

ARTÍCULOS DE REVISIÓN REVIEW ARTICLES

Diseño de biomateriales inyectables para aplicaciones biomédicas y farmacéuticas: pasado, presente y futuro de los implantes generados *in situ*

Design of Injectable Biomaterials for Biomedical and Pharmaceutical Applications: The Past, Present and Future of in situ generated implants

SOSNIK A

Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Junín 956, 6° Piso. Buenos Aires CP1113, Argentina
alesosnik@gmail.com

RESUMEN

El implante de materiales biomédicos macroscópicos sólidos requiere de procedimientos quirúrgicos convencionales, comúnmente asociados con un extenso daño tisular. Con el objetivo de superar estas limitaciones, se han diseñado matrices capaces de ser insertadas a través de metodologías mínimamente invasivas (inyección). De acuerdo a las propiedades estructurales del implante luego de la inyección, los mismos pueden clasificarse en 2 categorías: (1) implantes carentes de integridad estructural o no continuos y (2) materiales que forman un implante estructuralmente íntegro o continuo. La primera estrategia se basa en la inyección de micro o nanopartículas suspendidas en un vehículo biocompatible. Debido a que no poseen propiedades mecánicas, estos implantes pueden migrar del sitio de inserción. Para sobreponerse a esta desventaja, se han diseñado sistemas que combinan: (1) baja viscosidad y alta fluidez al momento de la inyección con (2) un aumento pronunciado en las propiedades mecánicas a posteriori, que resultará en la formación de un implante sólido y con límites bien definidos. El presente trabajo introduce de manera concisa y detallada las distintas estrategias desarrolladas durante los últimos 20 años para el diseño de este tipo de implantes, así como también las perspectivas futuras en el área.

PALABRAS CLAVE: Biomateriales inyectables. Cirugía mínimamente invasiva. Pastas termoplásticas. Precipitación *in situ*. Polímeros entrecruzados *in situ*. Materiales inteligentes. Matrices termosensibles. Matrices pH-dependientes. Matrices de comportamiento dual.

ABSTRACT

The implantation of solid macroscopic biomedical materials requires conventional surgical procedures, which are commonly associated with extensive tissue damage. In an attempt to overcome these limitations, matrices that may be inserted through minimally invasive methodologies (injection) have been designed. Implants, after injection, may be classified, in accordance with their structural properties, into two categories: (1) implant materials that have no structural or continuous integrity or (2) those that are structurally continuous or integral. The employment of the first method is based on the injection of micro or nano particles, suspended in a biocompatible vehicle. However, the fact that these implants do not possess mechanical properties means that they may migrate from the site in which they have been inserted. In an attempt to overcome this drawback, system combining: (1) low viscosity and high fluidity on injection with (2) a subsequently pronounced increase in mechanical properties, leading to the formation of a solid implant with well defined limits. The present work provides a concise and detailed introduction to the different strategies that have been developed in the design of this type of implants over the past 20 years, as well as an assessment of the future perspectives within this sphere.

KEY WORDS: Injectable biomaterials. Minimally invasive surgery. Thermoplastic pastes. *In situ* precipitation. *In situ* crosslinked polymers. Smart materials. Thermosensitive matrices. pH-dependant matrices. Dual behaviour matrices.

Fecha de recepción: 22-01-07

Fecha aceptación: 03-04-07

INTRODUCCIÓN Y VISIÓN

El desarrollo de los primeros polímeros sintéticos hace aproximadamente un siglo introdujo el uso de materiales livianos, con altas propiedades mecánicas, relativamente inertes y fácilmente fabricables en diversas aplicaciones biomédicas. A lo largo de los años, los polímeros se han convertido en el grupo de biomateriales más importante y representativo. Sin embargo, el implante de materiales biomédicos macroscópicos sólidos requiere de procedimientos quirúrgicos convencionales que traen aparejados daño tisular y dolor. Con el objetivo de superar estas limitaciones, durante las últimas décadas, se han desarrollado matrices capaces de ser implantadas por técnicas mínimamente invasivas (por ejemplo inyección). Entre las ventajas más destacables de este tipo de cirugía cabe mencionar la fácil administración, la mínima incomodidad para el paciente, el uso de anestesia local, el más bajo costo, la fácil programación del procedimiento y la más precisa cantidad de material implantado. Además, permite el acceso a áreas del cuerpo que de otra manera son difícilmente accesibles. Otra ventaja es que el implante se adapta mejor al tejido circundante y alcanza un mejor contacto y adhesión al mismo. De acuerdo a las propiedades estructurales del implante, los materiales biomédicos inyectables se pueden clasificar en 2 categorías¹. El primer grupo comprende sistemas que no poseen integridad estructural luego de su inserción. Éstos se basan en la inyección de micro o nanopartículas suspendidas en un vehículo biocompatible²⁻⁵. La mayor desventaja de los mismos es que debido al carácter particulado, no presentan continuidad y no pueden ser usados en aplicaciones que requieren una función mecánica o estructural. Si bien estos materiales son en general biocompatibles, pueden migrar a otras zonas del cuerpo distantes del sitio de implante. Además, cuando son implantados en cavidades con alto flujo de líquidos biológicos como por ejemplo la bolsa periodontal, el ojo o la vagina, las pequeñas partículas son difícilmente retenidas en el sitio de acción. En la segunda categoría se encuentran aquellos biomateriales que forman un implante integral y con límites bien definidos. En este caso se requieren dos propiedades fundamentales y antagónicas: (1) baja viscosidad al momento de la inyección que les permitirá fluir en el sitio de implante y

INTRODUCTION AND SCOPE

The development of the first synthetic polymers, approximately a century ago, introduced the use of light materials, with high mechanical properties, which are relatively inert and easily manufactured for numerous biomedical applications. Over the years, the polymers have become the most important and representative group of biomaterials. However, the implantation of solid macroscopic biomedical materials requires conventional surgical procedures, which result in tissue damage and pain. Throughout recent decades, attempts have been made to overcome these drawbacks, through the development of matrices that may be implanted through minimally invasive techniques (e.g. injection). The use of this type of surgery presents a number of advantages, such as ease of administration, minimal patient discomfort, the use of local anaesthetic, low cost, easy procedural programming and precision in the quantity of material to be implanted. Furthermore, it enables easy access to areas of the body that would otherwise be difficult using other methods. Another advantage is that the implant adapts more readily to surrounding tissues, reaching a higher level of contact and adhesion. Injectable biomedical materials may be classified into 2 categories, in accordance with the structural properties of the implant¹. The first group comprises systems that do not display structural integrity after injection. These consist of an injection of micro or nano particles suspended in a biocompatible vehicle²⁻⁵. However, the main disadvantage is that these materials are made up of particles, which are not continuous and cannot be used in applications that require a mechanical or structural function. Despite the fact that these materials are generally biocompatible, they may migrate to other parts of the body. Furthermore, when they are implanted into cavities associated with a high flow of biological fluids, such as the periodontal pocket, the eye or the vagina, it is very difficult to retain the particles within the area of action. Materials that may be classified into the second category are those consisting of integral implants with well-defined limits. In this case two fundamental and conflicting properties are required: (1) a low level of viscosity on injection permitting an easy flow into the area of implantation and (2) a pronounced increase in rheological and mechanical properties after

(2) un aumento pronunciado en las propiedades reológicas y mecánicas una vez en el sitio de acción que resultará en la formación de un implante sólido que ajustará su geometría al tejido circundante. De acuerdo a la aplicación y el tipo de tejido donde serán implantados, se requerirán composiciones con distintas propiedades. Entre los usos más comunes caben ser destacados los selladores y pegamentos de tejidos blandos⁶, las barreras mecánicas que previenen adhesiones postquirúrgicas entre tejidos⁷, los rellenos de tejidos utilizados en cirugía reparadora y cosmética⁸, los sistemas de liberación controlada de drogas⁹, las prótesis¹⁰, etc.

Debido a sus cualidades singulares, los materiales que forman un implante continuo han tenido una gran influencia en el desarrollo de nuevos materiales y tecnologías. Los primeros trabajos en el desarrollo de inyectables fueron más intuitivos. John Charnley en 1954, desarrolló el cemento óseo a base de polimetilmetacrilato (PMMA) que se polimeriza *in situ* y es utilizado en el procedimiento de reemplazo de cabeza del fémur (hip replacement)^{11,12}. En 1977, Knapp y colaboradores utilizaron colágeno inyectable como relleno estético¹³. Desde aquellos días, el área ha evolucionado dramáticamente. Existe un constante y renovado interés por sofisticar los sistemas existentes. Los objetivos primordiales son el mejoramiento de la biocompatibilidad, de los perfiles de biodegradación y la ampliación del espectro de aplicación. Se podría sostener de alguna manera que la influencia recíproca entre la estrategia conceptual y el diseño constante de nuevos materiales ha llevado a una rápida evolución de los materiales disponibles hoy en día. Este fenómeno fue remarcado en el año 2002 con la publicación del '...primer volumen especial...' dedicado a Biomateriales Inyectables en una revista científica periódica¹⁴.

El presente trabajo de revisión es una síntesis concisa y detallada del Estado del Arte en el área de biomateriales inyectables y las estrategias para el desarrollo de implantes generados *in situ*.

Las dos primeras familias de biomateriales presentadas están caracterizadas por una alta hidrofobicidad y, consecuentemente, por una baja permeabilidad a oxígeno y otros nutrientes. Los mismos se utilizan como selladores, adhesivos, rellenos tisulares y en sistemas de liberación de fármacos. Los siguientes dos grupos incorporaron agua en su composición y permitieron extender el

injection, permitting the formation of a solid implant that will adjust its shape to the surrounding tissue. Different compositions with different properties will be required in accordance with the application method and the type of tissue into which the material is to be implanted. The most common uses for this type of implant are soft tissue sealants and glues⁶, the manufacture of mechanical barriers to prevent post surgical tissue adhesions⁷, the filling of tissues used in restorative and cosmetic surgery⁸, controlled drug release systems⁹, prostheses¹⁰, etc.

Materials that form a continuous implant have had a great influence on the development of new materials and technologies, due to their very singular properties. The first work carried out on the development of injectables was based on more intuitive notions. John Charnley in 1954, developed a bone cement, based on polymethylmethacrylate (PMMA), which polymerises *in situ* and is used in hip replacements^{11,12}. In 1977, Knapp et al used injectable collagen as an aesthetic filling material. Since then, spectacular progress in this field has been made. Nowadays, there is a great deal of interest in the development of more sophisticated implant systems. The main objectives are the improvement of biocompatibility and biodegradation profiles, and a widening of the spectrum of applications. To some extent, it can be said that the reciprocal influence between the conceptual strategy and the constant design of new materials has led to the fast evolution of the materials that are now available. The growth of interest in the field became apparent in the year 2002, when the first special volume devoted to injectable biomaterials was published by a periodical scientific journal¹⁴.

The present revision work is a concise and detailed summary of the state of the art of injectable biomaterials and the strategies that have been devised in the development of *in situ* generated implants.

The first two families of biomaterials are characterised by a high hydrophobicity and, consequently, by a low permeability to oxygen and other nutrients. They are used as sealants, adhesives, tissue fillers and drug delivery systems. The following two groups of materials had water incorporated into their composition, enabling their use to be extended to other disciplines, involving macromolecules that are soluble in water, cells and tissues. The descriptions presented in this

uso a disciplinas que involucran macromoléculas solubles en agua, células y tejidos. La descripción que aquí se presenta no es cronológica sino por orden de sofisticación y evolución en el diseño de los sistemas. Finalmente, se describen Sistemas Combinados. Éstos integran más de una estrategia desplegando propiedades únicas.

PASTAS TERMOPLÁSTICAS

2.1. Pastas termoplásticas sin aumento de viscosidad

Scopelianos y Bezwada de Ethicon Inc. patentaron una gran diversidad de materiales líquidos hidrofóbicos y bioabsorbibles a base de policaprolactona (PCL), ácidos poliláctico (PLA), poliglicólico (PGA) y polidioxanona (PDO) y que fueron estudiados en: (1) reparación y relleno de tejidos^{15,16} y (2) en sistemas de liberación controlada de drogas de aplicación veterinaria^{16,17}. Los materiales se encuentran en su estado fundido tanto a temperatura ambiente como a 37°C y no despliegan ningún cambio relevante en sus propiedades reológicas como consecuencia de la exposición al medio biológico. La propiedad más importante para impedir su rápida solubilización y reabsorción por el entorno biológico es la baja solubilidad en agua. Heller y colegas desarrollaron una serie de poliortoésteres (POEs) inyectables a través de una jeringa 22G. Los mismos fueron utilizados para la liberación sostenida de bupivacaína y tetraciclina, dos drogas para el tratamiento del dolor y la enfermedad periodontal, respectivamente¹⁸. Los estudios de liberación mostraron una cinética lineal a lo largo de hasta 2 semanas. Cabe destacar que debido a sus características composicionales (peso molecular e hidrofobicidad), en algunos trabajos de revisión, este grupo de materiales se encuentra junto al próximo (pastas termoplásticas que muestran aumento de viscosidad a 37°C)¹⁹. Sin embargo, mientras los presentes sistemas no sufren cambios estructurales que resulten en un aumento de la viscosidad, los comprendidos en la siguiente sección solidifican a 37°C, llevando a un aumento de la viscosidad con el tiempo. Esta diferencia parece substancial para ser soslayada y por ese motivo en el presente trabajo se introducen separadamente.

work have not been based on a chronological order of development, but rather on the degrees of sophistication and evolution in the design of each system. Finally, a description of combined systems has been provided, in which more than one strategy has been employed, in order to obtain unique properties.

THERMOPLASTIC PASTES

2.1. Thermoplastic pastes that do not display a viscosity increase

Scopelianos and Bezwada from Ethicon Inc. patented a great variety of hydrophobic and bioabsorbable liquid materials of polycaprolactone (PCL), polylactic (PLA) and polyglycolic (PGA) acids, and polydioxanone (PDO), which were studied in: (1) the repair and filling of tissues^{15,16} and (2) in controlled drug delivery systems for veterinary applications^{16,17}. These materials appear in a melted state at both room temperature and at 37°C, and do not undergo rheological changes upon exposure to the biological medium. An important property associated with these materials is that they are not readily soluble and are not reabsorbed by the biological environment, due to their low solubility in water. Heller et al. developed a series of injectable polyorthoesters (POEs) using a syringe 22G, for use as a sustained release vehicle for bupivacaine and tetracycline, in the treatment of pain and periodontal disease, respectively¹⁸. Drug delivery studies showed a linear profile over a period of up to two weeks. At this point it is worth mentioning that in some review articles, this group of materials has been classified in close association with the following group (thermoplastic pastes that display an increase in viscosity at 37°C), due to the characteristics of its composition (molecular weight and hydrophobicity). However, while the present systems do not undergo structural changes that lead to an increase in viscosity, those classified within the following section solidify at 37°C, leading to an increase in viscosity over time. This difference seems to be too substantial to be ignored and consequently, has been dealt separately in this study.

2.2. Pastas termoplásticas que despliegan aumento de viscosidad a 37°C

Las pastas termoplásticas que despliegan un aumento de viscosidad luego de la inserción son materiales de bajo peso molecular caracterizados por una baja temperatura de transición vítrea (T_g) y una temperatura de fusión (T_m) entre 37°C y 65°C. Así, las pastas son inyectadas en estado fundido (en general a una temperatura por encima de la temperatura corporal) y la cristalización gradual en el cuerpo resulta en la solidificación y formación de un implante continuo¹⁹. Por ejemplo, Walter et al. utilizaron pastas para la liberación de taxol en el tratamiento de glioma maligno con resultados promisorios²⁰. Un estudio similar fue llevado a cabo por Zhang y colaboradores²¹. Einmahl y colegas diseñaron un poliorotéster bioerodible para liberación intraocular de principios activos²². Los polímeros más importantes para el desarrollo de estos implantes son PLA, PGA, PCL, PDO y POEs, entre otros. Las aplicaciones más relevantes se circunscriben a sistemas de liberación sostenida. Las limitaciones de esta estrategia están asociadas fundamentalmente a que temperaturas mayores de 60°C pueden causar necrosis tisular y dolor. Sosnik y Cohn diseñaron una modificación de esta estrategia mediante la síntesis de oligómeros segmentados de polietilenglicol y PCL que combinaron inyectabilidad mejorada y endurecimiento gradual a 37°C a lo largo del tiempo²³. Los materiales fueron calentados a 80°C (1 h) para borrar la historia térmica y luego enfriados rápidamente (quenching) en N₂ (l) (1/2 h). Este procedimiento permitió obtener materiales en estado amorfo, que una vez re-calentados a 37°C pudieron ser inyectados y mostraron un aumento gradual en su viscosidad debido a la paulatina cristalización de los segmentos de PCL a la temperatura fisiológica.

PRECIPITACIÓN IN SITU

La precipitación *in situ* fue otra de las estrategias pioneras en el estudio sistemático de materiales para la obtención de implantes inyectables continuos. La misma fue desarrollada por Dunn y colaboradores en los laboratorios Atrix a principios de la década de 1990²⁴⁻³⁰. La metodología se basa en el uso de un solvente orgánico miscible en agua que es no-tóxico y

2.2. Thermoplastic pastes that undergo an increase in viscosity at 37°C

Thermoplastic pastes that undergo an increase in viscosity after insertion are of low molecular weight materials and are characterised by low glass transition temperature (T_g) and a melting temperature (T_m) between 37°C and 65°C. As a consequence, these pastes may be injected in melted state (generally above body temperature) and crystallisation in the body is gradual, resulting in subsequent solidification and the formation of an integral implant¹⁹. Promising results, for example, were obtained by Walter et al., who used pastes for the gradual release of taxol in the treatment of malignant glioma²⁰. A similar study was carried out by Zhang et al²¹. Einmahl et al. designed a bioerodible polyorthoester for the release of intraocular active agents²². The most important polymers in the development of these implants are, among others PLA, PGA, PCL, PDO & POEs. The most relevant applications are confined to sustained release systems. However, the fact that this strategy involves temperatures over 60°C which may cause tissue necrosis and pain, is a limiting factor. Sosnik and Cohn modified this system through the synthesis of segmented oligomers of polyethyleneglycol and PCL, which served to improve injectability and display gradual hardening over time at 37°C²³. The materials were heated to 80°C (1Hr), in order to erase their thermal history and subsequently, quenched rapidly in N₂ (l) (1/2 h). Through such a procedure the materials were transformed into an amorphous state. Once re-heated to 37°C, the materials became injectable liquids, that underwent a gradual increase in viscosity, due to the gradual crystallisation of PCL segments at physiological temperature.

IN SITU PRECIPITATION

Another pioneering strategy in the systematic search for continuous injectable materials was the use of *in situ* precipitation. Dunn et al developed such a strategy at Atrix Laboratories at the beginning of the 1990s²⁴⁻³⁰. This method used a non-toxic and biocompatible water miscible organic solvent, capable of solubilizing the polymer, which is not soluble in aqueous medium. The most commonly used solvent was

es biocompatible y que a su vez solubiliza al polímero que es insoluble en el medio acuoso. El solvente más popular es la N-metil 2-vinil pirrolidona. Esta metodología está limitada a polímeros que muestran buena solubilidad en dicho medio pero que a su vez son insolubles en agua. El polímero se encuentra disuelto en el solvente orgánico y una vez inyectado, dicho solvente gradualmente se disuelve en el medio biológico, dejando una solución de polímero de elevada concentración que finalmente resulta en la precipitación del mismo y la formación de un implante sólido. Entre las aplicaciones más comunes se pueden mencionar sistemas de liberación controlada^{27,31}. Kost y Eliaz desarrollaron materiales a base de PLA y PGA para la liberación de proteínas^{32,33}. El solvente de elección en dicho trabajo fue glicofurol. Venkatraman et al. describieron la formación de sistemas inyectables de PLGA y bencilbenzoato³⁴⁻³⁶. Jordan y colaboradores utilizaron sistemas similares para el desarrollo de implantes en el tratamiento de incontinencia urinaria³⁷.

SISTEMAS POLIMERIZABLES O ENTRECruzABLES IN SITU

Varios grupos han descrito el uso de precursores de bajo peso molecular (monómeros o macrómeros) que poseen al menos dos grupos funcionales reactivos y que son inyectados en solución acuosa. Luego, estas mezclas reactivas se polimerizan o entrecruzan dentro del cuerpo a través de reacciones de polimerización de radicales libres iniciadas por iniciadores químicos (p.e. persulfato de amonio) o fotoquímicos (con luz visible o U.V) bajo condiciones fisiológicas. Los hidrogeles generados son física y mecánicamente estables³⁸. Langer et al han llevado a cabo un extenso trabajo desarrollando sistemas a base de polietilenglicol (PEG). Los mismos fueron fotopolimerizados *in situ* (p.e. transdermalmente) y utilizados para la liberación controlada de drogas y proteínas y para cultivo celular³⁹⁻⁴⁴. Hubbell y colaboradores desarrollaron varias matrices inyectables foto-entrecruzables para la prevención de adhesions post-quirúrgicas^{45,46} y como soportes para Ingeniería de Tejidos⁴⁷⁻⁴⁹. El grupo de Mikos introdujo el uso de polipropilenefumaratos (PPFs) entrecruzables *in situ* con una amplia diversidad de propiedades (por ejemplo afinidad por agua)

N-methyl 2-vinylpyrrolidone. However, this methodology is limited to polymers that are readily soluble in such a medium but at the same time are insoluble in water. The polymer remains in a dissolved state in the organic solvent, but once injected, the solvent gradually dissolves in the biological medium, leaving behind a highly concentrated polymer solution, which finally precipitates, forming a solid implant. The most commonly used applications for such systems were controlled release of active substances^{27,31}. Kost & Eliaz developed materials based on PLA and PGA for the release of proteins^{32,33}, using glycofurol as solvent. Venkatraman et al. described the formation of injectable systems of PLGA and benzylbenzoate³⁴⁻³⁶. Jordan et al. used similar systems in the development of implants for the treatment of urinary incontinence³⁷.

POLYMERIZABLE OR IN SITU CROSS-LINKING SYSTEMS

Several research groups have described the use of low molecular weight precursors (monomers or macromers), which possess at least two reactive functional groups that are injected as an aqueous solution. These reactive mixtures are then polymerised or cross-linked within the body through free radical polymerisation, whose reaction is triggered either by chemical (e.g. ammonium persulphate) or photochemical (visible or U.V. light) initiators, under physiological conditions. The generated hydrogels are physically and mechanically stable³⁸. Langer et al. carried out an extensive work in the development of systems using polyethylenglycol (PEG). Through *in situ* photopolymerisation (e.g. transdermal polymerization), these systems were used in the controlled release of drugs and proteins, and in cell culture³⁹⁻⁴⁴. Hubbell et al. developed several injectable photocrosslinking matrixes for the prevention of post-surgical adhesions^{45,46} and for scaffolds in tissue engineering⁴⁷⁻⁴⁹. Mikos and collaborators introduced the use of *in situ* crosslinking polypropylenefumarates (PPFs) with a wide range of applications in the regeneration of tissues⁵⁰⁻⁵³. West et al. designed crosslinking matrixes using polyvinyl alcohol (PVA)⁵⁴. Even though the hydrogels did not permit cell adhesion, the subsequent incorporation of pro-adhesive oligopeptides, such as Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS),

para su aplicación en regeneración de tejidos⁵⁰⁻⁵³. Dentro de aplicaciones similares, West et al. diseñaron matrices entrecruzables a base de alcohol polivinílico (PVA)⁵⁴. Si bien los hidrogeles no permitieron la adhesión de células, la posterior incorporación de oligopeptidos pro-adhesivos como Arg-Gli-Asp-Ser (RGDS) resultó en un aumento de la citocompatibilidad. Bowman y colaboradores han realizado un extenso estudio de las propiedades de hidrogeles entrecruzados por medio de reacciones fotoquímicas para aplicaciones en liberación de fármacos y medicina regenerativa^{55,56}. Algunos de sus discípulos continuaron su trabajo de investigación independiente en esta área y diseñaron matrices compuestas de una amplia variedad de polímeros naturales y sintéticos⁵⁷⁻⁵⁹. Más recientemente, matrices entrecruzadas conteniendo células fueron producidas utilizando reacciones de adición de tipo Michael de grupos tiol de cisteína o polímeros naturales modificados (p.e. ácido hialurónico) a grupos insaturados de PEG-diacrilato (PEGDA)⁶⁰⁻⁶² o por oxidación de grupos tiol para la formación de puentes disulfuro⁶³⁻⁶⁶.

Los materiales presentados en la presente sección no despliegan un aumento rápido en su viscosidad previo a la polimerización y debido a ello, el entrecruzamiento debe ser llevado a cabo inmediatamente después de la inyección para prevenir la migración o dilución del implante en el entorno biológico.

MATERIALES INTELIGENTES

Materiales inteligentes son aquellos que despliegan un cambio abrupto en una de sus propiedades (por ejemplo viscosidad) ante un pequeño cambio en las condiciones del entorno. El estímulo puede ser físico (p.e. temperatura, fuerza iónica, campo magnético o eléctrico, estrés mecánico), químico (p.e. pH) o bioquímico (p.e. substrato de enzimas o ligandos específicos)⁶⁷.

Matrices termosensibles

Estos materiales pueden ser clasificados en dos categorías: (1) sensibles positivos si poseen una temperatura superior crítica de solución (UCST) y se contraen por enfriamiento por debajo de esta temperatura⁶⁸⁻⁷⁰ o (2) sensibles negativos cuando

served to increase cytocompatibility. Bowman and collaborators carried out an extensive study on the properties of crosslinked hydrogels through photochemical reactions, for application in drug delivery and regenerative medicine^{55,56}. Some of their disciples continued with their research independently and designed matrices using a wide range of natural and synthetic polymers⁵⁷⁻⁵⁹. More recently, crosslinked matrices containing cells were produced using Michael-type addition reactions of cysteine thiol groups or modified natural polymers (e.g. hyaluronic acid) to unsaturated groups of PEG-diacrylate (PEGDA)⁶⁰⁻⁶² or through the oxidation of thiol groups, in order to form disulphur bridges⁶³⁻⁶⁶.

The materials presented in this section do not display a fast increase in viscosity prior to polymerization. For this reason, crosslinking should be carried out immediately after injection, in order to prevent migration or dilution of the implant within the biological medium.

SMART MATERIALS

Smart materials are those showing sharp changes in one of their properties (e.g. viscosity), in response to small environmental changes in the biological medium. Stimuli can be physical (e.g. temperature, ionic force, magnetic or electric field, mechanic stress), chemical (e.g. pH) or biochemical (e.g. enzyme substrate or specific ligands)⁶⁷.

Thermosensitive matrices

These materials may be classified into two categories: (1) positive-sensitive, if they have an upper critical solution temperature (UCST) and contract upon cooling below this temperature⁶⁸⁻⁷⁰, or negative sensitive, if they have a lower critical solution temperature (LCST) and contract upon heating above this temperature^{71,72}. The latter case is also known as reverse thermal gelation (RTG) and represents one of the most promising strategies in the development of injectable biomaterials. The aqueous solutions of these materials present low viscosity at room temperature and exhibit an increased viscosity upon heating, forming a semi-solid or solid gel at physiological temperature. This transition is generally been observed

despliegan una temperatura mínima crítica de solución (LCST) y se contraen por calentamiento por encima de ella^{71,72}. Este último fenómeno es también conocido como Gelación Térmica Inversa (Reverse Thermal Gelation, RTG) y constituye una de las estrategias más prometedoras para el desarrollo de biomateriales inyectables. Las soluciones acuosas de estos materiales tienen baja viscosidad a temperatura ambiente y exhiben un aumento con el calentamiento formando un gel semi-sólido o sólido cuando alcanzan la temperatura fisiológica. Esta transición se observa generalmente en un estrecho intervalo de temperatura. Existen varios polímeros que presentan este comportamiento. Entre ellos, cabe destacar la poli-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm)⁷³⁻⁷⁵, copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno) (PEO-PPO)⁷⁶⁻⁷⁹, copolímeros segmentados de poli(óxido de etileno)-poliésteres (PEO-PLA, PEO-PCL)⁸⁰⁻⁸³ y otras moléculas anfifílicas diseñadas alternando segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos⁸⁴⁻⁸⁸. Polímeros naturales como la hidroxipropilcelulosa mostraron un comportamiento similar⁸⁹. Además, con el objetivo de mejorar la biodegradabilidad y la compatibilidad y adhesión celular se han diseñado híbridos de estos materiales termosensibles con una gran diversidad de macromoléculas naturales (p.e. gelatina y quitosano)⁹⁰⁻⁹³. También se desarrollaron combinaciones con otros polímeros sintéticos. Entre ellos, alcohol polivinílico⁹⁴ y poliacrilatos^{95,96}, resultando en materiales con sensibilidad a más de un estímulo (ver materiales de comportamiento dual) y propiedades adicionales como bioadhesividad⁹⁵⁻⁹⁷. Por ejemplo, Huang et al sintetizaron derivados de Pluronic (PEO-PPO-PEO) modificados con 3,4-dihidroxifenil-L-alanina. Los materiales mostraron propiedades bioadhesivas mejoradas respecto de la matriz original⁹⁷.

Debido al gran impacto que los sistemas termosensibles inversos han tenido sobre el progreso de la aplicación de matrices inyectables, la presente sección presentará los materiales principales en este grupo en mayor detalle.

Poli-N-isopropilacrilamida (poliNIPAAm)

Poli-NIPAAm es uno de los polímeros termosensibles inversos más populares. Desde los primeros reportes por Tanaka en 1978⁷³, se ha observado un desarrollo remarcable. Han sido

within a narrow temperature interval. There are several polymers that have been observed to show this type of behaviour. Among them, it is worth mentioning polyisopropylacrylamide, (PNIPAAm)⁷³⁻⁷⁵, segmented copolymers of poly(ethylene oxide)- poly(propylene oxide) (PEO-PPO)⁷⁶⁻⁷⁹, segmented copolymers of poly(ethylene oxide)-polyesters (PEO-PLA, PEO-PCL)⁸⁰⁻⁸³ and other designed amphiphilic molecules, alternating hydrophilic and hydrophobic segments⁸⁴⁻⁸⁸. Natural polymers such as hydroxypropylcellulose show a similar behaviour⁸⁹. Furthermore, as a means to improving biodegradability, compatibility and cellular adhesion, hybrids of these thermosensitive materials with a great variety of natural macromolecules (e.g. gelatin and chitosan) have been developed⁹⁰⁻⁹³. Combinations of other synthetic polymers have also been developed, among which polyvinyl alcohol⁹⁴ and polyacrylates⁹⁵ have been observed to be sensitive to more than one stimuli (see dual behaviour materials) and also possess additional properties such as bioadhesiveness⁹⁵⁻⁹⁷. For example, Huang et al. synthesised derivatives from Pluronic (PEO-PPO-PEO), modified with 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine. The materials obtained showed improved bioadhesive properties in comparison to the original matrix⁹⁷.

Given the great impact that reverse thermosensitive systems have had on the progress made in the development of injectable matrices, we have chosen to deal with the main components in this group in greater detail.

Poly-N-isopropylacrylamide (polyNIPAAm)

Poly-NIPAAm is one of the most popular reverse thermosensitive polymers, which since the first reports made by Tanaka in 1978⁷³, have undergone a remarkable development. Sophisticated systems combining this material with other biologically active macromolecules have been designed for application in diverse fields such as diagnostics, separation methods, biosensors, enzyme processing, drug or chemical agent delivery systems, molecular marking, etc^{67,98-101}. Another interesting application of these gels, despite not being in injectable form, is the technique for the generation of cellular films developed by Okano¹⁰²⁻¹⁰⁵. This methodology uses poly-NiPAAm substrates that show differential affinity to cells at different temperatures. The main limitations of these materials are those associated with the non-degradability of the pure matrices,

diseñados sistemas sofisticados que combinan este material con otras macromoléculas biológicamente activas y han sido aplicados en campos tan diversos como diagnósticos, métodos separativos, biosensores, procesamiento de enzimas, liberación dirigida de drogas o agentes químicos, marcación molecular, etc^{67,98-101}. Otra aplicación de estos geles, si bien no en su forma inyectable pero que vale la pena mencionar, es la técnica de generación de láminas celulares desarrollada por Okano¹⁰²⁻¹⁰⁵. Esta metodología utiliza substratos de poliNiPAAm que muestran afinidad diferencial a las células a distinta temperatura. Las limitaciones más importantes de estos materiales están asociadas a la no degradabilidad de las matrices puras, la pérdida de transparencia durante la gelación y la pérdida de volumen o contracción durante el calentamiento.

Polímeros segmentados de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (PEO-PPO)

Otra familia de materiales RTG de suma importancia son los polímeros segmentados de PEO y PPO, comercialmente conocidos como Pluronic (lineales y bifuncionales) y Tetronic (ramificados y tetrafuncionales) [76]. La concentración de los mismos puede ser ajustada adecuadamente para la obtención de una transición sol-gel a la temperatura deseada y con una magnitud determinada. A diferencia de poli-NIPAAm, estos materiales no sufren cambios de volumen ni se ve afectada la transparencia de la matriz durante la gelación. Debido a estas propiedades únicas, estos polímeros han sido usados en un amplio espectro de aplicaciones biomédicas¹⁰⁶⁻¹¹¹. En estudios *in vivo* estos polímeros no causaron irritación cuando fueron aplicados tópicamente o subcutáneamente y provocaron mínima irritación luego de la administración intramuscular o intraperitoneal⁷⁸. Así mismo, mostraron buena citocompatibilidad en contacto con diferentes tipos celulares¹⁰⁷⁻¹¹⁰ y se utilizaron para el diseño de sistemas de liberación controlada de drogas¹¹¹. Si bien estos materiales son básicamente no degradables, moléculas con pesos moleculares < 10-15 kDa son eliminadas a través de filtración renal. En contraste con el extenso trabajo realizado con los derivados lineales (Pluronic), el potencial de los materiales tetrafuncionales fue menos explorado^{112,113}. La mayor limitación reside en la mayor concentración requerida para alcanzar

loss of transparency during gelation and the loss of volume or contraction during heating.

Segmented polymers of poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) (PEO-PPO)

Another highly important family of RTG materials are the block copolymers of PEO and PPO, commercially known as Pluronic (linear and bifunctional) and Tetronic (branched and tetrafunctional) [76]. Concentrations of these materials can be appropriately adjusted to obtain a sol-gel transition at a desired temperature. In contrast to poly-NIPAAm, these materials do not undergo changes in volume or transparency during gelation. Due to these unique properties, these polymers have been used in a wide spectrum of biomedical applications¹⁰⁶⁻¹¹¹. In *in vivo* studies, they did not cause irritation when applied topically or subcutaneously and irritation was minimal on intramuscular or intraperitoneal administration⁷⁸. Similarly, they presented good cytocompatibility in contact with different types of cells¹⁰⁷⁻¹¹⁰ and were used in the design of controlled drug delivery systems¹¹¹. In spite of the non-degradable nature of these materials, molecules of molecular weights < 10-15 kDa may be eliminated through renal filtration. However, in contrast to the extensive work carried out on linear derivatives (Pluronic), the potential of tetrafunctional materials has been explored to a lesser extent^{112,113}. Their greatest limitation is that higher concentrations, generally around 30%, are required to achieve gelation, while in contrast, concentrations of between only 15 and 20% of linear derivatives are required. On the other hand, higher functionality permitted greater degrees of crosslinking, at lower concentrations of the polymeric precursor¹¹³. However, it is important to point out that even in cases where commercial materials presented sol-gel transition, the viscosity levels obtained were not sufficiently high for most clinical applications. Furthermore, mechanical properties were unsatisfactory and the gels showed excessive permeability to water. As a consequence, residence time at the implant site were extremely short^{114,115}. In an attempt to overcome such drawbacks, Cohn and co-workers employed two alternative synthetic strategies: (1) the polymerisation of PEO-PPO-PEO triblocks with bifunctional molecules such as hexamethylenediisocyanate (HDI)^{116,117} and (2) the polymerisation

la gelación, generalmente alrededor del 30%. Esto contrasta con concentraciones entre 15 y 20% de los derivados lineales. Por otro lado, la mayor funcionalidad permitió alcanzar grados de entrecruzamiento mayores utilizando concentraciones más bajas del precursor polimérico¹¹³. Es importante resaltar que aún en casos donde los materiales comerciales presentaron la transición sol-gel, los niveles de viscosidad alcanzados no fueron lo suficientemente elevados para la mayoría de las aplicaciones clínicas. Las propiedades mecánicas fueron insatisfactorias y los geles mostraron excesiva permeabilidad al agua y consecuentemente tiempos de residencia sumamente cortos en el sitio del implante^{114,115}. Con el objeto de sobreponerse a dichas desventajas, el grupo de Cohn ha empleado dos estrategias sintéticas alternativas: (1) la polimerización de tribloques PEO-PPO-PEO con moléculas bifuncionales como hexametildisocianato (HDI)^{116,117} y (2) la polimerización de precursores de polietilenglicol (PEG) y polipropilenglicol (PPG) de distintos pesos moleculares utilizando agentes acoplantes como fosgeno y cloruros de diacilo^{116,118,119}. Los materiales desarrollados mostraron propiedades muy superiores a los comerciales: mayor performance reológica y mayor estabilidad y tiempo de residencia en medios acuosos. Por otro lado, la concentración mínima requerida para obtener sistemas que desplieguen la transición se redujo de 15 a 5-7% (esto en el caso de Pluronic F127)¹¹⁶. Finalmente, mientras matrices de Pluronic F127 30% liberaron principios activos dentro de los 2-7 días, derivados de mayor peso molecular (con grado de polimerización 4) mostraron una cinética bimodal y la liberación se prolongó por hasta 40 días¹¹⁶.

Otros biomateriales relacionados pero que fueron menos estudiados incluyen derivados donde el bloque hidrofóbico de PPO fue reemplazado por poli(óxido de butileno) (PBO), poli(óxido de feniletileno) (PS) y poli(óxido de fenilglicidilo) (PG)^{77,120-124}. Un parámetro que debe ser considerado en el diseño de los mismos es la hidrofobicidad del nuevo bloque hidrofóbico incorporado respecto del PPO. Por ejemplo, en el caso específico de PBO una relación PEO/PBO 4 veces mayor es necesaria para alcanzar niveles de solubilización y gelación comparables a materiales conteniendo PPO⁷⁷.

of precursors of polyethyleneglycol (PEG) and polypropyleneglycol (PPG) of different molecular weights, using coupling agents such as phosgene and diacyl chlorides^{116,118,119}. The resulting materials displayed much better property attributes than the commercially available equivalents, with better rheological performance, greater stability and longer residence times in aqueous media. On the other hand, minimal concentrations required for gelation were reduced from about 15 to 5-7% (in the case of Pluronic F127)¹¹⁶. Finally, while Pluronic F127 30% matrices released active agents within 2-7 days, derivatives of greater molecular weight (with a degree of polymerisation 4) displayed a bimodal profile, with release being sustained for up to 40 days¹¹⁶.

Other related but less studied biomaterials include derivatives where the PPO hydrophobic block was replaced by poly(butylene oxide) (PBO), poly(phenylene oxide) (PS) and poly(phenylglycidyl oxide) (PG)^{77,120-124}. One of the parameters that should be taken into account in the design of these is the hydrophobicity of the newly incorporated hydrophobic block with respect to PPO. For example, in the specific case of PBO, a four times greater ratio of PEO/PBO is required to obtain solubilisation and gelation, in comparison with materials containing PPO⁷⁷.

Segmented copolymers type PEO-PLA and PEO-PCL-based

One of the disadvantages of commercial PEO-PPO polymers is the non-degradability of the polyether chain in the biological medium. On the basis of this assumption, alternating molecules of PEG and degradable hydrophobic blocks were designed. Kim et al. for example, described the synthesis of triblocks with a general PEO-polyester-PEO structure^{69,70,79-81}. This material was used as drug delivery system and as matrix for cell culture.

Others

Armes and collaborators developed thermosensitive materials with less conventional molecular architectures and compositions^{125,126}. Examples of such are the segmented copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate, 2-(diethylamino)ethyl methacrylate, a methacrylate of monomethoxylated poly(propylene oxide)¹²⁵ and

Copolímeros segmentados del tipo PEO-PLA y PEO-PCL-based

Una de las desventajas presentada por los polímeros comerciales de PEO y PPO es la no degradabilidad de la cadena polietérica en el medio biológico. Siguiendo el mismo concepto, se diseñaron moléculas alternando PEG y bloques hidrofóbicos degradables. Por ejemplo, Kim et al. describieron la síntesis de triblocks con estructura general PEO-poliéster-PEO^{69,70,79-81}. Los materiales fueron aplicadas para la liberación de fármacos y como matrices para el cultivo celular.

Otros

Armes y colaboradores desarrollaron materiales termosensibles con arquitecturas y composiciones moleculares menos convencionales^{125,126}. Entre ellos, copolímeros segmentados de 2-(dimetilamino)etil metacrilato, 2-(dietilamino)etil metacrilato, un metacrilato de poli(óxido de propileno) monometoxilado¹²⁵ y otros materiales con estructura estrellada¹²⁶ que forman geles por calentamiento a la temperatura corporal. Otros trabajos llevados a cabo por el mismo grupo de investigadores y que vale la pena ser mencionados comprenden copolímeros segmentados lineales del tipo ABA (poliNiPAAm-poli(2-metacrililoiloxietil fosforilcolina)-poliNiPAAm)¹²⁷ y ABC (poliNiPAAm-poli(2-metacrililoiloxietil fosforilcolina)-PPO)¹²⁸. También Lin y Cheng diseñaron geles RTG combinando PEG y NiPAAm con diferentes estructuras moleculares, lineales y estrellados¹²⁹.

Matrices pH-dependientes

Los polímeros pH-sensibles presentan grupos laterales ácidos (p.e. carboxílico o sulfónico) o básicos (p.e. amina) a lo largo de la cadena polimérica que se ionizan o no, dependiendo del pH del medio⁷⁴. Por ejemplo, matrices de los ácidos polimetacrílico (PMAA) y poliacrílico (PAA) colapsan o se expanden dependiendo de la acidez del medio⁷⁴. Hoffman y colegas describieron la utilización de ácido polipropilacrílico para la liberación intracelular *in vivo*⁹⁸. Más recientemente, Lewis et al desarrollaron copolímeros segmentados del tipo ABA a base de 2-(diisopropilamino)-etil metacrilato) o 2-

other materials with a star-branched structure¹²⁶ which form gels after heating to body temperature. Additional work carried out by the same group of investigators and worth to be mentioned is the design of linear block copolymers with the structure ABA (polyNiPAAm-poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)- polyNiPAAm)¹²⁷ and ABC (polyNiPAAm-poly (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-PPO)¹²⁸. Similarly, Lin and Cheng designed RTG gels, combining PEG and NiPPAAm with different linear and star-branched molecular structures¹²⁹.

pH-responsive matrices

pH-sensitive polymers present lateral acid groups (e.g. Carboxylic or sulphonic acids) or basic groups (e.g. Amine) along the polymeric chain, which either ionise or not, depending on the pH of the medium⁷⁴. For example, matrices of polymethacrylic (PMAA) and polyacrylic (PAA) acids either collapse or expand depending on the acidity of the medium⁷⁴. Hoffman and colleagues described the use of polypropylacrylic acid for *in vivo* intracellular release⁹⁸ and more recently, Lewis et al developed ABA type segmented copolymers of 2-(diisopropylamine)-ethyl methacrylate) or 2-(diethylamine)-ethyl methacrylate) as segment A and 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine as block B¹³⁰. Other polymers manifesting a similar behaviour, but based on dextrans with lateral segments of acrylate, were published by Liu and Fan¹³¹. Bae et al. synthesized pH-dependent polymers containing sulphonamide groups through the copolymerization of 4-amino-N-[4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl]-benzensulphonamide with N,N-dimethylacrylamide¹³². Williams developed synthetic pH-dependent proteins and studied them using atomic absorption microscopy¹³³. Finally, Ishiara and colleagues developed pH-sensitive phospholipids¹³⁴.

Dual behaviour matrices

In recent years there has been an attempt to sophisticate the existing systems to adjust properties to more specific applications by developing materials that display dual behaviour patterns with response mechanisms to more than one stimulus. Peppas and collaborators developed polymers of

(dietilamino)-etil metacrilato) como segmento A y 2-metacrililoiloxietil fosforilcolina como bloque B¹³⁰. Otros polímeros con similar comportamiento pero a base de dextrinas con segmentos laterales de acrilatos fueron publicados por Liu y Fan¹³¹. Bae y colaboradores sintetizaron polímeros pH-dependientes conteniendo grupos sulfonamida a través de la copolimerización de 4-amino-N-[4,6-dimetil-2-pirimidinil]-bencensulfonamida con N,N-dimetilacrilamida¹³². Williams desarrollo proteínas sintéticas pH-dependientes y las estudio por microscopía de absorción atómica¹³³. Finalmente, Ishiara y colegas desarrollaron fosfolípidos pH-sensibles¹³⁴.

Matrices de comportamiento dual

Con el objeto de sofisticar los sistemas existentes y ajustar las propiedades a aplicaciones más específicas, en los últimos años se han diseñado materiales que despliegan un comportamiento dual, siendo sensibles a más de un estímulo. Peppas y colaboradores desarrollaron polímeros a base de poli(acrilamida-ácido) poli(acrílico) que mostraron sensibilidad tanto a la temperatura como al pH⁷⁵. Otros materiales que muestran un comportamiento similar son polietilpirrolidina-polimetacrilato¹³⁵, Pluronic-polimetilmetacrilato¹³⁶, poliNiPAAm-alginato¹³⁷ y poliglutamina N-subsituída¹³⁷. Un trabajo reciente por Hubble y colaboradores describe el desarrollo de un material que responde a cambios de pH y fuerza iónica¹³⁸.

Otros mecanismos

Sistemas no-Newtonianos

Materiales no-newtonianos son aquellos que demuestran un comportamiento dependiente de la fuerza de giro (shear stress) aplicada. Existen dos fenómenos posibles. El primero se denomina *shear thinning* y se caracteriza porque a mayor fuerza aplicada, mayor el descenso de viscosidad observado. Así, para una fuerza aplicada constante se alcanza un valor de viscosidad determinado. El segundo mecanismo es la tixotropía. Los materiales tixotrópicos despliegan una caída de la viscosidad con el tiempo cuando una fuerza fija es aplicada. Estos procesos son reversibles. En ambos casos, las matrices se pueden licuar por

polyacrylamide- polyacrylic acid which displayed sensitivity to both temperature and pH⁷⁵. Other materials that showed similar behaviour were polyethylpyrrolidin-polymethacrylate¹³⁵, Pluronic-polymethylmethacrylate¹³⁶, polyNiPAAm-alginate¹³⁷ and N-substituted polyglutamine¹³⁷. Recent research by Hubble and co-workers describes the development of a material that is responsive to pH changes and ionic strength¹³⁸.

Other mechanisms

Non-Newtonian systems

Non-newtonian systems are those showing a shear stress-dependent behaviour. Two possible shears-stress dependent phenomena can be described. The first is known as shear thinning, in which increasing applied force, results in decreasing viscosity. As a consequence, a determined viscosity value may be obtained from the application of a determined constant force. The second mechanism is known a thixotropy. Thixotropic materials display a decrease in viscosity over time when a constant force is applied. These processes are reversible. In both cases, the matrices can be liquified through shaking before injection, but once at the implant site will recover their previous initial consistency. Yu and collaborators have developed decapeptides showing force-dependent properties¹³⁹. Shoichet and her group designed mixtures of hyaluronic acid and methylcellulose in order to perform localized delivery in damaged spinal cord¹⁴⁰. Owen and colleagues reported on the use of polyacrylic acid and carboxymethylcellulose in local contraceptive treatment preparations¹⁴¹. Becker and Kipke developed systems of calcium alginate with a similar response, for endovascular embolisation¹⁴². Finally, Barbucci et al have recently described a study on mixtures of hyaluronate and alginate displaying thixotropic behaviour¹⁴³.

Steric or stereo complexes

Stereo-complexes are formed by polymers with complimentary stereoregular structures, which through interaction, generate a new compound which displays different properties from those displayed by the original components. Experimental results have suggested that the forces

agitación previa a la inyección y una vez en el sitio del implante recobrarán la consistencia inicial. Yu y colaboradores han desarrollado decapeptidos con propiedades fuerza-dependientes¹³⁹. Shoichet y su grupo diseñaron mezclas de ácido hialurónico y metilcelulosa para la liberación localizada en espina dorsal dañada¹⁴⁰. Owen y colegas reportó el uso de ácido poliacrílico y carboximetilcelulosa para el tratamiento contraceptivo local¹⁴¹. Becker y Kipke desarrollaron sistemas a base de alginato de calcio con una respuesta similar, para embolización endovascular¹⁴². Finalmente, Barbucci et al describieron recientemente un estudio sobre mezclas de hialuronato y alginato que despliegan comportamiento tixotrópico¹⁴³.

Complejos estéricos o estereo-complejos

Los estereo-complejos son formados por polímeros con estructura estereoregular complementaria que generan por interacción un nuevo compuesto que muestra propiedades diferentes de las de los constituyentes originales. Resultados experimentales han sugerido que las fuerzas involucradas en la formación del complejo son fuerzas de van der Waals¹⁴⁴. Dentro de los pocos trabajos de investigación que utilizan esta metodología para la producción de sistemas inyectables cabe mencionar los realizados por Slager y Domb para la liberación de leuprolida^{145,146} y de Bos y colaboradores que diseñaron matrices de liberación a base de dextrano y cadenas cortas de ácido poliláctico^{147,148}.

Órganogeles

Los órganogeles están compuestos por lípidos anfifílicos insolubles en agua que se hinchan en contacto con ella para formar diferentes tipos de cristales líquidos liotrópicos. Los lípidos evaluados hasta hoy para liberación controlada han sido principalmente ésteres de glicerol de ácidos grasos que son ceras a temperatura ambiente. Los mismos forman cristales líquidos de fase cúbica luego de ser inyectados en un medio acuoso viscoso¹⁴⁹⁻¹⁵². Leroux y su grupo desarrollaron sistemas a base de alanina para la formación *in situ* de implantes para la liberación parenteral de drogas a lo largo de períodos prolongados¹⁵³. Shikanov and Domb describieron la síntesis de un copolímero segmentado del tipo poliácido sebácico-poliácido ricinoleico que forma geles

involucrados en la formación del complejo de un carácter de Van der Waals¹⁴⁴. Little research work has been carried out to produce injectable systems using this methodology. However, work carried out by Slager and Domb, who produced a delivery system for leuprolid^{145,146} and Bos and collaborators, who designed delivery matrices from dextrane and short chain polylactic acid^{147,148} are worthy of mention.

Organogels

Organogels are made up of water-insoluble amphiphilic lipids. On contact with water they swell up and form different types of lyotropic liquid crystals. The types of lipids that have been assessed in controlled drug delivery until the present are mainly fatty acid glycerol esters, which adopt waxy consistency at room temperature, forming cubic phase liquid crystals after injection in viscous aqueous medium¹⁴⁹⁻¹⁵². Leroux and his group developed alanin based systems for *in situ* implants for parenteral drug delivery over prolonged periods of time¹⁵³. Shikanov and Domb described the synthesis of a poly(sebacic acid-co- ricinoleic acid) type segmented copolymer to form stable gels at 37°C¹⁵⁴. The main consideration in the production of these gels was the purity and stability of the oils.

COMBINED STRATEGIES

In this final section we discuss the combination of two groups of the previously mentioned materials for the production of injectables: (1) those presenting RTG behaviour, as a means to preventing reabsorption of the implant immediately after insertion, through a pronounced increase in viscosity and (2) those presenting covalent cross-linking behaviour in order to obtain robust mechanical properties and greater structural stability. The use of such a combination permits injection in liquid form with gelling at 37°C to form a semi-solid gel, which can finally be stabilised through covalent cross-linking. Sosnik et al. modified Pluronic F127 molecules with different reactive functional groups, which permitted cross-linking under physiological temperature conditions¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. The first modification comprised the incorporation of methacrylate groups, which were subsequently polymerised through free radical

estables a 37°C¹⁵⁴. La pureza y la estabilidad de los aceites fueron el parámetro principal a considerar en su producción.

ESTRATEGIAS COMBINADAS

En esta última sección se introducirán sistemas inyectables que combinan las propiedades de dos grupos de materiales anteriormente descriptos: (1) comportamiento RTG, con el objeto de prevenir la reabsorción del implante inmediatamente después de la inserción, esto mediante el aumento pronunciado de la viscosidad y (2) entrecruzamiento covalente para obtener propiedades mecánicas robustas y mayor estabilidad estructural. Así, el implante puede ser insertado en forma líquida, gelar a 37°C para formar un gel semi-sólido y finalmente ser estabilizado por entrecruzamiento covalente. Sosnik et al. modificaron moléculas de Pluronic F127 con diferentes grupos funcionales reactivos que permitieron el entrecruzamiento en condiciones fisiológicas de temperatura¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. La primera modificación comprendió la incorporación de grupos metacrilato que fueron posteriormente polimerizados mediante reacciones de radicales libres iniciadas por iniciadores químicos y fotoquímicos^{155,156}. Antes de la polimerización, el derivado metacrilado mostró perfiles de viscosidad *versus* temperatura similares al producto no modificado. Luego, un rápido entrecruzamiento permitió alcanzar propiedades mecánicas muy superiores. Mientras que el gel no entrecruzado mostró un módulo de compresión de 142,5 kPa, el hidrogel superó los 415 kPa¹⁵⁵. La segunda modificación realizada utilizó la tecnología sol-gel¹⁵⁷. Así, se introdujeron grupos etoxisilano en los extremos de la molécula de Pluronic. En una primera etapa, la reacción de hidrólisis resultó en la generación de grupos silanol. Posteriormente, estos grupos condensaron gradualmente para formar uniones siloxano estables y dar lugar a una red tridimensional con altas propiedades mecánicas. Estas matrices permitieron extender el tiempo de liberación de una molécula modelo de 2 a 15 días.

reactions initiated by chemical and photochemical initiators^{155,156}. Prior to polymerisation, the methacrylate derivative displayed viscosity versus temperature profiles that were similar to the unmodified product. Rapid posterior cross-linking permitted much higher mechanical properties to be obtained. While the non-crosslinked gel presented a compression module of 142.5 kPa, that of the hydrogel exceeded 415 kPa¹⁵⁵. The second modification was carried out using sol-gel technology¹⁵⁷, in which ethoxysilane groups were introduced into the extremes of the Pluronic molecule. During the first stage, the reaction brought about the generation of silanol groups, which subsequently condensed gradually to form stable siloxane bonds, giving rise to a tridimensional network with high mechanical properties. These matrices allowed delivery of a model drug to be extended from 2 to 15 days.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

This review has discussed the different strategies that have been developed over almost 20 years in the development of implants generated at the insertion site. The marked increase in the number of research papers dealing with this topic over recent years highlights the great potential of this field. During this initial development stage, new methodologies have been established, the range of available materials has been widened and the most versatile alternatives have been identified. To the present, research has been mainly focussed on efforts to prove the basic concepts and applicability of this technology. However, current perspectives in the field of biomaterials in general, and injectable materials in particular, suggests that future work may be directed towards the solution of specific problems associated with particular applications, rather than the search for applications which substantiate new methodologies.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El presente trabajo de revisión ha introducido las distintas estrategias desarrolladas a lo largo de los últimos casi 20 años para el desarrollo de implantes en el sitio de inserción. En los últimos años, el número de trabajos científicos en este tópico ha mostrado un singular y pronunciado aumento que resalta el potencial de los mismos. Durante esta etapa de gestación y crecimiento inicial se han diseñado nuevas metodologías, se ha ampliado el espectro de materiales disponibles y se han substanciado aquellas alternativas más versátiles. Los trabajos de investigación han concentrado fundamentalmente sus esfuerzos en probar el concepto básico y la aplicabilidad de las mismas. Sin embargo, las perspectivas actuales del área de los biomateriales en general y de los materiales inyectables en particular, sugieren que a diferencia de la etapa previa, en el futuro los trabajos estarán orientados a la resolución de problemas específicos dentro de aplicaciones particulares más que a la búsqueda de aplicaciones que substancien nuevas metodologías.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Sosnik A. Novel Biodegradable Polymers for Non-Invasive Surgery. PhD Thesis, The Hebrew University of Jerusalem, 2003.
2. Gamisans F, Lacoulonche F, Chauvet A, Espina M, García ML, et al. Flurbiprofen-loaded nanospheres: Analysis of the matrix structure by thermal methods. *Int J Pharm* 1999; 79: 37-48.
3. Igartua M, Hernandez RM, Esquisabel A, Gascón AR, Calvo MB, Pedraz JL. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. *J Control Rel* 1998; 56: 63-73.
4. Brannon-Peppas L. Controlled release of β -estradiol from biodegradable microparticles within silicone matrix; In: *Polymer Biomaterials in Solution, as Interfaces and as Solids*. 1st ed. Utrech (The Netherlands): VSP-Utrecht; 1995.
5. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Prog Polym Sci* 2000; 25: 1171-1210.
6. Nivasu VM, Reddy TT, Tammishetti S. Functional polymer microspheres. *Biomaterials* 2004; 24: 3283-3291.
7. Oh SH, Kim JK, Song KS, Noh SM, Ghil SH, Yuk SH, Lee JH. Prevention of postsurgical tissue adhesion by anti-inflammatory drug-loaded Pluronic mixtures with sol-gel transition behavior. *J Biomed Mater Res Part A* 2005; 72: 306-316.
8. Homicz MR, Watson D. Review of Injectable Materials for Soft Tissue Augmentation. *Facial Plast Surg* 2004; 20: 21-29.
9. Merkli A, Heller J, Tabatabay C, Gurny R. The use of acidic and basic excipients in the release of 5-fluorouracil and mitomycin C from a semi-solid bioerodible poly(ortho ester). *J Control Rel* 1995; 33: 415-421.
10. Weiss P, Gauthier O, Bouler J-M, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone* 1999; 25: 67S-70S.
11. Charnley J. Total hip replacement. *JAMA* 1974; 230: 1025-1028.
12. DiMaio FR. The science of bone cement: A historical review. *Orthopedics* 2002; 25: 1399-1407.
13. Kaplan EN, Falces E, Tolleth H. Clinical utilization of injectable collagen. *Ann Plast Surg* 1983; 10: 437-451.
14. Mallapragada SK, Narasimhan B. Biomaterials: Editorial. *Biomaterials* 2002; 23: 4305.
15. Scopelianos AG, Bezwada RS, Arnold SC. Injectable liquid copolymers for soft tissue repair and augmentation. US Patent 5824333, 1998.
16. Bezwada RS, Arnold SC, Shalaby SW, Williams BL. Liquid absorbable copolymers for parenteral applications. US Patent 5631015, 1997.
17. Bezwada RS. Liquid copolymers of epsilon-caprolactone and lactide. US Patent 5442033, 1995.

18. Heller J, Barr J, Ng SY, Shen H-R, Schwach-Abdellaoui K, Gurny R, et al. Development and applications of injectable poly(ortho esters) for pain control and periodontal treatment. *Biomaterials* 2002; 23: 4397-4404.
19. Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J Control Rel* 2002; 80: 9-28.
20. Walter KA, Cahan MA, Gur A, Tyler B, Hilton J, Colvin OM, et al. Interstitial taxol delivered from a biodegradable polymer implant against experimental malignant glioma. *Cancer Res* 1994; 54: 2207-2212.
21. Zhang X, Jackson JK, Wong W, Min W, Cruz T, Hunter WL, et al. Development of biodegradable polymeric paste formulations for taxol: An in vitro and in vivo study. *Int J Pharm* 1996; 137: 199-208.
22. Einmahl S, Behar-Cohen F, Tabatabay C, Savoldelli M, Hermies FD, Chauvaud D, et al. A viscous bioerodible poly(ortho ester) as a new biomaterial for intraocular application. *J Biomed Mater Res Part A* 2000; 50: 566-573.
23. Sosnik A, Cohn D, *Polymer* 2003; 44: 7033-7042.
24. Dunn RL, English JP, Cowsar DR, Vanderbilt DP. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same. US Patent 4938763, 1990.
25. Tipton AJ, Fujita SM, Frank KR, Dunn RL. A biodegradable, injectable delivery system for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pharm Res* 1991; 9: S196.
26. Dunn RL, English JP, Cowsar DR, Vanderbilt DP. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same. US Patent 5278201, 1994.
27. Dunn RL, Powers BE, Yewey GL, Fujita SM, Josephs KR, Whitman SL, et al. Sustained release of cisplatin in dogs from an injectable implant delivery system. *J Bioact Compat Polym* 1996; 11: 286-300.
28. Dunn RL, English JP, Cowsar DR, Vanderbilt DP. Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same. US Patent 5733950, 1998.
29. Dunn RL, English JP. Biodegradable polymer composition. US Patent 6528080, 2003.
30. Dunn RL, Garrett JS, Ravivarapu H, Chandrashekar BL. Polymeric delivery formulations of leuprolide with improved efficacy. US Patent 6773714, 2004.
31. Hatefi A, Amsden B. Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *J Control Rel* 2002; 80: 9-28.
32. Kost J, Eliaz R. Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins. *J Biomed Mater Res Part A* 2000; 50: 388-396.
33. Eliaz RE, Wallach D, Kost J. Delivery of soluble tumor necrosis factor receptor from in-situ forming PLGA implants: In-vivo. *Pharm Res* 2000; 17: 1546-1550.
34. Wang L, Kleiner L, Venkatraman S. Structure formation in injectable poly(lactide-co-glycolide) depots. *J Control Rel* 2003;90:345-354.
35. Wang L, Venkatraman S, Kleiner L. Drug release from injectable depots: Two different in vitro mechanisms. *J Control Rel* 2004; 99: 207-216.
36. Wang L, Venkatraman S, Gan LH, Kleiner L. Structure formation in injectable poly(lactide-co-glycolide) depots. II. Nature of the gel. *J Biomed Mater Res Part B* 2005; 72: 215-222.
37. Jordan O, Doelker E, Defabiani N, Caviezel A, Iselin C. Novel injectable urethral bulking agents for the treatment of urinary incontinence. *J Mater Sci Mater Med.* 2004; 15: 519-522.
38. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliver Rev* 2002; 43: 3-12.
39. Elisseeff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, Langer R. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc Nat Acad Sci US* 1999;96:3104-3107.
40. Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, Blunk T, R. Langer. Controlled-release of IGF-I and TGF- β 1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *J Orthop Res* 2001; 19: 1098-1104.
41. Elisseeff J, Anseth KS, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Yaremchuk M, Langer R. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999; 104: 1014-1022.
42. Kim BS, Hrkach JS, Langer R. Biodegradable photo-crosslinked poly(ether-ester) networks for lubricious coating. *Biomaterials* 2000; 21: 259-265.
43. Burdick JA, Ward M, Liang E, Young MJ, Langer R. Stimulation of neurite outgrowth by neurotrophins delivered from degradable hydrogels. *Biomaterials* 2006; 27: 452-459.
44. Piantino J, Burdick JA, Goldberg D, Langer R, Benowitz, LI. An injectable, biodegradable hydrogel for trophic factor delivery enhances axonal rewiring and improves performance after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2006; 201: 359-367.
45. Sawhney AS, Pathak CP, Hubbell JA. Bioerodible hydrogels based on photopolymerized poly(ethylene glycol)-copoly(α -hydroxy acid) diacrylate macromers. *Macromolecules* 1993; 26: 581-587.
46. Sawhney AS, Pathak CP, van Rensburg JJ, Dunn RC, Hubbell JA. Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention. *J Biomed Mater Res* 1994; 28: 831-838.
46. Hill-West JL, Chowdhury SM, Sawhney AS, Pathak CP, Dunn RC, Hubbell JA. Prevention of postoperative adhesions in the rat by in situ photopolymerization of bioresorbable hydrogel barriers. *Obst & Gynec* 1994; 83: 59-64.
47. Cruise GM, Hegre OD, Scharp DS, Hubbell JA. A sensitivity study of the key parameters in the interfacial photopolymerization of poly(ethylene glycol) diacrylate upon porcine islets. *Biotech Bioeng* 1998; 57: 655-665.
48. Halstenberg S, Panitch A, Rizzi S, Hall H, Hubbell JA. Biologically engineered protein-graft-poly(ethylene glycol) hydrogels: A cell adhesive and plasmin-degradable biosynthetic material for tissue repair. *Biomacromolecules* 2005; 3: 710-723.
49. Rizzi SC, Hubbell JA. Recombinant protein-co-PEG networks as cell-adhesive and proteolytically degradable hydrogel matrixes. Part I: Development and physicochemical characteristics. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1226-1238.

50. Jo S, Shin H, Shung A, Fisher JP, Mikos AG. Synthesis and characterization of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) macromer. *Macromolecules* 2001; 34: 2839-2844.
51. Payne RG, Yaszemski MJ, Yasko AW, Mikos AG. Development of an injectable, in situ crosslinkable, degradable polymeric carrier for osteogenic cell populations. Part 1. Encapsulation of marrow stromal osteoblasts in surface crosslinked gelatin microparticles. *Biomaterials* 2002; 23: 4359-4371.
52. Shung AK, Behravesh E, Jo S, Mikos AG. Crosslinking characteristics of and cell adhesion to an injectable poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogel using a water-soluble crosslinking system. *Tissue Eng* 2003; 9: 243-254.
53. Timmer MD, Shin H, Horch RA, Ambrose CG, Mikos AG. In vitro cytotoxicity of injectable and biodegradable poly(propylene fumarate)-based networks: Unreacted macromers, cross-linked networks, and degradation products. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1026-1033.
54. Schmedlen RH, Masters KS, West JL. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23: 4325-4332.
55. Metters AT, Anseth KS, Bowman CN. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel. *Polymer* 2000; 41: 3993-4004.
56. Anseth KS, Metters AT, Bryant SJ, Martens PJ, Elisseeff JH, Bowman CN. In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *J Control Rel* 2002; 78: 199-209.
57. Bryant SJ, Nuttelman CR, Anseth KS. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *J Biomater Sci Polym Ed* 2000; 11: 439-457.
58. Burdick JA, Anseth KS. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2002; 23: 4315-4323.
59. Li Q, Williams CG, Sun DD, Wang J, Leong K, Elisseeff JH. Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate. *J Biomed Mater Res Part A* 2004 ;68: 28-33.
60. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthesis and physicochemical characterization of end-linked poly(ethylene glycol)-co-peptide hydrogels formed by Michael-type addition. *Biomacromolecules* 2003; 4: 713-722.
61. Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Prestwich GD, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res Part A* 2004; 68: 365-375.
62. Cai S, Liu Y, Xiao ZS, Shu XZ, Prestwich GD. Injectable glycosaminoglycan hydrogels for controlled release of human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials* 2005; 26: 6054-6067.
63. Shu XZ, Liu Y, Luo Y, Roberts MC, Prestwich GD. Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels. *Biomacromolecules* 2002; 3: 1304-1311.
64. Liu Y, Shu XZ, Gray SD, Prestwich GD. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin sponge: Growth of fibrous tissue in vivo. *J Biomed Mater Res Part A* 2004; 68: 142-149.
65. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. *Biomaterials* 2005; 26: 4737-4746.
66. Brown AL, Srokowski EM, Shu XZ, Prestwich GD, Woodhouse KA. Development of a model bladder extracellular matrix combining disulfide cross-linked hyaluronan with decellularized bladder tissue. *Macromolecular Bioscience* 2006; 6: 648-657.
67. Hoffman AS, Stayton PS, Bulmus V, Chen G, Chen J, Cheung C, et al. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *J Biomed Mater Res Part A* 2000; 52: 577-586.
68. Harris JM, Introduction to biotechnical and biomedical applications of poly(ethylene glycol). 1st ed. In: *Topics in Applied Chemistry*. New York (NY):Plenum Press;1992.
69. Jeong B, Bae YH, Lee DS, Kim SW. Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 1997; 388: 860-862.
70. Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv Drug Del Rev* 2002; 54: 37-51.
71. Ruel-Gariépy E, Leroux J-C. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58: 409-426.
72. de las Heras Alarcón C, Pennadam S, Alexander C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chem Soc Rev* 2005; 3: 276-285.
73. Tanaka T. Collapse of gels and the critical end point. *Phys Rev Lett* 1978; 40: 820-823.
74. Hoffman AS. Applications of thermally reversible polymers and hydrogels in therapeutics and diagnostics. *J Control Rel* 1987; 6: 297-305.
75. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50: 27-46.
76. Krezanoski JZ. Clear, water-miscible, liquid pharmaceutical vehicles and compositions which gel at body temperature for drug delivery to mucous membranes. US Patent 4188373, 1980.
77. Alexandridis P, Hatton TA. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surf A* 1995; 96: 1-46.
78. Reeve L, The poloxamers: their chemistry and medical applications. In: *Handbook of Biodegradable Polymers*. Vol. 7. Drug Targeting and Delivery. 2nd ed. London (UK):Harwood Academic Publishers;1997.
79. Bromberg L, Ron ES. Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery. *Adv Drug Del Rev* 1998; 31: 197-221.
80. Jeong B, Choi YK, Bae YH, Zentner G, Kim SW. New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *J Control Rel* 1999; 62: 109-114.

81. Jeong B, Bae YH, Kim SW. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules* 1999; 32: 7064-7069.
82. Lee HT, Lee DS. Thermoresponsive phase transitions of PLA-block-PEO-block-PLA triblock stereo-copolymers in aqueous solution. *Macromol Res* 2002; 10: 359-364.
83. Bae SJ, Suh JM, Sohn YS, Bae YH, Kim SW, Jeong B. Thermogelling poly(caprolactone-6-ethylene glycol-b-caprolactone) aqueous solutions. *Macromolecules* 2005; 38: 5260-5265.
84. Chun Y, Mielewczyk SS, Breslauer KJ, Kohn J. Tyrosine-PEG-derived poly(ether carbonate)s as new biomaterials. Part II: Study of inverse temperature transitions. *Biomaterials* 1999; 20: 265-272.
85. Song SC, Lee SB, Jin JI, Sohn YS. New class of biodegradable thermosensitive polymers. I. Synthesis and characterization of poly(organophosphazenes) with methoxy-poly(ethylene glycol) and amino acid esters as side groups. *Macromolecules* 1999; 32: 2188-2193.
86. Lee BH, Lee YM, Sohn YS, Song SC. A thermosensitive poly(organophosphazene) gel. *Macromolecules* 2002; 35: 3876-3879.
87. Sohn YS, Kim K, Song R, Jeong B. The relationship of thermosensitive properties with structure of organophosphazenes. *Polymer* 2004; 45: 3081-3084.
88. Fisher JP, Jo S, Mikos AG, Reddi AH. Thermoreversible hydrogel scaffolds for articular cartilage engineering. *J Biomed Mater Res Part A* 2004; 71: 268-274.
89. Uraki Y, Imura T, Kishimoto T, Ubukata M. Body temperature-responsive gels derived from hydroxypropylcellulose bearing lignin. *Carbohydrate Polym* 2004; 58: 123-130.
90. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T. In vivo evaluation of poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin as an in situ-formable scaffold. *J Artif Org* 2004; 7: 181-186.
91. Chung HJ, Bae JW, Park HD, Lee JW, Park KD. Thermosensitive chitosans as novel injectable biomaterials. *Macromol Symp* 2005; 224: 275-286.
92. Chung HJ, Go DH, Bae JW, Jung IK, Lee JW, Park KD. Synthesis and characterization of Pluronic® grafted chitosan copolymer as a novel injectable biomaterial. *Curr Appl Phys* 2005; 5: 485-488.
93. Don TM, Chen HR. Synthesis and characterization of AB-crosslinked graft copolymers based on maleilated chitosan and N-isopropylacrylamide. *Carbohydrate Polym* 2005; 61: 334-347.
94. Bromberg L, Temchenko M. Self-assembly in aqueous solutions of poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide)-b-poly(vinyl alcohol). *Langmuir* 1999; 15: 8633-8639.
95. Bromberg L, Temchenko M, Hatton TA. Dually responsive microgels from polyether-modified poly(acrylic acid): Swelling and drug loading. *Langmuir* 2002; 18: 4944-4952.
96. Bromberg L, Temchenko M, Alakhov V, Hatton TA. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly(acrylic acid) hydrogels. *Int J Pharm* 2004; 282: 45-60.
97. Huang K, Lee BP, Ingram DR, Messersmith PB. Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing bioadhesive end groups. *Biomacromolecules* 2002; 3: 397-406.
98. Bulmus V, Ding Z, Long CJ, Stayton PS, Hoffman AS. Site-specific polymer- Streptavidin bioconjugate for pH-controlled binding and triggered release of biotin. *Bioconjugate Chem* 2000; 11: 78-83.
99. Meyer DE, Shin BC, Kong GA, Dewhirst MW, Chilkoti A. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia. *J Control Rel* 2001; 74: 213-224.
100. Hoffman AS, Stayton PS, Press O, Murthy N, Lackey CA, Cheung C, et al. Design of "smart" Polymers that can direct intracellular drug delivery. *Polym Adv Tech* 2002; 13: 992-999.
101. Chilkoti A, Dreher MR, Meyer DE, Raucher D. Targeted drug delivery by thermally responsive polymers. *Adv Drug Del Rev* 2002; 54: 613-630.
102. Ebara M, Yamato M, Hirose M, Aoyagi T, Kikuchi A, Sakai K, et al. Copolymerization of 2-carboxyisopropylacrylamide with N-isopropylacrylamide accelerates cell detachment from grafted surfaces by reducing temperature. *Biomacromolecules* 2003; 4: 344-349.
103. Akiyama Y, Kikuchi A, Yamato M, Okano T. Ultrathin poly(N-isopropylacrylamide) grafted layer on polystyrene surfaces for cell adhesion/detachment control. *Langmuir* 2004; 20: 5506-5511.
104. Tsuda Y, Kikuchi A, Yamato M, Nakao A, Sakurai Y, Umezumi M, et al. The use of patterned dual thermoresponsive surfaces for the collective recovery as co-cultured cell sheets. *Biomaterials* 2005; 26: 1885-1893.
105. Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, Nozaki T, et al. Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 2006; 27: 607-614.
106. Attwood D, Collett JH, O'Connor CA. The effect of gamma irradiation on the surface, rheological and micellar behaviour of the block copolymer, Tetronic 908. *Int J Pharm* 1990; 65: 201-209.
107. Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998; 9: 475-487.
108. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int J Pharm* 1999; 184: 189-198.
109. Moghimi SM, Hunter AC. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *TIBTECH* 2000; 18: 412-420.
110. Saim AB, Cao Y, Weng Y, Chang CN, Vacanti MA, Vacanti CA, Eavey RD. Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold. *Laryngoscope* 2000; 10: 1694-1697.

111. Scherlund M, Brodin A, Malmsten M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. *Int J Pharm* 2000; 211: 37-49.
112. Cellesi F, Tirelli N, Hubbell JA. A new process for cell encapsulation: Thermal gelation and chemical cross-Linking in 'tandem'. *Biomaterials* 2004; 25: 5115-5124.
113. Sosnik A, Sefton MV. Semi-synthetic collagen/poloxamine matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 7425-7435.
114. Steinleitner A, Lambert H, Kazensky C, Cantor B. Poloxamer 407 as an intraperitoneal barrier material for the prevention of postsurgical adhesion formation and reformation in rodent models for reproductive surgery. *Obst & Gynecol* 1991; 77: 48-52.
115. Esposito E, Carotta Y, Scabbia A, Trombelli L, D'Antona P, Menegatti E, Nastruzzi C. Comparative analysis of tetracycline-containing dental gels: Poloxamer- and monoglyceride-based formulations. *Int J Pharm* 1996; 142:9-23.
116. Cohn D, Sosnik A, Levy A. Improved reverse thermo-responsive polymeric systems, *Biomaterials* 2003; 24: 3707-3714.
117. Cohn D, Lando G, Sosnik A, Garty S, Levi A. Novel degradable reverse thermoresponsive multiblock copolymers, *Biomaterials* 2006; 27:1718-1727.
118. Cohn D, Sosnik A. Novel reverse thermo-responsive injectable poly(ether carbonate)s. *J Mat Sci Mater Med* 14; 175-180: 2003.
119. Sosnik A, Cohn D. Reverse thermo-responsive poly(ethylene oxide) and poly(propylene oxide) multiblock copolymers, *Biomaterials* 2005; 26: 349-357.
120. Ricardo NMPS, Honorato SB, Yang Z, Castelletto V, Hamley IW, Yuan X-F, et al. Gelation of concentrated micellar solutions of a triblock copolymer of ethylene oxide and styrene oxide, S5E4S5. *Langmuir* 2004; 20: 4272-4278.
121. Harrison WJ, Aboulgasem GJ, Elathrem FAI, Nixon SK, Attwood D, et al. Micelles and gels of mixed triblock copoly(oxyalkylene)s in aqueous solution. *Langmuir* 2005; 21: 6170-6178.
122. Ricardo NMPS, Pinho MEN, Yang Z, Attwood D, Booth C. Controlling the gelation of aqueous micellar solutions of ethylene-oxide-based block copoly(oxyalkylene)s. *Int J Pharm* 2005; 300: 22-31.
123. Taboada P, Velasquez G, Barbosa S, Castelletto V, Nixon SK, Yang Z, et al. Block copolymers of ethylene oxide and phenyl glycidyl ether: Micellization, gelation, and drug solubilization. *Langmuir* 2005; 21: 5263-5271.
124. Taboada P, Velasquez G, Barbosa S, Yang Z, Nixon SK, Zhou Z. Micellization and drug solubilization in aqueous solutions of a diblock copolymer of ethylene oxide and phenyl glycidyl ether. *Langmuir* 2006; 22: 7465-7470.
125. Li Y, Tang Y, Narain R, Lewis AL, Armes SP. Biomimetic stimulus-responsive star diblock gelators. *Langmuir* 2005; 21: 9946-9954.
126. Li Y, Narain R, Ma Y, Lewis AL, Armes SP. Biomimetic thermo-responsive star diblock gelators. *Chem Commun* 2004; 23: 2746-2747.
127. Li C, Tang Y, Armes SP, Morris CJ, Rose SF, Lloyd AW, et al. Synthesis and characterization of biocompatible thermo-responsive gelators based on ABA triblock copolymers. *Biomacromolecules* 2005; 6: 994-999.
128. Li C, Buurma NJ, Haq I, Turner C, Armes SP, Castelletto V, et al. Synthesis and characterization of biocompatible, thermoresponsive ABC and ABA triblock copolymer gelators. *Langmuir* 2005; 21: 11026-11033.
129. Lin H, Cheng Y-L. In-situ thermoreversible gelation of block and star copolymers of poly(ethylene glycol) and poly(n-isopropylacrylamide) of varying architectures. *Macromolecules* 2001; 34: 3710-3715.
130. Ma Y, Tang Y, Billingham NC, Armes SP, Lewis AL. Synthesis of biocompatible, stimuli-responsive, physical gels based on ABA triblock copolymers. *Biomacromolecules* 2003; 4: 864-868.
131. Liu Y-Y, Fan X-D. Synthesis, properties and controlled release behaviors of hydrogel networks using cyclodextrin as pendant groups. *Biomaterials* 2005; 26: 6367-6374.
132. Park SY, Bae YH. Novel pH-sensitive polymers containing sulfonamide groups. *Macromol Rapid Commun* 1999; 20: 269-273.
133. Stevens MM, Allen S, Davies MC, Roberts CJ, Sakata JK, Tendler SJB, et al. Molecular level investigations of the inter- and intramolecular interactions of pH-responsive artificial triblock proteins. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1266-1271.
134. Kimura M, Fukumoto K, Watanabe J, Takai M, Ishihara K. Spontaneously forming hydrogel from water-soluble random- and block-type phospholipid polymers. *Biomaterials* 2005; 26: 6853-6862.
135. González N, Elvira C, San Román J. Novel Dual-Stimuli-Responsive Polymers Derived from Ethylpyrrolidine. *Macromolecules* 2005; 38: 9298-9303.
136. Determan MD, Cox JP, Seifert S, Thiyagarajan P, Mallapragada SK. Synthesis and characterization of temperature and pH-responsive pentablock copolymers. *Polymer* 2005; 46: 6933-6946.
137. Kim JH, Lee SB, Kim SJ, Lee YM. Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels. *Polymer* 2002; 43: 7549-7558.
138. Zhang R, Tang M, Bowyer A, Eisenthal R, Hubble J. A novel pH- and ionic-strength-sensitive carboxy methyl dextran hydrogel. *Biomaterials* 2005; 26: 4677-4683.
139. Ramachandran S, Tseng Y, Yu YB. Repeated rapid shear-responsiveness of peptide hydrogels with tunable shear modulus. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1316-1321.
140. Gupta D, Tator CH, Shoichet MS. Fast-gelling injectable blend of hyaluronan and methylcellulose for intrathecal, localized delivery to the injured spinal cord. *Biomaterials* 2006; 27: 2370-2379.
141. Owen DH, Peters JJ, Lavine ML, Katz DF. Effect of temperature and pH on contraceptive gel viscosity. *Contraception* 2003; 67: 57-64.

142. Becker TA, Kipke DR. Flow properties of liquid calcium alginate polymer injected through medical microcatheters for endovascular embolization. *J Biomed Mater Res Part A* 2002; 61: 533-540.
143. Barbucci R, Leone G, Lamponi S. Thixotrophy property of hydrogels to evaluate the cell growing on the inside of the material bulk (Amber effect). *J Biomed Mater Res Part B* 2006; 76: 33-40.
144. Slager J, Domb AJ. Biopolymer stereocomplexes. *Adv Drug Del Rev* 2003; 55: 549-583.
145. Slager J, Domb AJ. Heterostereocomplexes prepared from D-PLA and L-PLA and leuprolide. II. Release of leuprolide. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1316-1320.
146. Slager J, Domb AJ. Heterostereocomplexes prepared from D-poly(lactide) and leuprolide. I. Characterization. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1308-1315.
147. Bos GW, Jacobs JLL, Koten JW, Van Tomme S, Veldhuis T, van Nostrum CF, et al. In situ crosslinked biodegradable hydrogels loaded with IL-2 are effective tools for local IL-2 therapy. *Eur J Pharm Sci* 2004; 21: 561-567.
148. Bos GW, Hennink WE, Brouwer LA, den Otter W, Veldhuis TFJ, van Nostrum CF, et al. Tissue reactions of in situ formed dextran hydrogels crosslinked by stereocomplex formation after subcutaneous implantation in rats. *Biomaterials* 2005; 26: 3901-3909.
149. Anand B, Pisal SS, Paradkar AR, Mahadik KR. Applications of organogels in pharmaceuticals. *J Sci Ind Res* 2001; 60: 311-318.
150. Shchipunov YuA. Lecithin organogelA micellar system with unique properties. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Asp* 2001; 183-185: 541-554.
151. Murdan S. Organogels in drug delivery. *Exp Op Drug Del* 2005; 2: 489-505.
152. Kumar R, Katare OP. Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review. *AAPS PharmSciTech* 2005; 6: art. no. 40.
153. Plourde F, Motulsky A, Couffin-Hoarau A-C, Hoarau D, Ong H, et al. First report on the efficacy of L-alanine-based in situ-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs. *J Control Rel* 2005; 108: 433-441.
154. Shikanov A, Domb AJ. Poly(sebacic acid-co-ricinoleic acid) biodegradable injectable in situ gelling polymer. *Biomacromolecules* 2006; 7: 288-296.
155. Sosnik A, Cohn D, San Roman J, Abraham GA. Crosslinkable PEO-PPO-PEO-based reverse thermo-responsive gels as potentially injectable materials. *J Biomater Sci Pol Ed* 2003; 14: 227-239.
156. Cohn D, Sosnik A, Garty S. Smart hydrogels for in situ-generated implants. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1168-1175.
157. Sosnik A, Cohn D. Ethoxysilane-capped PEO-PPO-PEO triblocks: a new family of reverse thermo-responsive polymers. *Biomaterials* 2004; 25: 2851-2858.