul) carregados com células EpH4 (vermelho) sobre a PLL-FITC (verde) (Fig. 6.3.B3). Coletivamente, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o alginato fluorescente desenvolvido é um biomaterial que poderá ser bastante útil em diversas aplicações biomédicas, particularmente quando se necessita de rastrear o polímero durante longos períodos de tempo, nomeadamente na presença de células.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por fundos provenientes do programa FEDER - Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional através do COMPETE 2020 – Programa Operacional para Competitividade e Internacionalização (POCI), Portugal 2020, e por fundos provenientes da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia/Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, no âmbito do projecto 3DEMT (PTDC/BBB-ECT/2518/2014). S.J.B. e C.C.B. agradecem à FCT pela bolsa SFRH/BPD/80571/2011 e pela posição de investigador IF/00296/2015, respetivamente. M.F.A. e J.V. agradecem à Agência para Desenvolvimento e Coesão e ao Ministerio de Hacienda, Dirección General de Fondos Europeos pelo programa Interreg V-A Espanha-Portugal (POCTEP) 2014-2020 e FEDER (0245_IBEROS_1_E) pela bolsa de pós-doutoramento. J.V. e J.A.V. agradecem igualmente à Xunta de Galicia (Grupos de

Potencial Crecimiento, IN607B 2018/19). Os autores agradecem igualmente o suporte do Dr. André Maia, da plataforma científica Biosciences Screening, e à plataforma científica Bioimaging, ambas do i3S e membros do PPBI (PPBI-POCI-01-0145-FEDER-022122), bem como o suporte da plataforma científica BN (UID/BIM/04293/2019) do i3S. Os autores agradecem também à Dr. Carla Oliveira, pertencente ao i3S/IPATIMUP pela sua ajuda nos estudos *in vitro*.

Referencias bibliográficas

Araki, Y., H. Sugihara, and T. Hattori. 2006. 'In vitro effects of dextran sulfate sodium on a Caco-2 cell line and plausible mechanisms for dextran sulfate sodium-induced colitis', *Oncol. Rep.*, 16: 1357-62.

Araujo, M., S. J. Bidarra, P. M. Alves, J. Valcarcel, J. A. Vazquez, and C. C. Barrias. 2020. 'Coumarin-grafted blue-emitting fluorescent alginate as a potentially valuable tool for biomedical applications', *J Mater Chem B*, 8: 813-25.

Araújo, Marco, Santiago Díaz-Oltra, and Beatriu Escuder. 2016. 'Triazolyl-Based Molecular Gels as Ligands for Autocatalytic 'Click' Reactions', *Chemistry – A European Journal*, 22: 8676-84.

Araújo, Marco, and Beatriu Escuder. 2017. 'Transient Catalytic Activity of a Triazole-based Gelator Regulated by Molecular Gel Assembly/Disassembly', *ChemistrySelect*, 2: 854-62.

Berdichevski, Alexandra, Haneen Simaan Yameen, Hagit Dafni, Michal Neeman, and Dror Seliktar. 2015. 'Using bimodal MRI/fluorescence imaging to identify host angiogenic response to implants', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 5147-52.

Brelje, T. C., M. W. Wessendorf, and R. L. Sorenson. 2002. 'Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations', *Methods in cell biology*, 70: 165-244.

Danko, Martin, Erik Szabo, and Pavol Hrdlovic. 2011. 'Synthesis and spectral characteristics of fluorescent dyes based on coumarin fluorophore and hindered amine stabilizer in solution and polymer matrices', *Dyes and Pigments*, 90: 129-38.

de la Fuente, M., B. Seijo, and M. J. Alonso. 2008. 'Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy', *IOVS*, 49: 2016-24.

Fonseca, K. B., S. J. Bidarra, M. J. Oliveira, P. L. Granja, and C. C. Barrias. 2011. 'Molecularly designed alginate hydrogels susceptible to local proteolysis as three-dimensional cellular microenvironments', *Acta Biomater.*, 7: 1674-82.

Huebsch, N., P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, and D. J. Mooney. 2010. 'Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate', *Nat Mater*, 9: 518-26.

Maia, F. Raquel, Mariana Barbosa, David B. Gomes, Nuno Vale, Paula Gomes, Pedro L. Granja, and Cristina C. Barrias. 2014. 'Hydrogel depots for local co-delivery of osteoinductive peptides and mesenchymal stem cells', *Journal of Controlled Release*, 189: 158-68.

Maiti, S., K. Singha, S. Ray, P. Dey, and B. Sa. 2009. 'Adipic acid dihydrazide treated partially oxidized alginate beads for sustained oral delivery of flurbiprofen', *Pharm. Dev. Technol.*, 14: 461-70.

Ngororabanga, J. M. V., J. Du Plessis, and N. Mama. 2017. 'Fluorescent Polymer Incorporating Triazolyl Coumarin Units for Cu(2+) Detection via Planarization of Ict-Based Fluorophore', *Sensors*, 17.

Piper, Sophie K., Christina Habermehl, Christoph H. Schmitz, Wolfgang M. Kuebler, Hellmuth Obrig, Jens Steinbrink, and Jan Mehnert. 2013. 'Towards whole-body fluorescence imaging in humans', *PloS one*, 8: e83749-e49.

Riveiro, M. E., N. De Kimpe, A. Moglioni, R. Vazquez, F. Monczor, C. Shayo, and C. Davio. 2010. 'Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives', *Current medicinal chemistry*, 17: 1325-38.

Sivakumar, K., F. Xie, B. M. Cash, S. Long, H. N. Barnhill, and Q. Wang. 2004. 'A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes', *Organic letters*, 6: 4603-6.

Smidsrod, Olav, Arne Haug, and Bjorn Larsen. 1963. 'Degradation of alginate in the presence of reducing compounds', *Acta Chemica Scandinavica*, 17: 2628-37.

Taruttis, A., and V. Ntziachristos. 2012. 'Translational optical imaging', *Am. J. Roentgenol.*, 199: 263-71.

Wang, K., F. Cheng, X. Pan, T. Zhou, X. Liu, Z. Zheng, L. Luo, and Y. Zhang. 2017. 'Investigation of the transport and absorption of Angelica sinensis polysaccharide through gastrointestinal tract both in vitro and in vivo', *Drug Deliv.*, 24: 1360-71.

Zhang, Y., J. Liu, L. Huang, Z. Wang, and L. Wang. 2015. 'Design and performance of a sericin-alginate interpenetrating network hydrogel for cell and drug delivery', *Sci. Rep.*, 5: 12374.

Zhang, Y., Z. Wang, X. Zhang, W. Zhou, and L. Huang. 2011. 'One-pot fluorescent labeling of saccharides with fluorescein-5-thiosemicarbazide for imaging polysaccharides transported in living cells', *Carbohydrate research*, 346: 2156-64.

Zheng, Tianqing, Sara H. Rouhanifard, Abubakar S. Jalloh, and Peng Wu. 2012. 'Click Triazoles for Bioconjugation', *Topics in heterocyclic chemistry*, 28: 163-83.

7. Valorización de biopolímeros marinos para aplicaciones en medicina regenerativa.

J. Valcarcel^{1,2}, L. Fernández-Sampayo^{1,2}, P. Salgado^{1,3}, R. Riveiro^{1,3}, U. Ramos^{1,2},
R.I. Pérez-Martín^{1,3}, C.G. Sotelo^{1,3}, J.A. Vázquez^{1,2}

¹Grupo de Biotecnología y Bioprocesos Marinos, IIM-CSIC, Vigo, España.

²Laboratorio de Reciclado y Valorización de Materiales Residuales (REVAL), Instituto de Investigaciones Marinas (IIM-CSIC), Vigo, España.

³Laboratorio de Bioquímica de Alimentos, (IIM-CSIC), Vigo, España.

jvalcarcel@iim.csic.es

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961437>

Los residuos y descartes generados por la industria pesquera representan una fuente valiosa de biomateriales que pueden ser recuperados mediante procesos de valorización. Algunos de estos materiales son ampliamente investigados en medicina regenerativa, en muchos casos proyectando aplicaciones con potencial impacto en el envejecimiento saludable. Dentro de una perspectiva de sostenibilidad, se describen los procesos de obtención, características y aplicaciones del sulfato de condroitina, ácido hialurónico, quitosano, gelatina y colágeno de origen marino, ya que, por su bioactividad, accesibilidad y abundancia presentan una mayor viabilidad como productos de alto valor en medicina regenerativa.

El medio marino constituye una rica fuente de materiales con diversas propiedades útiles para su potencial aplicación en el campo biomédico. Aunque los mayores esfuerzos han sido llevados a cabo en el descubrimiento de nuevos fármacos, polisacáridos, proteínas y materia mineral extraídos de algas, animales y microorganismos marinos han sido caracterizados en las últimas décadas y propuestos como componentes de sistemas para la liberación controlada de fármacos y en ingeniería de tejidos (Silva et al., 2012). Sin embargo, la actual sobreexplotación del medio marino impone restricciones en cuanto a la viabilidad de obtener estos materiales de especies amenazadas o cuando su extracción suponga un impacto ambiental considerable, aún cuando sus características sean deseables.

En este escenario cobra especial relevancia la obtención de estos materiales a partir de descartes pesqueros y de residuos generados en el procesado industrial de alimentos, lo cual supone un mejor aprovechamiento de los recursos marinos, con los consiguientes beneficios ambiental y económico. Además, dentro del concepto de economía circular, los procesos de valorización de esta biomasa deben aspirar a minimizar los residuos generados, diseñando en la medida de lo posible ciclos cerrados. Con esta visión hemos identificado los biopolímeros que, por su bioactividad, accesibilidad, abundancia y rendimiento presentan mayor potencial como productos de alto valor en medicina regenerativa, y por tanto mayor viabilidad. Los procesos de valorización de los cuatro materiales seleccionados - sulfato de condroitina, ácido hialurónico, quitosano y colágeno – se pueden integrar siguiendo el concepto de biorefinería marina (Antelo et al., 2015), como se muestra en la Fig. 7.1.

Sulfato de condroitina

El sulfato de condroitina es un polisacárido lineal perteneciente a la familia de los glicosaminoglicanos, comúnmente presente tanto en la superficie de las células como en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos animales, donde participa en procesos celulares fundamentales, tales como comunicación, diferenciación y crecimiento celular (Yamada and Sugahara, 2008). Estas propiedades biológicas hacen que el sulfato de condroitina sea interesante en regeneración de cartílago, bien como nutracéutico o incorporado en andamiajes de ingeniería de tejidos, en regeneración nerviosa y como agente antiinflamatorio, antimetastático y anticoagulante (Valcarcel et al., 2017).

La bioactividad del sulfato de condroitina depende en gran medida de su capacidad para interactuar con proteínas, la cual viene determinada por sus propiedades químicas y por

tanto por su estructura (Benito-Arenas et al., 2018; Djerbal et al., 2017; Miller and Hsieh-Wilson, 2015). Esta estructura se basa en una secuencia de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetilgalactosamina (GalNAc) unidos por enlaces glicosídicos alternos β -(1 \rightarrow 4) y β -(1 \rightarrow 3). Ambos anillos pueden estar sulfatados en diferentes posiciones, dando lugar a distintas unidades de disacáridos dispuestas secuencialmente en cadenas poliméricas de longitud variable, lo cual resulta en una heterogeneidad considerable en masa molecular, patrón de sulfatación y densidad de carga (Fig. 7.2.) (Kjellén and Lindahl, 2018; Valcarcel et al., 2017).

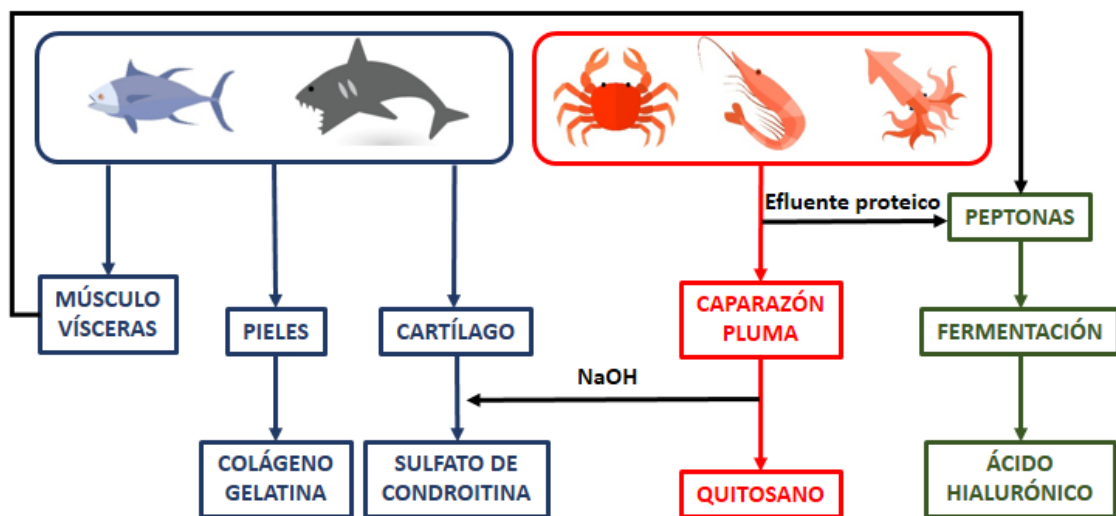


FIGURA 7.1. Procesos de valorización para la obtención de biopolímeros con aplicaciones biomédicas.

Tanto sulfatación como masa molecular son diferentes entre el sulfato de condroitina marino y el extraído de animales terrestres, siendo esta última generalmente mayor en materiales marinos.

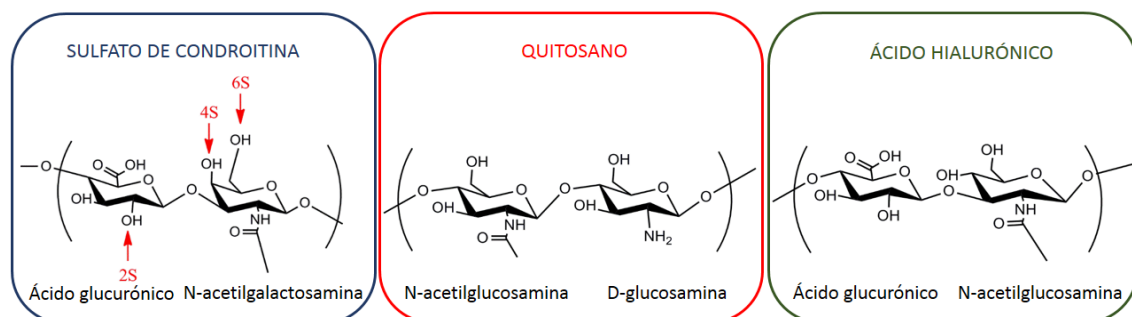


FIGURA 7.2. Estructura química del sulfato de condroitina, quitosano y ácido hialurónico.

En lo que respecta a sulfatación, en fuentes terrestres predominan los disacáridos sulfatados en posición -4 de GalNAc (CS-A), mientras en animales marinos la mayoría

de unidades están sulfatadas en posición -6 (CS-C), acompañadas de una importante proporción de unidades disulfatadas (López-Álvarez et al., 2019). Además, la diversidad es mayor en el medio marino, habiéndose descubierto sulfataciones únicas, tales como el CS-K (GlcA3S-GalNAc4S) extraído del pulpo con actividad neuritogénica (Higashi et al., 2015), o sulfato de condroitina fucosilado presente en pepinos de mar con actividad anticoagulante (Wu et al., 2012).

El sulfato de condroitina es además uno de los componentes principales del cartílago, por lo que los peces cartilaginosos como rayas y tiburones representan una fuente importante de este material. Algunas especies de estos peces poseen valor comercial, generando volúmenes considerables de residuos en su procesamiento, a lo que hay que añadir aquellos individuos por debajo de las tallas mínimas, o pertenecientes a especies no comerciales, que son considerados descartes. Como resultado existe una importante biomasa residual susceptible de valorización para obtener sulfato de condroitina.

TABLA 7.1. Caracterización de sulfato de condroitina de cinco especies de peces. Masa molecular como “number average molecular weight” (Mn) en kDa con índice de polidispersión asociado entre paréntesis. Composición de disacáridos expresada como % medio \pm desviación estándar (n=2). Relación 4S/6S = [% GlcA-GalNAc 4S / (%GlcA-GalNAc 6S + GlcA 2S-GalNAc 6S)]. n.o no observado. *(Vázquez et al., 2019), +(Vázquez et al., 2018a), §(Novoa-Carballal et al., 2017).

	<i>C. monstrosa</i> *	<i>G. melastomus</i> +	<i>P. Glauca</i> §	<i>S. canicula</i> §	<i>R. clavata</i> §
Mn	51 (1,38)	55 (1,26)	60 (1,18)	43 (1,49)	44 (1,30)
GlcA-GalNAc 4S	22,13 \pm 0,27	23,77 \pm 0,13	10,1 \pm 0,1	31,5 \pm 0,62	16,0 \pm 0,1
GlcA-GalNAc 6S	52,70 \pm 0,08	54,93 \pm 0,36	64,2 \pm 0,4	32,4 \pm 0,1	55,9 \pm 0,1
GlcA-GalNAc 0S	4,37 \pm 0,20	4,23 \pm 0,55	16,3 \pm 0,6	22,5 \pm 1,4	19,5 \pm 0,1
GlcA 2S-GalNAc 6S	17,38 \pm 0,09	15,00 \pm 0,05	9,3 \pm 0,2	16,3 \pm 0,2	8,6 \pm 0,12
GlcA -GalNAc 4,6S	2,39 \pm 0,10	1,48 \pm 0,01	n.o	n.o	n,o
GlcA 2S-GalNAc 4S	1,03 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	n.o	n.o	n.o
Relación 4S/6S	0,32	0,34	0,15	0,64	0,26

Con el objetivo de evaluar el potencial del sulfato de condroitina de estas fuentes, se llevó a cabo el aislamiento y caracterización de sulfato de condroitina de tiburón azul (*Prionace glauca*), zapata (*Galeus melastomus*), pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), raya (*Raja clavata*) y quimera (*Chimaera monstrosa*). Con la idea de reducir el impacto ambiental, en el proceso se sustituyó la desproteínización química inicial por hidrólisis enzimática, seguida de precipitación hidroalcohólica y purificación final con membranas de ultrafiltración, estableciendo en cada caso los parámetros óptimos de operación (Murado et al., 2010; Vázquez et al., 2016; Vázquez et al., 2019; Vázquez et al., 2018a). En la tabla 1 se recogen las características de los sulfatos de condroitina extraídos de cada especie.

Como se observa, existen diferencias tanto en masa molecular como en composición entre las especies seleccionadas, con la excepción de *C. monstrosa* y *G. melastomus* que presentan características muy similares. Son destacables las especies *P. glauca* y *S. canicula*, ya que el primero muestra la mayor masa molecular y un porcentaje excepcionalmente elevado de CS-C, mientras que las características del segundo se encontrarían a medio camino entre el sulfato de condroitina marino y terrestre, con un porcentaje similar de CS-A y CS-C.

Estos materiales, obtenidos con un alto grado de pureza y perfectamente caracterizados, son adecuados para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, y su diversidad los hace además interesantes para estudiar diferencias en bioactividad en base a su composición. En este sentido, también se han estudiado cinéticas de depolimerización enzimática para producir sulfato de condroitina de masa molecular deseada (Valcarcel et al., 2020), lo cual permitiría disponer de materiales con la misma masa molecular pero diferente sulfatación.

Ácido hialurónico

Al igual que el sulfato de condroitina, el ácido hialurónico es uno de los componentes principales del cartílago y también pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos. Su estructura es similar a la del sulfato de condroitina, conteniendo N-acetilglucosamina en lugar de N-acetilgalactosamina, aunque en este caso no existe sulfatación (Fig. 7.2). A pesar de su aparente simplicidad, el ácido hialurónico se revela como un componente esencial de las matrices extracelular y pericelular, donde regula procesos esenciales tales como adhesión, movilidad, proliferación y diferenciación celular (Garantziotis and Savani, 2019; Liang et al., 2016). Además participa en funciones estructurales, como lubricante en articulaciones y dotando al cartílago de resistencia a la compresión al formar complejos supramoleculares con glicoproteínas (proteoglicanos conteniendo sulfato de condroitina) capaces de incorporar agua en su estructura (Camarero-Espinosa et al., 2016).

Al igual que otros glicosaminoglicanos, actualmente no es posible la síntesis química del ácido hialurónico, por lo que tradicionalmente se ha obtenido a partir de tejidos ricos en ácido hialurónico, tales como crestas de gallo o el humor vítreo de los ojos, pudiendo también extraerse a través de procesos de valorización de ojos de peces (Murado et al., 2012). Sin embargo, el desarrollo de procesos biotecnológicos para su producción ha desplazado considerablemente a los productos naturales, ya que es posible conseguir

mayores rendimientos por fermentación con algunas especies de estreptococos. En estos procesos, se han usado fuentes proteicas procedentes de la valorización de vísceras y músculo de peces como sustrato para el crecimiento microbiano (Vázquez et al., 2010), siendo posible también incorporar efluentes producidos en pasos de desproteización en otros procesos de valorización como el del quitosano (Fig. 7.1.)

Las aplicaciones actuales del ácido hialurónico incluyen inyecciones intra-articulares para el tratamiento de la osteoartritis (Maheu et al., 2019), formulación de lágrimas artificiales con función humectante del ojo (Beck et al., 2019), como agente de relleno en cirugía estética (Beasley et al., 2009) y en productos cosméticos. En ingeniería de tejidos es ampliamente estudiado como componente de andamiajes y para la liberación controlada de fármacos, en ocasiones modificado químicamente (López-Ruiz et al., 2019; Tripodo et al., 2015).

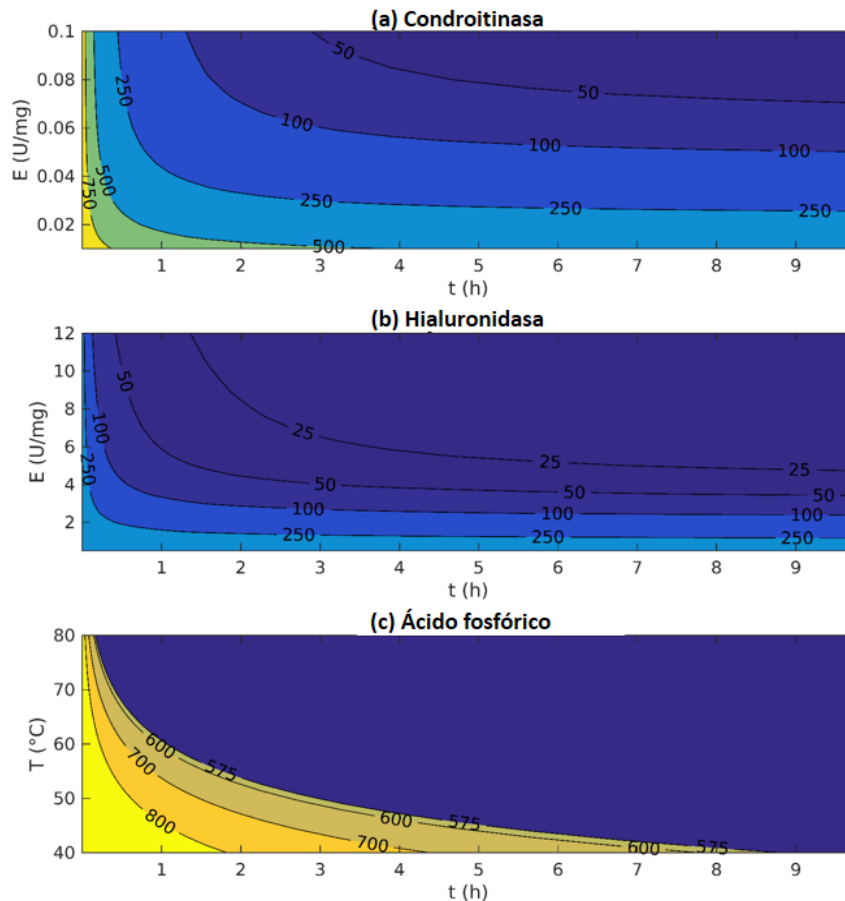


FIGURA 7.3. Variación de la masa molecular del ácido hialurónico con el tiempo de reacción y (a,b) relación enzima: sustrato (E) y (c) temperatura (T) .

La actividad biológica del ácido hialurónico depende fundamentalmente de su masa molecular, habiéndose asociado procesos de curación de heridas, supresión de la

inflamación, protección del tejido epitelial, homeostasis de tejidos y efectos antiproliferativos y antiangiogénicos a masas moleculares por encima de 1MDa, mientras cadenas de entre 250 kDa y 1 MDa parecen comportarse como agentes proinflamatorios. Fragmentos más cortos han mostrado efectos variables en la migración e invasión de células cancerosas, angiogénesis, proliferación celular e inflamación (Tavianatou et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Tanto el ácido hialurónico extraído de tejido animal, que puede llegar a los 10MDa, como el producido por fermentación, en torno a 1MDa, requieren procesos de depolimerización para obtener masas moleculares menores, que pueden ser deseables dependiendo de la aplicación. En animales, la rotura del ácido hialurónico es catalizada por hialuronidasas y radicales libres, pero también es posible la depolimerización *in vitro* con enzimas bacterianas y por medios fisicoquímicos. Además de la obtención de ácido hialurónico en medios marinos, se ha modelado la rotura del ácido hialurónico por vía enzimática, con hialuronidasa y condroitinasa, y química, con ácido fosfórico. Como resultado, es posible establecer las condiciones para obtener ácido hialurónico de masa molecular deseada combinando tiempo de reacción y relación enzima:sustrato (vía enzimática) o temperatura (vía química), como se muestra en la Fig. 7.3.

Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal derivado de la quitina, la cual está formada por monómeros de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$. La quitina ejerce funciones estructurales formando parte del exoesqueleto y las escamas de algunos animales, y de la pared celular de los hongos, lo que la sitúa como el segundo polímero más abundante en la naturaleza tras la celulosa. Debido a su muy limitada solubilidad, generalmente se desacetila parcialmente en medio alcalino para dar lugar a quitosano (Fig. 7.2.), el cual es soluble en medio ácido.

Las aplicaciones del quitosano son muy diversas, abarcando desde agricultura, alimentación, o medicina, hasta cosmética (Hamed et al., 2016). En el marco del envejecimiento saludable, destaca la investigación del quitosano y derivados en biomateriales para reconstruir defectos óseos y del cartílago articular (LogithKumar et al., 2016) (Li et al., 2018), así como en nanocomposites para la liberación controlada de fármacos (Ali and Ahmed, 2018).

El quitosano comercial se obtiene generalmente a partir de quitina extraída del caparazón

de crustáceos o aislada tras fermentación con hongos. En la quitina de estas fuentes, las cadenas poliméricas están en disposición antiparalela (quitina α), sin embargo en la pluma de calamar, estas se ordenan paralelamente (quitina β), dando lugar a menores fuerzas inter- e intra- moleculares que resultan en mayor capacidad de absorción de agua y un quitosano más homogéneo que el obtenido a partir de quitina α (Domard, 2011). Algunos estudios han encontrado también diferencias entre ambos en aplicaciones de ingeniería de tejidos (Reys et al., 2013; Shavandi et al., 2015).

Con el objetivo de disponer de quitosano de distintas fuentes se llevó a cabo la desproteínización de pluma de calamar de dos especies distintas y del exoesqueleto del cefalotórax de langostino mediante hidrólisis enzimática, dando lugar a un efluente rico en proteínas que puede ser reutilizado para la producción de ácido hialurónico. De modo similar, el efluente alcalino resultante de la desacetilación de la quitina se puede usar en la producción de sulfato de condroitina (Fig. 7.1). Los procesos fueron optimizados dando lugar a diversos tipos de quitosano (Tabla 7.2) (Vázquez et al., 2017a; Vázquez, et al., 2017b; Vázquez et al., 2018b). El quitosano de ambas especies de calamar presenta masas moleculares semejantes, mientras el de cabeza de langostino es considerablemente menor. En los tres casos se pueden obtener elevados grados de desacetilación (porcentaje de unidades de D-glucosamina), entre 92 y 94%, lo cual favorece la solubilidad de los polímeros.

Colágeno y gelatina

El colágeno, la proteína más abundante en mamíferos especialmente presente en piel y huesos, está constituida por una estructura trifibrilar (triple hélice con peso molecular superior a 300 kDa) y es completamente insoluble en agua en su forma nativa o después de su aislamiento. La hidrólisis parcial de esta proteína se denomina gelatina, de mayor o menor calidad en función del grado de rotura del colágeno inicial, la cual sí que es soluble en agua. A su vez la hidrólisis enzimática controlada, con endo y/o exoproteasas, tanto del colágeno como de la gelatina da lugar a péptidos de menor tamaño –generalmente en el rango 500-10000 Da– habitualmente conocidos como hidrolizados de colágeno.

Son diferentes los ámbitos de aplicación de estos bioproductos: 1) en el mundo alimentario las gelatinas son ampliamente utilizadas como espesantes, clarificantes y formadores de geles (Gómez-Guillén et al. 2002), 2) a nivel industrial son también empleadas como precursores de tintes, pegamentos y cápsulas, 3) a nivel nutracéutico y cosmético los hidrolizados son ingredientes funcionales con diferentes bioactividades

incluyendo la activación de los fibroblastos (Alves et al., 2017; Venkatesan et al., 2017), y 4) en el campo farmacológico y clínico el colágeno forma parte de múltiples nanodispositivos para la liberación de bioactivos, andamiajes celulares y apósitos (Silva et al., 2014; Raftery et al., 2016).

TABLA 7.2. Masa molecular como “number average molecular weight” (Mn) y grado de desacetilación del quitosano.

Fuente	Especie	Masa molecular (kDa)	Grado de desacetilación (%)
Pluma de calamar	<i>Illex argentinus</i>	143-339	<93
	<i>Loligo opalescens</i>	139-300	<94
Cabeza de langostino	<i>Penaeus vannamei</i>	58-82	<92

En términos comerciales, el mercado se abastece fundamental de aquellos colágenos y gelatinas recuperados de mamíferos terrestres, principalmente de cerdo, pero ciertos subproductos pesqueros, principalmente las pieles, huesos y escamas, son fuentes estimables de estos recursos (Sousa et al., 2017; Li et al., 2018). Además, las propiedades fisicoquímicas de estos biopolímeros de origen marino presentan ciertas peculiaridades y condicionantes sociales que las hacen complementarias y, en algunos casos, sustitutivas de las de tierra (Karayannakidis et al., 2014). Los procesos de producción de colágeno a partir de sustratos como la piel de pescado implican las siguientes etapas (Li et al., 2018; Blanco et al., 2019a): a) corte y limpieza de la piel, b) tratamiento alcalino, c) tratamiento ácido, d) tratamiento salino, e) diafiltración y f) secado, cuando se trata del colágeno soluble en ácido (ASC) o añadiendo un tratamiento enzimático con pepsina para el conocido como colágeno soluble en pepsina (PSC). En este sentido, el aislamiento de gelatina de pescado mantiene los mismos pasos descritos para el colágeno ASC pero sustituyendo el d) por una extracción acuosa (sólido:líquido) de la gelatina en caliente. Las concentraciones y tipos de reactivos, los tiempos de tratamiento, las relaciones sólido:líquido, etc., son también diferentes entre la purificación de colágeno y gelatina, y dependientes de la especie de pescado de la que provenga el material de partida (Thuy et al., 2014; Lin et al., 2017; Blanco et al., 2019b). Optimizando estas condiciones nos ha permitido una reducción significativa de la concentración de reactivos necesarios, incluyendo el volumen de agua, tiempos de proceso, aislar colágeno y similares de nuevas especies (p.e., tiburón azul y pintarroja) y poder escalar tales producciones con el propósito de suministrar, a varios socios de IBEROS, biomateriales dirigidos a la

formulación de membranas y scaffolds para su aplicación en varias estrategias relacionadas con la medicina regenerativa.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a IBEROS (0245_IBEROS_1_E,POCTEP 2015) y Xunta de Galicia (Grupos de Potencial Crecimiento, IN607B 2018/19).

Imágenes diseñadas con vectores de: [Food vector created by macrovector - www.freepik.com](https://www.freepik.com/free-photos-vectors/food)

Referencias bibliográficas

Ali, A., Ahmed, S., (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* 109, 273-286.

Alves, A.L., Marques, A.L.P., Martins, E., Silva, T.H., Reis, R.L., (2017). Cosmetic potential of marine fish skin collagen. *Cosmetics* 4, 39.

Antelo, L.T., de Hijas-Liste, G.M., Franco-Uría, A., Alonso, A.A., Pérez-Martín, R.I., (2015). Optimisation of processing routes for a marine biorefinery. *Journal of Cleaner Production* 104, 489-501.

Beasley, K.L., Weiss, M.A., Weiss, R.A., (2009). Hyaluronic acid fillers: a comprehensive review. *Facial Plastic Surgery* 25(02), 086-094.

Beck, R., Stachs, O., Koschmieder, A., Mueller-Lierheim, W.G.K., Peschel, S., van Setten, G.B., (2019). Hyaluronic Acid as an Alternative to Autologous Human Serum Eye Drops: Initial Clinical Results with High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid Eye Drops. *Case Reports in Ophthalmology* 10(2), 244-255.

Benito-Arenas, R., Doncel-Pérez, E., Fernández-Gutiérrez, M., Garrido, L., García-Junceda, E., Revuelta, J., Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., (2018). A holistic approach to unravelling chondroitin sulfation: Correlations between surface charge, structure and binding to growth factors. *Carbohydrate Polymers* 202, 211-218.

Blanco, M. Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., (2019a). New strategy to cope with common fishery policy landing obligation: Collagen extraction from skins and bones of undersized hake (*Merluccius merluccius*). *Polymers* 11(9), 1485.

Blanco, M., Vázquez, J.A., Pérez-Martín, R.I., Sotelo, C.G., (2019b). Collagen extraction optimization from the skin of the small-spotted catshark (*S. canicula*) by response surface methodology. *Marine Drugs* 17, 40.

Camarero-Espinosa, S., Rothen-Rutishauser, B., Foster, E.J., Weder, C., (2016). Articular cartilage: from formation to tissue engineering. *Biomaterials Science* 4(5), 734-767.

Djrbal, L., Lortat-Jacob, H., Kwok, J., (2017). Chondroitin sulfates and their binding molecules in the central nervous system. *Glycoconjugate Journal* 34(3), 363-376.

Domard, A., (2011). A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers* 84(2), 696-703.

Garantziotis, S., Savani, R.C., (2019). Hyaluronan biology: A complex balancing act of structure, function, location and context. *Matrix Biology* 78-79, 1-10.

Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A., Montero, P., (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids* 16, 25–34.

Hamed, I., Özogul, F., Regenstein, J.M., (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* 48, 40-50.

Higashi, K., Okamoto, Y., Mukuno, A., Wakai, J., Hosoyama, S., Linhardt, R.J., Toida, T., (2015). Functional chondroitin sulfate from *Enteroctopus dofleini* containing a 3-O-sulfo glucuronic acid residue. *Carbohydrate Polymers* 134, 557-565.

Karayannakidis, P.D., Chatziantoniou, S.E., Zotos, A., (2018). Effects of selected process parameters on physical and sensorial properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin. *Journal of Food Process Engineering* 37, 461–473.

Kjellén, L., Lindahl, U., (2018). Specificity of glycosaminoglycan–protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 50, 101-108.

Li, H., Hu, C., Yu, H., Chen, C., (2018). Chitosan composite scaffolds for articular cartilage defect repair: a review. *RSC advances* 8(7), 3736-3749.

Li, J., Wang, M., Qiao, Y., Tian, Y., Liu, J., Qin, S, Wu, W., (2018). Extraction and characterization of type I collagen from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its

potential application in biomedical scaffold material for tissue engineering. *Process Biochemistry* 74, 156-163.

Liang, J., Jiang, D., Noble, P.W., (2016). Hyaluronan as a therapeutic target in human diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 97, 186-203.

Lin, L., Regenstein, J.M., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., (2017). An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. *Trends in Food Science & Technology* 68, 102-112.

LogithKumar, R., KeshavNarayan, A., Dhivya, S., Chawla, A., Saravanan, S., Selvamurugan, N., (2016). A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers* 151, 172-188.

López-Álvarez, M., López-Senra, E., Valcárcel, J., Vázquez, J.A., Serra, J., González, P., (2019). Quantitative evaluation of sulfation position prevalence in chondroitin sulphate by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy* 50(5), 656-664.

López-Ruiz, E., Jiménez, G., Alvarez de Cienfuegos, L., Antic, C., Sabata, R., Marchal, J., Gálvez-Martín, P., (2019). Advances of hyaluronic acid in stem cell therapy and tissue engineering, including current clinical trials. *Eur Cell Mater* 37, 186-213.

Maheu, E., Bannuru, R.R., Herrero-Beaumont, G., Allali, F., Bard, H., Migliore, A., (2019). Why we should definitely include intra-articular hyaluronic acid as a therapeutic option in the management of knee osteoarthritis: Results of an extensive critical literature review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 48(4), 563-572.

Miller, G.M., Hsieh-Wilson, L.C., (2015). Sugar-dependent modulation of neuronal development, regeneration, and plasticity by chondroitin sulfate proteoglycans. *Experimental Neurology* 274, 115-125.

Murado, M.A., Fraguas, J., Montemayor, M.I., Vázquez, J.A., González, P., (2010). Preparation of highly purified chondroitin sulphate from skate (*Raja clavata*) cartilage by-products. Process optimization including a new procedure of alkaline hydroalcoholic hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal* 49(1), 126-132.

Murado, M.A., Montemayor, M.I., Cabo, M., Vázquez, J.A., González, M., (2012). Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bioproducts Processing* 90(3), 491-498.

Novoa-Carballal, R., Pérez-Martín, R., Blanco, M., Sotelo, C.G., Fassini, D., Nunes, C., Coimbra, M.A., Silva, T.H., Reis, R.L., Vázquez, J.A., (2017). By-products of *Scyliorhinus canicula*, *Prionace glauca* and *Raja clavata*: A valuable source of predominantly 6S sulfated chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers* 157, 31-37.

Raftery, R.M., Woods, B., Marques, A.L.P., Moreira-Silva, J., Silva, T.H., Cryan, S.-A.,

Reis, R.L., O'Brien, F.J., (2016). Multifunctional biomaterials from the sea: assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality. *Acta Biomaterialia* 43, 160–169.

Reys, L.L., Silva, S.S., Oliveira, J.M., Caridade, S.G., Mano, J.F., Silva, T.H., Reis, R.L., (2013). Revealing the potential of squid chitosan-based structures for biomedical applications. *Biomedical Materials* 8(4), 045002.

Shavandi, A., Bekhit, A.E.-D.A., Ali, M.A., Sun, Z., (2015). Bio-mimetic composite scaffold from mussel shells, squid pen and crab chitosan for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 80, 445-454.

Silva, T.H., Alves, A., Ferreira, B., Oliveira, J.M., Reys, L., Ferreira, R., Sousa, R., Silva, S., Mano, J., Reis, R., (2012). Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews* 57(5), 276-306.

Silva, T.H., Moreira-Silva, J., Marques, A.L.P., Domingues, A., Bayon, Y., Reis, R.L., (2014). Marine origin collagens and its potential applications. *Marine Drugs* 12, 5881-5901.

Sousa, S.C., Vázquez, J.A., Pérez-Martín, R.I., Carvalho, A.P., Gomes, A.M., (2017). Valorization of by-products from commercial fish species: Extraction and chemical properties of skin gelatins. *Molecules* 22, 1545.

Tavianatou, A.G., Caon, I., Franchi, M., Piperigkou, Z., Galesso, D., Karamanos, N.K., (2019). Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS journal* 286(15), 2883-2908.

Thuy, L.T.M., Okazaki, E., Osako, K., (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry* 149, 264–270.

Tripodo, G., Trapani, A., Torre, M.L., Giammona, G., Trapani, G., Mandracchia, D., (2015). Hyaluronic acid and its derivatives in drug delivery and imaging: Recent advances and challenges. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 97, 400-416.

Valcarcel, J., García, M.R., Sampayo, L.F., Vázquez, J.A., (2020). Marine chondroitin sulfate of defined molecular weight by enzymatic depolymerization. *Carbohydrate Polymers* 229, 115450.

Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pérez-Martín, R.I., Reis, R.L., Vázquez, J.A., (2017). Glycosaminoglycans from marine sources as therapeutic agents. *Biotechnology Advances* 35(6), 711-725.

Vázquez, J.A., Blanco, M., Fraguas, J., Pastrana, L., Pérez-Martín, R., (2016). Optimisation of the extraction and purification of chondroitin sulphate from head by-products of *Prionace glauca* by environmental friendly processes. *Food Chemistry* 198, 28-35.

Vázquez, J.A., Fraguas, J., Novoa-Carballal, R., Reis, R.L., Pérez-Martín, R.I., Valcarcel, J., (2019). Optimal isolation and characterisation of chondroitin sulfate from rabbit fish (*Chimaera monstrosa*). *Carbohydrate Polymers* 210, 302-313.

Vázquez, J.A., Fraguas, J., Novoa-Carvallal, R., Reis, R., Antelo, L., Pérez-Martín, R., Valcarcel, J., (2018a). Isolation and chemical characterization of chondroitin sulfate from cartilage by-products of Blackmouth Catshark (*Galeus melastomus*). *Marine Drugs* 16(10), 344.

Vázquez, J.A., Montemayor, M.I., Fraguas, J., Murado, M.A., (2010). Hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* in marine by-products media from mussel processing wastewaters and tuna peptone viscera. *Microbial Cell Factories* 9(1), 46.

Vázquez, J.A., Noriega, D., Ramos, P., Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pastrana, L., Reis, R.L., Pérez-Martín, R.I., (2017a). Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus* pens by a combination of enzymatic and chemical processes. *Carbohydrate Polymers* 174, 262-272.

Vázquez, J.A., Ramos, P., Mirón, J., Valcarcel, J., Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., (2017b). Production of Chitin from *Penaeus vannamei* By-Products to Pilot Plant Scale Using a Combination of Enzymatic and Chemical Processes and Subsequent

Optimization of the Chemical Production of Chitosan by Response Surface Methodology. *Marine Drugs* 15(6), 180.

Vázquez, J.A., Ramos, P., Valcarcel, J., Antelo, L.T., Novoa-Carballal, R., Reis, R.L., Pérez-Martín, R.I., (2018b). An integral and sustainable valorisation strategy of squid pen by-products. *Journal of Cleaner Production* 201, 207-218.

Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S.-K., Shim, M.S., (2017). Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. *Marine Drugs* 15, 143.

Wu, M., Huang, R., Wen, D., Gao, N., He, J., Li, Z., Zhao, J., (2012). Structure and effect of sulfated fucose branches on anticoagulant activity of the fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Thelenata ananas*. *Carbohydrate Polymers* 87(1), 862-868.

Yamada, S., Sugahara, K., (2008). Potential therapeutic application of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *Current Drug Discovery Technologies* 5(4), 289-301.

Zhao, Y.-f., Qiao, S.-p., Shi, S.-l., Yao, L.-f., Hou, X.-l., Li, C.-f., Lin, F.-H., Guo, K., Acharya, A., Chen, X.-b., Nie, Y., Tian, W.-m., (2017). Modulating Three-Dimensional Microenvironment with Hyaluronan of Different Molecular Weights Alters Breast Cancer Cell Invasion Behavior. *ACS Applied Materials & Interfaces* 9(11), 9327-9338.



Interreg
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional



UNIÓN EUROPEA



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional