

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Odontología

Departamento de Estomatología

***BIO-NANOTECNOLOGÍA APLICADA A LA
REGENERACIÓN ÓSEA MEDIANTE EL
TRANSPORTE DE BIOMOLÉCULAS USANDO
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: ESTUDIO IN
VITRO.***



Inmaculada Ortega Oller

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Inmaculada Ortega Oller
ISBN: 978-84-1306-879-4
URI: <http://hdl.handle.net/10481/68568>

BIO-NANOTECNOLOGÍA APLICADA A LA
REGENERACIÓN ÓSEA MEDIANTE EL
TRANSPORTE DE BIOMOLÉCULAS USANDO
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS: ESTUDIO
IN VITRO

por

Inmaculada Ortega Oller
Licenciada en Odontología

Directores de la Tesis

Dr. D. José Manuel Peula
Prof. Titular de Física Aplicada

Dr. D. Francisco O´Valle Ravassa
Prof. Catedrático de Anatomía Patológica

Dr. D. Pablo Galindo Moreno
Prof. Catedrático de Estomatología

*A mi familia
y directores, y en especial
a mi PADRE,
Juan Ortega Navarro.*

Agradecimientos

Después de un apasionado y largo período de elaboración de esta tesis doctoral, hoy es el día: escribo este apartado de agradecimientos para finalizar un arduo trabajo. Ha sido un período de aprendizaje intenso, no solo en el campo científico, sino también a nivel personal, que ha supuesto un gran impacto en mí. Por tal motivo me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y brindado su apoyo durante este proceso.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores:

Don Jose Manuel Peula García, Profesor Titular de Física Aplicada, quien con sus conocimientos y apoyo me guió a través de cada una de las etapas de este proyecto para alcanzar los resultados que buscaba. Gracias por su paciencia, calma y tranquilidad para explicar detenidamente a una odontóloga todos y cada uno de los conceptos aprendidos e interiorizados. Todo mi agradecimiento por su tiempo, dedicación y por haberme acogido de la manera que lo hizo, dándome todo su cariño, apoyo y comprensión.

Don Pablo Galindo Moreno, Profesor Catedrático de Estomatología.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas y que te escogen a ti para saber llevarlas a cabo. En este caso mi más sincero agradecimiento a usted, con cuyo trabajo estaré siempre en deuda y con quien he compartido proyectos e ilusiones durante todos estos años. Gracias por su amabilidad para facilitarme su tiempo y sus ideas. Ha sido una fuente de paz en tiempos muy duros.

Don Francisco O'Valle Ravassa, Profesor Catedrático de Anatomía Patológica, por su orientación, atención a mis consultas y por sus valiosas sugerencias en momentos de duda, así como por su completa disponibilidad siempre que lo he necesitado.

También quiero agradecer a Mis Iberica S.L. y a la Consejería de Economía, Innovación, Educación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. No hubiese podido arribar a estos resultados sin su incondicional ayuda.

Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales, este es el caso del Dr. Don Miguel Padial, y de las Dras. Doña Azahara Rata-Aguilar, Doña Ana Jodar y Doña Teresa Del Castillo. Gracias por vuestra cercana visión de todo. También quería dedicar unas palabras a un buen amigo, Javier Vidao, quien con sus conocimientos informáticos me ha ayudado con la elaboración de este documento de tesis. Gracias.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros y amigos por hacer feliz mi día a día y a mi familia, por apoyarme aún cuando mis ánimos decaían. A mis hermanos, Juan Javier y Dorothy y a mi madre, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y un abrazo reconfortante para renovar energías.

Gracias a mi pareja, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me ha concedido, un tiempo robado al disfrute conjunto que ha respetado y valorado. Te agradezco la esperanza que me has brindado en los momentos y situaciones más tormentosas de mi vida.

Por último, dedico con todo mi corazón mi tesis doctoral a mi PADRE, a quien perdimos recientemente, pues sin él no habría logrado nada de esto; gracias por haberme forjado como la persona que hoy soy.

Muchos de mis logros se los debo a él, quien me educó con firmeza, pero a la vez sabiendo darme la libertad suficiente para permitirme evolucionar por mi misma como persona, motivandome constantemente a alcanzar mis metas. Fue mi referente en la vida y quien me dió el último y más grande de los aprendizajes, dejando en mí un gran espíritu de lucha, sacrificio, esfuerzo y sabiduría ante la más difícil situación planteable. Por todo ello, este trabajo te lo dedico a ti, allí donde estés espero que seas feliz y puedas disfrutar de los logros conseguidos aquí.

A todos, muchas gracias.

RESUMEN

REGENERACIÓN ÓSEA A PARTIR DE NANO/MICROPARTICULAS DE PLGA CARGADAS DE BMP-2.

El ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) es uno de los polímeros sintéticos más ampliamente utilizados para el desarrollo de sistemas de administración de fármacos y biomoléculas terapéuticas así como componente principal en aplicaciones de ingeniería de tejidos. Sus propiedades y versatilidad le permiten ser un polímero de referencia en la fabricación de nanopartículas y micropartículas para encapsular y liberar una amplia variedad de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. Además, sus propiedades de biodegradabilidad y biocompatibilidad hacen del mismo un candidato idóneo para encapsular biomoléculas como proteínas o ácidos nucleicos permitiendo su liberación de forma controlada.

Este trabajo se centra en el uso de nanopartículas (NP) de PLGA como un sistema de entrega de uno de los factores de crecimiento más comúnmente utilizados en la ingeniería del tejido óseo, la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2). Por lo tanto, examinamos todos los requisitos necesarios para alcanzar una correcta encapsulación y una liberación controlada y sostenida de BMP2 utilizando partículas de PLGA como componente principal, discutiendo todos los problemas y soluciones que hemos encontrado para el desarrollo adecuado de este sistema con un gran potencial en el proceso de diferenciación celular y proliferación bajo el punto de vista de la regeneración ósea.

Hemos desarrollado y optimizando dos métodos de formulación diferentes para obtener NP de PLGA cargadas con una proteína modelo con actividad enzimática como la lisozima que posee características similares a la BMP2. Estas formulaciones se basan en una técnica de doble emulsión con evaporación de solvente (agua / aceite / agua, W/O/W). Se diferencian principalmente en la fase en la que se agrega el surfactante (Pluronic® F68): agua (W-F68) o

aceite (O-F68). Este surfactante polimérico no iónico puede modular una serie de propiedades del nanosistema transportador en el que se integra, reduciendo el tamaño de las NPs, incrementando su estabilidad coloidal y facilitando la protección de la biomolécula encapsulada. Además, gracias a su disposición superficial y la hidrofiliidad de sus colas polares se reduce la interacción con el sistema fagocítico mononuclear con una mejora de la biodistribución al aumentar su tiempo de circulación después de una administración intravenosa en un organismo vivo.

Analizamos las propiedades coloidales de estos sistemas usando diferentes técnicas experimentales: (morfología por SEM y STEM, tamaño hidrodinámico por DLS y NTA, movilidad electroforética, estabilidad temporal en diferentes medios); así como la encapsulación, patrón de liberación y bioactividad de la lisozima. Asimismo, realizamos una caracterización interfacial de la interacción surfactante-proteína en la primera emulsión agua-aceite para cada procedimiento de formulación mediante el análisis de la tensión superficial y la elasticidad. Finalmente, examinamos la captación celular por células estromales mesenquimáticas humanas y la citotoxicidad para ambos nanosistemas.

Mediante las dos formulaciones, O-F68 y W-F68, se obtienen NPs sólidas de morfología esférica si bien en un caso, el sistema presenta monodispersidad con diámetros alrededor de 120 nm (O-F68), en el otro se obtiene un nanosistema polidisperso con diámetros de partícula comprendidos entre 100 y 500 nm. (W-F68). Como resultado más relevante observamos que la eficacia de encapsulación, la liberación y la bioactividad de la lisozima se han mantenido mejor con el método de formulación W-F68. En este caso, dada la heterogeneidad de tamaños, se podría hablar de un prometedor sistema multimodal para encapsular proteínas con una fuerte actividad biológica que permita una “entrega dual” a nivel extra- e intracelular facilitando la actividad proteica en la superficie celular y en el citoplasma.

Tras desarrollar y optimizar el método de síntesis para las NPs de PLGA cargadas de lisozima, tratamos de adaptar la formulación para conseguir la encapsulación de la proteína terapéutica BMP-2. Así, basándonos en los resultados obtenidos con la lisozima, se ha optado por usar el

procedimiento de síntesis W-F68 para favorecer la protección de las moléculas proteicas y su actividad biológica. Con esta formulación se han obtenido, con buena reproducibilidad, NPs esféricas con el tamaño multimodal referido anteriormente, entre 100 y 500 nm, que posibilitarán el suministro extra- e intracelular. Además de NPs con BMP2 encapsulada obtenemos un nanosistema en el que la BMP2 no está encapsulada sino co-adsorbida superficialmente junto a una proteína estabilizadora como la albúmina de suero bovino. De nuevo, se lleva a cabo una completa caracterización fisico-química y biológica de ambos sistemas de NPs analizando las propiedades indicadas previamente, esto es: morfología y tamaño, carga superficial, estabilidad coloidal y temporal, encapsulación y patrón de liberación. Es conocido que la cinética de liberación en los sistemas poliméricos basados en PLGA dependen en gran medida de la degradación hidrolítica del polímero. Sin embargo, la liberación a tiempos cortos está influenciada por otros procesos físicos y es crucial evitar una descarga inicial excesiva sobre todo si se quiere optimizar la aplicación de esta nanotecnología en procesos de regeneración ósea muy importantes en odontología. En consecuencia hemos incidido en el análisis del patrón de liberación de la BMP2 a tiempos cortos utilizando diferentes técnicas y comparando el comportamiento de los dos sistemas de NPs con la proteína encapsulada o adsorbida superficialmente.

Finalmente, se ha analizado la actividad biológica de las NPs cargadas con BMP2 mediante estudios *in vitro* de proliferación celular, migración y diferenciación osteogénica usando para ello células estromales mesenquimales obtenidas a partir de hueso alveolar humano (ABSC). En base a todo esto, se puede confirmar que las NPs con BMP2 encapsuladas presentan un patrón de liberación adecuado a corto plazo, manteniendo un suministro proteico sostenido y una actividad biológica adecuada para dosis iniciales de BMP2 muy reducidas.

SUMMARY

BONE REGENERATION FROM PLGA NANO/MICROPARTICLES LOADED WITH BMP-2.

Poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) is one of the most widely used synthetic polymers for the development of drug delivery systems and therapeutic biomolecules and as a component of tissue engineering applications. Its properties and versatility allow it to be a reference polymer in the manufacture of nanoparticles and microparticles to encapsulate and release a wide variety of hydrophobic and hydrophilic molecules. Furthermore, its biodegradability and biocompatibility properties make it an ideal candidate for encapsulating biomolecules such as proteins or nucleic acids that can be released in a controlled manner. This work focuses on the use of PLGA nanoparticles (NP) as a delivery system for one of the most commonly used growth factors in bone tissue engineering, bone morphogenetic protein 2 (BMP2). Therefore, we examine all the necessary requirements to achieve a correct encapsulation and a controlled and sustained release of BMP2 using PLGA particles as the main component, discussing all the problems and solutions that we have found for the proper development of this system with great potential. In the process of cell differentiation and proliferation from the point of view of bone regeneration. We have developed and optimized two different formulation methods to obtain PLGA NP loaded with a model protein with enzymatic activity such as lysozyme with similar characteristics to BMP2. These formulations are based on a double emulsion technique with solvent evaporation (water/oil/water, W/O/W). They differ mainly in the phase in which the surfactant (Pluronic® F68) is added: water (W-F68) or oil (O-F68). This non-ionic polymeric surfactant can modulate a series of properties of the transporter nanosystem in which it is integrated, reducing the size of the NPs, increasing their colloidal stability and facilitating the protection of the encapsulated biomolecule. Furthermore, thanks to its superficial arrangement and the hydrophilicity of its polar

tails, interaction with the mononuclear phagocytic system is reduced with an improvement in biodistribution by increasing its circulation time after intravenous administration in a living organism. The colloidal properties of these systems have been analyzed using different experimental techniques: (morphology by SEM and STEM, hydrodynamic size by DLS and NTA, electrophoretic mobility, temporal stability in different media; as well as the encapsulation, release pattern and bioactivity of the lysozyme. Likewise, an interfacial characterization of the surfactant-protein interaction was carried out in the first water-oil emulsion for each formulation procedure by analyzing the surface tension and elasticity. Finally, we analyzed the cellular uptake by human mesenchymal stromal cells and cytotoxicity for both nanosystems. Through the two formulations, O-F68 and W-F68, solid NPs of spherical morphology are obtained, although in one case, the system presents monodispersity with diameters around 120 nm (O-F68), while in the other a Polydisperse nanosystem with particle diameters between 100 and 500 nm. (W-F68). As a more relevant result, we observed that the encapsulation efficiency, the release and the bioactivity of lysozyme have been better maintained with the W-F68 formulation method. In this case, given the heterogeneity of sizes, one could speak of a promising multimodal system to encapsulate proteins with strong biological activity that allows a "dual delivery" at the extra- and intracellular level, facilitating protein activity on the cell surface and in the cytoplasm. After developing and optimizing the synthesis method for lysozyme-loaded PLGA NPs, we tried to adapt the formulation to achieve encapsulation of the therapeutic protein BMP-2. Thus, based on the results obtained with lysozyme, it was decided to use the W-F68 synthesis procedure to favor the protection of protein molecules and their biological activity. With this formulation, spherical NPs with the aforementioned multimodal size, between 100 and 500 nm, have been obtained with good reproducibility, which would allow extra- and intracellular delivery. In addition to NPs with encapsulated BMP2, a nanosystem has been obtained in which BMP2 is not encapsulated but is superficially co-adsorbed with a stabilizing protein such as bovine serum albumin. Again, a complete physico-chemical and biological characterization of both NPs systems is carried out,

analyzing the previously indicated properties, that is: morphology and size, surface charge, colloidal and temporal stability, encapsulation and release pattern.

It is known that release kinetics in PLGA-based polymer systems are highly dependent on the hydrolytic degradation of the polymer. However, the short-time release is influenced by other physical processes and it is crucial to avoid an excessive initial discharge, especially if the application of this nanotechnology is to be optimized in very important bone regeneration processes in dentistry. Consequently, we have focused on the analysis of the release pattern of BMP2 at short times using different techniques and comparing the behavior of the two NPs systems with the encapsulated or superficially adsorbed protein. Finally, the biological activity of NPs loaded with BMP2 has been analyzed by in vitro studies of cell proliferation, migration and osteogenic differentiation using mesenchymal stromal cells obtained from human alveolar bone (ABSC). Based on all this, it can be confirmed that NPs with encapsulated BMP2 present an adequate release pattern in the short term, maintaining a sustained protein supply and adequate biological activity for very low initial doses of BMP2.

LISTA DE PUBLICACIONES

1. Ortega-Oller, I.; Padial-Molina, M.; Galindo-Moreno, P.; O'Valle, F.; Jódar-Reyes, A. B.; Peula-García, J. M. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *Biomed Res. Int.* **2015**, vol. 2015, 1–18. doi:10.1155/2015/415289. IF: Q2, Rank: 82/161, JIFpercentil: 49,4. N° de citas: 33
2. Ortega-Oller, I.; del Castillo-Santaella, T.; Padial-Molina, M.; Galindo-Moreno, P.; Jódar-Reyes, A. B.; Peula-García, J. M. Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, characterization, and in vitro release. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, 159, 586–595. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.027. IF: Q1, Rank:12/72, JIF percentil: 82,6. N°citas: 5.
3. del Castillo-Santaella, T.; Ortega-Oller, I.; Padial-Molina, M.; O'Valle, F.; Galindo-Moreno, P.; Jódar-Reyes, A. B.; Peula-García, J. M. Formulation, Colloidal Characterization, and In Vitro Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration. *Pharmaceutics* **2019**, 11(8), 388. doi:10.3390/pharmaceutics11080388.; IF: Q1, Rank:26/267, JIFpercentil: 90,5. N°citas: 3.

Índice

0. GLOSARIO (lista de abreviaturas)	19
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 BMPs: ACCIÓN Y REGULACIÓN	24
1.1.1 <i>Uso clínico de la BMP-2</i>	27
1.2 PARTÍCULAS COLOIDALES POLIMÉRICAS PARA ENCAPSULAR MOLÉCULAS HIDROFÍLICAS	30
1.2.1 <i>Métodos de síntesis</i>	33
1.2.3 <i>Tamaño y morfología de las partículas</i>	35
1.3AGENTES ESTABILIZADORES	39
1.3.1 <i>Estabilidad coloidal</i>	39
1.3.2 <i>Eficacia de encapsulación y bioactividad</i>	42
1.4. PATRÓN DE LIBERACIÓN	44
1.5. VECTORIZACIÓN: ENTREGA DIRIGIDA	52
1.6. INGENIERÍA TISULAR: SOPORTES 3D O “SCAFFOLDS”	53
2. HIPÓTESIS	55
3. OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL:.....	56
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS:	56
4. NANOSISTEMA DE ENTREGA DOBLE PARA BIOMOLÉCULAS, FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y LIBERACIÓN IN VITRO	58
4.1. ANTECEDENTES.....	58
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	60
4.2.1 <i>Formulación de las nanopartículas</i>	60
4.2.2 <i>Limpieza y almacenamiento</i>	61
4.2.3 <i>Caracterización de las nanopartículas</i>	62
4.2.4 <i>Estabilidad coloidal y temporal en biología media</i>	63
4.2.5 <i>Actividad biológica e interacciones</i>	64
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65

4.3.1	Formulación de las nanopartículas.....	65
4.3.2	Caracterización de las Nanopartículas	69
4.3.3	Actividad biológica e interacciones.....	84
5.	FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN COLOIDAL Y EFECTO BIOLÓGICO IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CARGADAS CON BMP-2 PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA.....	96
5.1	ANTECEDENTES	96
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS	98
5.2.1	Síntesis de nanopartículas.....	98
5.2.2	Caracterización de nanopartículas: morfología, tamaño, concentración y movilidad electrocinética.	101
5.2.3	Estabilidad coloidal y temporal en medios biológicos	101
5.2.4	Interacciones celulares.....	102
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	105
5.3.1	Formulación de nanopartículas.....	105
5.3.2	Caracterización de nanopartículas	109
5.3.3	Actividad biológica e interacciones.....	118
6.	CONCLUSIONES	125
7.	CONFLICTO DE INTERESES.....	127
8.	RECURSOS ECONÓMICOS.....	127
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	128
10.	ANEXO MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	154
	- <i>Enlace a videos</i>	
11.	ANEXO DE PUBLICACIONES	156
	- <u>Artículo 1</u> : Bone regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles.	
	- <u>Artículo 2</u> : Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, characterization, and <i>in vitro</i> release.	

-Artículo 3: Formulation, Colloidal Characterization, and In Vitro Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration.

12. ANEXO DE ORIGINALIDAD 158

LISTA DE ABREVIACIONES

NP	Nanopartículas
MP	Micropartículas
MSC	Células mesenquimales
BMP	Proteína morfogenética ósea
Rh BMP	Proteína morfogenética ósea recombinante
BMP I y II	Proteína morfogenética ósea receptora I y II
GF	Factor de crecimiento
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
IGF	Factor de crecimiento de insulina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
RUNX2	Factor de transcripción
MPS	Sistema fagocítico mononuclear
hMSC	Células mesenquimales humanas
ABSC	Células estromales mesenquimales ósea
OSX	Osterix
LMP	Proteína de mineralización de dominio Lim
SEM	Microscopia electrónica de barrido
STEM	Microscopia electrónica de transmisión de barrido
PLA	Ácido poli-lactico
PLGA	Ácido poli-lactico co-glicolico
LYS	Lisozima
LYSF	Lisozima final (encapsulada)

F68	Pluronic (W-F68= en agua) (O-F68= en aceite)
W/O/W	Doble emulsión de agua en aceite
AP	Fase acuosa
OP	Fase orgánica
SA	Albúmina sérica
BSA	Albúmina sérica bovina
HSA	Albúmina sérica humana
PVA	Alcohol polivinílico
PBS	Tampón fosfato salino
PB	Tampón fosfato
FBS	Suero fetal bovino
PEO	Óxido de polietileno
DCM	Diclorometano
EA	Acetato de etilo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
DPPC	Dipalmitoil-fosfatidilcolina
PGE	Polietilenglicol
DC	Ácido dexosicólico
BCA	Ácido bicinconínico
DTT	Ditiotreitol
SDS	Duodecil sulfato de sodio
ALP	Fosfatasa alcalina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
SDS	Gel duodecilsulfato de sodio
PI3K	Fosfoinositida 3-quinasa
ALP	Fosfatasa alcalina

SDS-PAGE	Electroforesis en gel poliacrilamida con duodecilsulfato sódico
PDI	Índice de polidispersidad
DLS	Dispersión de luz dinámica
EE	Eficacia de encapsulación
SRB	Absorbancia de sulforamida
DL	Carga del fármaco
FDA	Administración de medicamentos y alimentos
RMN	Resonancia magnética nuclear
NTA	Análisis de seguimiento de nanopartículas
NLS	Señales de localización nuclear
DMEM	Medio Eagle modificado con dulbecco

1. INTRODUCCIÓN

La regeneración ósea es uno de los principales desafíos a los que nos enfrentamos en la clínica diariamente. Inmediatamente después de la extracción de un diente, los procesos biológicos normales remodelan el hueso alveolar limitando en algunos casos la posibilidad de una futura colocación de implante. En los últimos años han sido estudiadas diferentes estrategias para llevar a cabo la preservación de ese hueso. Otras afecciones, como el traumatismo, la cirugía de resección tumoral o las deformidades congénitas, requieren requisitos técnicos y biológicos aún mayores para generar la estructura ósea necesaria para la rehabilitación oclusal del paciente. Para superar estas limitaciones anatómicas en términos de volumen óseo, existen diferentes enfoques para mejorar la osteointegración del implante o para aumentar la anatomía del hueso donde se colocará el futuro implante (M. Padial-Molina, P. Galindo-Moreno, 2009) (Al-Nawas and Schiegnitz, 2014). El injerto óseo autógeno todavía se considera el “gold estándar” debido a sus propiedades osteogénicas, osteoconductoras y osteoinductivas (Katranchi, Fotek and Wang, 2008) (Misch, 1987). Sin embargo también presenta varias limitaciones, incluida la necesidad de una segunda cirugía, disponibilidad limitada y morbilidad en el área donante (Myeroff and Archdeacon, 2011). Por lo tanto, otros biomateriales como injertos alogénicos e injertos xenogénicos, con osteoconductividad y capacidades osteoinductivas (Avila *et al.*, 2010) (Froum *et al.*, 2006); fueron propuestos (Galindo-Moreno *et al.*, 2007) (Galindo-Moreno *et al.*, 2011) así como biomateriales aloplásticos (Wheeler, 1997), con potencial osteoconductor. Todos estos materiales, aunque aceptables, no son adecuados en muchas condiciones y generalmente requieren una consideración adicional en el proceso de decisión (Wallace and Froum, 2003). Además, la cantidad y calidad de hueso que se puede obtener con estos materiales a menudo es limitada.

El uso de moléculas bioactivas, por sí solas o en combinación con los materiales descritos previamente, se ha convertido, por lo tanto, en un área de interés principal gracias a su alto potencial. Al usar este tipo de procedimientos, es importante considerar: 1) el método de administración, y 2) la molécula por sí misma. Las moléculas bioactivas pueden transportarse al

área del defecto como una solución o un gel, incrustados en esponjas, adheridos a *scaffolds* sólidos y, más recientemente, incluidos en partículas de diferentes tamaños. Usando estos métodos se puede acudir a una gran diversidad de biomoléculas, como, PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF (factor de crecimiento de fibroblastos), IGF (factor de crecimiento de insulina), RUNX2, osterix (Osx), proteína de mineralización de dominio LIM (LMP), BMP (proteína morfogénica ósea) y, más recientemente, periostin como candidatos potenciales para los procedimientos de regeneración dentro de la cavidad oral, incluidos los tejidos óseos y periodontales (Padial-Molina and Rios, 2014) (Padial-Molina, Volk and Rios, 2014). Estas moléculas se probaron solas o en combinación con células madre (Behnia *et al.*, 2012) utilizando varias estrategias in vitro e in vivo (Padial-Molina *et al.*, 2012) .

1.1 BMPs: Acción y regulación

En regeneración ósea, y en particular, los factores de crecimiento morfogenéticos óseos (BMP) son probablemente el grupo de moléculas más común. Desde 1965, cuando Urist (Urist, 1965) demostró que las BMPs óseas extraídas podrían inducir la formación de hueso y cartílago cuando se implantan en tejido animal, un alto número de artículos han probado su aplicación in vivo y su base biológica cuando se usan en defectos óseos (Boyne and Jones, 2004) (Wang *et al.*, 1990) (Wozney, 1992) . Las BMPs son miembros de la súper familia de proteínas TGF- β (Barboza, Caula and Machado, 1999). La familia de proteínas BMP agrupa más de 20 proteínas morfogenéticas homodiméricas o heterodiméricas, que funcionan en muchos tipos y tejidos celulares, no todos tienen que ser necesariamente osteogénicos (Ana Claudia Carreira *et al.*, 2014). Las BMPs se pueden dividir en 4 subfamilias según su función y secuencia, siendo BMP-2, -4 y -7 las que tienen un fuerte potencial osteogénico (Ana Claudia Carreira *et al.*, 2014). Las acciones de las BMPs incluyen la condrogénesis, la osteogénesis, la angiogénesis y la síntesis de la matriz extracelular (Bustos-Valenzuela *et al.*, 2011). Dentro de esta familia de proteínas, BMP-2 ha sido la más estudiada. Tiene propiedades osteoinductoras que promueven la formación de

nuevo hueso al iniciar, estimular y amplificar la cascada de la formación ósea a través de la quimiotaxis y la estimulación de la proliferación y diferenciación del linaje celular osteoblástico (Myeroff and Archdeacon, 2011) (Boyne and Jones, 2004) (Wozney, 1992) (Barboza, Caula and Machado, 1999). La ausencia de ésta, como se estudió en los modelos eliminatorios, conduce a fracturas espontáneas que no cicatrizan con el tiempo (Tsuji *et al.*, 2006). De hecho, otros modelos han demostrado que la ausencia de cualquiera de estas dos, BMP-4 (Tsuji *et al.*, 2008) o -7 (Tsuji *et al.*, 2010), no conducen a la formación de hueso y deterioro como demuestra el efecto producido por BMP-2 sola (Chen, Deng and Li, 2012).

Muchos tipos de células en el tejido óseo producen BMP, como las células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrocitos, plaquetas y células endoteliales. Esta BMP secretada se almacena en la matriz extracelular donde interactúa principalmente con el colágeno tipo IV (Ramel and Hill, 2012). Durante los procesos de reparación y remodelación, la actividad absorbente de los osteoclastos induce la liberación de BMP al medio para que se suspenda la función de absorción y ésta pueda interactuar con las células cercanas para iniciar el consecuente proceso osteogénico (A C Carreira *et al.*, 2014) .

La BMP en la matriz extracelular se une a los receptores de la superficie celular BMPR-I y II y activa las proteínas citoplasmáticas Smad o la vía MAPK (Deschaseaux, Sensebe and Heymann, 2009). Cuando BMPR-I se activa, BMPR-II se engancha y se activa también (Mueller and Nickel, 2012). La activación del complejo BMPR-I y BMPR-II conduce a la activación de varios Smads (1, 5 y 8) que también activan Smad-4 y todos forman complejos proteicos que se transportan al núcleo donde Runx2, Dlx5 y los genes Osterix (importantes en la osteogénesis) se activan (Chen, Deng and Li, 2012) (Ramel and Hill, 2012) (Figura 1). De forma similar, cuando se activa la ruta de MAPK, conduce a la inducción de la transcripción de Runx2 y, por lo tanto, a la diferenciación ósea (Sieber *et al.*, 2009). También se han descrito varios antagonistas extracelulares e intracelulares, que incluyen noggin, chordin y gremlin o Smad-6, -7 y -8b, respectivamente (Sapkota *et al.*, 2007).

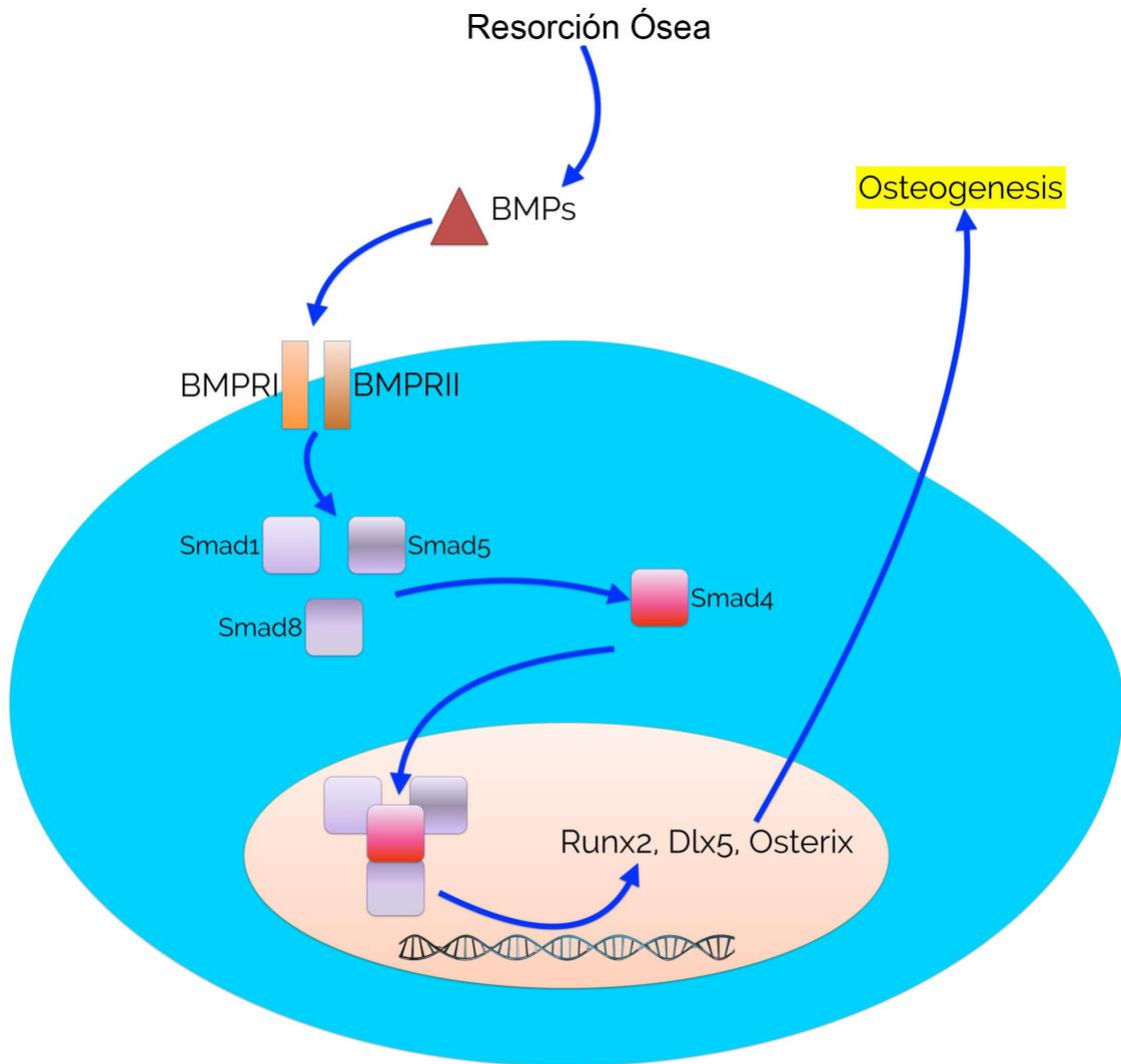


Figura 1. Representación esquemática de la ruta molecular principal de BMP a la osteogénesis. Las BMP interactúan con los receptores de la superficie celular I y II para activar Smads 1, 5 y 8. Estos Smads activados activan Smad 4. Todos juntos como un complejo de proteínas activan Runx2, Dlx5 y Osterix.

Foto tomada de Artículo: Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jodar-Reyes AB, Peula-Garcia JM. Bone regeneration form Plga Micro-Nanoparticles. *BioMed Research International*. 2015, 415289 (2015).

1.1.1 Uso clínico de la BMP-2

Hoy en día, la BMP-2 está disponible comercialmente bajo diferentes nombres de marcas y concentraciones. Por lo general, consiste en una esponja absorbible de colágeno fijada con BMP-2 humana recombinante. En 2002, fue aprobado por la FDA como una alternativa de injerto óseo autógeno en la fusión intersomática lumbar anterior (McKay, Peckham and Badura, 2007). Más tarde, en 2007, la FDA aprobó el uso de rhBMP-2 como una alternativa para el injerto óseo autógeno en el aumento de los defectos de la cresta alveolar asociados con la extracción del diente en la neumatización del seno maxilar (McKay, Peckham and Badura, 2007).

Además de las aplicaciones en estudios clínicos de columna, donde se usan concentraciones muy altas (AMPLIFYTM, rhBMP-2, 40 mg), los estudios clínicos han apoyado su uso en la cavidad oral. Las BMP se han utilizado en la regeneración periodontal, la terapéutica ósea, la osteointegración de implantes, la cirugía oral con fines ortodóncicos, la reparación de secuelas derivadas de la patología ósea, la osteogénesis por distracción y la cirugía reparadora de endodoncia (A C Carreira *et al.*, 2014) (Hong *et al.*, 2013). Sin embargo, han mostrado resultados más prometedores en casos en los que solo se regenerará el tejido óseo, incluido el desarrollo del sitio pre-implantario, la elevación de seno, el aumento de cresta vertical y horizontal y la cicatrización de cirugías de implantes dentales (Spagnoli and Marx, 2011). En este sentido, se evidenció que el uso de rhBMP-2 indujo la formación de hueso adecuado para la colocación de implantes dentales y su osteointegración (Nevins *et al.*, 1996). Además, parece que el hueso recién formado tiene propiedades similares al hueso nativo y, por lo tanto, es capaz de soportar las fuerzas oclusales que ejerce la dentadura durante su función masticatoria (Boyne *et al.*, 2005). En resumen, los estudios nombrados concluyeron que rhBMP-2 induce la formación de nuevo hueso con una calidad y cantidad comparable al inducido por la cicatrización del propio paciente e incluso en algunos de los casos, se informó de haber obtenido una cantidad y calidad de hueso mayor a la que se hubiese obtenido por la vía de cicatrización normal del paciente (Lee *et al.*, 2013).

Por el contrario, estudios recientes revelan graves complicaciones después de su uso (Ronga *et al.*, 2013). Además, se han asociado efectos carcinogénicos a altas dosis, lo que llevó a los autores a enfatizar en la necesidad de mejores pautas en el uso clínico de BMP (Devine *et al.*, 2012). No tan drásticos, son los últimos estudios que destacan los efectos secundarios negativos y los riesgos de su aplicación, haciendo gran hincapié en el sesgo potencial de la investigación patrocinada por la industria no reproducible, especialmente cuando se utiliza en la médula espinal (Fu *et al.*, 2013) (Carragee, Hurwitz and Weiner, 2011) (Simmonds *et al.*, 2013). Se observó también que el uso de rhBMP-2 aumenta el riesgo de complicaciones en la zona tratada, disfagia con alta eficacia y daña la tergiversación mediante informes selectivos, publicaciones duplicadas y subregistros (Fu *et al.*, 2013). Específicamente en el campo de la regeneración ósea dentro de la cavidad oral, un estudio de elevación de seno concluyó que el uso de BMP-2 promueve efectos negativos en la formación ósea cuando se combina con matriz ósea bovina inorgánica vs. hueso bovino inorgánico solo (Kao *et al.*, 2012), en contraste con artículos y revisiones previas (Torrecillas-Martinez *et al.*, 2013). Al tomar en cuenta esta información, se puede concluir que es de extrema importancia tener cuidado con el uso clínico de nuevos productos, evitando las aplicaciones no clasificadas. También es importante resaltar la necesidad de más y mejores investigaciones clínicas.

Para superar estas limitaciones, el uso de células mesenquimales específicas (MSC) autólogas modificadas por BMP-2 *ex vivo* (Chung *et al.*, 2012), en los últimos años, está dando lugar a explorar nuevas estrategias como la encapsulación de la proteína en diferentes biomateriales o el suministro mediante terapia génica.

El desarrollo de estas tecnologías se basa en algunos hechos biológicos. Los efectos *in vitro* de las BMP se observan en dosis muy bajas (5-20 ng/ml), aunque las rhBMP actuales disponibles comercialmente se usan en dosis grandes (hasta 40 mg de algunos productos) (A C Carreira *et al.*, 2014). Esto probablemente se deba a un consumo proteolítico intenso durante las primeras fases quirúrgicas. Es importante conocer la secuencia adecuada de los procesos biológicos que

conducen a la cicatrización normal del tejido. Por lo tanto, este conocimiento se puede usar para intervenir en el marco temporal específico en el que se pretende que actúe nuestra terapia (Padial-Molina *et al.*, 2012). También es importante tener en cuenta que el papel de otras vías moleculares y la diafonía entre los diferentes componentes que llevan a cabo la regeneración ósea todavía no se entiende perfectamente, y, por lo tanto, se debe realizar más investigación.

Lo que hasta ahora se sabe, en resumen, es que las BMP, y específicamente BMP-2, son útiles para promover la regeneración ósea (A C Carreira *et al.*, 2014). Sin embargo, las rutas disponibles de administración local basadas en la activación de las BMP entregadas por esponjas de colágeno presentan importantes limitaciones (Chung *et al.*, 2012). En primer lugar, la proteína se inactiva rápidamente. Por lo tanto, su acción biológica desaparece, puede ser incluso antes de que se forme el coágulo de sangre, el cual se forma después de la cirugía. Además, la distribución de la BMP en una suspensión líquida incrustada en una esponja de colágeno hace que sea imposible estar seguro de que la proteína está alcanzando el objetivo ideal. Debido a eso, deben desarrollarse nuevas formas de administración de BMP-2. Estas nuevas tecnologías tienen que garantizar una mayor vida media de la proteína y una liberación escalonada, para aumentar los efectos sobre los objetivos celulares deseados. La biotecnología abre la puerta para poder proporcionar una solución a estas limitaciones.

De esta manera, las nanopartículas biodegradables (nanoesferas y nanocápsulas) fueron desarrolladas como una herramienta importante y prometedora para la administración de macromoléculas a través de aplicaciones parenterales, mucosas y tópicas (Barratt, 2003) (Bramwell and Perrie, 2005) (Csaba, Garcia-Fuentes and Alonso, 2006) (M J Santander-Ortega *et al.*, 2010). Los polímeros biodegradables bien establecidos tales como poli (ácido D, L-láctico) o poli (D, L-láctico-co-glicólico) se están utilizando ampliamente en la preparación de nanopartículas en las últimas décadas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad completa (Jiang *et al.*, 2005). Sin embargo, se sabe que ciertas macromoléculas, como proteínas o péptidos, pueden perder actividad durante su encapsulación, almacenamiento, administración y

liberación (Kumar, Soppimath and Nachaegari, 2006). Para superar este problema, la adición de estabilizadores tales como óxido de polietileno (PEO) o la co-encapsulación con otras macromoléculas y sus derivados parece ser una estrategia prometedora.

1.2 Partículas coloidales poliméricas para encapsular moléculas hidrofílicas

Generalmente, las partículas coloidales poliméricas son sistemas consistentes con una forma esférica homogénea compuesta por polímeros naturales o sintéticos. Con el fin de encapsular moléculas hidrófilas como proteínas o ácidos nucleicos, para ello, es necesario optimizar la composición polimérica y el método de síntesis. En este proceso, se debe lograr una alta eficacia de encapsulación, el mantenimiento de la actividad biológica de la biomolécula encapsulada y la obtención de un patrón de liberación adecuado (Danhier *et al.*, 2012) (Kumari, Yadav and Yadav, 2010) (Makadia and Siegel, 2011). Varios sistemas de administración de BMP2 (y otros GF) que usan partículas poliméricas están descritos en la bibliografía. La mayoría de ellos son sistemas microparticulados. Casi en su totalidad, todos ellos usan el copolímero de PLGA biocompatible y biodegradable como componente principal (Mohamed and van der Walle, 2008) (Silva *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta la incorporación de BMP2 al sistema portador, la encapsulación es preferible a la adsorción porque los factores de crecimiento están más protegidos contra factores ambientales en el medio y pueden tener un mejor control sobre la administración y liberación para alcanzar las concentraciones deseadas en sitio y tiempo específicos (Zhang and Uludag, 2009).

Normalmente, si los GF están relacionados con los procesos de regeneración ósea, las nano-micropartículas quedan atrapadas en un segundo sistema como hidrogeles o *scaffolds* de ingeniería tisular, que también juegan un papel importante en el perfil de liberación de los GF de estas partículas (Zhang and Uludag, 2009). Las nano-micropartículas han permitido el desarrollo de *scaffolds* multiescala, lo que facilita el control de la arquitectura interna y los patrones

adecuados de los gradientes mecánicos de las células así como los factores de señalización (Santo *et al.*, 2012).

Todos los pasos, desde el método de síntesis y sus características, el proceso de encapsulación o la modificación final de la superficie para una entrega dirigida, determinan las características de estos sistemas y su objetivo principal: la liberación controlada de GF bioactivos.

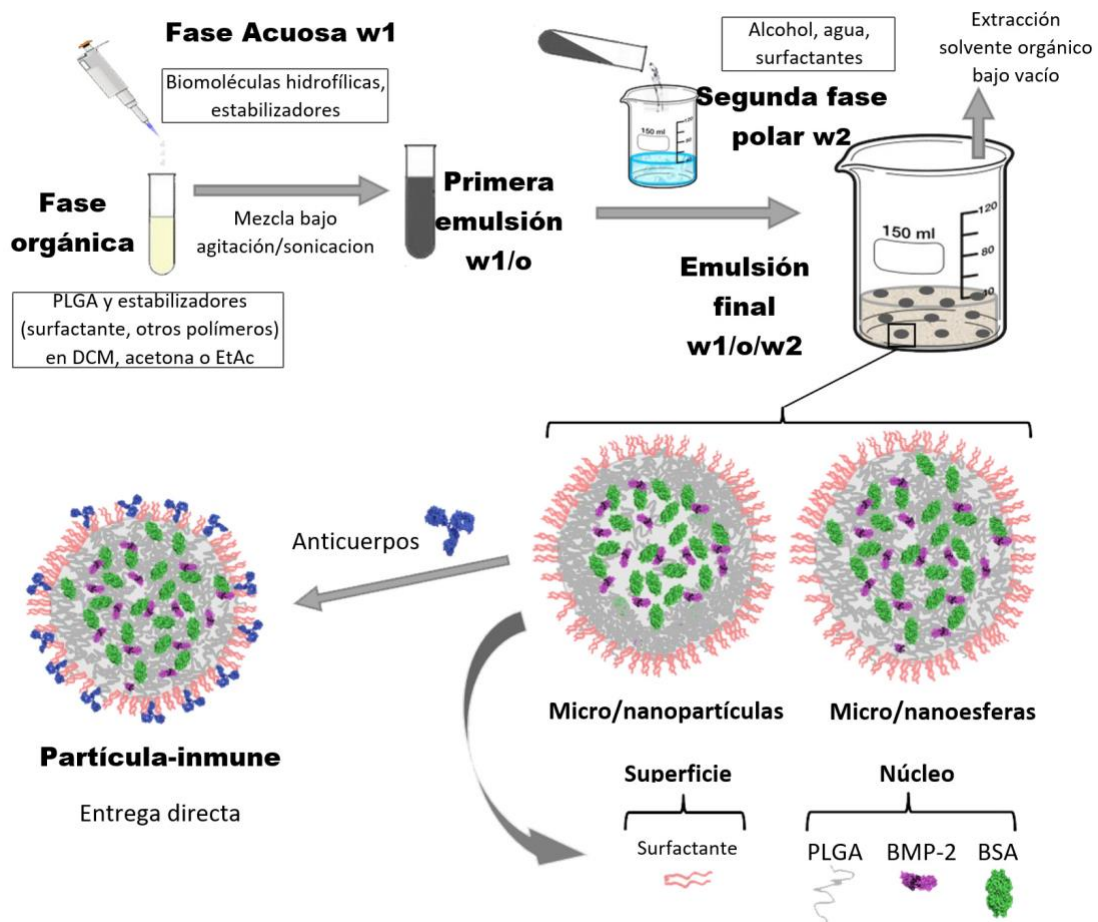


Figura 2. Procedimiento de doble emulsión (emulsión agua / aceite / agua, $W_1/O/W_2$) para obtener micropartículas / nanopartículas de PLGA.

En la figura 2 se muestra el esquema de síntesis de micro-nanopartículas de PLGA mediante un procedimiento de doble emulsión. Dependiendo de las condiciones de síntesis (estabilizadores, disolventes y procedimiento de mezcla) es posible obtener micro-nanoesferas con una matriz uniforme o micro-nanocápsulas con una estructura corteza-núcleo. Las inmunopartículas

utilizadas para la administración dirigida pueden obtenerse uniendo moléculas específicas de anticuerpos en la superficie de la partícula.

1.2.1 Métodos de síntesis

Es posible encontrar varios procedimientos para encapsular moléculas hidrofílicas como proteínas o ácidos nucleicos en nano / micropartículas poliméricas. Se ha observado, que las técnicas de separación de fases (Tran, Swed and Boury, 2012) o secado por pulverización (Ertl *et al.*, 2000) encapsulan moléculas hidrófilas. Sin embargo, en el caso de las proteínas, el procedimiento más utilizado para encapsularlas en micropartículas y nanopartículas de PLGA es la técnica de evaporación con disolvente de doble emulsión (W/O/W) (Makadia and Siegel, 2011) (Hans and Lowman, 2002). En la figura 2 se presenta una descripción esquemática de esta técnica. De manera general, el PLGA se disuelve en un disolvente orgánico y se emulsiona, usando agitación mecánica o sonicación, con agua que contiene una cantidad apropiada de proteína.

Por lo tanto, se obtiene una emulsión W_1/O primaria. En la segunda fase, esta emulsión se vierte en una gran fase polar que conduce a una precipitación inmediata de las partículas como consecuencia de la contracción del polímero alrededor de las gotitas de la emulsión primaria. Esta fase puede estar compuesta por una solución acuosa de un estabilizador (surfactante) o mezclas de etanol y agua (Blanco and Alonso, 1998) (Csaba *et al.*, 2005). Después de agitar, el resultado del disolvente orgánico se extrae rápidamente por evaporación al vacío. En este procedimiento se ha probado una amplia lista de diferentes modificaciones con el fin de obtener un sistema micro / nanoportador con estabilidad coloidal adecuada, alta eficacia de encapsulación, bioactividad adecuada y, finalmente, un perfil de liberación a largo plazo con una mínima "descarga inicial". El objetivo es evitar que se libere una gran cantidad de proteína (> 60%) muy rápidamente (24 horas), que es uno de los mayores problemas de un sistema de liberación controlada (Mohamed and van der Walle, 2008).

1.2.2. Disolvente orgánico

Hans y colaboradores muestran diferentes ejemplos de solventes orgánicos usados en múltiples procesos de emulsión. Normalmente, pueden usarse diclorometano (DMC), acetato de etilo, acetona y otras mezclas (Hans and Lowman, 2002). En el primer paso, sería una buena elección escoger un buen solvente orgánico con baja solubilidad en agua para facilitar el proceso de emulsión y bajo punto de ebullición para una fácil evaporación. Sin embargo, la estructura de las moléculas de proteínas encapsuladas puede verse afectada y los procesos de desnaturalización y pérdida de actividad biológica aparecen cuando interactúan con un solvente orgánico típico como DMC (Danhier *et al.*, 2012). El acetato de etilo, por otro lado, ejerce efectos menos desnaturalizantes con una menor incidencia en la bioactividad de las proteínas encapsuladas (Sturesson and Carlfors, 2000).

Otros factores importantes relacionados con el disolvente orgánico son sus propiedades físicas, que afectan la forma en que las moléculas del polímero se auto organizan en la envoltura de las gotas de la emulsión y modifican la morfología de las nanopartículas y la eficacia de encapsulación (Rosca, Watari and Uo, 2004). De esta forma, una mayor solubilidad en agua del disolvente orgánico, es decir, acetato de etilo, favorece una eliminación más rápida del disolvente. Además, la velocidad de eliminación del disolvente puede controlarse ajustando el volumen de la fase polar, así como la tensión de cizallamiento durante la segunda etapa de la emulsión. Un aumento de estos dos parámetros aumenta la velocidad de difusión del acetato de etilo desde las micropartículas primarias a la fase acuosa externa, lo que da como resultado su rápida solidificación (Meng *et al.*, 2003). También mejora la eficiencia de encapsulación y minimiza el tiempo de contacto entre las moléculas de proteína y el solvente orgánico (Ghaderi and Carlfors, 1997), obteniendo al mismo tiempo un menor efecto de ráfaga y una liberación más lenta del fármaco desde las micropartículas (Meng *et al.*, 2003).

1.2.3 Tamaño y morfología de las partículas

El tamaño de la partícula es un parámetro importante y uno de los objetivos principales del sistema de liberación polimérica. Las microesferas, desde unos pocos micrómetros hasta 100 μm , son adecuadas para el suministro oral, la adhesión a la mucosa o el uso interior del armazón, es decir, para la regeneración ósea. La dimensión a nano-escala del soporte ofrece una versatilidad mejorada cuando se compara con partículas de mayor tamaño. Esto se debe a que tienen una mayor estabilidad coloidal, una mejor dispersabilidad y biodisponibilidad, una superficie más reactiva y, además, pueden administrar proteínas o fármacos dentro y fuera de las células correspondientes (Wang *et al.*, 2012). BMP2 promueve la formación de hueso e induce la expresión de otras BMP e inicia la vía de señalización desde la superficie de la célula uniéndose a dos receptores de superficie diferentes (Bustos-Valenzuela *et al.*, 2011). Por lo tanto, las partículas portadoras de BMP2 deben liberarlo en el medio extracelular. Dado que la ingesta celular de nanopartículas de PLGA es muy rápida, el proceso de incorporación puede verse limitado por un aumento en el tamaño de nano a micropartículas (Xiong *et al.*, 2011). Sin embargo, la interacción entre partículas y células está fuertemente influenciada por el tamaño de la partícula. Si se desea la internalización de la célula, la partícula debe estar comprendida en la escala submicrónica en un intervalo entre 2-500 nm (Chou, Ming and Chan, 2011). Además, este tamaño es necesario para una distribución rápida después de la administración parenteral con el fin de alcanzar diferentes tejidos a través de diferentes barreras biológicas. Además, la ingesta de macrófagos se minimiza con un diámetro de nanopartículas por debajo de 200 nm, e incluso más pequeño (Hans and Lowman, 2002) (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010). Como se discutió en un artículo escrito por Yang y colaboradores (Yang, Chung and Ng, 2001), ligeras modificaciones del procedimiento de síntesis pueden suponer efectos drásticos en el tamaño o la morfología de las partículas y, por lo tanto, en la eficacia de encapsulación de proteínas y la liberación cinética.

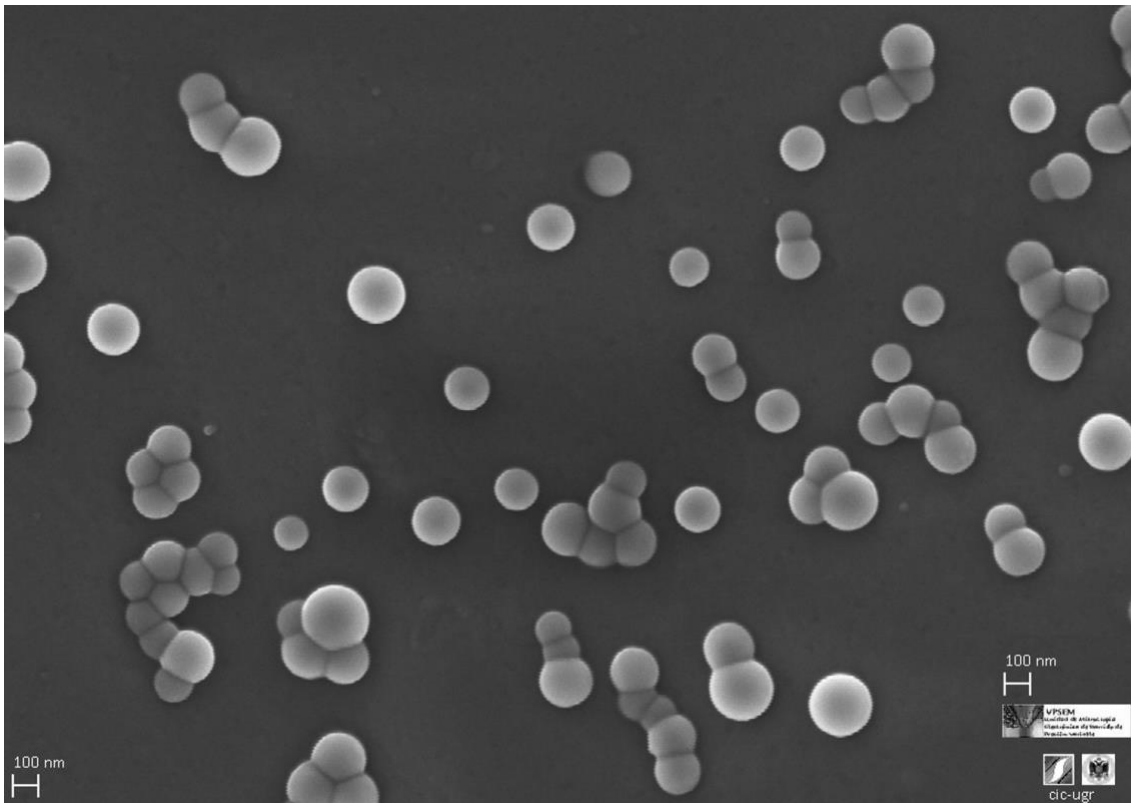


Figura 3. Fotografía mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas de PLGA obtenidas mediante un procedimiento de emulsificación de doble emulsión. Es un sistema con forma esférica, baja polidispersidad y una escala nanoscópica que muestra las propiedades deseadas para una distribución fisiológica adecuada y la internalización celular.

En los procesos de doble emulsión, la primera etapa de emulsión determina en gran medida el tamaño de la partícula, mientras que la segunda etapa de emulsión, caracterizada por la eliminación del disolvente y la precipitación del polímero, afecta principalmente a la morfología de la partícula (Rosca, Watari and Uo, 2004). Sin embargo, en este paso, el uso de soluciones surfactantes como el medio polar del segundo proceso de emulsión y la relación de volumen entre las fases orgánicas y polares, han mostrado una influencia importante en el tamaño final (Feczko, Tóth and Gyenis, 2008). Por lo tanto, la elección correcta del solvente orgánico, la concentración del polímero, la adición de surfactante y la energía del proceso de emulsión permiten controlar el tamaño del sistema.

La incorporación de poloxámeros (F68) en el disolvente orgánico de la emulsión primaria ayuda a aumentar la estabilidad coloidal de la primera dispersión al colocarla en el interfaz W/O. Esto reduce el tamaño de partícula en comparación con las nanopartículas de PLGA puro en las que la única fuente de estabilidad proviene de la carga eléctrica de los grupos carboxilo del PLGA (Santander-Ortega, Bastos-Gonzalez and Ortega-Vinuesa, 2007). Es normal obtener micro / nanoesferas cilíndricas con un núcleo poroso polimérico. En la figura 3 se muestra una micrografía SEM típica de nanopartículas de PLGA obtenidas mediante emulsión W/O/W usando una mezcla de disolventes orgánicos (DCM / acetona) y etanol / agua como segundo medio polar, en la que la forma esférica y la distribución uniforme del tamaño son las principales características. La cubierta exterior polimérica en la segunda etapa de emulsión empujó las gotas de agua hacia el núcleo interno de acuerdo con el proceso de solidificación (Yang, Chia and Chung, 2000). Este proceso permite producir partícula, como son estas cápsulas con una estructura núcleo-capa en la que el núcleo interno tiene una baja densidad de polímero.

La figura 4 muestra una estructura núcleo-capa típica en la que el polímero precipita y se contrae alrededor de las gotas de agua durante el cambio de disolvente de la segunda fase y el posterior proceso de evaporación del disolvente orgánico (Fang *et al.*, 2014). En este caso, el proceso de solidificación del polímero se ve influenciado y determinado por la miscibilidad del disolvente orgánico con la segunda fase polar y la velocidad de eliminación.

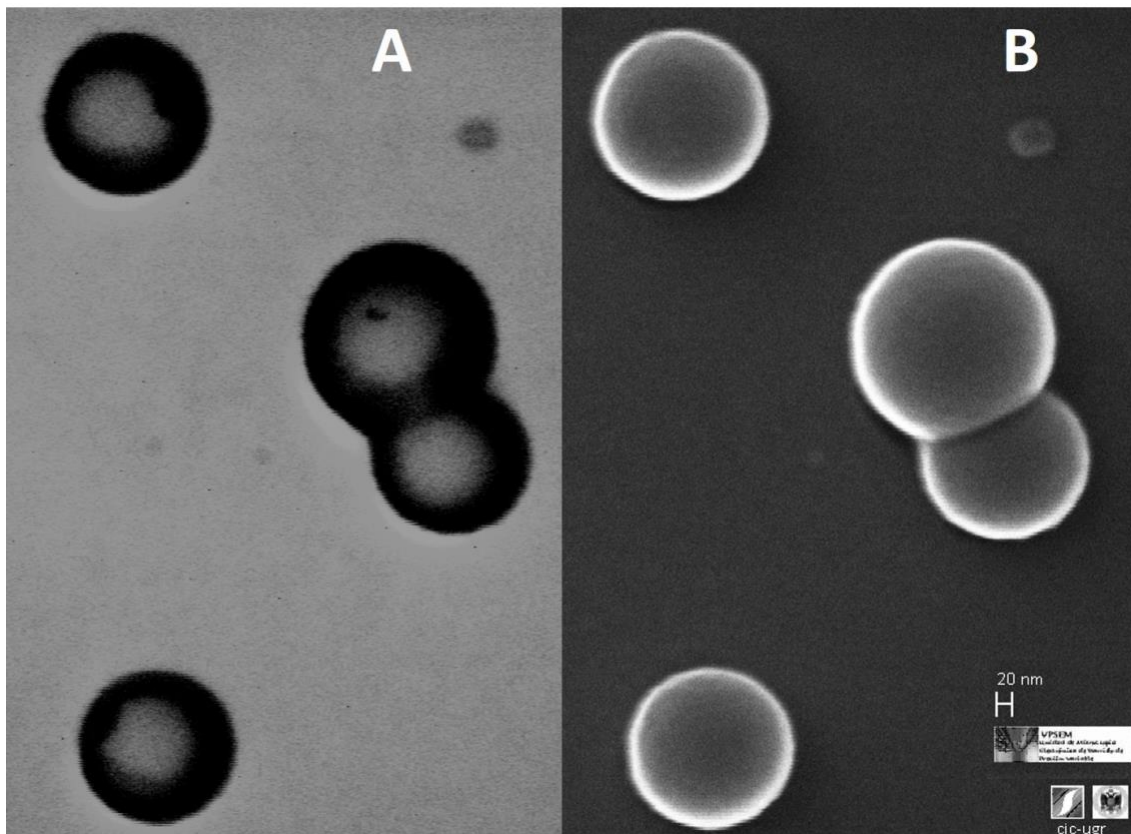


Figura 4. Nanopartículas de mezcla PLGA / poloxamers188. (a) Fotografía de microscopía electrónica de transmisión (STEM); (b) Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM). La técnica STEM permite el análisis de la estructura de nanopartículas con una región interna con baja densidad de polímero, que es representativa de nanocápsulas con estructura núcleo-caparazón.

La cubierta polimérica a menudo presenta canales o poros como consecuencia de la extrusión de agua interna debido a las fuerzas osmóticas. Esto puede reducir la eficacia de la encapsulación y favorecer una rápida fuga inicial con la "liberación en ráfaga" no deseada (Yang, Chung and Ng, 2001). Esta modificación de la estructura interna de las partículas generalmente se indica asignando el término "nanoesfera" al sistema con un núcleo que consiste en una matriz polimérica homogénea. El agente bioactivo se dispersa dentro de ellas, mientras que la estructura núcleo-caparazón sería similar a una "nanocápsula" donde la biomolécula está preferiblemente en la cavidad acuosa rodeada por la cubierta polimérica (Zhang and Uludag, 2009) (ver figura 2).

1.3 Agentes estabilizadores

1.3.1 Estabilidad coloidal.

El método de doble emulsión normalmente requiere la presencia de estabilizadores para conferir estabilidad coloidal durante la primera etapa de emulsión, para evitar la coalescencia de las gotas de la emulsión, y más tarde, para mantener la estabilidad de las nano / micropartículas finales (Ratzinger *et al.*, 2010). El alcohol polivinílico (PVA) y el derivado de PEO ,como poloxámeros, se han usado en la mayoría de los casos (Blanco and Alonso, 1998) (Feczko, Tóth and Gyenis, 2008). Otros incluyen surfactantes naturales, como los fosfolípidos (Feng and Huang, 2001) (Chan *et al.*, 2009). En algunos casos, es posible evitar los surfactantes si las partículas tienen una contribución de estabilidad electrostática, es decir, de los grupos carboxilo terminales no protegidos de las moléculas de PLGA (Fraylich *et al.*, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, el PVA y los poloxámeros han demostrado su eficacia en la síntesis de nanopartículas y micropartículas, afectando no solo la estabilidad de los sistemas sino también su tamaño y morfología. Por lo tanto, se ha encontrado un efecto de reducción de tamaño usando PVA en la fase acuosa externa, que afecta al mismo tiempo la porosidad superficial, principalmente en partículas de tamaño micro (Feczko, Tóth and Gyenis, 2008). Un estudio comparativo entre PVA y fosfolípidos (di-palmitoil fosfatidilcolina) como estabilizadores, mostró que DPPC podría ser un mejor emulsionante que PVA para producir nano y micropartículas. Con este método, se necesitaba una cantidad de estabilizador mucho más baja para obtener un tamaño similar. En el mismo estudio, se demostró una mayor porosidad en la superficie de la partícula para las nanoesferas emulsionadas con PVA (Feng and Huang, 2001).

Por otro lado, la combinación de PLGA con poloxámeros ha mostrado efectos positivos para los nano y microsistemas en términos de estabilidad, eficacia de encapsulación o características de liberación controlada (Santander-Ortega *et al.*, 2011). El uso de estos surfactantes en el primer o segundo paso del procedimiento de emulsión W/O/W conduce a situaciones diferentes. Por lo

tanto, si los poloxámeros se mezclan con PLGA en la fase orgánica de la emulsión primaria, se obtiene una alteración de la rugosidad superficial. Sin embargo, si se agregan en la fase de agua interna, se encuentra un aumento de la porosidad (Blanco and Alonso, 1998). La inclusión de poloxámeros en la fase polar de la segunda etapa de emulsión también genera superficies de rugosidad hidrófila. Una cuantificación de esto se muestra en la figura 5, en la que se mide la movilidad electroforética de PLGA puro y PLGA / pluronic F68 nanopartículas como una función del pH del medio. La composición de superficie diferente afecta el comportamiento electrocinético de las nanopartículas desnudas. La carga superficial se modula por la presencia de tensioactivo no iónico como poloxámeros, o, en mayor medida, por la presencia de moléculas de anticuerpos unidos en la superficie. La dependencia observada con este parámetro es una consecuencia del carácter ácido débil de los grupos carboxilo de PLGA. Cuando las moléculas de poloxámero están presentes en la interfaz, se encuentra una reducción sistemática de la movilidad como consecuencia del aumento de la rugosidad superficial. Las cadenas de surfactante hidrófilo se dispersan hacia el disolvente originando un desplazamiento del plano de corte y la consecuente reducción de movilidad (Santander-Ortega, Bastos-Gonzalez and Ortega-Vinuesa, 2007) (Fraylich *et al.*, 2008). La presencia de moléculas proteicas en la superficie introduce una dependencia de la carga neta superficial con el punto isoeléctrico de éstas, situación que se refleja en el comportamiento electrocinético que incluso muestra valores positivos en pHs inferiores al punto isoeléctrico del anticuerpo.

El tamaño final de las partículas de PLGA se controla principalmente por fuerzas electrostáticas y no se ve significativamente afectado por la presencia o la naturaleza de los estabilizadores de poloxámero (Fraylich *et al.*, 2008). El reconocimiento de los nanovehículos por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) se puede alterar significativamente si la superficie de las partículas coloidales se modifica mediante el uso de copolímeros de bloque PEO de las moléculas de poloxámero. La barrera estérica proporcionada por estas moléculas surfactantes previenen o minimizan la adsorción de proteínas plasmáticas y disminuye el reconocimiento por

los macrófagos (Tan *et al.*, 1993). El tamaño de las microesferas tampoco se ve afectado por la encapsulación de poloxámeros. El sistema que contiene mezclas de poloxámero-PLGA conduce a una estructura interna que muestra pequeños orificios y cavidades en relación con microesferas de PLGA puro con una estructura de tipo matriz compacta (Blanco and Alonso, 1998).

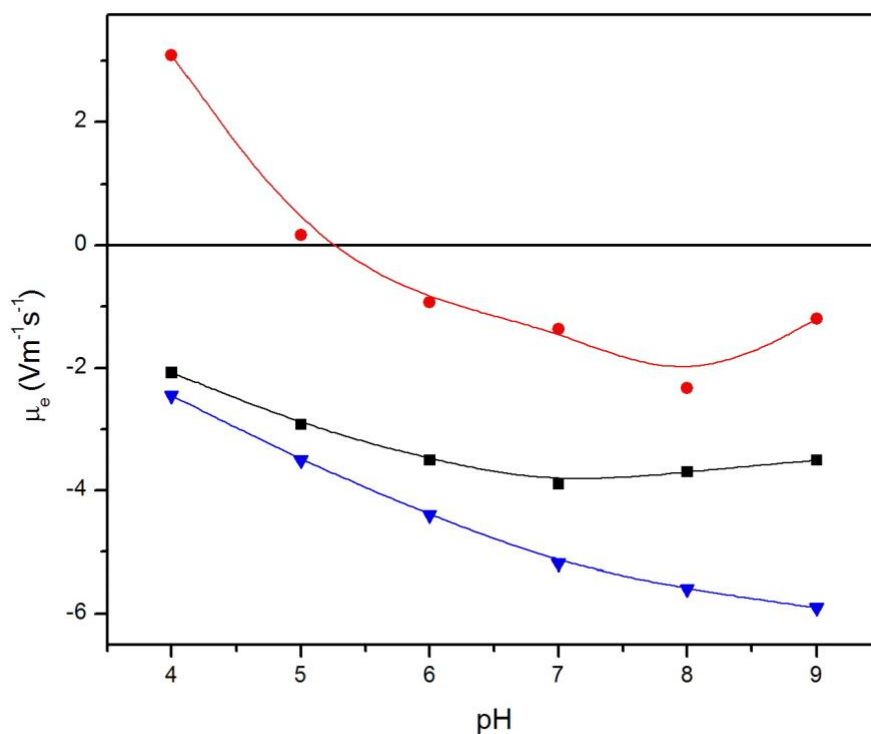


Figura 5. Movilidad electroforética versus pH para nanopartículas de PLGA con diferentes características. (▼) PLGA, (■) mezcla de PLGA / poloxamer188, y (●) PLGA cubierto por Immuno- γ -globulina.

Las micropartículas formuladas por poloxámero en el segundo medio polar tienen una superficie completamente diferente que las de PVA, casi sin poros (Feczko, Tóth and Gyenis, 2008). Una comparación entre diferentes poloxámeros muestra que el balance hidrófilo-lipófilo (HBL) del surfactante juega un papel crucial determinando las interacciones surfactante-polímero y controlando la porosidad y la rugosidad de las nano-micropartículas (Blanco and Alonso, 1998) (Bouissou *et al.*, 2004).

De manera similar a los surfactantes, las características del polímero, como el grado de hidrofobicidad, el peso molecular o la velocidad de degradación de la hidrólisis, pueden influir fuertemente en la morfología de la partícula. Por lo tanto, la composición polimérica de las partículas afecta en gran medida su estructura y propiedades. Es por eso que es habitual usar otros polímeros para modificar el comportamiento y la aplicación de las partículas. De esta manera, el polietilenglicol (PEG) de diferente longitud de cadena se usa frecuentemente para modificar las características de la superficie. Con PEG, las partículas son más hidrófilas y tienen superficies más rugosas que afectan la acción de MPS al aumentar el tiempo de circulación y la vida media in vivo, como la presencia de cadenas de PEO (Gref *et al.*, 1994). Además, las cadenas de PEG también proporcionan estabilidad coloidal a través de la estabilización estérica. Las nanopartículas o micropartículas de PLGA se pueden obtener normalmente mediante el uso en el método de síntesis de copolímeros de di y tri-bloque de PLGA / PEG (Lochmann *et al.*, 2010) (White *et al.*, 2013) (Makadia and Siegel, 2011). Los polímeros naturales como el quitosano, además de aumentar la hidrofobicidad de la superficie, también les confieren un carácter mucoadherente (Paolicelli *et al.*, 2010).

1.3.2. Eficacia de encapsulación y bioactividad

Además, el uso de estabilizantes (surfactantes o polímeros) también influye en la eficacia de encapsulación y la estabilidad de la proteína. De hecho, para el proceso de evaporación del solvente W/O/W, el solvente orgánico clorado usado para la primera emulsión puede degradar las moléculas de proteína encapsuladas, en este paso si entran en contacto con la interfaz orgánica / agua, causando su agregación o desnaturalización (Brigger, Dubernet and Couvreur, 2002). La interacción polímero-proteína, el estrés de cizallamiento para el proceso de emulsión y la reducción del pH derivada de la degradación del polímero PLGA también pueden producir la misma situación con la pérdida posterior de la actividad biológica de las biomoléculas encapsuladas. Se han usado diferentes estrategias para prevenirlo. Por ejemplo, un aumento de la viscosidad alrededor de las moléculas de proteínas puede ayudar a aislarlas de su microambiente

(Giteau *et al.*, 2008). De esta forma, los productos viscosos, como el almidón, se han utilizado para prevenir la inestabilidad proteica (Balmayor *et al.*, 2009). Estos autores coencapsulan BMP2 con albúmina dentro de micropartículas de almidón usando otro polímero biodegradable, poli- ϵ -caprolactona, en lugar de PLGA. La BMP2 retuvo la bioactividad. A pesar de una baja tasa de encapsulación, además de una ráfaga inicial seguida de una liberación incompleta, la cantidad de BMP2 necesaria al principio fue menor (Balmayor *et al.*, 2009). La combinación de surfactantes PEO con PLGA (mezclados en la fase orgánica) también puede preservar la bioactividad de las proteínas microencapsuladas (Santander-Ortega *et al.*, 2009) o los ácidos nucleicos (Csaba *et al.*, 2005).

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la estrategia preferida fue la coencapsulación de estabilizadores con biomoléculas. De este modo, las albúminas séricas (SA) han demostrado la capacidad de limitar la agregación-desestabilización de varias proteínas incitadas por el interfaz agua / disolvente orgánico del proceso de emulsión primaria (Meinel *et al.*, 2001) (Srinivasan *et al.*, 2005). White y colaboradores en uno de sus estudios encapsularon lisozima dentro de micropartículas de PLGA-PEG. Además de la función de protección, también observaron un aumento importante de la eficiencia de encapsulación cuando el SA humana se co-encapsuló con lisozima y BMP2 (White *et al.*, 2013). Dr. Angelo y colaboradores usaron heparina como estabilizador porque ésta forma un complejo específico con varios factores de crecimiento, estabiliza su estructura tridimensional y promueve su bioactividad. Se consiguió aumentar así la eficacia de encapsulación del 35% al 87% usando SA bovina como un segundo estabilizador para encapsular dos factores de crecimiento proangiogénico naturales dentro de las nanopartículas mezcladas con PLGA-poloxámero. Los ensayos celulares *in vitro* mostraron la preservación de la actividad biológica de GF hasta un mes después (d'Angelo *et al.*, 2010).

El uso de más surfactantes hidrófilos (poloxámeros) o polímeros (PEG) en la fase acuosa interna o durante la mezcla del PLGA en la fase orgánica de la emulsión primaria reduce la interacción de las proteínas encapsuladas con la matriz de PLGA hidrófoba. Esto evita la

alteración de la estructura de las moléculas de proteína y ayuda, al mismo tiempo, a neutralizar la acidez generada por la degradación hidrolítica del PLGA (Tan *et al.*, 1993). En algunos casos, se ha demostrado que la combinación de varios estabilizadores, como poloxámeros, tranexámico y bicarbonato de sodio, preserva la integridad de las proteínas encapsuladas, pero también reduce la eficacia de la encapsulación (Bouissou *et al.*, 2004).

Como regla general, la eficacia de la encapsulación aumenta con el tamaño de las partículas (Hans and Lowman, 2002). Además, la estabilización adecuada de la emulsión primaria por polímeros anfifílicos y una solidificación (precipitación) rápida del polímero en el segundo paso son parámetros favorables para mejorar la eficacia de encapsulación de proteínas en la técnica de emulsión W/O/W (Meng *et al.*, 2003).

La tendencia de BMP2 a interactuar con superficies hidrofóbicas puede disminuir la pérdida de proteína encapsulada durante la liberación de la fase de disolvente. Esto favorece una mayor encapsulación pero disminuye la liberación posterior (Lochmann *et al.*, 2010). Se obtiene una encapsulación proteica óptima cuando el pH de las fases de agua internas y externas están cerca del punto isoeléctrico de la proteína (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010). Blanco y Alonso (Blanco and Alonso, 1998) observaron una reducción en la eficacia de encapsulación de proteína cuando el poloxámero se coencapsuló en la emulsión primaria. Esto pone de relieve el papel principal desempeñado por la interacción proteína-polímero en la eficacia de encapsulación y el proceso de liberación posterior. Sin embargo, demasiado emulsionante también puede dar como resultado una reducción de la eficacia de encapsulación (Feng and Huang, 2001). Por lo tanto, se necesita un equilibrio entre el polvo de emulsión del surfactante y su concentración.

1.4. Patrón de liberación

El patrón de liberación representa una de las características más importantes de un sistema portador de partículas nano / micro, ya que su desarrollo tiene un objetivo final principal: la

liberación adecuada de las moléculas bioactivas encapsuladas para alcanzar la acción clínica deseada.

Se han definido diferentes patrones de liberación de proteínas encapsuladas en micropartículas / nanopartículas de PLGA. Es posible encontrar una liberación continua cuando la difusión de la biomolécula es más rápida que la erosión de la partícula. Este proceso implica una difusión continua de la proteína que se encuentra en la matriz del polímero antes de que la partícula de PLGA se degrade en monómeros de ácido láctico y glicólico por hidrólisis (Kumari, Yadav and Yadav, 2010). También se ha descrito una liberación bifásica caracterizada por una descarga inicial dentro o cerca de la superficie de la partícula seguido por una segunda fase en la que la proteína se libera progresivamente por difusión. La segunda fase se puede mejorar mediante la erosión masiva del caparazón y la matriz de PLGA, lo que da como resultado un importante aumento de poros y canales (Makadia and Siegel, 2011). Se ha encontrado un tercer perfil de liberación trifásica cuando se produce un período de liberación de retardo después de la descarga inicial y hasta la degradación del polímero (Cleland, 1997). Finalmente, es posible obtener una liberación de proteína incompleta como consecuencia de factores adicionales relacionados con la interacción proteína-polímero o la inestabilidad proteica. La Figura 6 ilustra los diferentes perfiles de liberación descritos anteriormente. Un sistema de transporte óptimo debería ser capaz de liberar un gradiente de concentración controlado de factores de crecimiento en el momento apropiado, evitando, o al menos reduciendo o controlando, el efecto de descarga inicial (Oh, Kim and Lee, 2011). Una explosión inicial controlada seguida de una liberación sostenida mejora significativamente la regeneración ósea in vivo (Brown *et al.*, 2009) (Brown *et al.*, 2011) (Li *et al.*, 2009).

Giteau y colaboradores (Giteau *et al.*, 2008) presentan una revisión interesante sobre "Cómo lograr una liberación sostenida y completa de micropartículas de PLGA". Comienzan por analizar la influencia del medio de liberación y el método de muestreo en el perfil de liberación y resaltan la importancia del proceso de limpieza por centrifugación o el volumen del medio de liberación.

Ajustando a valores adecuados la velocidad de centrifugación o el volumen del tampón, es posible separar micro / nanopartículas del medio de liberación que contiene proteínas de una manera muy fácil. Esto permite patrones de liberación estables y reproducibles. Por otro lado, para garantizar un mejor perfil de liberación de proteínas, se debe realizar la modificación de la formulación de micropartículas y el proceso de microencapsulación para preservar la agregación de proteínas. La estabilidad de la proteína debe mantenerse evitando la formación de un medio dañino. Por ejemplo, la formulación de una síntesis en concreto, puede modificarse para usar polímeros más hidrófilos, ya que se ha demostrado que reducen el estallido inicial y proporcionan proteínas bioactivas durante largos periodos de tiempo.

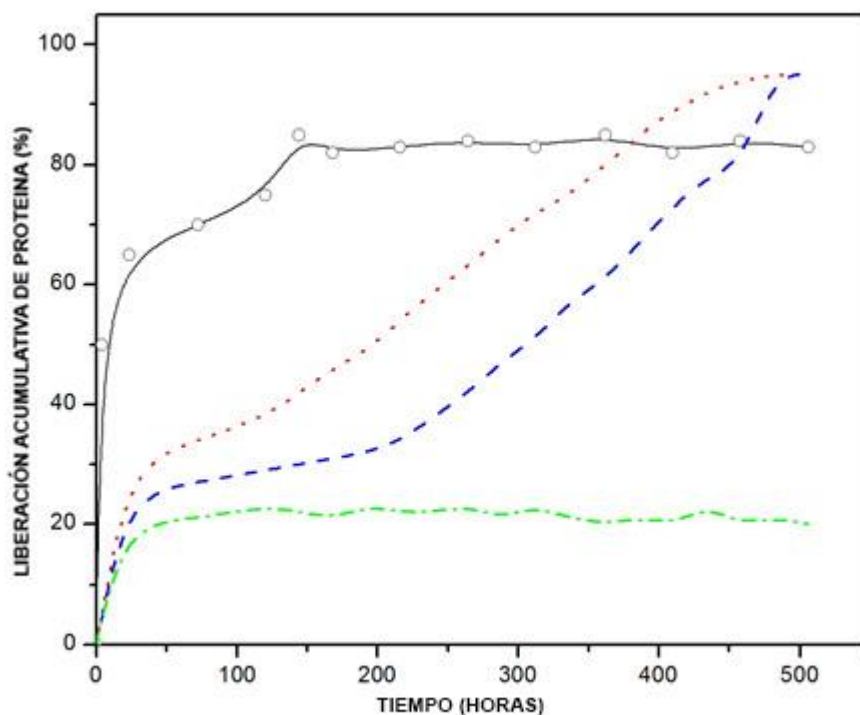


Figura 6. Patrón de liberación. (línea negra) Cinética de liberación de BSA en nanopartículas de PLGA con alta liberación inicial; (línea de puntos rojos) modelo bifásico que combina un estallido inicial moderado y una liberación sostenida posterior; (línea de trazos azules) modelo trifásico con un retraso de liberación entre las fases de liberación inicial y sostenida; (línea verde de guiones) liberación incompleta.

Las estrategias más relevantes se mencionan a continuación. La liberación de fármaco a partir de nano / micropartículas de PLGA puede controlarse por el peso molecular del polímero y la relación entre monómeros (láctico / glicólico), de forma que un aumento del ácido glicólico acelera la pérdida de peso del polímero debido a la mayor hidrofiliidad de la matriz (Makadia and Siegel, 2011).

Por otro lado, se ha descrito una erosión más rápida de las microesferas con reducción en el peso molecular de PLGA debido a la facilidad de penetración del agua y la posterior degradación del polímero (Blanco and Alonso, 1998). Schrier y colaboradores trabajaron con microesferas

preparadas por W/O/W utilizando diferentes tipos de PLGA, analizaron el importante papel del peso molecular, la relación láctico-glicólico y los residuos de ácido (Schrier *et al.*, 2001). La cantidad de rhBMP2 adsorbido en la superficie de la micropartícula aumentó con la hidrofobicidad del polímero. Al mismo tiempo, la liberación estaba en correlación con el perfil de degradación de los diferentes polímeros (Schrier *et al.*, 2001).

Por lo tanto, el uso de polímeros más hidrófilos reduce la interacción proteína hidrófoba-polímero. Este efecto favorece una distribución más homogénea en la matriz polimérica y aumenta la absorción de agua en las microesferas. Por lo que, la velocidad de liberación de rhBMP2 encapsulada en microesferas compuestas por un copolímero de di-bloque PEG-PLGA se incrementa con el contenido de PEG de la matriz de polímero (Lochmann *et al.*, 2010). Se obtuvo un resultado similar utilizando copolímeros tri-bloque PLGA-PEG-PLGA (White *et al.*, 2013). En este caso, modificando la relación del monómero (láctido-glicólido) en el PLGA y aumentando la cantidad de PLGA-PEG-PLGA en las formulaciones, el patrón de liberación de BMP-2 co-encapsulada con HSA en microesferas fue ajustable.

Por otro lado, el uso de mezclas de PLGA-poloxámeros es útil para obtener una liberación sostenida durante más de un mes sin incidencia de producirse una descarga inicial (d'Angelo *et al.*, 2010) (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010). Sin embargo, para un plásmido encapsulado dentro de nanopartículas obtenidas mediante mezclas de PLGA-poloxámero, la hidrofobicidad del surfactante permite prolongar la liberación hasta 2 semanas de una manera controlada. Por otra parte, se alcanzó una liberación completa para la mezcla de PLGA-poloxámero en lugar de nanopartículas de PLGA, en la que la liberación máxima fue de alrededor del 40% (Csaba *et al.*, 2005).

Las mezclas de PLGA y poloxámeros (pluronic F68) también se pueden usar para obtener vesículas o cámaras nanocompuestas mediante un proceso de doble emulsión. Estas vesículas son adecuadas para la encapsulación de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas. La presencia de pluronic afecta la estabilidad coloidal de las vesículas y el patrón de liberación de las moléculas

encapsuladas. Estas vesículas presentan una pared de 30 nm y el fármaco está encapsulado en presencia del poloxámero (Nair and Sharma, 2012).

Otras estrategias incluyen el uso de diferentes compuestos para aumentar el tiempo de liberación. Por lo tanto, BMP2 encapsulada en nanopartículas de PLGA-PVA (alrededor de 300 nm) mostró una mayor eficiencia de encapsulación y un perfil de liberación de corta duración con un estallido inicial muy alto. De forma similar, las nanopartículas de mezcla PLGA-poloxámero se modificaron superficialmente introduciendo quitosano en el segundo paso de la síntesis. Este método mostró un perfil de liberación sostenida de hasta 14 días sin ningún estallido importante inicial. En este caso, se utilizó un antígeno recombinante de hepatitis B (Paolicelli *et al.*, 2010). Además, el uso de heparina conjugada con microesferas porosas de PLGA también se ha descrito para obtener un sistema de administración a largo plazo que reduce al mismo tiempo el estallido inicial. En estos sistemas, la heparina se inmovilizó en la superficie nano / micropartícula. La liberación se controló usando las afinidades de unión de la heparina a varios factores de crecimiento, incluida la BMP2. En este caso, el estallido inicial se redujo hasta un 4-7% durante el primer día seguido de una liberación sostenida de aproximadamente un 1% por día (La *et al.*, 2010) (Chung *et al.*, 2007) (Jeon *et al.*, 2008).

La liberación de proteína en la descarga inicial puede atenuarse mediante la fabricación de microesferas de doble pared, es decir, micropartículas con núcleo y concha. La presencia de un revestimiento o armazón de PLA reduce la tasa de liberación de BSA encapsulado en el núcleo PLGA y extiende la duración del perfil de liberación hasta dos meses. Por otra parte, un aumento en el peso molecular de PLA influye en la tasa de erosión de las partículas, lo que ralentiza aún más la liberación de proteínas (Xia *et al.*, 2013).

La modificación de la viscosidad en el entorno de micropartículas influye adicionalmente en el patrón de liberación. La viscosidad puede controlar el estallido en el punto más temprano y promover una liberación sostenida. Esta situación se ha demostrado para las microesferas de rhBMP2-PLGA incrustadas en un hidrogel de ácido quitosano-tioglicólico (Poloxámero 407) (Fu

et al., 2012). Yilgor y colaboradores también incorporaron las nanopartículas de su sistema de administración secuencial a un *scaffolds* compuesto por quitosano y quitosano-PEO (Yilgor *et al.*, 2009). En otro trabajo, las microesferas de PLGA / PVA con BMP2 encapsulado se combinaron con diferentes biomateriales compuestos (hidrogel de gelatina o fumarato de polipropileno). La liberación sostenida de la molécula bioactiva se extendió durante un período de 42 días. Los resultados *in vivo* indican la importancia de las características compuestas. En este caso, se obtuvo una mejor formación de hueso cuando las micropartículas de PLGA se incorporaron a la matriz más hidrófoba (fumarato de polipropileno) (Kempen *et al.*, 2008) (Kempen *et al.*, 2009).

Finalmente, la tabla 1 resume información importante sobre diferentes parámetros relacionados con el uso de nano o micropartículas basadas en PLGA para encapsular, transportar y liberar factores de crecimiento (principalmente BMP2). La mayoría de ellos están en la escala microscópica. El PVA ha sido el estabilizador de surfactante más utilizado. Es posible encontrar tanto la encapsulación como la adsorción de superficie de los factores de crecimiento con una eficiencia alta a moderada. El uso de heparina como estabilizador reduce significativamente la liberación inicial en estallido, favoreciendo una liberación sostenida en el tiempo. La bioactividad del GF se conservó en la mayoría de los sistemas y la encapsulación con otras biomoléculas parece tener un efecto similar al del uso de surfactantes como estabilizadores.

Polímeros	Estabilizadores	Tamaño	EE % Encapsulación	Liberación	Actividad biológica	Referencia
PLGA	PVA	10-20 μm	Adsorción rhBMP2	20 ng/ml de contante liberación sostenida	Mejor formación ósea 8 semanas después.	Fu at al. 2012 (126)
PLGA	PVA	10-100 μm	rhBMP2-BSA 69 % (BMP)	Burst (20 %) Prolongado hasta un 77 % (28 días)	Moléculas de BMP2 con bioactividad.	Tian et al. 2012 (130)
PLGA 75:25	PVA	182 μm	82 %	-	Buenos resultados de reparación ósea de 8 a 12 semanas.	Rodriguez-Evora et al. 2014 (130)
PLGA	PVA	228 μm	60,5 %	30 % en la descarga inicial. Liberación más lenta de un 4% por semana. Después de 8 semanas, liberado un 60%	Sin pérdida de bioactividad	Reyes et al. 2013 (132)
PLGA/PEG	Sin síntesis de doble emulsion	100-200 μm	Adsorción BMP2	13 % en la descarga inicial. Liberación mas lenta de 0.01-8 % por día. Después de 23 días, liberado un 70 %	Sustancial regeneración ósea debido al "andamio"	Rahman et al 2014 (181)
PLGA Diferente	PVA	20-100 μm	30 % (sin cubrir PLGA) 90 % (cubriendo PLGA)	26-49 % (1 día) Total 2 semanas después	Sin pérdida de bioactividad	Lupu-Haber et al. 2013 (134)
PLGA 75:25	PVA	5-125 μm	-	Descarga inicial de un 30% (1 día) Prolongada 35 días.	Mayores volúmenes y cobertura de superficie del Nuevo hueso	Wink et al. 2014 (138)
PLGA	Heparina	200-800 nm	Adsorción BMP2 94 %	Sin descarga inicial. Prolongado 4 semanas.	Reducción significativa de la dosis de BMP2 para una Buena formación ósea.	La et al. 2010 (122)
PLGA	Heparina-poloxámero	160 nm	Adsorción BMP2 100%	Descarga inicial (4-7%) perfil lineal	Mayor mineralización de la matriz del hueso regenerado.	Chung et al. 2007 (123)
PLGA	Heparina	100-250 nm	Adsorción 94 %	Descarga inicial 10% (1 día) 60% 30 días después	Sin pérdida de bioactividad. Eficacia de la administración, cantidad 50 veces menor	Jeon et al. 2008 (124)
PLGA	PVA	~ 300 nm	80 %	85 % descarga inicial (1 día)	Sin pérdida de bioactividad	Yilgor et al. 2009 (127)
PLGA (en anillos)	PVA	215 μm	66 %	Descarga	El 60 % de los	Rodriguez-

TABLA 1. *Sistemas de nano / micropartículas para encapsular GF, principalmente el factor de crecimiento BMP2.*

1.5. Vectorización: Entrega dirigida.

Las nano-esferas de PLGA representan un sistema de administración de biomoléculas bien estudiado que podría aplicarse a la selección celular, con el fin de mejorar el suministro de proteínas específicas o ácidos nucleicos dentro o cerca de las células de referencia de ingeniería ósea, es decir, células madre mesenquimales (Vo, Kasper and Mikos, 2012). Las propiedades de direccionamiento pueden ser suministradas por una estrategia de funcionalización del ligando: modificación de la estructura superficial del nano-transportador conjugando un ligando específico de célula para dirigir la liberación de biomoléculas encapsuladas preferiblemente en estrecha asociación con las células diana (Ji *et al.*, 2012). El uso de nanopartículas con una unión covalente de diferentes ligandos da lugar a una técnica potencial para administrar biomoléculas específicas de células óseas para la ingeniería ósea (Luginbuehl *et al.*, 2004).

Los anticuerpos específicos que reconocen los receptores de superficie en estas células podrían acoplarse covalentemente a la superficie de las nanopartículas de PLGA, obteniendo "inmunonanopartículas". Hay varios ejemplos de inmovilización de anticuerpos en la superficie de nanopartículas de PLGA. Kocbek y colaboradores demostraron el reconocimiento específico de las células tumorales de mama por un anticuerpo monoclonal específico unido a las nanopartículas fluorescentes PLGA obtenidas mediante el proceso de emulsión W/O/W (Kocbek *et al.*, 2007). Para la unión covalente de la superficie, utilizaron un método de carbodimida más simple, que promueve la formación de un enlace amida entre los grupos terminales carboxílicos libres de nanopartículas de PLGA y los grupos amino primarios de la molécula del anticuerpo (Ertl *et al.*, 2000). Este procedimiento puede verse muy influenciado por la presencia de estabilizadores frecuentemente utilizados para conferir estabilidad coloidal a las nanopartículas. La movilidad electroforética de las nanopartículas de PLGA con un anticuerpo (inmuno- γ -globulina anti-proteína C-reactiva humana) unido covalentemente a la superficie como se muestra en la figura 5. Es necesario observar la drástica disminución en los valores de movilidad del anticuerpo modificado con respecto a las nanopartículas de PLGA desnudas, lo que podría implicar una baja

estabilidad coloidal y la posterior agregación del nanosistema. Santander y colaboradores propusieron una menor carga de anticuerpos en la que las nanopartículas de PLGA desnudas deben ser recubiertas por un agente surfactante no iónico con el fin de obtener nanopartículas estables inmunorrectivas (Santander-Ortega, Bastos-Gonzalez and Ortega-Vinuesa, 2007). Ratzinger y colaboradores indicaron que la presencia de altas concentraciones de poloxámero disminuyó la eficacia de acoplamiento a grupos carboxílicos en nanopartículas de PLGA, lo que demuestra que es necesario un equilibrio que combine más estabilidad y mejor eficacia de acoplamiento (Ratzinger *et al.*, 2010). Para evitar este problema, Cheng y colaboradores, sintetizaron el copolímero en bloque de PLGA-PEG funcionalizado con carboxilo, uniendo un aptámero específico a la superficie de las nanopartículas pegiladas mediante el método de la carbodiimida. En este trabajo, se ha demostrado una mejor administración de fármacos en los tumores de próstata en comparación con las nanopartículas equivalentes no dirigidas (Cheng *et al.*, 2007).

1.6. Ingeniería tisular: soportes 3D o “scaffolds”.

Los datos publicados en la literatura indican que las nanopartículas / micropartículas de PLGA prometen lograr una administración sostenida, espacial y temporalmente controlada por factores de crecimiento requeridos para el desarrollo celular y la diferenciación celular. Se pueden incorporar a células en *scaffolds* sólidos o hidrogeles inyectables (Danhier *et al.*, 2012). Los *scaffolds* o andamios son estructuras 3D porosas que normalmente se utilizan para mejorar la ingeniería tisular ósea (A C Carreira *et al.*, 2014). De acuerdo con Tian y colaboradores (Tian *et al.*, 2012), un *scaffolds* diseñado con este objetivo debe tener: (1) resistencia mecánica apropiada para soportar el crecimiento de hueso nuevo; (2) porosidad apropiada para permitir el crecimiento de las células relacionadas con los huesos; (3) buena biocompatibilidad que permite el crecimiento de células en su superficie sin ser rechazado por el cuerpo; (4) baja toxicidad para las células y tejidos de alrededor; (5) ser capaz de inducir la diferenciación osteogénica de las células madre

relacionadas con los huesos; (6) ser biodegradable con productos de degradación no tóxicos para que eventualmente puedan ser reemplazados por nuevo hueso. Además, el *scaffolds* para la regeneración ósea debe mantener el suministro o la liberación de BMP (factores de crecimiento) "in situ" durante un tiempo prolongado. De esta forma, las nano / micropartículas dentro de los *scaffolds* se utilizan para liberar un flujo adecuado de estas biomoléculas de señalización y preservar su estructura funcional (Romagnoli, D'Asta and Brandi, 2013). Para hacerlo, se requiere una liberación inicial del factor de crecimiento encapsulado en las primeras horas para poder obtener rápidamente una concentración terapéutica efectiva seguida de un perfil de liberación sostenido a largo plazo (Puppi *et al.*, 2014). La mayoría de las partículas poliméricas insertadas en las estructuras de los scaffolds están en una escala micrométrica. El objetivo principal de estas micropartículas es la protección y el control temporal de la entrega del factor de crecimiento. Sin embargo, dada la porosidad de estas estructuras, las nanopartículas, y especialmente las partículas de algunas micras, pueden volverse más importantes ya que es posible diseñar sistemas con una difusión simple y fácil a través de la estructura. Este proceso podría permitir el reconocimiento específico de un tipo de célula particular, liberando sus BMP encapsuladas en el mismo entorno y ayudando a su diferenciación al tejido celular / óseo.

2. HIPÓTESIS

Lo que sabemos hasta ahora es que las BMPs, y específicamente la BMP-2, son muy útiles para promover la regeneración ósea induciendo una mayor formación de hueso de la zona receptora de igual calidad que el hueso nativo del paciente. Sin embargo, la administración local presenta algunas limitaciones, como que la proteína se puede inactivar muy rápidamente y la distribución de la BMP en una suspensión líquida hace que sea imposible estar seguro de que la proteína haya alcanzado el objetivo. Para ayudar a resolver estos problemas planteamos la siguiente hipótesis.

HIPOTESIS CIERTA: La encapsulación de BMP-2 con nuestras nanopartículas permiten una administración localizada, un transporte específico y una liberación controlada de la biomolécula mejorando así su farmacocinética y farmacodinamia y disminuyendo los efectos secundarios derivados de esta.

HIPÓTESIS NULA: Que tras la experimentación no seamos capaces de promover la encapsulación de la BMP-2 dentro de nuestras nanopartículas de PLGA, o que produciéndose, no se produzca la administración de BMP-2 localizada y liberación prolongada o que nuestro sistema de encapsulación pueda presentar efectos citotóxicos a nivel celular.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal:

Optimizar la formulación de diferentes tipos de nanopartículas de PLGA para el transporte y suministro de BMP-2 que permita conseguir una cinética de liberación controlada aumentando la vida media de este factor de crecimiento óseo y preservando su acción biológica.

3.2 Objetivos secundarios:

Nos planteamos los siguientes:

1. Llevar a cabo la síntesis de NPs poliméricas de PLGA mediante el procedimiento de doble emulsión para conseguir nanosistemas, coloidal y temporalmente estables.
2. Modelar los procedimientos de síntesis de NPs de PLGA para la encapsulación o carga de moléculas proteicas en la proporción adecuada sin alterar su actividad biológica.
3. Desarrollar una completa caracterización químico-física de los diferentes nanosistemas poliméricos en ausencia de proteína y con carga de la misma haciendo hincapié en la interacción surfactante-proteína y analizando sus propiedades superficiales y coloidales.
4. Desarrollar una caracterización biológica de los diferentes nanosistemas con proteína centrada en el análisis de la cinética de liberación proteica y su actividad biológica.
5. Evaluar *in vitro* las interacciones celulares, citotoxicidad y captación celular, de los diferentes sistemas de NPs de PLGA en células estromales mesenquimales de hueso alveolar humano.
6. Tomando como punto de partida el modelo de NPs con proteína con las mejores propiedades coloidales y biológicas, formular las condiciones óptimas para obtener un nanotransportador de partículas de PLGA cargado con BMP2.

7. Desarrollar una completa caracterización químico-física y biológica de las NPs con BMP2 analizando sus propiedades superficiales, coloidales y la cinética de liberación proteica.

8. Analizar la actividad biológica de la BMP-2 vehiculizada mediante las NPs de PLGA mediante experiencias de proliferación, migración y diferenciación osteogénica en células estromales mesenquimales de hueso alveolar humano.

4. NANOSISTEMA DE ENTREGA DOBLE PARA BIOMOLÉCULAS, FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y LIBERACIÓN IN VITRO.

4.1. Antecedentes

La regeneración tisular es una acción biológica compleja que implica múltiples pasos de forma secuencial, ordenada y controlada (Padial-Molina *et al.*, 2012) (Padial-Molina, Rodriguez, *et al.*, 2015). Clásicamente, se han propuesto moléculas bioactivas para ayudar en estos procesos. Sin embargo, el uso de altas dosis, la desnaturalización y la pérdida de actividad biológica, el tiempo de acción descontrolado y la difusión a otros tejidos destacan como los principales problemas de esta estrategia terapéutica (Ortega-Oller *et al.*, 2015). Para ayudar a resolver estas dificultades, en los últimos años se ha investigado intensamente la nanomedicina como un área emergente. Esto implica métodos de diagnóstico, terapéuticos y de regeneración mediante estructuras y sistemas en los que el tamaño y la forma se controlan a nivel atómico, molecular y supramolecular (Ki-Bum Lee, Ani Solanki, J Dongun Kim, 2009). El transporte y la administración controlada de fármacos y/o biomoléculas terapéuticas mejora su farmacocinética y farmacodinámica y, al mismo tiempo, minimiza los efectos secundarios nocivos. Para estos propósitos, se describieron diferentes tipos de nanosistemas. El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) exhibe una baja citotoxicidad, así como una alta biocompatibilidad y biodegradabilidad con las liberaciones de subproductos no tóxicos.

En la última década, se ha investigado el uso de PLGA para administrar un amplio espectro de agentes activos, desde moléculas de fármacos hidrófobas (Yallapu *et al.*, 2010) (Nair and Sharma, 2012) (Shankarayan, Kumar and Mishra, 2013) a biomoléculas hidrófilas como péptidos (Loureiro *et al.*, 2016), proteínas (Blanco and Alonso, 1998) (Perez, De Jesus and Griebenow, 2002) (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010) (Pirooznia *et al.*, 2012) (d'Angelo *et al.*, 2010) (White *et al.*, 2013) o ácidos nucleicos (Pantazis *et al.*, 2012) (Park *et al.*, 2013). Estos

sistemas de entrega se han producido a través de diferentes procesos de formulación para su aplicación en terapias tanto sistémicas como locales específicas del sitio (Wan and Yang, 2016).

Sin embargo, su diseño y desarrollo como nanotransportadores son difíciles debido al patrón de liberación problemático que presentan cuando las moléculas encapsuladas son proteínas para las cuales las descargas iniciales y la liberación lenta o incompleta podrían ser un problema (Wan and Yang, 2016) (Giteau *et al.*, 2008) (Fredenberg *et al.*, 2011). Además, las condiciones específicas de la liberación pueden necesitar ser diferentes dependiendo de la aplicación final del nanotransportador (Fredenberg *et al.*, 2011) (Mohamed and van der Walle, 2008).

La técnica de doble emulsión de agua/aceite/agua (W/O/W) es el método de encapsulación de proteínas más ampliamente utilizado para PLGA en micro (MP) y nanopartículas (NP) (Csaba *et al.*, 2004) (Makadia and Siegel, 2011). Permite modular diferentes factores como el tipo de PLGA, el uso de otros polímeros mezclados con PLGA, la adición de surfactantes, el estrés mecánico o el solvente orgánico (Fredenberg *et al.*, 2011). También es posible construir varios tipos de copolímeros para modificar la hidrofobicidad: la relación de hidrofiliicidad (Wan and Yang, 2016) (Danhier *et al.*, 2012) y la estabilidad, el tamaño y el proceso de liberación coloidal. El par PLGA / polietilenglicol y los surfactantes como el alcohol polivinílico (PVA) o los óxidos de polietileno (PEO) son los más ampliamente estudiados (Nair and Sharma, 2012) (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010) (Ratzinger *et al.*, 2010) (Meng *et al.*, 2003).

Por otro lado, la ingeniería de tejidos requiere la participación de células estromales mesenquimales (MSC) (Padial-Molina, O'Valle, *et al.*, 2015). Se sabe que las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células, incluidos los osteoblastos. Los osteoblastos son las células principales responsables de sintetizar el tejido óseo mineralizado. Este proceso está regulado por, entre otras moléculas, BMP-2 (Ortega-Oller *et al.*, 2015). Las partículas de PLGA cargadas con BMP-2 son sistemas ampliamente utilizados, como se ha descrito y revisado por otros autores (Ortega-Oller *et al.*, 2015) (Yilgor, Hasirci and Hasirci, 2010) (Li *et al.*, 2009) (Wang *et al.*, 2015) (Shim *et al.*, 2016).

Así, dentro de este contexto, el objetivo del presente estudio fue optimizar la formulación y propiedades de un sistema de nanopartículas con gran variedad de aplicaciones terapéuticas. Probamos dos estrategias diferentes para obtener NP de tensioactivo PLGA, utilizando lisozima como modelo para BMP-2. Analizamos el tamaño y la morfología, el índice de polidespersidad, el potencial zeta, la estabilidad coloidal y la eficiencia de encapsulación (EE) de la proteína.

Una vez finalizada la caracterización físico-química, el estudio se centró en el proceso de liberación de proteínas, utilizando diferentes técnicas para estudiar los resultados de experimentos *in vitro* y centrándose en el patrón de liberación y la actividad biológica de la lisozima liberada. De esta manera, se estableció una nueva formulación para desarrollar un nanosistema de PLGA con una distribución de tamaño dual singular y el equilibrio adecuado entre encapsulación y liberación de proteínas biológicamente activas. Finalmente, los efectos del sistema PLGA propuesto se probaron en MSC primarias *in vitro* como prueba del nuevo sistema desarrollado.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1 Formulación de las nanopartículas.

El ácido-poli (láctico-co-glicólico) (PLGA 50:50) ($[C_2 H_2 O_2]_x [C_3 H_4 O_2]_y$) $x = 50$, $y = 50$ (Resomer® 503H) 32 - 44 kDa, se usó como polímero. El surfactante polimérico Pluronic® F68 (Poloxámero 188) (Sigma-Aldrich) se usó como el emulsionante. Su estructura se basa en un copolímero tri-bloque de poli (óxido de etileno) PEO y poli (óxido de propileno) PPO, $(PEO)_a - (PPO)_b - (PEO)_a$, con $a = 75$ y $b = 30$. La lisozima de huevo de gallina (Sigma-L7651) se usó como proteína hidrófila. El agua se purificó en un sistema Milli-Q Academic de Millipore. Se desarrollaron dos métodos de formulación diferentes, denominados O-F68 y W-F68.

En el método O-F68, se disolvieron 25 mg de PLGA y 15 mg de F68 en 660 μL de diclorometano (DMC) y se agitaron en el vortex. Luego, se añadieron 330 micro-litros de acetona y se agitaron en el vortex también. A continuación, se añadieron 100 μL de una solución tamponada a pH 12,8, con o sin lisozima (5 mg / mL), gota a gota mientras se agita en vortex

durante 30 s. Inmediatamente, esta emulsión primaria de agua / aceite (W/O) se vertió en un vidrio que contenía 12,5 ml de etanol bajo agitación magnética, y se añadieron 12,5 ml de agua MilliQ. Después de 10 minutos de agitación magnética, los disolventes orgánicos se extrajeron rápidamente por evaporación al vacío hasta que la muestra alcanzó un volumen final de 10 ml.

En el método W-F68, se disolvieron 100 mg de PLGA en un tubo que contenía 1 ml de acetato de etilo (EA) y se agitaron en vortex. Se añadieron 40 μ L de una solución tamponada a pH 12,8 con o sin lisozima (20 mg / ml) e inmediatamente se sonicaron (Branson Ultrasonics 450 Analog Sonifier), fijando el debido ciclo de trabajo al 20% y de control de salida a 4, durante 1 min con el tubo rodeado de hielo. Esta emulsión primaria W/O se vertió en un tubo de plástico que contenía 2 ml de una solución tamponada (pH 12,8) de F68 a 1 mg / ml, y se agitó en vórtex durante 30 s. Luego, el tubo rodeado de hielo se sonicó de nuevo a la máxima amplitud para la micro punta (control de salida 7), durante 1 minuto. Esta segunda emulsión W/O/W se vertió en un vaso que contenía 10 ml de la solución tamponada de F68 y se mantuvo bajo agitación magnética durante 2 min. El disolvente orgánico se extrajo luego rápidamente por evaporación al vacío hasta un volumen final de 8 ml.

4.2.2 Limpieza y almacenamiento

Después de la evaporación del disolvente orgánico, la muestra se centrifugó durante 10 min a 20 ° C a 14000 o 12000 rpm para los métodos O-F68 y W-F68, respectivamente. El sobrenadante se filtró usando filtros de 100 nm para medir la proteína no encapsulada libre. El sedimento se resuspendió luego en PB hasta un volumen final de 4 ml y se mantuvo en refrigeración a 4°C.

1.La carga de proteínas y la eficiencia de encapsulación

La carga de proteína inicial se optimizó para la formulación de nanopartículas, preservando la estabilidad coloidal final después del paso de evaporación y siendo diferente para cada nanosistema. Además, se usó 1,6% p / p (Lys / PLGA) para O-F68 y 0,8% p / p (Lys / PLGA) para W-F68. La cantidad de lisozima encapsulada se calculó midiendo la diferencia entre la cantidad inicial añadida y la proteína libre no encapsulada, que se analizó mediante el ensayo con

ácido bicinconínico (BCA, Sigma-Aldrich). Luego, la eficacia de encapsulación de proteínas (EE) y la carga de fármaco final (DL) se calcularon de la siguiente manera:

$$EE = \frac{MI-MF}{MI} \times 100 \quad DL = \frac{MI-MF}{M_{polimer}} \times 10$$

donde MI es la masa total inicial de Lys, MF es la masa total de Lys en el sobrenadante acuoso, y Mpolímero es la masa de PLGA en la formulación.

4.2.3 Caracterización de las nanopartículas

2. Caracterización interfacial de la primera emulsión agua en aceite.

La tensión superficial y las mediciones de reología dilatacional en la interfaz aire-agua se realizaron en el OCTOPUS (Maldonado-Valderrama *et al.*, 2013), dispositivo de análisis de superficies por gota pendiente con intercambio múltiple de subfase (patente presentada P201001588) descrito en detalle por Cabrerizo-Vílchez y col. (Wege, Holgado-Terriza and Cabrerizo-Vilchez, 2002). Aquí, el aire juega el papel de la fase orgánica. La tensión superficial se calcula con el software DINATEN®, basado en el análisis de forma de gota axisimétrica (ADSA), y el módulo de dilatación (E) de la capa interfacial se determina a partir del análisis de imagen con el programa CONTACTO®.

3. Morfología de la partícula

Las nanopartículas se obtuvieron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión de barrido (STEM) usando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo Zeiss SUPRA 40VP del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC, UGR).

4. Tamaño de las nanopartículas y movilidad electrocinética.

El diámetro hidrodinámico y la movilidad electroforética de las NP se determinaron usando un dispositivo Zetasizer NanoZeta ZS (Malvern Instrument Ltd, U.K.) que trabaja a 25 ° C con un

láser He-Ne de 633 nm y un ángulo de dispersión de 173 °. Cada punto de datos se tomó como un promedio de tres mediciones de muestra independientes. El tamaño de las NP se caracterizó por escáner de luz dinámica (DLS). Se calcularon el diámetro hidrodinámico promedio (media Z o media acumulada) y el índice de polidispersidad (PDI). Estos parámetros se calculan a través de un análisis acumulativo de los datos, que es aplicable para las distribuciones de tamaño monomodal estrecho (Hassan, Rana and Verma, 2015). También determinamos la distribución del tamaño de intensidad a partir de un algoritmo proporcionado por el software Zetasizer.

La movilidad electroforética se determinó mediante la técnica de electroforesis láser Doppler. Se estableció una distribución de movilidad electroforética, así como una movilidad electroforética promedio para cada muestra (entendiendo por promedio dos veces seguidas para cada una de las muestras).

La distribución del tamaño hidrodinámico de las NP con distribuciones de tamaño amplio de DLS también se midió usando análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) en un NanoSight LM10-HS (GB) FT14 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido). Todas las muestras se midieron más de tres veces durante 60 s con ajuste manual del obturador, ganancia, brillo y umbral a 25 ° C. La distribución de tamaño promedio (concentración de partículas frente a diámetro) se calculó como un promedio de al menos tres independientes distribuciones del tamaño.

5. Resonancia magnética nuclear (RMN) de las nanopartículas

El espectro de ¹H NMR de F68 libre, las partículas cargadas con lisozima del método O-F68 con y sin F68 y las partículas cargadas con lisozima del método W-F68 se midieron con un espectrómetro VNMRS de 500 MHz (Agilent) en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

4.2.4 Estabilidad coloidal y temporal en biología media

Se midió el diámetro hidrodinámico promedio y el índice de polidispersidad (PDI) por DLS de cada sistema para determinar su estabilidad coloidal en diferentes medios (tampón de fosfato

[PB], solución salina tamponada con fosfato [PBS] y medio de cultivo celular: medio de Eagle modificado de Dulbecco, [DMEM] de Sigma) y en diferentes momentos después (0, 1 y 5 días).

Los experimentos de liberación *in vitro* se realizaron siguiendo una metodología similar a la descrita anteriormente (eficacia de encapsulación) pero utilizando 1 ml de cada muestra suspendida en PBS a 37 ° C. La proteína liberada de estas muestras se determinó cada 24 horas mediante análisis de sobrenadante, y el sedimento se suspendió en el mismo volumen de tampón para mantener las condiciones de liberación. Todos los experimentos fueron desarrollados por triplicado.

6. Microscopia confocal

La lisozima se marcó con isotopo de fluoresceína (FITC) usando un método descrito por Kok *et al.* (Kok *et al.*, 1998). Después de la conjugación covalente de FITC y lisozima, las concentraciones se estimaron espectrofotométricamente utilizando los coeficientes de extinción descritos para FITC a 494 nm y 280 nm. La concentración de lisozima se calculó midiendo la absorbancia óptica a 280 nm y restando la absorbancia FITC correspondiente a esta longitud de onda. Las imágenes se realizaron en un microscopio confocal de escaneo láser Nikon A1 de CIC, UGR. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se replicaron al menos dos veces.

4.2.5 Actividad biológica e interacciones

7. Actividad biológica de la lisozima

La actividad biológica de la lisozima se analizó mediante un kit de actividad enzimática (Sigma-Aldrich) utilizando células de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato, siguiendo las instrucciones del fabricante.

8. Captación celular

Se tomaron células madre mesenquimales humanas primarias (hMSC) del hueso alveolar maxilar sano de acuerdo con protocolos descritos (Mason *et al.*, 2014). Después de confirmar su fenotipo por pruebas de citometría de flujo y diferenciación trilineaje, 12000 células por pozo se cultivaron en placas estériles con fondo de vidrio (Ibidi cat nº 81158) durante la noche. Estas

células fueron tratadas con medio sin suero fetal bovino (FBS) y guía celular roja (1: 5000) (C34552, ThermoFisher) durante 30 min. Entonces, el medio fue eliminado y complementado con 10% de SFB, después de lo cual, se agregaron partículas con lisozima-FITC. Entonces, los hMSCs eran incubadas 30 minutos nuevamente, lavadas tres veces con PBS 1X y un suplementado medio fresco con 2% de FBS agregado. Finalmente, las hMSCs fueron examinadas por un microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti-E). Cultivo celular en todos los casos se mantuvieron a 37 ° C y 5% de atmósfera de CO.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Formulación de las nanopartículas

Los métodos desarrollados en este trabajo están destinados a mejorar las técnicas de formulación existentes para las NP de PLGA cargadas de proteínas hidrofílicas basadas en un proceso de doble emulsión (Blanco and Alonso, 1998) (Csaba *et al.*, 2004). La novedad de estos métodos es el uso del surfactante polimérico F68, ya sea en la fase orgánica (método O-F68) o en la fase acuosa (W-F68). Este surfactante reduce el tamaño de las NP, mejora su estabilidad y protege la proteína encapsulada. Además, la presencia de F68 en la superficie de las partículas reduce el reconocimiento de los nanovehículos (nanotransportadores) por el sistema mononuclear fagocítico (MPS) (Farace *et al.*, 2016).

Además, la elección del solvente orgánico afecta significativamente las propiedades del sistema coloidal final, ya que la solubilidad del solvente orgánico regula la estructura interna y superficial de la partícula. Además, la interacción del disolvente con la biomolécula encapsulada puede alterar su bioactividad como consecuencia de su desnaturalización, como se encontró para el cloruro de metileno (Meng *et al.*, 2003). En el método O-F68, se elige DMC como disolvente orgánico debido a su menor solubilidad en agua para facilitar el proceso de emulsificación y su bajo punto de ebullición para facilitar la evaporación. Sin embargo, se añadió un solvente orgánico libremente miscible en agua (acetona) y el emulsionante F68 en esta fase orgánica para reducir

sus efectos biológicos negativos sobre la proteína encapsulada (Danhier *et al.*, 2012). Este emulsionante también reduce la interacción de la matriz de PLGA proteína-hidrofóbica, y por lo tanto, la interrupción de la estructura de la proteína (Ortega-Oller *et al.*, 2015). Por el contrario, en el método W-F68, se utilizó acetato de etilo como disolvente orgánico, que ejerce menos efectos de desnaturalización sobre la proteína encapsulada (Sturesson and Carlfors, 2000). La mayor solubilidad en agua de este solvente favorece la eliminación rápida del solvente. La velocidad de eliminación del disolvente también se acelera al aumentar la tensión de cizallamiento durante la segunda etapa de emulsificación. También mejora la eficacia del encapsulamiento y minimiza el tiempo de contacto entre la proteína y el disolvente orgánico (Ortega-Oller *et al.*, 2015). El poloxámero F68 se introduce en la fase acuosa externa.

Ambas formulaciones (O-F68 y W-F68) (Tabla 2) dieron lugar a muestras coloidalmente estables y a la encapsulación de la lisozima dentro de las nanopartículas, de acuerdo con el doble método de emulsión W/O/W (Makadia and Siegel, 2011).

	PLGA (mg)	F68 (mg)	LYS_I (mg)	Initial %	EE	LYS_F (mg)	DL
O-F68-Lys	25	15	0.4	1.6	62.5	0.25	1
W-F68-Lys	100	2	0.8	0.8	73.1	0.58	0.58

Tabla 2. Condiciones de formulación y resultados de encapsulación de proteínas. **PLGA, F68** y **LYS_I** son la cantidad inicial de polímero, surfactante y lisozima, respectivamente; El % inicial es la tasa inicial de proteína-polímero en peso:peso ; **EE** es la eficiencia de encapsulación; **LYS_F** es la cantidad final encapsulada de lisozima; **DL** es la tasa final de carga del fármaco en peso:peso

La lisozima fue elegida como una proteína modelo debido a su bioestabilidad, sus características bien conocidas y su facilidad para cuantificar su actividad biológica (Lin *et al.*, 2007) (Cai *et al.*, 2008). Además, su tamaño molecular (14,3 kD) y su punto isoeléctrico básico (alrededor de pH = 11) lo convierten en un modelo apropiado para otras proteínas como los factores de crecimiento óseo (White *et al.*, 2013). Tres objetivos principales impulsaron la optimización de la relación apropiada entre el polímero, el poloxámero y la proteína: (1) para tener nanosistemas coloides estables de tamaños submicrométricos; (2) encapsular una cantidad suficiente de proteína; y (3) para prevenir la desestabilización de proteínas manteniendo su actividad biológica.

Por lo tanto, independientemente del método de formulación, se pretendía limitar la carga de proteína inicial para proporcionar nanosistemas estables coloidalmente. En nuestro caso, como se muestra en la Tabla 2, los valores de % iniciales fueron la mejor opción para mantener la estabilidad coloidal sin cambiar significativamente la distribución del tamaño (ver a continuación). En consecuencia, DL presenta valores relativamente bajos para ambas formulaciones, aunque la cantidad encapsulada de lisozima, LYS_F, es mayor que las requeridas

para proteínas terapéuticas con cantidades clínicamente efectivas más bajas (Paillard-Giteau *et al.*, 2010). El valor de EE encontrado para las NP de O-F68-Lys está en consonancia con las características de la formulación y es similar a otros informes con diferentes proteínas (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010) (Blanco and Alonso, 1998) (Santander-Ortega *et al.*, 2009) (d'Angelo *et al.*, 2010), incluida la albúmina de suero bovino (BSA) o la insulina (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010) (Santander-Ortega *et al.*, 2009), y varios factores de crecimiento (d'Angelo *et al.*, 2010).

La presencia de surfactante estabiliza la emulsión y reduce su tamaño. Sin embargo, también altera la interacción proteína-polímero, lo que se traduce en una reducción de la eficacia de encapsulación. Esto fue evidenciado por Blanco y colaboradores al encapsular BSA y lisozima en diferentes micropartículas de PLGA-poloxámero (Blanco and Alonso, 1998). Además, el tipo de proteína y su carga teórica inicial son factores directamente relacionados con la EE y pueden afectar la estabilidad coloidal de la emulsión primaria, como lo muestran Santander y colaboradores (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010). La diferente relación polímero: tensioactivo entre las dos formulaciones no es comparable ya que el tensioactivo se agrega de una manera diferente. En ambos casos, utilizamos formulaciones anteriores como punto de partida (Blanco and Alonso, 1998) (Csaba *et al.*, 2004), y probamos varias relaciones polímero: tensioactivo (datos no mostrados) con el fin de obtener la mejor estabilidad coloidal, EE y DL. En la Tabla 2 mostramos los datos para las relaciones optimizadas de PLGA: F68 en ambos sistemas.

En el método W-F68, a pesar del mayor valor de EE con respecto al sistema O-F68, se esperaba una encapsulación casi completa, debido a la baja relación inicial de proteína: masa de PLGA (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010) y a la ausencia de surfactante en la primera emulsión. Las características del proceso de formulación modificado pueden tener la clave. En esta formulación, la solubilidad relativamente alta del acetato de etilo en agua promueve la difusión rápida del disolvente orgánico en la segunda fase acuosa. Inicialmente se agrega un

pequeño volumen inicial de agua que contiene poloxámero para evitar una precipitación rápida e incontrolada del polímero y para controlar la velocidad del proceso. Esto se complementa posteriormente con la adición de un volumen acuoso más grande, como se describió anteriormente (Meng *et al.*, 2003). Cuando esta solidificación es lenta, favorece el escape de la proteína y la EE disminuye. Sin embargo, si la solidificación es muy rápida, el contacto de la proteína con el solvente orgánico se minimiza y la EE aumenta. En el lado negativo, puede producir aglomeración de polímero, que interfiere con la correcta formación de las NP. La introducción de un paso intermedio con un volumen reducido de fase acuosa con poloxámero puede modular la velocidad del proceso controlando la difusión de acetato de etilo en el agua y permitiendo la difusión en la fase orgánica del poloxámero. Una velocidad controlada del proceso de pre-solidificación del polímero en presencia de surfactante puede producir canales o poros en la cubierta polimérica que, por un lado, podrían facilitar la liberación de proteína y, por otro lado, podría reducir el valor EE (Rosca, Watari and Uo, 2004). Como resultado de estos fenómenos, los DL finales (p: p de la lisozima: polímero) que se muestran en la Tabla 2 para ambos sistemas NP son adecuados para su aplicación como sistemas de nanotransporte.

4.3.2 Caracterización de las Nanopartículas

9. Caracterización interfacial de la primera formulación de agua en aceite

Para obtener una mejor comprensión del efecto del método de formulación sobre las propiedades interfaciales de la primera solución de agua (solución de lisozima) emulsión en aceite, diseñamos experimentos de superficie con lisozima y Pluronic® F68. La diferencia principal en los dos métodos de formulación es cómo se agrega Pluronic® F68: en fase acuosa (W-F68) o en fase orgánica (O-F68). Esta diferencia podría afectar la composición de la superficie de las NP y, como resultado, sus propiedades coloidales.

La tensión superficial y la elasticidad en el interfaz aire-agua fueron las propiedades analizadas (Tabla 3). En esta interfaz, las proteínas cambian su conformación y exponen su parte hidrofóbica al aire, dependiendo de su estabilidad termodinámica, flexibilidad, anfipaticidad, tamaño

molecular y carga. En nuestro caso, la lisozima es una proteína globular que se adsorbe en la interfase aire-agua y forma una monocapa rígida debido a su estructura interna y la presencia y cantidad de puentes disulfuro (Pezennec *et al.*, 2008). Nuestras mediciones se realizaron a pH 12; por lo tanto, la lisozima está cargada negativamente. La Tabla 3 muestra la tensión interfacial de la monocapa de lisozima en la interfaz aire-agua después de 50 minutos de adsorción ($45,7 \pm 0,4$ (mN / m)) y su elasticidad (83 ± 4 (mN / m)). La reducción de la tensión interfacial en comparación con la de la interfaz aire-agua (72 mN / m) indica las características de tensioactivo de la lisozima. El alto valor de la elasticidad se debió a la carga y a las altas interacciones moleculares en la monocapa de lisozima. Cuando la monocapa se forma con Pluronic® F68, la tensión superficial es ligeramente menor que con la lisozima cuando se agrega Pluronic® en AP, pero similar (teniendo en cuenta el error) cuando se agrega en OP.

Pluronic® F68 es una molécula desmontable híbrida que se introduce en el interfaz aire-agua cuando se disuelve en fase acuosa y también cuando se deposita en la superficie de la partícula. Se encuentran pequeñas diferencias al comparar la tensión superficial de la monocapa Pluronic® de los dos métodos. Los diferentes valores de tensión interfacial alcanzados en ambos casos se deben a los diferentes métodos para agregar Pluronic® F68 a la monocapa de lisozima formada. Pluronic® F68 presenta una elasticidad menor que la lisozima, como se esperaba, ya que se sabe que Pluronic® F68 forma una monocapa flexible en la interfaz aire-agua (Torcello-Gómez *et al.*, 2011).

Primer Paso	Tensión Interfacial (mN/m)	Elasticidad^a (mN/m)	Segundo Paso	Tensión Interfacial (mN/m)	Elasticidad^b (mN/m)
Lisozima	45.7±0.4	83±4	-	-	-
Lisozima	45.7±0.4	83±4	-	-	-
Pluronic® F68 (AP)	42.1±0.3	15±3	Pluronic® F68 (AP)	37.9±0.6	14.2±0.5
Pluronic® F68 (OP)	47.5±2.1	9.4±0.5	Pluronic® F68 (OP)	38±2	43±4

Tabla 3. Tensión interfacial y elasticidad dilatacional (a 1 Hz) de la interfase aire-agua: (a) después de adsorber lisozima o Pluronic F68 en la fase acuosa (AP) o Pluronic® F68 en fase orgánica (OP) en el primer paso, (b) cuando Pluronic F68 se agrega en AP u OP después de la adsorción de la monocapa de lisozima (media ± s.d., n = 3).

Se diseñaron dos ensayos para imitar los métodos de formulación de las partículas. En el primer ensayo, (método W-F68), se formó una monocapa de lisozima; luego, la mayor parte de la partícula se intercambió con la solución acuosa de Pluronic® F68, y después de la adsorción se midieron la tensión interfacial y la elasticidad del interfaz (37.9 ± 0.6 mN / m y 14.2 ± 0.5 mN / m, respectivamente). Este bajo valor de elasticidad fue muy similar al de la monocapa de Pluronic® F68, lo que indica que Pluronic® F68 se encuentra en el interfaz adecuado y elimina la lisozima previamente adsorbida. En el segundo ensayo (método O-F68) después de que se formara la monocapa de lisozima, Pluronic® F68 disuelto en cloroformo se depositó sobre la superficie de la partícula. El cloroformo se evapora rápidamente y se mide la tensión interfacial y la elasticidad del interfaz (38 ± 2 mN / m y 43 ± 4 mN / m, respectivamente). La elasticidad fue la mitad de la de la monocapa de lisozima pura, tal vez debido a la coexistencia de las moléculas de

lisozima y Pluronic® F68 en el interfaz. La tensión superficial del interfaz final no depende del método de adición de Pluronic®, pero es menor que la de la lisozima pura o que el Pluronic® puro.

Dentro de este contexto, se ha informado ampliamente que la adsorción de PEO y poloxámeros en el interfaz reduce la unión a proteínas (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010) (Torcello-Gómez *et al.*, 2011). En el método O-F68, la lisozima se expone al DCM después de la formación de la primera emulsión de agua en aceite, incluso si se agrega Pluronic®, ya que ambos coexisten en el interfaz. En el método W-F68, la proteína estará en contacto con el acetato de etilo en este paso, ya que el Pluronic® está ausente. Sin embargo, este disolvente tiene efectos biológicos más débiles sobre la lisozima. Pluronic® podría alcanzar el interfaz cuando se agrega a la fase acuosa en el siguiente paso, y desplazar la proteína del interfaz, que podría difundirse hacia afuera a la fase acuosa.

10. Morfología de la partícula

La entrega, la biodistribución y el mecanismo de acción de un fármaco o biomolécula transportada dependen en gran medida del tamaño de la partícula, la concentración y el tiempo (Penaloza *et al.*, 2017). En general, la escala micrométrica está diseñada para un suministro local que permite la formación de reservorios de la molécula transportada y minimiza la acción del sistema fagocítico (Schwendeman *et al.*, 2014). Sin embargo, los sistemas nanométricos son más versátiles porque permiten una distribución sistémica, son más estables, reactivos y permiten la acción extra e intracelular. Este último mecanismo es esencial cuando la molécula o el fármaco debe actuar en el citoplasma (Wang *et al.*, 2012) o en cualquier otra estructura intracelular como la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico o el núcleo (Penaloza *et al.*, 2017) (Vasir and Labhasetwar, 2007) (Yameen *et al.*, 2014). También se han investigado otros parámetros para alterar el destino intracelular de las partículas, principalmente alterando la decoración de su superficie (Sneh-Edri, Likhtenshtein and Stepensky, 2011), por ejemplo, con señales de localización nuclear (NLS) que utilizan el núcleo como el objetivo de la partícula (Vasir

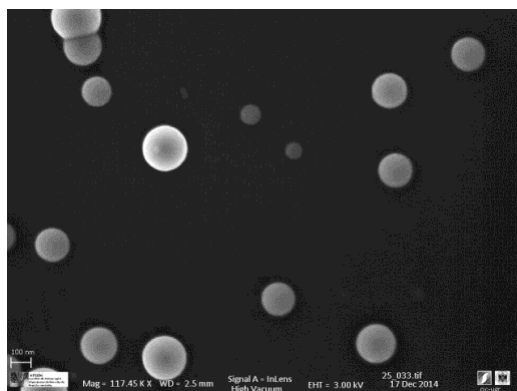
and Labhasetwar, 2007). Sin embargo, estas estrategias aún se encuentran en fase de desarrollo inicial (Penaloza *et al.*, 2017) (Yameen *et al.*, 2014).

Se buscó un tamaño de partícula en la escala submicrométrica (entre 2 y 500 nm), ya que es necesario para la internalización celular y una distribución rápida después de la administración parenteral para alcanzar diferentes tejidos a través de diferentes barreras biológicas. Las partículas de menos de 200 nm minimizan su ingesta por macrófagos. El tipo de disolvente orgánico, la concentración del polímero, la adición de surfactante y la energía de emulsión controlan el tamaño del sistema.

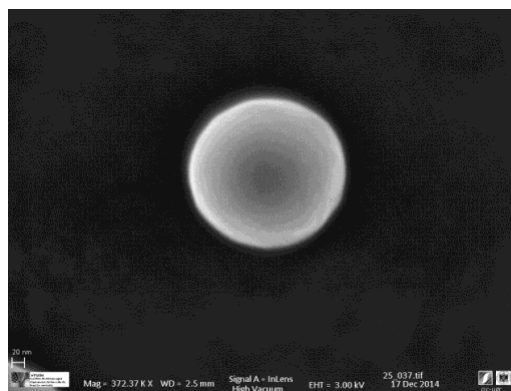
El método O-F68 da lugar a una distribución monomodal del tamaño de partículas con diámetros alrededor de 100 nm. La adición de Pluronic® F68 en la fase orgánica refuerza la estabilidad coloidal de la primera emulsión y reduce el tamaño de partícula en comparación con las NP de PLGA, en las que la estabilidad es puramente electrostática debido a los grupos carboxílicos del PLGA. En el método W-F68, se tienen en cuenta el esfuerzo cortante y el volumen de la fase acuosa para producir un sistema con partículas de entre 100 y 500 nm.

Las NP de O-F68-Lys tienen una forma esférica con una distribución de tamaño monomodal (diámetros alrededor de 100 nm) y una estructura núcleo-capa (Fig. 7a). Las partículas vacías producidas con el método O-F68 se muestran en las Figs. 7 (sin F68) y Fig. 8 (con F68). También son esféricas y con una estructura núcleo-caparazón, pero un poco más grande.

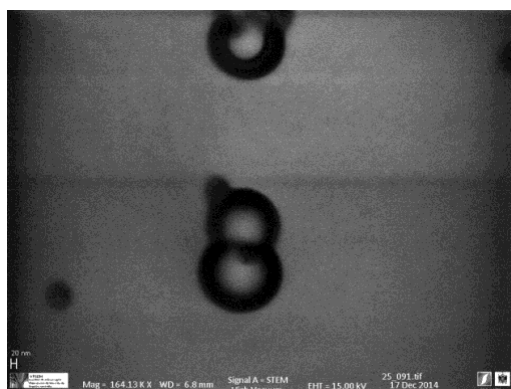
W-F68-Lys NP también presenta una forma esférica pero una distribución de tamaño multimodal con diámetros entre 140 y 450 nm, la población más grande está alrededor de 260 nm (Fig. 7b). También se observa una estructura núcleo-capa en estas partículas. Las partículas vacías del método W-F68 se presentan en la Fig. 9, correspondiente a un sistema más polidisperso.



(a)

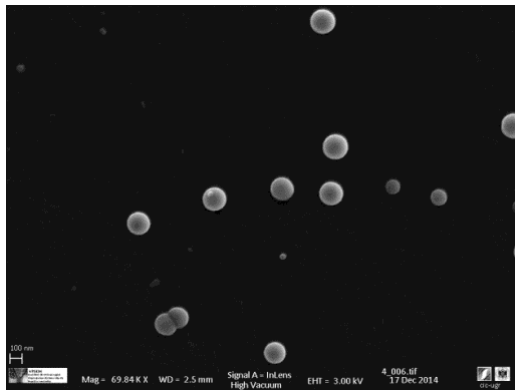


(b)

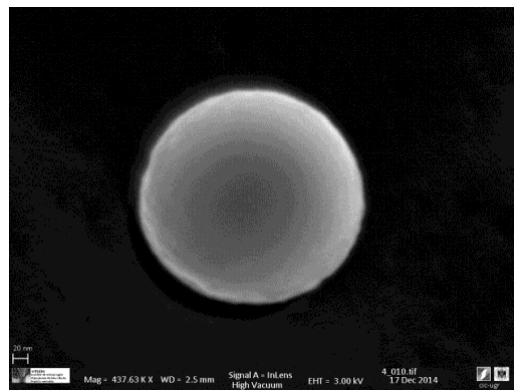


(c)

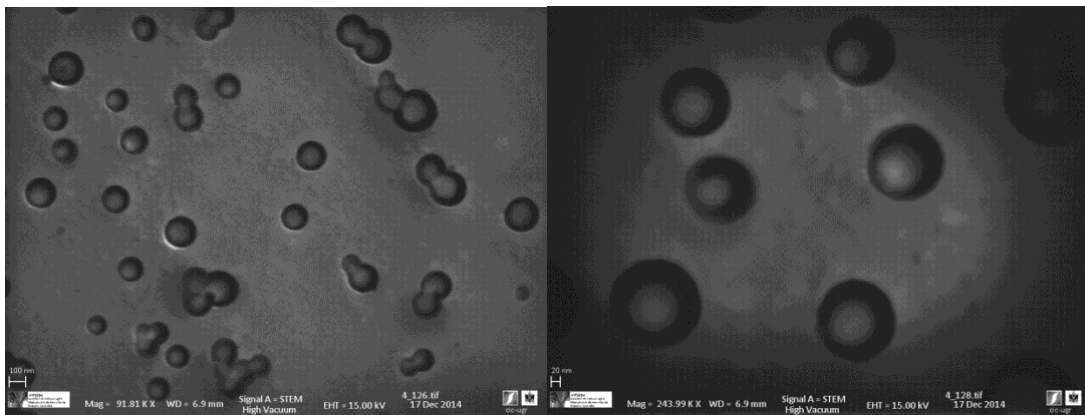
Figura 7. Morfología de las nanopartículas. Micrografías de SEM (a, b) y STEM (c) de nanopartículas vacías utilizando el método O-F68 sin F68.



(a)



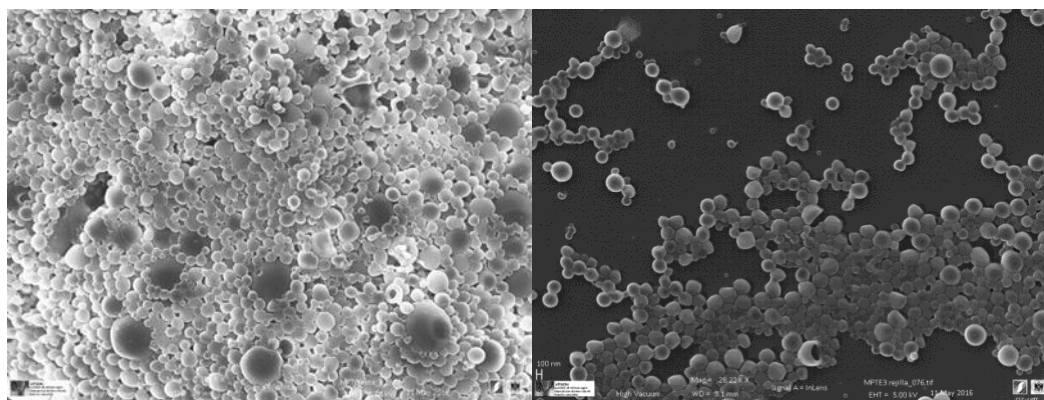
(b)



(c)

(d)

Figura 8. Micrografías de SEM (a, b) y STEM (c, d) de partículas vacías usando el método O-F68 con F68.



(a)

(b)

Figura 9. Micrografías de SEM de partículas vacías usando el método W-F68.

11. Tamaño de las nanopartículas, movilidad electrocinética y estabilidad coloidal

La distribución del diámetro hidrodinámico de las partículas se determinó en primer lugar por DLS. La Tabla 4 contiene las principales propiedades coloidales de las partículas producidas con los métodos O-F68 y W-F68, vacías o cargadas con lisozima. Los resultados de partículas vacías del método O-F68, pero sintetizados sin F68 también están incluidos.

Los parámetros de tamaño se calcularon a través de un análisis acumulativo de los datos, que es aplicable para distribuciones de tamaño monomodal estrechas (Hassan, Rana and Verma, 2015). Las micrografías SEM y STEM indican que se podría suponer tal aproximación para las partículas del método O-F68, pero no del W-F68. Por lo tanto, las distribuciones de tamaño de intensidad de los diferentes sistemas se muestran en la figura 11a. La presencia de Pluronic® F68 en el método O-F68 reduce significativamente el tamaño y la polidispersidad de las NP. Esto concuerda con la reducción de la tensión superficial cuando el F68 está en el interfaz (Tabla 3), lo que promueve el proceso de emulsión. Si las NP también están cargadas con lisozima, el tamaño es aún menor, pero la polidispersidad aumenta ligeramente en comparación con las partículas vacías. Las propiedades surfactantes de la lisozima se han demostrado con los resultados de la tensión superficial (Tabla 3).

La Fig. 11a indica la presencia de partículas superiores a 500 nm con el W-F68, que no se correlaciona con las micrografías SEM. Por lo tanto, se utilizó una técnica diferente (NTA) para

obtener información sobre la distribución del tamaño de dichos sistemas (figura 12b). Con NTA, la distribución de tamaños fue consistente con las imágenes SEM. Se encontraron distribuciones de gran tamaño correspondientes a los sistemas multimodales con este método, pero la adición de lisozima condujo a una clara reducción del tamaño. Esto se debe a que la lisozima también actúa como emulsionante en la primera emulsión.

La carga electrocinética de las NP se analizó midiendo la movilidad electroforética. Para comparación, todas las muestras se midieron a pH 7 (tampón de fosfato). En la Fig. 12, se presentan las distribuciones de movilidad electroforética mientras que los promedios correspondientes se muestran en la Tabla 4.

Las NP de PLGA normalmente están cargadas de forma negativa debido a los grupos carboxílicos del polímero. El uso de Pluronic® F68 en el método O-F68 reduce claramente la movilidad electroforética de las NP, lo que indica que algo de Pluronic® está ubicado en la superficie de las NP. Esta reducción se esperaba después de la incorporación de este tensioactivo no iónico al interfaz, ya que la presencia de cadenas de óxido de polietileno causaría un desplazamiento hacia afuera del plano de corte donde se define el potencial, y esto disminuiría posteriormente la movilidad electroforética. Los resultados previos para partículas de PLGA han mostrado una reducción significativa directamente relacionada con el recubrimiento de poloxámero (Santander-Ortega *et al.*, 2006). Si comparamos los dos sistemas, la superficie menos negativa para las NP OF68 se relacionaría con una menor densidad del polímero PLGA de superficie, llevando la carga eléctrica negativa a el interfaz. Este resultado estaría en línea con la mayor cantidad de PLGA en la formulación del nanosistema WF68.

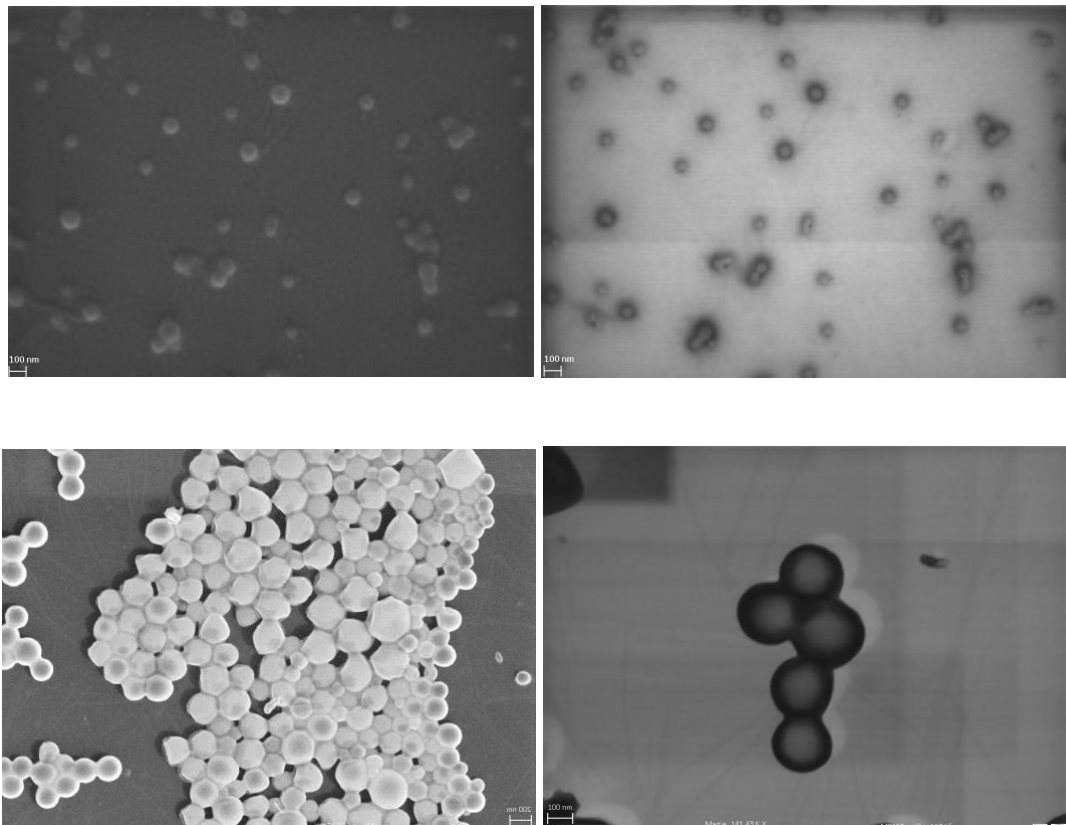
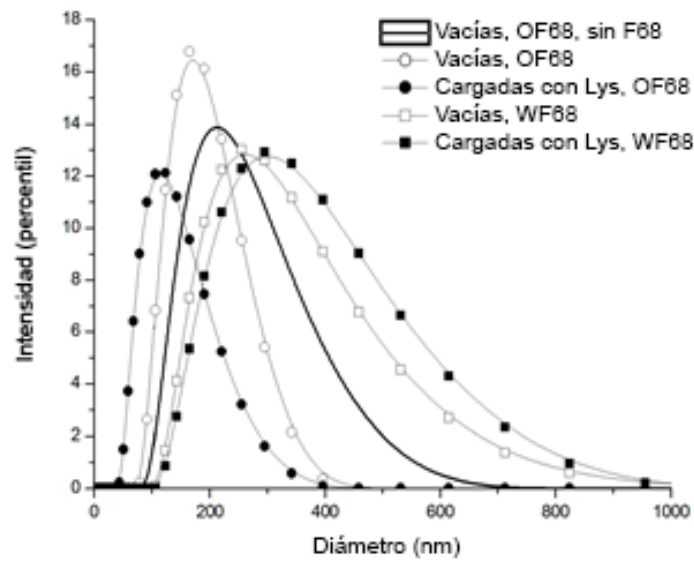


Figura 10. Micrografías SEM y STEM de partículas cargadas de lisozima usando el método O-F68 (a) o W-F68 (b).

		Media Z (nm)	PDI	Media-μ ($\mu\text{mcm/Vs}$)
Método O-F68	Vacío, sin F68	266 \pm 7	0.293	-5.06 \pm 0.15
	Vacío	162.7 \pm 2.1	0.081	-4.29 \pm 0.18
	Cargada de Lisozima	121.0 \pm 1.2	0.244	-3.34 \pm 0.07
Método W-F68	Vacío	273 \pm 3	0.193	-5.31 \pm 0.11
	Cargada de Lisozima	293 \pm 4	0.169	-4.212 \pm 0.013

Tabla 4. Propiedades coloidales de PLGA NP de diferentes métodos de formulación. Se midieron en tampón de fosfato (pH 7). El diámetro hidrodinámico promedio (media Z o media acumulada) y el índice de polidispersidad (PDI) se determinan a partir de DLS. (Media \pm s.d., n = 3).

(a)



(b)

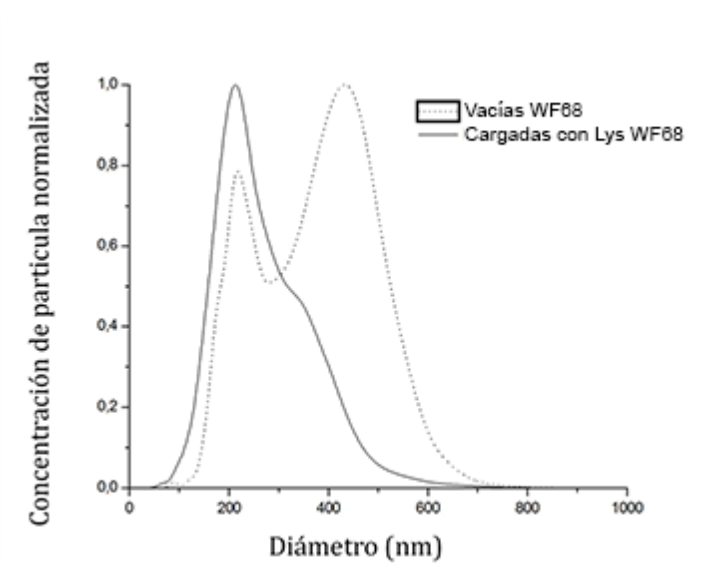
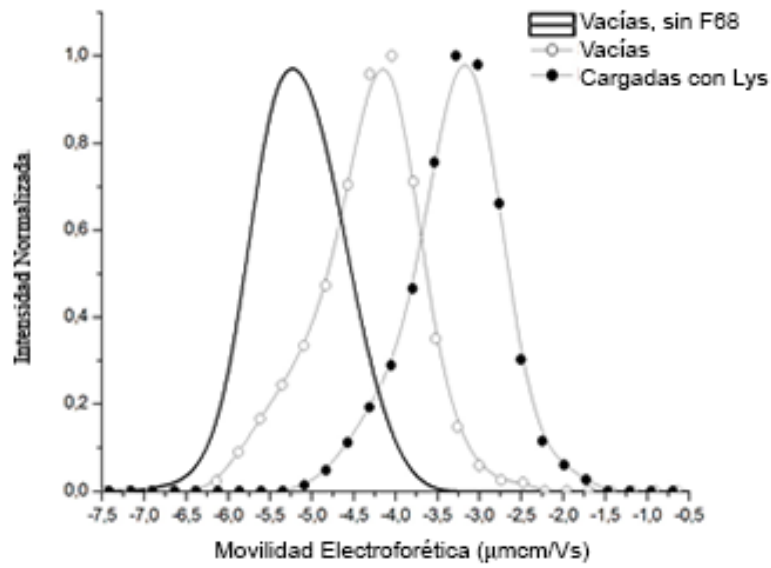


Figura 11: Distribución del diámetro hidrodinámico, (a) mediante DLS a pH 7 (tampón de fosfato) de partículas de PLGA vacías y cargadas con lisozima de los métodos O-F68 y W-F68; y (b) mediante NTA a pH 7 (tampón de fosfato) de partículas de PLGA vacías y cargadas con lisozima del método W-F68.

(a)



(b)

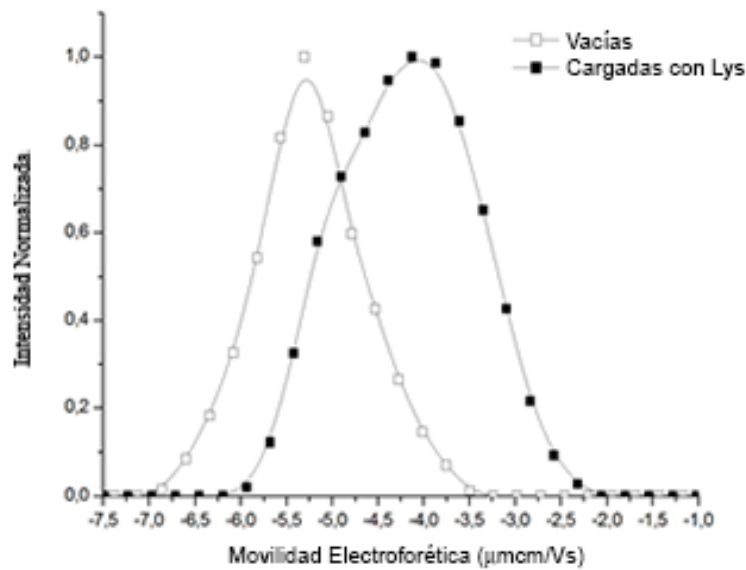


Figura 12. Distribución de movilidad electroforética a pH 7 (tampón de fosfato) de partículas de PLGA cargadas con lisozima y vacías a partir de los métodos (a) O-F68 y (b) W-F68.

Cuando la lisozima también se utiliza en la síntesis, la superficie es aún menos negativa, lo que podría explicarse por la presencia de alguna proteína (cuya carga neta es positiva) cerca o en el interfaz. Este último efecto también se encuentra con el método W-F68. La atractiva interacción electrostática entre los residuos de ácido terminales negativos de PLGA y las moléculas de lisozima juega un papel clave en el proceso de encapsulación de proteínas (Paillard-Giteau *et al.*, 2010) o adsorción (Cai *et al.*, 2008) en PLGA NPs, que afecta la carga final de proteínas

En relación con esta situación, una característica importante de la formulación de encapsulación W-F68 es que la fase acuosa tiene un pH de 12, lo que permite una carga neta negativa de lisozima y, por lo tanto, evita la atracción electrostática de la proteína y el polímero. Esta situación puede reducir la eficacia de la encapsulación, pero al mismo tiempo favorece el posterior proceso de difusión de proteínas y, en consecuencia, la liberación a corto plazo.

Estudios recientes han propuesto el uso de nanopartículas incrustadas en *scaffolds* impresos en 3D prediseñados (Baumann *et al.*, 2017) (Lee *et al.*, 2017), lo que nos lleva a analizar la estabilidad de las dos formulaciones en varios medios generalmente empleados durante la preparación de otras estructuras. Se encontraron distribuciones de tamaño similares al original para las dos formulaciones en diferentes medios (PB, PBS y DMEM) y en diferentes momentos después de la síntesis (0, 1 y 5 días). La carga eléctrica de los grupos terminales de ácido PLGA y las moléculas de poloxámero ubicadas en la superficie NP confiere un mecanismo de estabilidad coloidal combinado electrostático y estérico, como se ha descrito previamente (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010) (Santander-Ortega *et al.*, 2006). Además, las NPs en todos los casos mantienen su tamaño almacenado a 4 ° C al menos durante 1 mes (datos no mostrados). Por lo tanto, los medios descritos podrían usarse potencialmente como medios de almacenamiento o para preparar otras soluciones o *scaffolds* antes de colocarlos realmente en el entorno vivo (in vitro o in vivo).

12.NMR de las nanopartículas

En la Fig. 12, tanto las NP vacías como las cargadas de proteínas presentan una movilidad electroforética menos negativa que las NP vacías sin F68, lo que podría explicarse por la presencia de Pluronic® F68 en la superficie de la NP. Al comparar los espectros ¹HNMR de Pluronic® F68 libre y las NP cargadas con lisozima de los métodos O-F68 y W-F68, podemos verificar la presencia de F68 en la superficie de las NP (figura 13) por los picos que se muestran entre 3.25 y 3.75 ppm y a 1 ppm. Estos picos también son visibles en los espectros de NP formulados con F68 (O-F68 y W-F68, figuras 14 y 15, respectivamente).

RMN de las nanopartículas

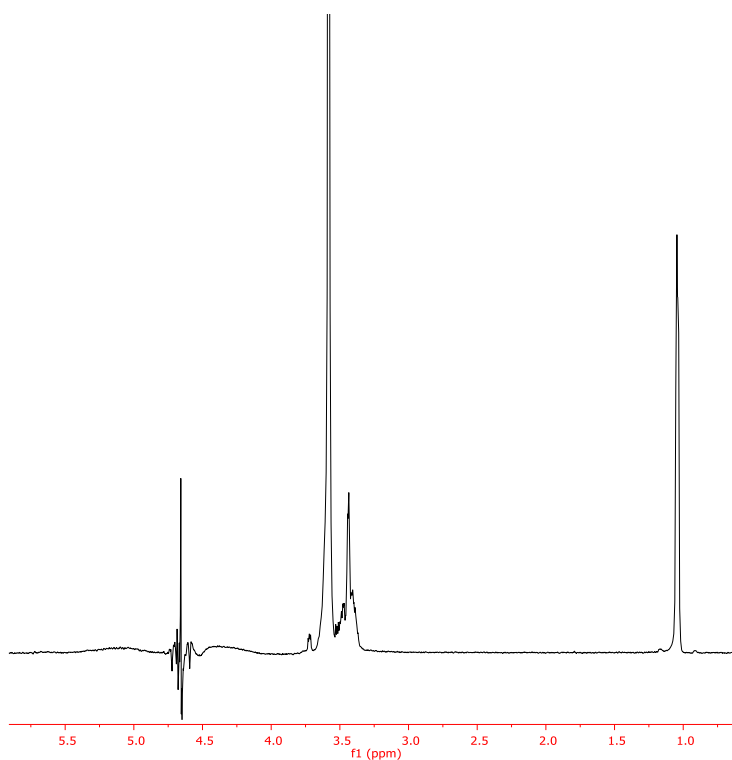


Figura 13. Espectro ¹HNMR de F68 libre.

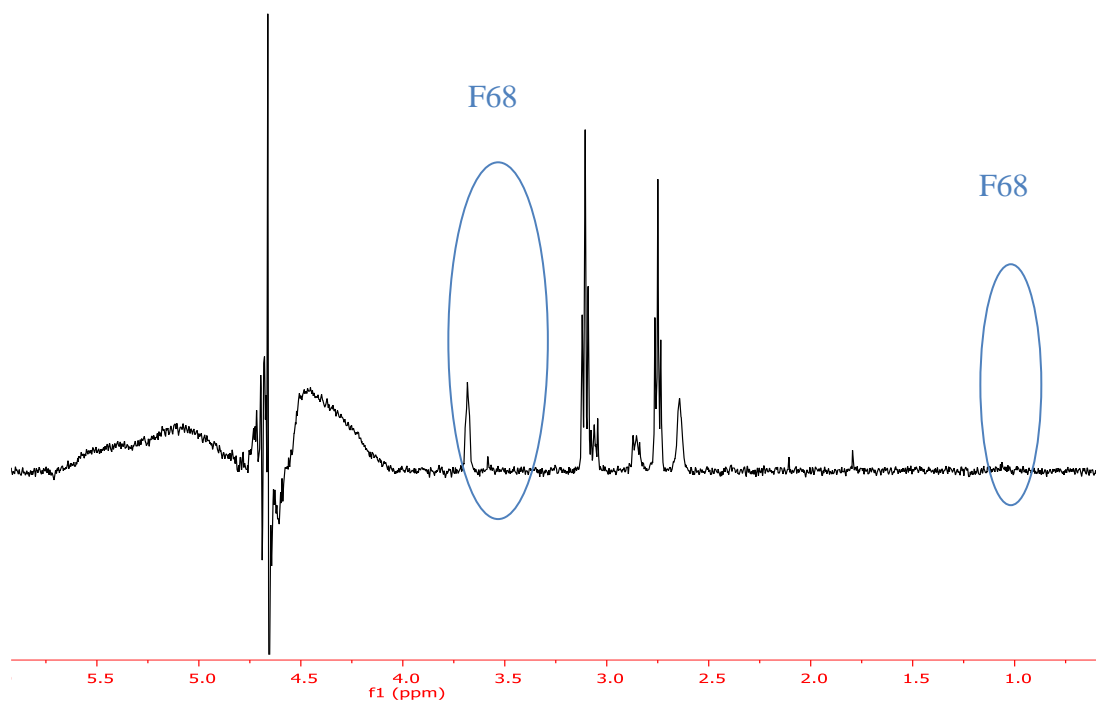


Figura 14. Espectro de 1HMNR de partículas cargadas con lisozima del método O-F68.

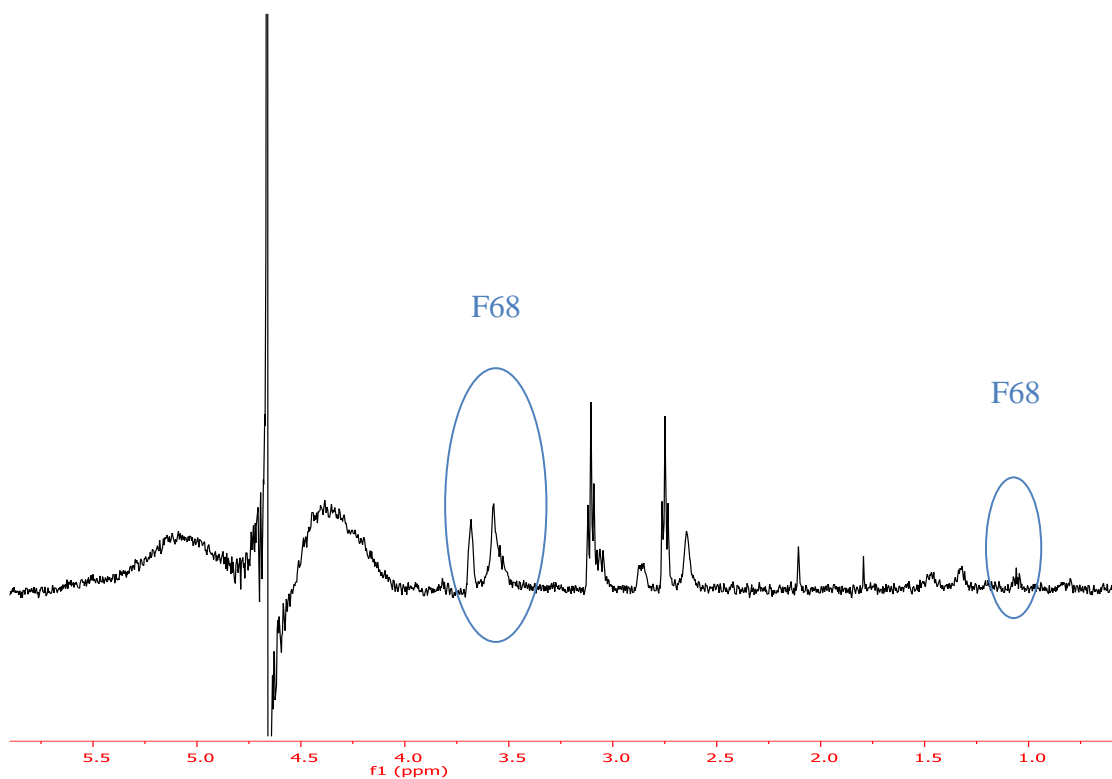


Figura 15. Espectro de 1HMNR de partículas cargadas con lisozima del método W-F68.

4.3.3 Actividad biológica e interacciones

Una liberación controlada desde un sistema de administración basado en PLGA es una tarea difícil, ya que depende de múltiples factores: el tipo de PLGA, el solvente, el estrés mecánico, el uso de surfactantes, etc (Hines and Kaplan, 2013). La difusión de la proteína y la erosión del polímero son los principales mecanismos implicados en la liberación de proteína en los sistemas de administración basados en PLGA. Además, es típico encontrar una liberación en forma de una rápida ráfaga en la etapa inicial, seguida de una fase de liberación lenta, en un corto y mediano plazo. En esta fase, las moléculas de proteína se difunden a través de la matriz del polímero hasta alcanzar una fase final en la que la degradación del polímero por hidrólisis permite una liberación más rápida (Fredenberg *et al.*, 2011).

Por otro lado, la liberación a corto plazo es de especial interés para el transporte de factores de crecimiento morfogenéticos óseos (BMP). Una explosión inicial controlada seguida de una liberación sostenida mejora significativamente la regeneración in vivo de hueso (Ortega-Oller *et al.*, 2015) y cartílago (Begam *et al.*, 2017) incluso en sistemas de liberación controlada doble (Kim and Tabata, 2015). Por estas razones, centramos nuestro análisis en la liberación a corto plazo, teniendo en cuenta la reducción de la degradación del polímero por hidrólisis encontrada en sistemas similares para estos primeros pasos (Rescignano *et al.*, 2016).

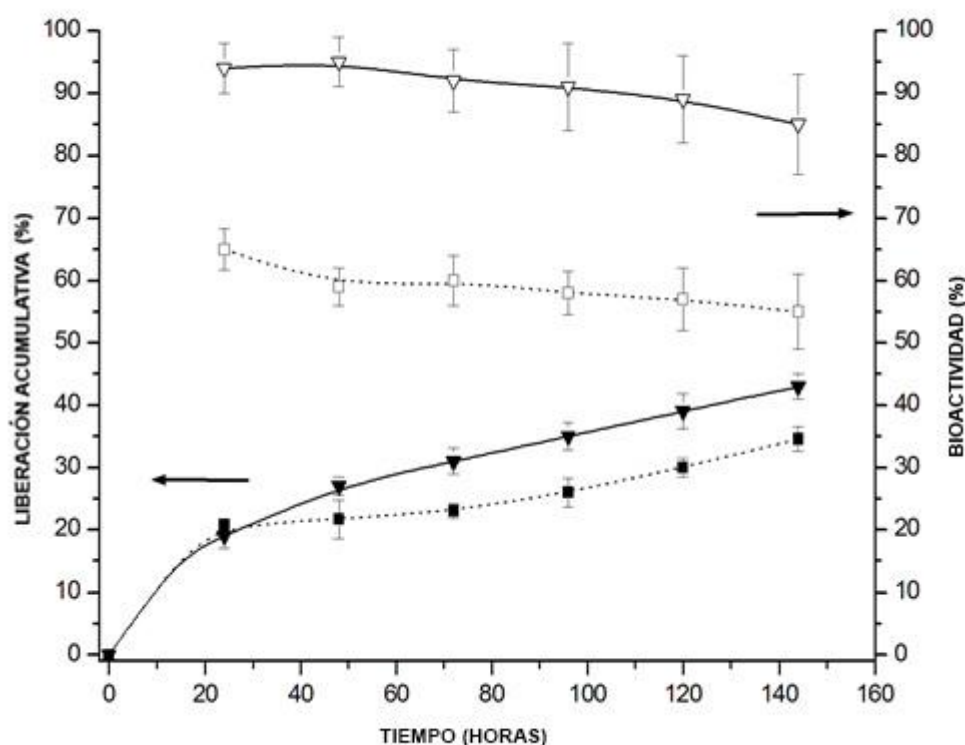


Figura 16. Liberación acumulada (símbolos rellenos) y bioactividad residual (símbolos abiertos) de O-F68-Lys (cuadrado) y W-F68-Lys (triángulo) incubados durante diferentes tiempos a 37 °C en tampón de fosfato salino (pH 7,4) (media \pm sd, n = 3).

La Fig. 16 muestra la liberación acumulativa de lisozima de las NP de O-F68-Lys a corto plazo (siete días). Estos resultados son consistentes con un proceso de dos pasos: un estallido inicial y uno de liberación lenta. El primer paso podría corresponder a la liberación de las moléculas de proteína ubicadas cerca de la superficie, cuya presencia se dedujo de los resultados de movilidad electroforética (Fig. 12). La segunda parte del proceso de liberación fue limitada y lenta debido a la difusión de proteínas a través de la matriz de la cubierta polimérica. La interacción electrostática específica entre las moléculas de lisozima positiva y los grupos dxe ácido terminal negativo de PLGA puede reducir la difusión de proteínas (Blanco and Alonso, 1998). Cuando se agrega el poloxámero (F68), la interacción entre el surfactante y la proteína ayuda al proceso de difusión, lo que lleva a una liberación más completa y sostenida (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et*

al., 2010). También ayuda a mantener la actividad biológica de la proteína (Paillard-Giteau *et al.*, 2010) (Morille *et al.*, 2013). El poloxámero reduce las interacciones proteína-polímero no específicas (es decir, interacciones hidrófobas) pero no las específicas (electrostática); por lo tanto, la difusión a través de los poros llenos de agua o a través del polímero sigue siendo limitada. En el estudio actual, la fracción de proteína liberada y el patrón de liberación son similares a los encontrados en la literatura para la lisozima encapsulada en nano y micropartículas de mezclas de PLGA y otros polímeros o surfactantes (Meng *et al.*, 2003) (White *et al.*, 2013) (Perez, De Jesus and Griebenow, 2002).

La curva de liberación de proteínas de W-F68-Lys NP (Fig. 16) revela que la tasa de administración inicial es idéntica a la del sistema O-F68, lo que podría significar una proporción similar de proteína encapsulada cerca o en la superficie para ambos sistemas NP. Esto estaría de acuerdo con la disminución análoga en la movilidad electroforética de las NP cargadas con lisozima de la que informaron previamente (Fig. 12). En la segunda parte del proceso, la interacción específica entre la proteína y el polímero está nuevamente presente. Sin embargo, el proceso de difusión en el sistema W-F68 parece mejorar, permitiendo una liberación continua y sostenida después del estallido inicial y alcanzando un valor ligeramente más alto para el tiempo de liberación máximo estudiado. Este resultado podría estar relacionado con la estructura interna de la capa de polímero que permite una mejor hidratación y, por lo tanto, una mejor difusión de la proteína hacia el exterior. Se ha informado previamente que el uso de disolventes orgánicos menos polares, tales como DCM, para formulaciones de partículas de PLGA aumenta la densidad de la matriz de polímero en comparación con disolventes orgánicos más polares tales como EA. Las matrices PLGA resultan más resistentes en el primer caso, pero reducen al mismo tiempo su conectividad y difusión (Bohr *et al.*, 2015). Meng y colaboradores (Meng *et al.*, 2003) encontraron que una eliminación más rápida de EA da como resultado una liberación cinética más lenta de la proteína debido a una disminución en la porosidad de las NP. En cuanto al papel de Pluronic®, Rafati y colaboradores (Rafati *et al.*, 2012) encontraron una mayor concentración de proteína

encapsulada en los poros superficiales, en micropartículas sintetizadas en presencia de surfactante en la segunda fase acuosa de la emulsión. Dado que se introdujo un paso intermedio en nuestra formulación W-F68 en la segunda fase acuosa de la emulsión, la eliminación de la EA por difusión se controló fuertemente, de modo que se esperaba que la porosidad de estas NP aumentara. Esta porosidad mejora la difusión de proteínas, lo que permite un patrón de liberación más estable de acuerdo con el resultado experimental encontrado para este sistema. A pesar del efecto desfavorable de la interacción proteína-polímero electrostático específico en la liberación, la cantidad de proteína liberada en nuestras NP es sustancial, lo que significa que hay otras interacciones inespecíficas que pueden ser moduladas por la presencia de surfactante permitiendo un lanzamiento sostenido. La cantidad de lisozima liberada es similar a la encontrada con la lisozima físicamente adsorbida en la superficie de las nanopartículas de PLGA a pesar de la atracción electrostática (Cai *et al.*, 2008). Además de otras interacciones inespecíficas, la concentración de electrolitos en el medio de liberación podría modular esta atracción electrostática entre la proteína y el polímero, disminuyéndola y facilitando el proceso de liberación (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010).

Otro parámetro notable es la actividad biológica de la liberación *in vitro* de lisozima que se muestra en la Fig. 16. Mientras que en el sistema O-F68 la bioactividad se reduce parcialmente hasta en un 40%, la proteína suministrada por el sistema W-F68 mantiene la actividad por encima del 90% con respecto a la de la lisozima suministrada comercialmente y se resuspende en el mismo tampón de liberación. Como se discutió anteriormente, tanto el solvente orgánico como la interacción hidrofóbica entre la proteína y el polímero a menudo causan la desnaturalización de las proteínas encapsuladas (Paillard-Giteau *et al.*, 2010) (Gaudana *et al.*, 2013). Perez y colaboradores. (Perez, De Jesus and Griebenow, 2002) describen una pérdida parcial de actividad cuando se usa DCM y una solución acuosa de PVA en la segunda etapa de emulsión sin ningún excipiente adicional. El uso de poloxámeros en la formulación reduce tales interacciones, mejora la estabilidad de la proteína y mantiene una capa acuosa que retiene las moléculas de agua

necesarias para la función biológica de la proteína, al mismo tiempo que ayuda a su difusión. Esta situación, junto con el uso de un solvente orgánico débil como EA, ayuda a preservar la actividad biológica de la lisozima, como se encuentra para el sistema W-F68-Lys.

La Fig. 17 presenta diferentes imágenes de microscopía confocal relacionadas con el proceso de liberación de NPs W-F68 cargadas de lisozima. Una disminución en la intensidad de fluorescencia fue apreciable a lo largo del experimento *in vitro*. Además, la agregación del sistema es visible a medida que avanza el proceso de incubación. El análisis de estas imágenes es consistente con los resultados informados previamente para este sistema NP.

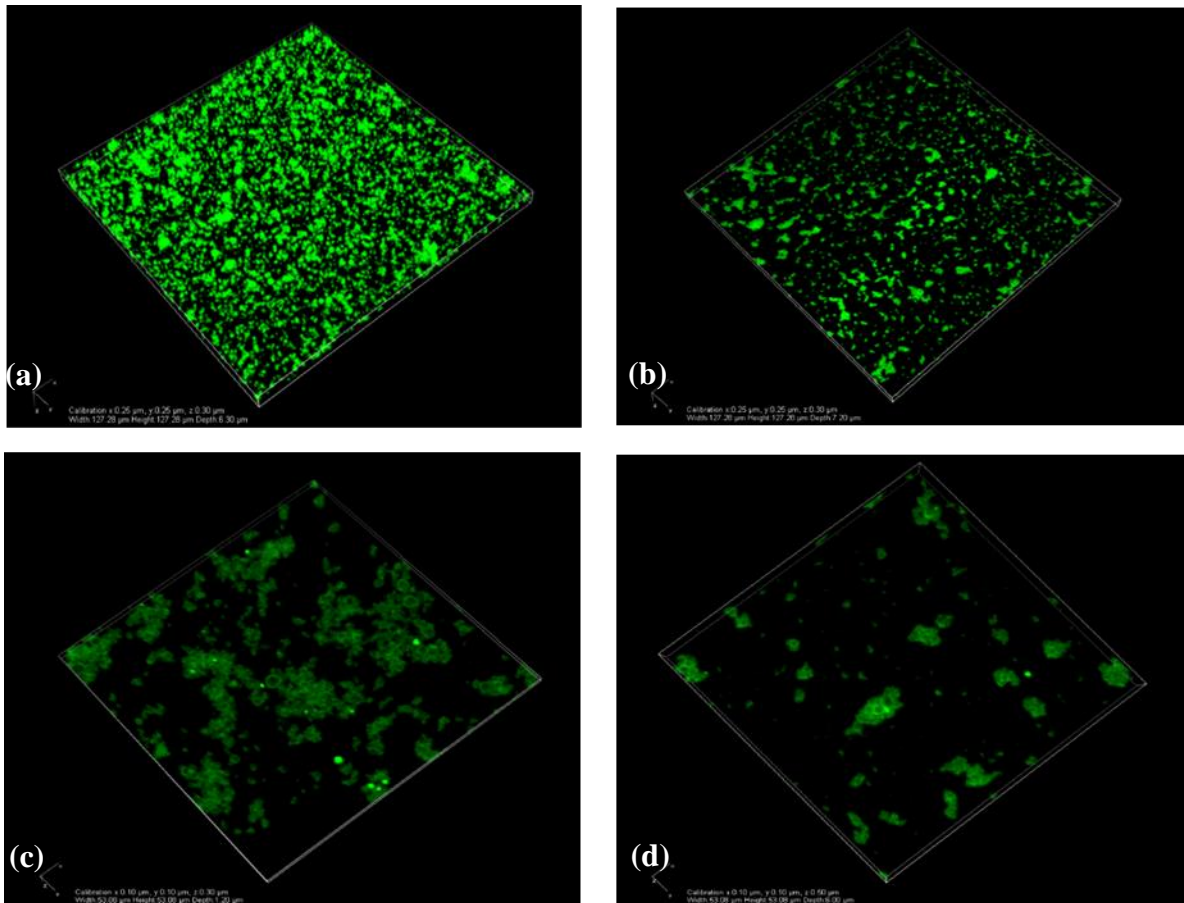


Figura 17. *Actividad biológica e interacciones. Imágenes octogonales obtenidas por microscopía confocal de Lisozima-FITC encapsulado en NPs W-F68 tras su incubación a diferentes tiempos en tampon fosfato salino (pH 7,4) a 37°C. Las NP se centrifugaron previamente para eliminar la proteína marcada liberada. (a): Experimentos previos al lanzamiento; (b): después de 24h; (c): después de 72h; (d): después de 168h.*

13. Captación celular

La captación celular de NP de PLGA es un proceso conocido que se ve afectado principalmente por las propiedades de superficie, la funcionalización (Loureiro *et al.*, 2016) y la agregación de partículas (Xiong *et al.*, 2011). La internalización y el procesamiento intracelular posterior de las partículas se ha descrito como un proceso activo; por lo tanto, depende de la energía y puede verse afectado por otros factores que alteran la absorción de energía por parte de las células, como la temperatura (Penalosa *et al.*, 2017). Las partículas pueden internalizarse mediante varios métodos de endocitosis, que dependen principalmente del tamaño de la partícula: partículas

dependientes de caveolina (diámetro ≈ 60 nm), independientes de clatrina (diámetro ≈ 90 nm) y dependientes de clatrina (diámetro ≈ 120 nm) (Vasir and Labhassetwar, 2007) (Yameen *et al.*, 2014). Una vez internalizados, alrededor del 65% se exportan al espacio extracelular antes de liberar cualquiera de sus contenidos, mientras que el resto libera lentamente la molécula encapsulada en el espacio intracelular (Panyam and Labhassetwar, 2003).

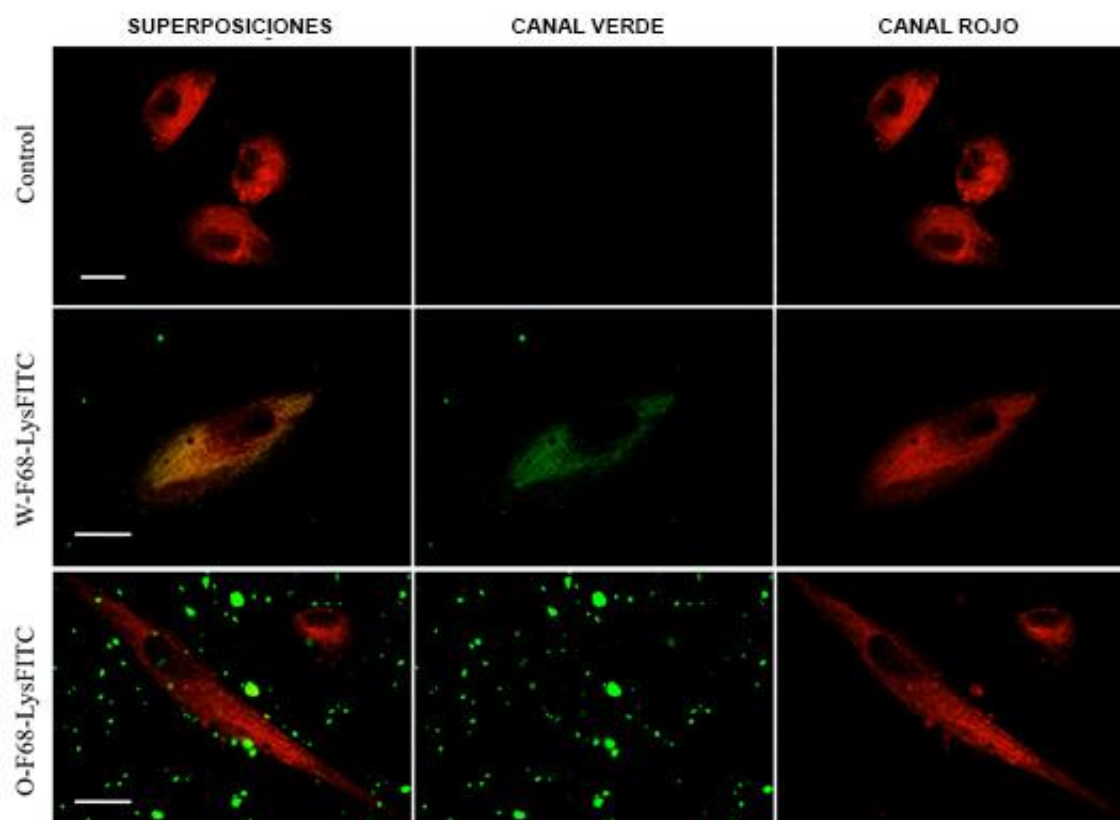
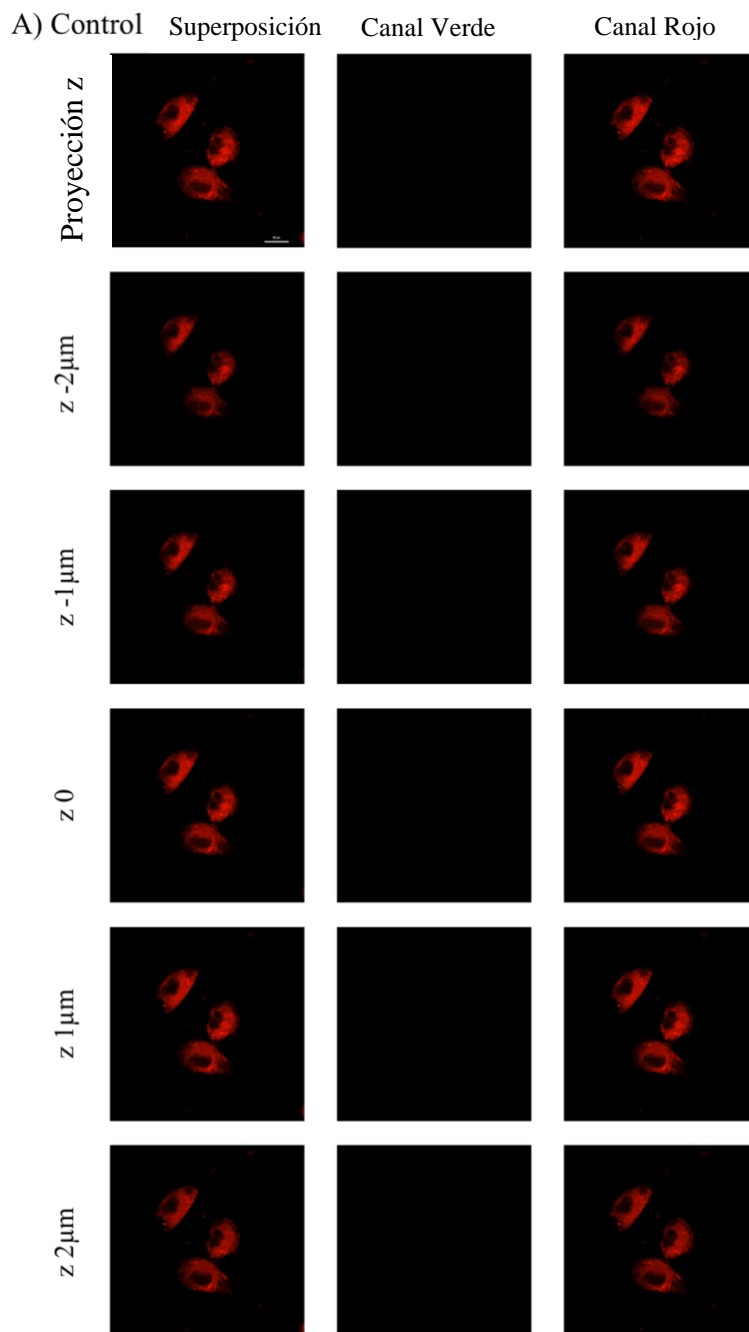
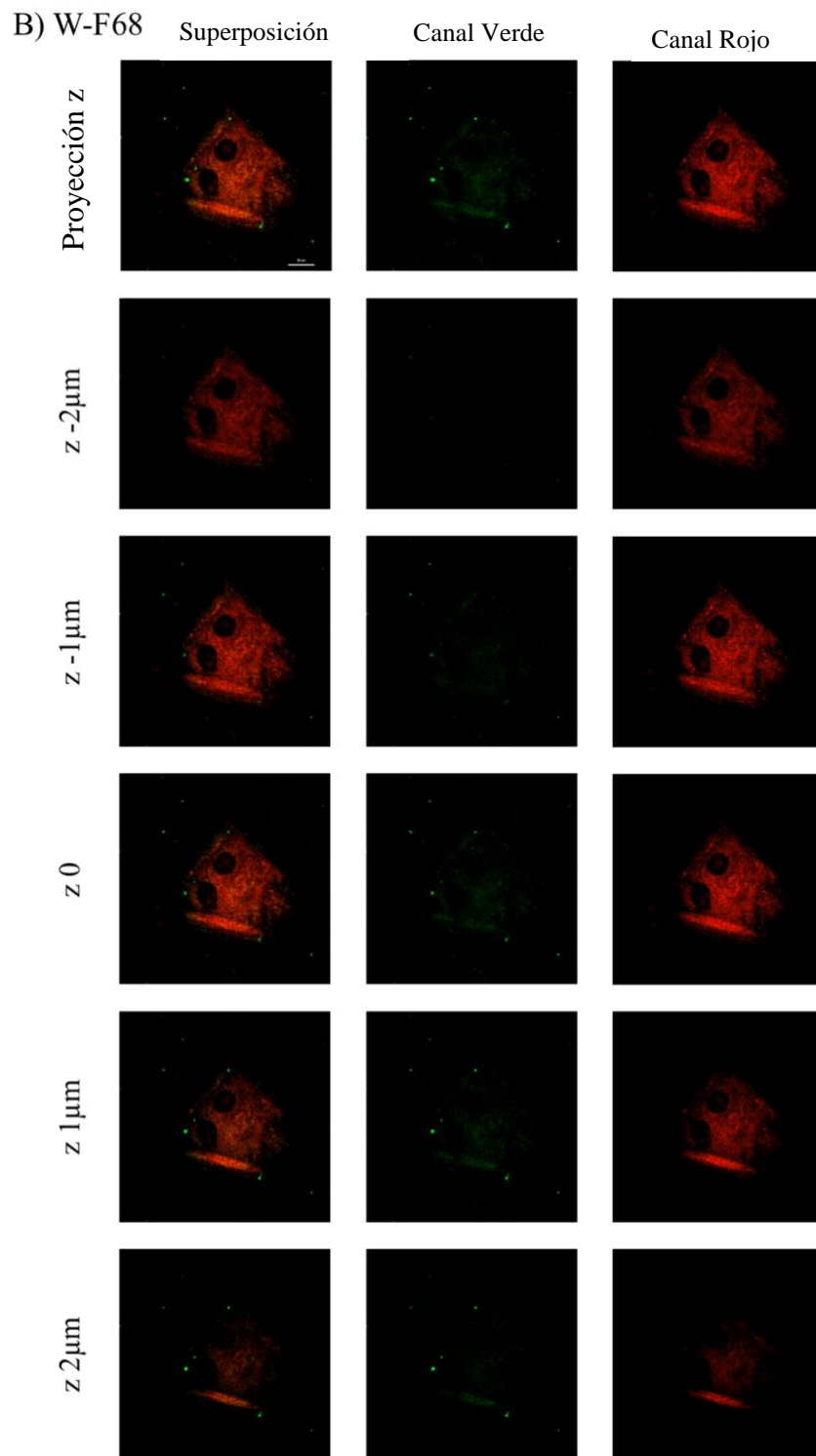


Figura 18. Proyección *z* de 5 imágenes de hMSCs visualizadas 30 minutos después de la incubación con W-F68-LysFITCNPs or O-F68-LysFITCNPs. Las hMSC se marcaron previamente con Guía celular roja. Barra de escala 20 m.

El proceso de liberación intracelular se ve afectado por la formulación de las partículas (Penaloza *et al.*, 2017). Hemos demostrado que los sistemas propuestos siguen un patrón similar a otros publicados anteriormente. En un periodo de tiempo tan corto, como 30 minutos después de la incubación, las NPs de W-F68-LysFITC fueron absorbidas por las células (Fig. 18). Algunas partículas W-F68 todavía estaban en el medio, por lo que la actividad dual podría ocurrir. Por el

contrario, las NP de O-F68-LysFITC se vieron afectadas por la agregación y, por lo tanto, no alcanzaron adecuadamente el espacio intracelular (Fig. 18; para las imágenes del eje Z, véase la Fig. 19).





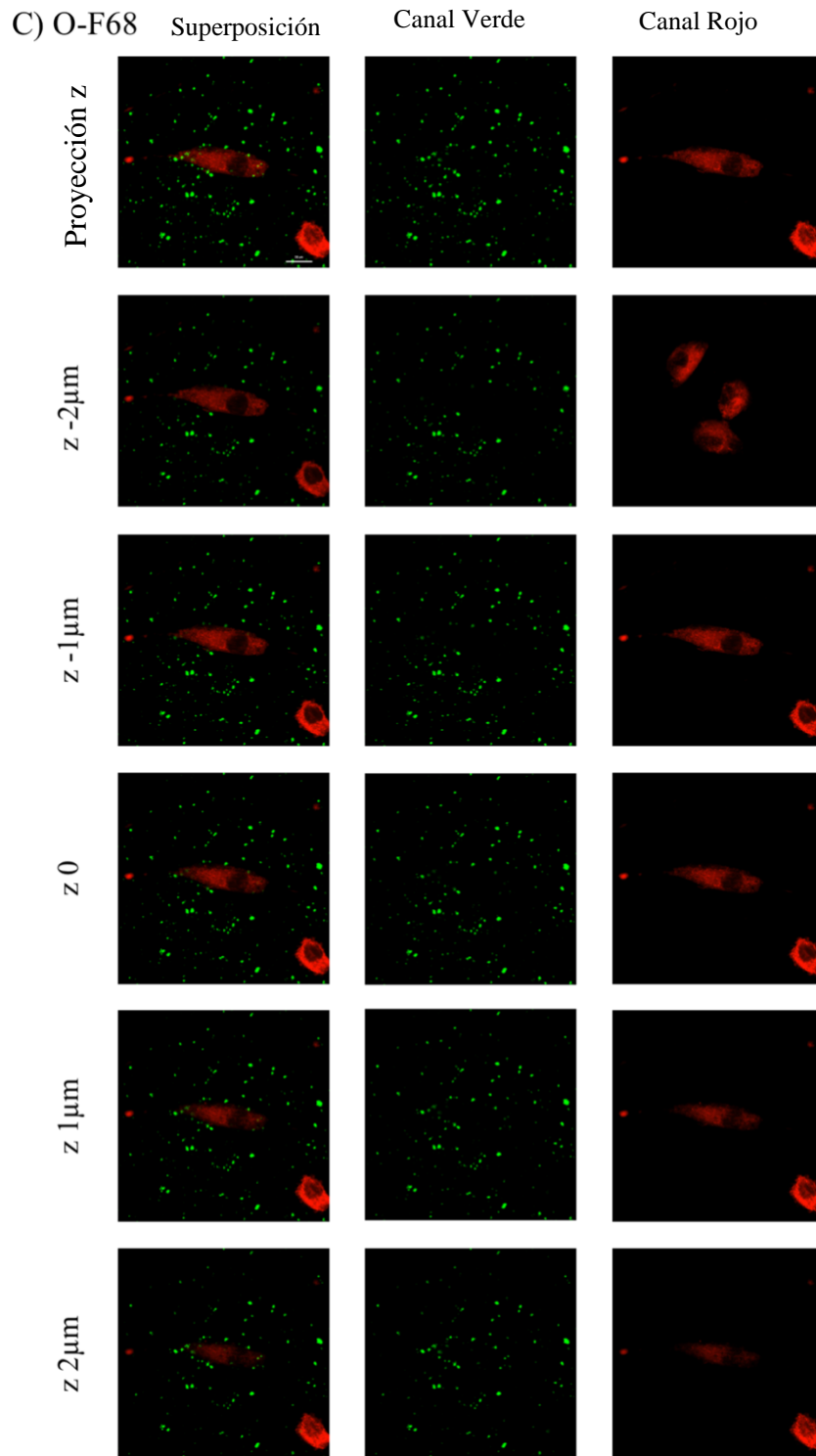


Figura 19. Proyección z de 5 imágenes e imágenes z independientes de hMSC visualizadas 30 minutos después de la incubación sin partículas y con NP W-F68-LysFITC o NP O-F68-LysFITC. Las hMSC se marcaron previamente con un rastreador celular rojo. Barra de escala 20 μm.

Esto contradice los análisis previos de la estabilidad coloidal en PB, PBS y DMEM. Este hallazgo puede explicarse por el hecho de que, aunque el medio de cultivo fue DMEM, este último medio se complementó con suero fetal bovino, y las células liberan muchos factores al medio extracelular que pueden afectar a este tipo de partículas. Ninguno de los sistemas demostró ser tóxico para las células (Fig. 20). No hay estudios disponibles que hayan informado algún efecto de la lisozima sobre las hMSC.

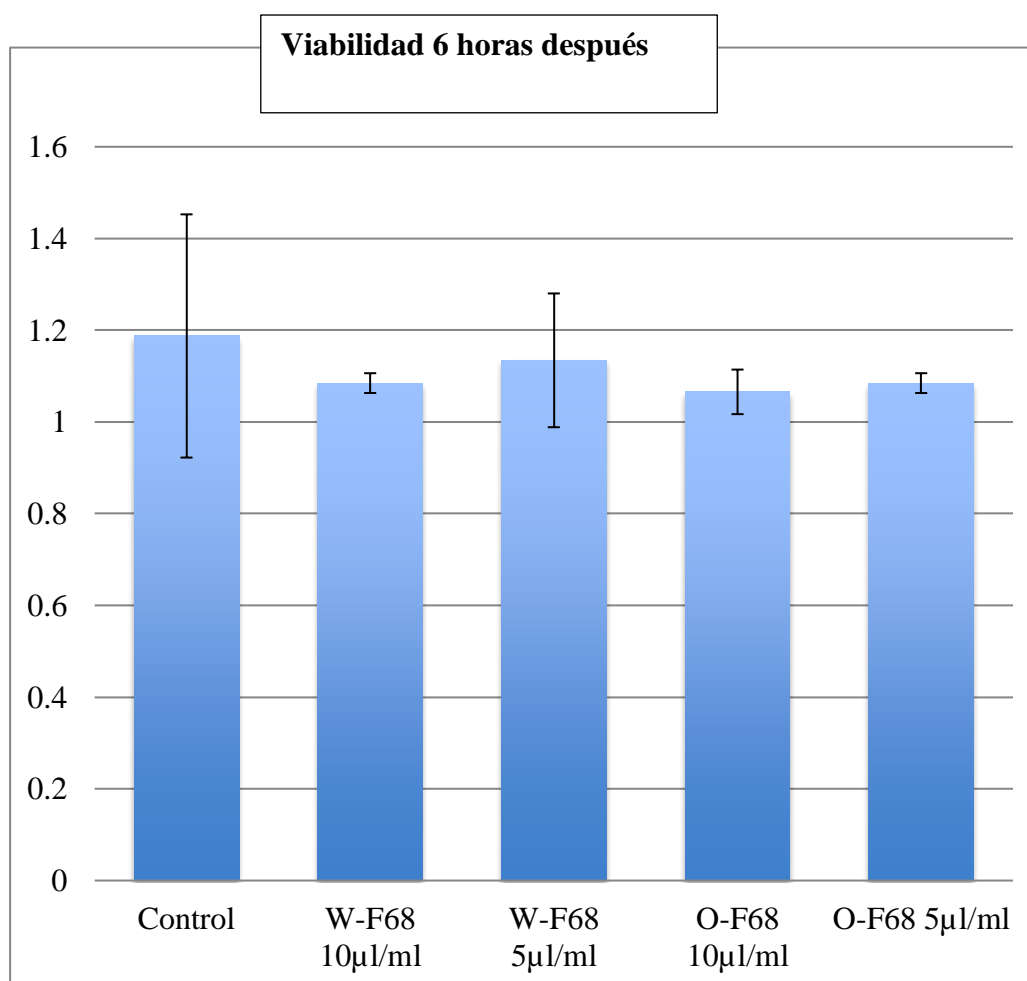


Figura 20. Pruebas de viabilidad a las 6 horas de añadir diferentes dosis de partículas. A continuación, se separaron las células, se tiñeron con azul tripán y se contaron las células vivas o muertas. El gráfico representa células vivas normalizadas y la desviación estándar de tres experimentos. No se encuentran diferencias.

5.FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN COLOIDAL Y EFECTO BIOLÓGICO IN VITRO DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CARGADAS CON BMP-2 PARA LA REGENERACIÓN ÓSEA.

5.1 Antecedentes

En el contexto de la nanomedicina, la regeneración de tejidos usando micro y nano estructuras coloidales que tienen un tamaño y actividad superficial únicos ha recibido una atención creciente en los últimos años. Se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la ingeniería de estos nano-sistemas con el fin de alcanzar una entrega "inteligente" de moléculas bioactivas para optimizar sus ventajas terapéuticas y minimizar los efectos secundarios nocivos (van Rijt and Habibovic, 2017). Con este objetivo, hay descrito un amplio espectro de nanoportadores biocompatibles, que muestran propiedades adecuadas para diferentes aplicaciones biológicas y terapéuticas (Kumar *et al.*, 2017). Entre estas variadas propuestas, los nanosistemas poliméricos representan un grupo importante siendo el PLGA uno de los más utilizados debido a las propiedades comentadas anteriormente a lo largo de este trabajo, entre ellas destaca su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja citotoxicidad, así como su capacidad para administrar una amplia variedad de moléculas y fármacos activos, moléculas sintéticas o naturales con propiedades hidrofílicas o hidrofóbicas, y biomoléculas de proteínas a ácidos nucleicos (Danhier *et al.*, 2012) (Ding and Zhu, 2018) (Arias *et al.*, 2015), obteniendo la aprobación de diferentes agencias farmacéuticas para uso humano (Mir, Ahmed and Rehman, 2017) (Jana and Jana, 2017).

Dentro de la ingeniería de tejidos, en el campo de la odontología, las técnicas de regeneración ósea empiezan a despertar un gran interés por parte de los diferentes profesionales de la salud, contribuyendo con ello a un mayor desarrollo de estas líneas de investigación y generando una mayor tendencia a diferentes vías de crecimiento relacionadas con el subsanamiento de los obstáculos que pueden originarse durante el proceso de encapsulación de moléculas hidrofílicas o en el de funcionalización específica de la superficie a fin de mejorar la versatilidad de las diferentes moléculas, supuestos éstos, en los que el PLGA es el polímero de referencia para la

comunidad científica en aras de crear NP para favorecer la cicatrización ósea (Bapat *et al.*, 2019). La literatura describe el suministro de moléculas bioactivas, normalmente factores de crecimiento, utilizando micropartículas poliméricas (MP) y NP con PLGA como componente principal (Ortega-Oller *et al.*, 2015). Entre los factores de crecimiento morfogenético óseo, la BMP-2 (proteína morfogenética ósea 2) ha sido la más citada, con muchos ejemplos en los que la encapsulación o la adsorción en la superficie permite una eficiencia de atrapamiento adecuada y diversos patrones de liberación (Ji *et al.*, 2010) (Kirby *et al.*, 2011) (Qutachi, Shakesheff and Buttery, 2013) (Wang *et al.*, 2015) (Zhang *et al.*, 2016). Para las proteínas con una vida media muy corta, como las BMP, los nanosistemas PLGA biodegradables proporcionan protección y una dosis óptima para una estimulación adecuada de la diferenciación celular (Begam *et al.*, 2017) (Balmayor *et al.*, 2009).

Por lo tanto, dentro de este escenario, en el presente trabajo, buscamos optimizar un sistema de nanopartículas para llevar a cabo y controlar la liberación de BMP-2 utilizando como punto de partida el procedimiento de síntesis de un sistema de NP cargado de lisozima, previamente descrito para la encapsulación de ese modelo de proteína (Ortega-Oller *et al.*, 2017). Además, para encapsular BMP-2, preparamos un segundo sistema en el que esta proteína se co-adsorbió con albúmina de suero bovino en la superficie de NP vacías. Hemos estudiado el tamaño y la morfología, la eficiencia de la encapsulación de proteínas, las características de la superficie y la estabilidad coloidal y temporal para completar la caracterización fisicoquímica de ambos sistemas NP.

El perfil de liberación de BMP-2 indica el potencial de un nanoportador PLGA para la regeneración ósea y depende en gran medida de la degradación del polímero por hidrólisis (Xu *et al.*, 2017). Sin embargo, a corto plazo, durante el cual la liberación no depende de esta degradación química, es necesario un control adecuado de la liberación para modular otros procesos físicos. Por lo tanto, enfocamos nuestros experimentos de liberación a corto plazo utilizando diferentes técnicas para comparar las dos muestras de NP y establecer los perfiles de liberación de BMP-2

correspondientes. Finalmente, la actividad biológica (migración celular, proliferación y diferenciación osteogénica) se probó in vitro utilizando células estromales mesenquimales (MSC) derivadas del hueso alveolar (Padiál-Molina *et al.*, 2019).

5.2 Materiales y Métodos

5.2.1 Síntesis de nanoparticulas

14. Formulación

El ácido-poli (lactico-co-glicólico) (PLGA 50:50) $([C_2 H_2 O_2]_x [C_3 H_4 O_2]_y)$ $x = 50, y = 50$ (Resomer® 503H) 32 - 44 kDa, se usó como polímero. El surfactante polimérico Pluronic® F68 (Poloxámero 188) (Sigma-Aldrich) se usó como el emulsionante. Su estructura se basa en un copolímero tri-bloque de poli (óxido de etileno) PEO y poli (óxido de propileno) PPO, $(PEO)_a - (PPO)_b - (PEO)_a$, con $a = 75$ y $b = 30$. La lisozima de huevo de gallina (Sigma-L7651) se usó como proteína hidrófila. La proteína morfogenética ósea recombinante humana, rhBMP-2 (Sigma-H4791), se utilizó como biomolécula terapéutica. El agua se purificó en un sistema Milli-Q Academic Millipore. Se usó un método de síntesis de doble emulsión siguiendo un procedimiento previamente descrito con ligeras modificaciones (Ortega-Oller *et al.*, 2017). En este método, se disolvieron 100 mg de PLGA y 3 mg de ácido desoxicólico (DC) en un tubo que contenía 1 ml de acetato de etilo (EA) y se sometieron a vórtice. En total, se agregaron 40 μ L de una solución tamponada a pH 12.8, con o sin rhBMP-2 (200 μ g / mL), y se sonicó de inmediato (Branson Ultrasonics 450 Analifier Sonifier) durante 1 min (Dial del ciclo de trabajo: 20%, Dial de control de salida: 4) con el tubo rodeado de hielo. Esta emulsión primaria de W/O se vertió en un tubo de plástico que contenía 2 ml de una solución tamponada (pH 12) de F68 a 1 mg / ml y se agitó en vórtex durante 30 s. Luego, el tubo rodeado de hielo se sonicó a la amplitud máxima de la micro punta durante 1 minuto (control de salida: 7). Esta segunda emulsión W/O/W se vertió en un vaso que contenía 10 ml de la solución F68 tamponada y se mantuvo bajo agitación magnética durante 2 minutos. El disolvente orgánico se extrajo rápidamente por evaporación al

vacío hasta un volumen final de 8 ml. Los sistemas de NP encapsulados vacíos y BMP-2 resultantes se denominaron NP y NP-BMP2, respectivamente. En la Figura 21 se muestra un esquema detallado del procedimiento de síntesis, con un rendimiento basado en el componente PLGA siempre superior al 85%.

15.Limpieza y almacenamiento

Después de la evaporación del solvente orgánico, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 20 ° C a 12,000 rpm. El sobrenadante se filtró usando nanofiltros Millipore, 0.1 µm para medir la proteína libre no encapsulada. El sedimento se resuspendió en tampón fosfato (NaH₂PO₄ 1,15 mM), PB, hasta un volumen final de 4 ml y se mantuvo refrigerado a 4°C. En estas condiciones, los sistemas mantuvieron la estabilidad coloidal al menos durante un mes.

16.Carga de proteínas y eficiencia de encapsulación

La carga inicial de proteínas se optimizó para la formulación de nanopartículas, preservando la estabilidad coloidal final después de la etapa de evaporación y teniendo en cuenta las cantidades mostradas en la literatura para este factor de crecimiento cuando se encapsula dentro de NPs de PLGA (d'Angelo *et al.*, 2010) (Chang *et al.*, 2017). Por lo tanto, elegimos 2 µg como la masa total inicial de rhBMP-2, lo que significa una relación de 2 → 10 5% p / p (rhBMP-2 / PLGA). La cantidad de rhBMP-2 encapsulado se calculó midiendo la diferencia entre la cantidad agregada inicial y la proteína libre no encapsulada presente en el sobrenadante después de la etapa de limpieza, que se probó mediante un ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas específicas siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISA, kit RAB0028 de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Luego, la eficiencia de encapsulación de proteínas (EE) se calculó de la siguiente manera:

$$EE = \frac{MI - MF}{MI} \times 100$$

donde MI es la masa total inicial de rhBMP-2 y MF es la masa total de rhBMP-2 en el sobrenadante acuoso.

17. Adsorción Física de Proteínas

La albúmina de suero bovino (BSA) y la rhBMP-2 se acoplaron en la superficie de nanopartículas vacías mediante un método de adsorción física. El volumen apropiado de una solución de proteína acuosa que contenía 0,5 mg de BSA y 2 µg de rhBMP-2 se mezcló con 5 ml de tampón de acetato (pH 5) que contenía NP vacías con 12,5 mg de PLGA. Esto proporcionó una cantidad inicial de proteínas correspondiente al 0,04% p / p (proteína / PLGA), mientras que la relación de masa entre proteínas fue de 0,4 p / p (rhBMP-2 / BSA). Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 2 h con agitación mecánica. Las nanopartículas se separaron de la solución de tampón por centrifugación, y después de que se filtraran los sobrenadantes (nanofiltros Millipore, 0,1 µm), se analizaron cualitativamente por electroforesis en gel mientras que la cuantificación de proteínas se realizó mediante un ensayo de proteína de ácido bicinonínico (BCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) Para BSA y el ELISA específico para rhBMP-2. El sedimento de nanopartículas se resuspendió en tampón fosfato (pH 7,4) y se almacenó a 4°C. Este sistema se denominó NP-BSA-BMP2.

18. Separación de proteínas por electroforesis en gel, SDS-PAGE

Las NP cargadas de proteína y los diferentes sobrenadantes se trataron a 90 ° C durante 10 minutos en el siguiente tampón: Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8 a 25 ° C), dodecil sulfato de sodio al 2% (p / v) (SDS), 10% de glicerol, 0.01% (p / v) de azul de bromofenol, ditioneitol (DTT) 40 mM. Las muestras se separaron luego por tamaño en gel de poliacrilamida poroso al 12% (electroforesis en gel de poliacrilamida SDS 1D), bajo el efecto de un campo eléctrico. La electroforesis se realizó a voltaje constante (130 V, 45 min) y los geles se tiñeron usando una solución de azul de Coomassie (0.1% de azul brillante de Coomassie R-250, 50% de metanol y 10% de ácido acético glacial) y se destiñeron con la misma solución que carece del tinte.

5.2.2 Caracterización de nanopartículas: morfología, tamaño, concentración y movilidad electrocinética.

Se obtuvieron imágenes de NP mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo SUPRA 40VP Zeiss del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC, UGR).

La distribución del tamaño hidrodinámico de las NP se evaluó mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) con un NanoSight LM10-HS (GB) FT14 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido) y una cámara sCMOS. La concentración de partículas de acuerdo con el diámetro (distribución de tamaños) se calculó como un promedio de al menos tres distribuciones de tamaños independientes. La concentración total de NP de cada sistema se determinó para controlar el número de partículas utilizadas en los experimentos celulares. Las condiciones de medición para todas las muestras fueron 25 ° C, una viscosidad de 0.89 cP, un tiempo de medición de 60 s y una ganancia de cámara de 250. El obturador de la cámara fue de 11 y 15 ms para las NP vacías y cargadas con BMP, respectivamente. El umbral de detección se fijó en 5.

La movilidad electroforética de las NP se determinó utilizando un dispositivo Zetasizer® NanoZeta ZS (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Reino Unido) que funciona a 25 ° C con un láser He-Ne de 633 nm y un ángulo de dispersión 173. Cada punto de datos se tomó como un promedio sobre tres mediciones de muestra independientes. Para cada muestra, la distribución de movilidad electroforética y la movilidad electroforética promedio (μ -promedio) se determinaron mediante la técnica de electroforesis Doppler láser.

5.2.3 Estabilidad coloidal y temporal en medios biológicos

El diámetro hidrodinámico promedio y el índice de polidispersidad (PDI) por dispersión dinámica de la luz (DLS) de cada sistema de NP se midieron en diferentes medios (tampón de fosfato (PB), tampón de fosfato salino (PBS) y medio de cultivo celular: Medio de Eagle modificado de Dulbecco, DMEM (Sigma)). Además, los datos sobre la estabilidad temporal se

obtuvieron repitiendo estos análisis en diferentes momentos después de la síntesis (0, 1 y 5 días) y después de 1 mes en condiciones de almacenamiento.

Los experimentos de liberación *in vitro* se realizaron de la siguiente manera: 1 ml de cada muestra para cada tiempo de incubación se suspendió en PBS a 37 ° C. Después del tiempo correspondiente (24, 48, 96, 168 h), las NP se separaron del sobrenadante de las proteínas liberadas por centrifugación durante 10 min a 14,000 rpm (10 C). El sedimento de NP se suspendió en 1 ml de NaOH 0,05 M y se agitó durante 2 h para una degradación completa del polímero. La solución de proteína alcalina se analizó mediante BCA y ELISA para cuantificar la cantidad inédita. La proteína liberada se calculó teniendo en cuenta la cantidad encapsulada total. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

5.2.4 Interacciones celulares

Para todos los estudios biológicos *in vitro*, se utilizó una población celular cultivada del hueso alveolar maxilar. Esta población se caracterizó previamente y se confirmó que presentaba todas las características de una población de células del estroma mesenquimatoso (MSC) (Padial-Molina *et al.*, 2019). Las células se tomaron de donantes humanos sanos después de la aprobación del Comité de Ética para la Investigación Humana de la Universidad de Granada (424 / CEIH / 2018). Medio de Eagle modificado por Dulbecco regular (DMEM) con 1 g / L de glucosa (DMEM-LG) (Gibco), suero bovino fetal al 10% (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), 1: 100 de aminoácidos no esenciales (NEAA) (Gibco), 0,01 µg / ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (PeproTech, Londres, Reino Unido), 100 U / ml de penicilina / estreptomycin y 0,25 µg / ml de anfotericina B utilizado como medio de cultivo para todos los experimentos. Los cultivos se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera de CO₂ al 5% (2000 células / pocillo). Todos los experimentos biológicos se repitieron por triplicado al menos 3 veces por condición.

19.Migración Celular

Un ensayo de migración celular se realizó como se describió anteriormente (Padial-Molina, Volk and Rios, 2014) (Liang, Park and Guan, 2007). Brevemente, las MSC se distribuyeron en tres pocillos para cada condición y se les permitió crecer hasta una confluencia celular cercana al 99%, en 24 pocillos / placa de 3000 células / cm², y en cada pocillo se realizaron tres rasguños diferentes. Luego, las células se privaron de hambre durante 24 h mediante la adición de medio de cultivo sin suero. Se hizo un rasguño usando una punta de pipeta a lo largo del diámetro del pozo. Se realizó un paso de lavado con PBS para eliminar las células rayadas. Se añadieron nuevos medios de cultivo completos y se suplementaron según el grupo asignado (BMP-2, NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2 a 1,25, 2,5 y 5 ng / ml de BMP-2). Posteriormente, se tomaron nueve imágenes de la misma área en cada condición hasta 48 h más tarde. En estas imágenes, el área raspada se midió con el software ImageJ (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EUA; (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)). La reducción en el área rayada con el tiempo se midió considerando el área en el tiempo 0 como 100% abierta.

20.Proliferación celular

La proliferación se evaluó mediante un ensayo de sulforhodamina (SRB) (Houghton *et al.*, 2007). El ensayo se realizó sembrando las células a 1500 células / cm² en una placa de 96 pocillos a una confluencia no superior al 50%. Después de la unión celular, se agregaron los diferentes suplementos (BMP-2, NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2 a 1,25, 2,5 y 5 ng / ml de BMP-2) y las células se mantuvieron en cultivo durante 7 días. En cada punto de tiempo, las células se lavaron con PBS 1X y se fijaron añadiendo ácido tricloroacético al 10% enfriado con hielo durante 20 minutos a 4°C. Luego, las células se lavaron 3 veces con dH₂O y se secaron hasta que se recogieron todos los puntos de tiempo. Cada pocillo recibió 0.4% de SRB en 1% de ácido acético durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La tinción se terminó lavando cada pocillo 3 veces con ácido acético al 1% y secándolo a temperatura ambiente durante 24 h. El colorante se recuperó de las células añadiendo Tris Base 10 mM a pH 10,5 y agitando suavemente durante 10

minutos. La solución recuperada se distribuyó luego en una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia óptica a 492 nm.

•*Diferenciación osteogénica*

La diferenciación osteogénica se evaluó mediante la adición de medios osteogénicos al cultivo celular en combinación con BMP-2, NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2 libres a las dosis más altas utilizadas en experimentos anteriores. Las células se sembraron a 3000 células / cm² y se cultivaron para alcanzar una confluencia del 85% al 90%. Esto fue seguido por la adición de medios de inducción que contenían 10 mM de glicerofosfato (Fluka, 50020), 0.1 µM de dexametasona (Sigma-Aldrich, D2915) y 0.05 mM de ácido L-ascórbico (Sigma-Aldrich, A8960). Los cultivos celulares se mantuvieron durante 7 días para analizar la actividad temprana. En el día 7, las células se recogieron en 1 ml de TRIzol®. Luego, se extrajo el ARN y se convirtió en ADNc. Luego se evaluó la fosfatasa alcalina (ALP), y se calculó la expresión con respecto a la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) por el método 2 DDCt. Estos procedimientos se llevaron a cabo como describe en otra parte el siguiente autor (Padial-Molina *et al.*, 2019). Las secuencias de cebador directo e inverso fueron AGCTCATTTTCCTGGTATGACAAC y TTACTCCTTGGAGGCCATGTG para GAPDH, TCCAGGGATAAAGCAGGTCTTG y CTTTCTCTTTCTCTGGCACTAAGG para ALP.

•*Evaluación estadística*

La migración y la proliferación celular se evaluaron mediante ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para el análisis por pares. La comparación entre los niveles de ALP a los 4 frente a los 7 días se analizó mediante un par de pruebas *t* de Student. En todos los casos, se estableció un valor *p* inferior a 0,05 como significación estadística.

5.3 Resultados y Discusión

5.3.1 Formulación de nanopartículas

La evaporación de doble emulsión-solvente ha sido descrita como un método robusto y de uso frecuente para producir NP de PLGA cargadas con biomoléculas (Ding and Zhu, 2018) (McClements, 2018) (Ortega-Oller *et al.*, 2015) (Iqbal *et al.*, 2015). Una formulación previamente optimizada por nuestro grupo permitió la preservación de la actividad biológica de biomoléculas encapsuladas usando un solvente orgánico ligeramente agresivo. Además, el ácido desoxicólico se ha utilizado en el primer paso de la formulación para mejorar la estabilidad coloidal de las NP y, simultáneamente, para obtener superficies de NP enriquecidas con grupos carboxílicos, mejorando su versatilidad y permitiendo que un químico posterior de lugar a la inmovilización de diferentes ligandos específicos (Sanchez-Moreno *et al.*, 2013). Por medio de esta formulación mejorada, en el presente trabajo, desarrollamos nanopartículas vacías (NP) o nanopartículas que encapsulan rhBMP-2 (NP-BMP2).

Una descripción esquemática del procedimiento de síntesis se muestra en la Figura 21.

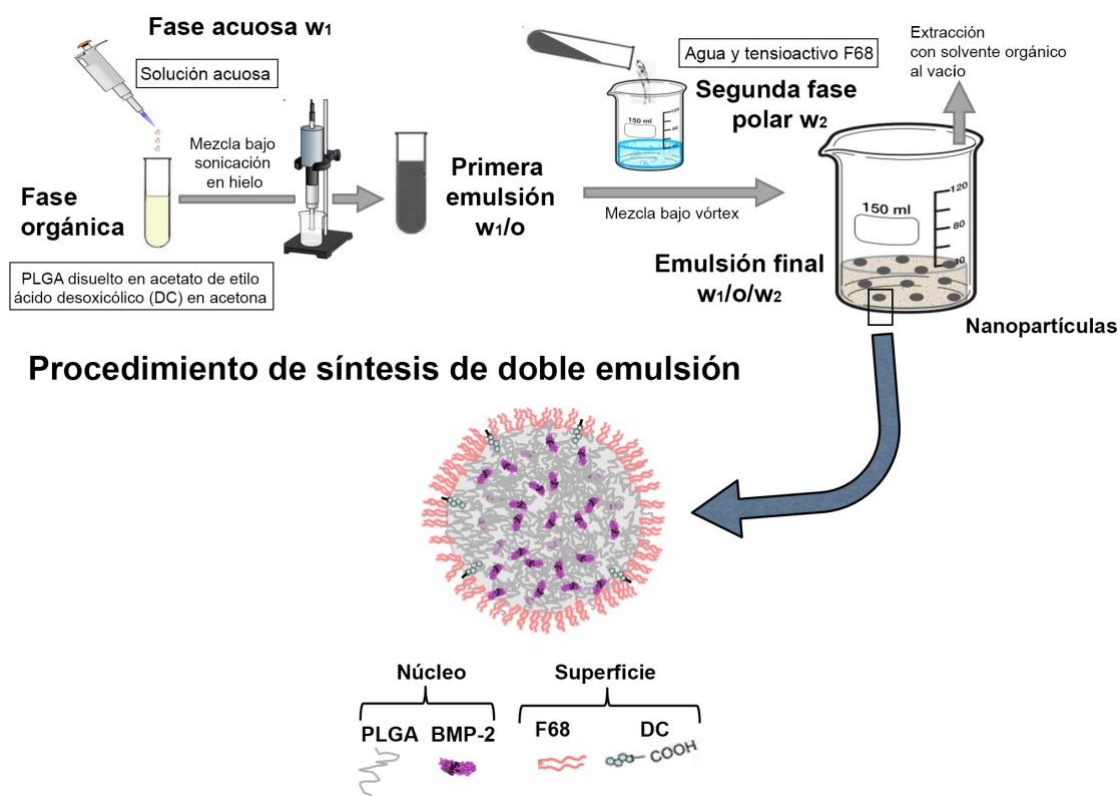


Figura 21. Esquema de la formulación de NP-BMP2.

Para NP-BMP2, logramos una eficiencia de encapsulación de proteínas (EE) de $97 \pm 2\%$. Este resultado es estable en la literatura en la que varios autores han reportado valores igualmente altos que encapsulan esta proteína dentro de nanopartículas y micropartículas de PLGA (Lochmann *et al.*, 2010) (Kempen *et al.*, 2008). Nuestra formulación tiene varios factores que conducen a este elevado valor de EE: La baja relación proteína / polímero en masa (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010), la afinidad de rhBMP-2 a una interacción inespecífica con superficies hidrofóbicas (Lochmann *et al.*, 2010), o la adición de estabilizadores (poloxámero) en el segundo paso del procedimiento de doble emulsión (Ortega-Oller *et al.*, 2015). La ausencia de rhBMP-2 en el sobrenadante resultante de la etapa de centrifugación en el proceso de limpieza se verificó mediante ELISA y SDS-PAGE, en el que se muestra una banda clara correspondiente a 14 kD de cadenas polipeptídicas rhBMP-2 para el carril A en la Figura 22, correspondiente a NP-BMP2. La masa de proteína encapsulada, alrededor de 2 μ g, es similar a la de diferentes micro y

nanosistemas PLGA descritos en la literatura (Wang *et al.*, 2015) (Chung *et al.*, 2007) (La *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta las condiciones de almacenamiento para nuestras muestras, esto corresponde a 500 ng /mL, lo que representa una cantidad suficiente de concentración para aplicaciones prácticas ya que este factor de crecimiento muestra actividades biológicas in vitro en dosis muy bajas (5–20 ng / ml) (Ortega-Oller *et al.*, 2015).

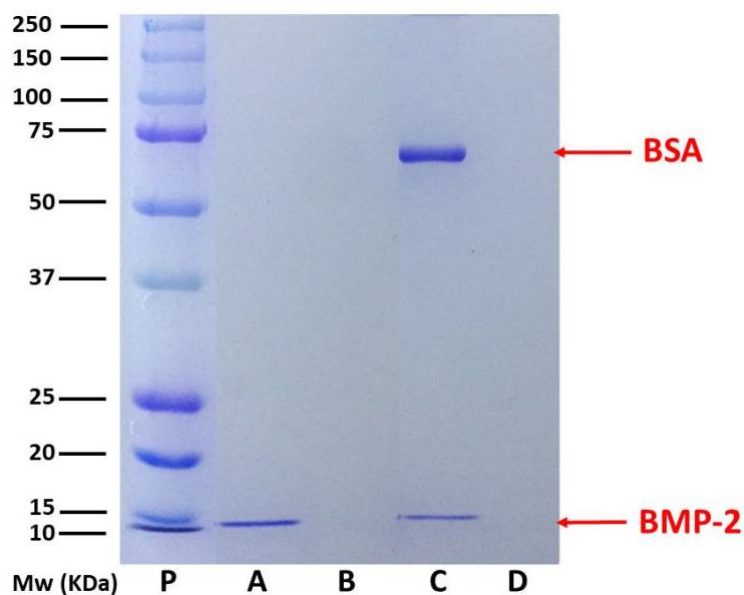


Figura 22. Análisis de electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras de Nanopartículas de PLGA sólidas (NP de PLGA) y fracciones líquidas (sobrenadante) de diferentes sistemas de NP. Carril **P**: proteínas estándares; carril **A**: NP-BMP2 (proteína morfogenética ósea); carril **B**: sobrenadante de NP-BMP2 después de la síntesis y encapsulación de rhBMP-2; carril **C**: NP después de la adsorción física de BSA / rhBMP-2; carril **D**: sobrenadante después de la adsorción física de BSA (albúmina de suero bovino) / rhBMP-2 en el sistema NP.

Por otro lado, resultó un segundo nanosistema, modificando la forma en que rhBMP-2 es incorporado en el nanoportador. Hay varios ejemplos de adsorción superficial de diferentes factores de crecimiento en micro y nanopartículas (La *et al.*, 2010) (Fu *et al.*, 2012) (Rahman *et al.*, 2014), y la inmovilización de la superficie sobre la encapsulación recientemente se ha

propuesto como una forma de modular la liberación posterior de biomoléculas. Este proceso, que depende de la lenta difusión de las biomoléculas a través de la matriz polimérica, está en consecuencia altamente influenciado por la interacción proteína-polímero (Pakulska *et al.*, 2016) (Fu *et al.*, 2017) y degradación del polímero (Mir, Ahmed and Rehman, 2017) (Ding and Zhu, 2018). Por lo tanto, este nuevo enfoque en el uso de NP de PLGA para el suministro de biomoléculas se exploró inmovilizando la proteína rhBMP-2 en la superficie de las NP vacías mediante una simple adsorción física. Se sabe que este proceso se rige por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre las moléculas de proteínas y las superficies NP (Peula and de las Nieves, 1993).

Para esto, los grupos cargados en la superficie, la hidrofilia, la carga neta de las moléculas de proteína, y las características del medio de adsorción son los parámetros de referencia. Por lo tanto, diseñamos un experimento de co-adsorción en el que interactúa una mezcla de rhBMP-2 y BSA (0.4% p / p, rhBMP-2 / BSA) simultáneamente con la superficie de NP de PLGA. Las albúminas se usan habitualmente como proteínas protectoras cuando los factores de crecimiento se incorporan en las NPs de PLGA (Ortega-Oller *et al.*, 2015) (Zhang *et al.*, 2016). Además, una distribución superficial de las moléculas de BSA puede mejorar la estabilidad coloidal de las NP a pH fisiológico debido a su carga negativa neta bajo estas condiciones (Peula and de las Nieves, 1994). La Figura 23 muestra un esquema del proceso de co-adsorción. La eficiencia de adsorción es superior al 95% y en el SDS-PAGE de la Figura 22, se pueden ver dos bandas características de ambas proteínas en el carril C, correspondiente al nanosistema NP-BSA-BMP2.

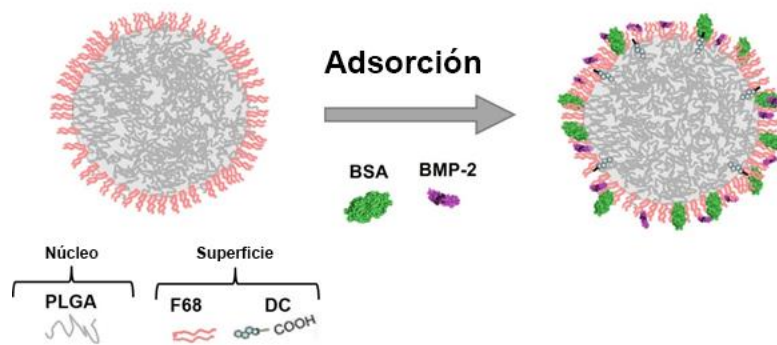


Figura 23. Esquema del proceso de adsorción de proteínas para NP-BSA-BMP2.

Sin embargo, el carril D, correspondiente a la ejecución del sobrenadante desde la centrifugación del nanosistema después de los procesos de adsorción, muestra la ausencia de cualquier proteína. Este resultado se explica completamente teniendo en cuenta el pH del medio (pH 5.0), cerca del punto isoeléctrico de BSA, donde la adsorción de esta proteína en nanopartículas cargadas negativamente presenta un máximo (Peula and de las Nieves, 1993) (Peula, Hidalgo-Alvarez and de las Nieves, 1995). La inmovilización de rhBMP-2 en la superficie cargada negativamente de las NPs demuestra que están favorecidos electrostáticamente debido a la carga neta positiva de esta proteína a pH ácido y neutro.

5.3.2 Caracterización de nanopartículas

21. Tamaño de nanopartículas

Micrografías SEM y STEM (Figura 24) muestran que las muestras consisten en partículas esféricas de diámetros diferentes (entre 150 y 450 nm), un rango similar al encontrado en un trabajo anterior en el que las NP se cargaron con lisozima siguiendo un protocolo de síntesis similar (Ortega-Oller *et al.*, 2017). En ese trabajo la técnica DLS no pudo proporcionar una distribución de tamaño confiable. Por lo tanto, la técnica NTA fue directamente utilizada para determinar el tamaño hidrodinámico de las NP cargadas con BMP2.

Las distribuciones de tamaño para NP vacías (NP) y cargadas con BMP (NP-BMP2) de NTA (Figura 25 y videos S1, S2) fueron consistentes con las imágenes SEM. Se encontró que las partículas con diámetros entre 100 y 500 nm tenían la concentración de partículas más alta en

alrededor de 200 nm. La carga con BMP tuvo un efecto en la distribución del tamaño, lo que condujo a picos más definidos. Estas mediciones nos permitieron determinar la concentración de partículas en la muestra medida: $6.88 \pm 0.09 \times 10^8$ pp / mL y $5.19 \pm 0.12 \times 10^8$ pp / mL para nanosistemas NP y NP-BMP2, respectivamente. Estos valores fueron utilizados (teniendo en cuenta la dilución correspondiente) para controlar el número de partículas añadidas en los experimentos celulares.

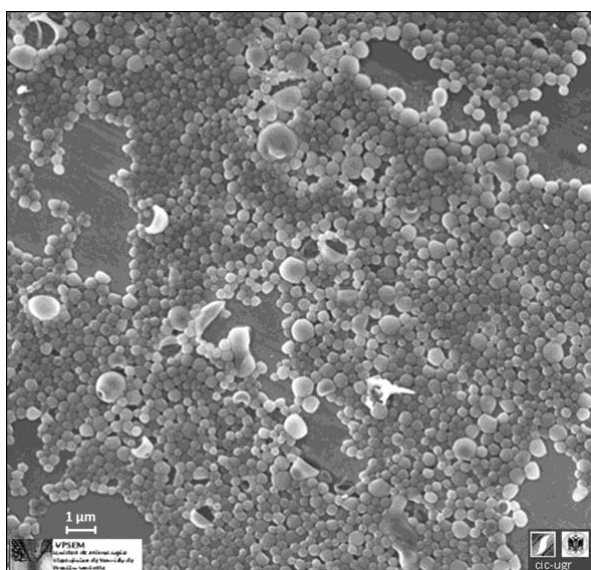


Figura 24. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas cargadas con rhBMP-2 (NP-BMP2).

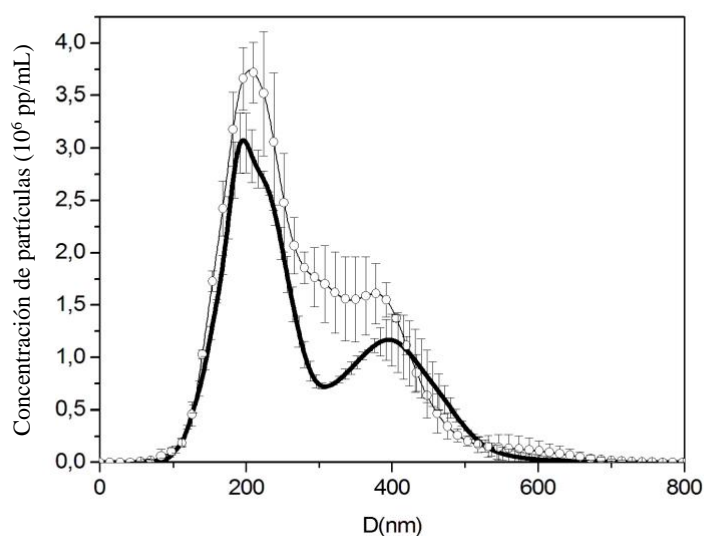


Figura 25. Distribución del diámetro hidrodinámico de NP (círculos) y NP-BMP2 (línea negra gruesa) medidos a pH 7.0 (tampón de fosfato) por análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA).

• *Movilidad electrocinética y estabilidad coloidal*

La carga superficial de las nanopartículas se puede analizar mediante un estudio electrocinético midiendo la movilidad electroforética (μe) en diferentes condiciones. La Figura 26 muestra la movilidad electroforética y el potencial zeta evaluado para los tres nanosistemas: NP, NP- BMP2 y NP-BSA-BMP2, a baja fuerza iónica y diferentes valores de pH. La carga superficial eléctrica de las NP reside en los grupos carboxílicos de las no cubiertas por PLGA y moléculas de ácido desoxicólico. Estos grupos funcionalizados también son útiles debido a la posibilidad de una vectorización química de la superficie para desarrollar nanoportadores de entrega dirigida (Siafaka *et al.*, 2016).

Se confirmó previamente que la protonación de estos grupos de superficies ácidas a valores de pH bajo su valor de pKa estaba estrechamente relacionado con una pérdida de carga superficial y, en consecuencia, una reducción (en valor absoluto) de la movilidad electroforética del sistema coloidal (Peula-García, Hidalgo-Alvarez and De Las Nieves, 1997) (Manuel J. Santander-Ortega, Lozano-López, *et al.*, 2010). Por lo general, cuando las partículas coloidales están recubiertas por

moléculas de proteína, los valores de μ_e cambian notablemente en comparación con el mismo valor de las superficies desnudas y están influenciadas por la carga eléctrica de las moléculas de proteína adsorbidas (Peula-Garcia, Hidalgo-Alvarez and De las Nieves, 1997) (Santander-Ortega, Bastos-Gonzalez and Ortega-Vinuesa, 2007) . El comportamiento electrocinético del sistema NP-BMP2 sigue siendo similar al de NP, y la encapsulación de rhBMP-2 no afecta la distribución de carga superficial. D'Angelo y colaboradores. informaron de un resultado similar al encapsular diferentes factores de crecimiento en nanopartículas de mezcla de PLGA-poloxámero en la misma proporción p / p de proteína / polímero (d'Angelo *et al.*, 2010). Esto puede deberse a la baja cantidad de proteína encapsulada y su distribución en la parte interna de las NP (lejos de la superficie). En nuestro sistema, la distribución interna puede verse favorecida por las condiciones de encapsulación donde el pH básico (pH 12.0) del agua contiene rhBMP-2 que permite una carga negativa de estas moléculas de proteína, evitando así su interacción electrostática específica con grupos ácidos de las NP.

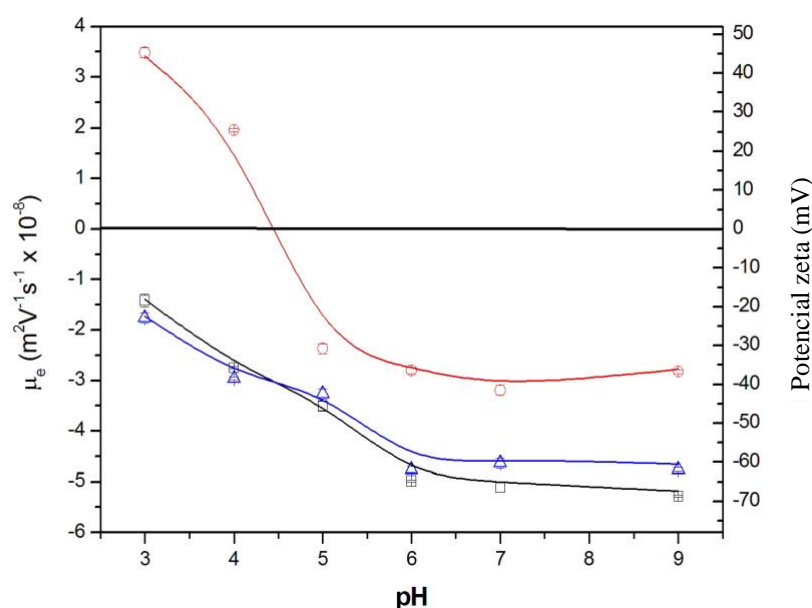


Figura 26. Movilidad electroforética y potencial zeta versus pH en medios de baja salinidad (fuerza iónica igual a 0.002 M) para los diferentes nanosistemas: (cuadrado negro) NP; (triángulo azul) NP-BMP2; (círculo rojo) NP-BSA-BMP2.

La distribución electrocinética para el sistema NP-BSA-BMP2 cambia radicalmente. Como se mostró anteriormente, la eficiencia de adsorción muy alta conduce a NP con ambas proteínas adsorbidas alrededor de su superficie. Esta situación está estrechamente relacionada con los valores μ_e de la Figura 26. Teniendo en cuenta la relación p / p entre proteínas adsorbidas (250 veces mayor para BSA), las moléculas de albúmina modulan el comportamiento a valores de pH por debajo de su punto isoeléctrico (pI 4.7), donde la carga neta positiva BSA enmascara la carga superficial original de las NP e incluso cambia sus valores originales a valores positivos. Esto es un resultado típico encontrado para estas partículas coloidales que cubren proteínas (Peula, Hidalgo-Alvarez and de las Nieves, 1995) (Peula, J.M.; Callejas, J.; de las Nieves, 1994). A valores de pH neutros y básicos, las moléculas de BSA tienen una carga neta negativa, y la ligera disminución en los valores absolutos μ_e podría ser debido a la reducción de la carga superficial neta negativa de los NP, que pueden estar protegidos, al menos en una pequeña parte, por la carga positiva de las moléculas de rhBMP-2 bajo su punto isoeléctrico básico (pI 9.0).

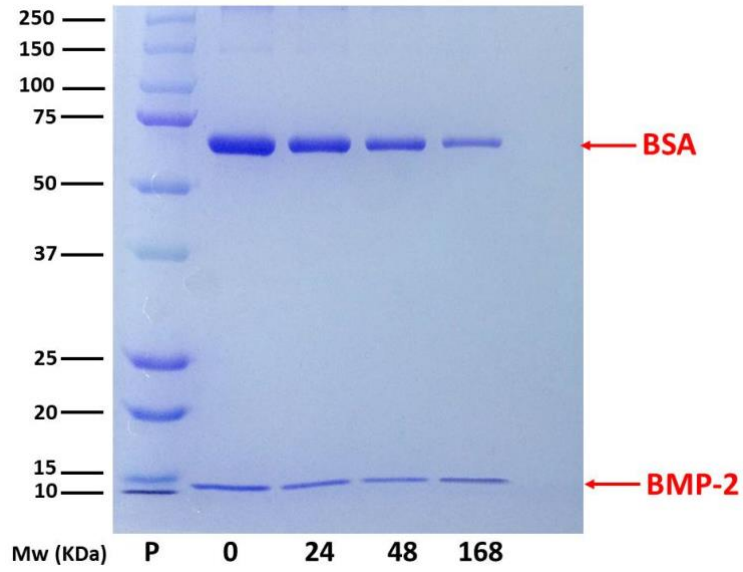
La estabilidad coloidal para los diferentes nanosistemas (NP, NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2) fue determinada mediante el análisis de las distribuciones de tamaño en varios medios (PB, PBS y DMEM) en diferentes tiempos después de la síntesis (0, 1 y 5 días). Se encontraron distribuciones de tamaño similares a las originales para las dos formulaciones, NP y NP-BMP2, en todos los medios analizados. Este resultado fue similar al encontrado previamente para estos tipos de NP que encapsulan la lisozima (Ortega-Oller *et al.*, 2017), en el que la combinación de las interacciones electrostáticas y estéricas generadas por grupos químicos superficiales de NP confieren estabilidad al mecanismo que evita la agregación coloidal (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010). La disminución del valor absoluto del potencial zeta para el sistema NP-BSA-BMP2 como consecuencia de la distribución de proteínas en la superficie no afecta su estabilidad coloidal. Este sistema también mantiene la misma distribución de tamaños en los diferentes medios. Se acepta comúnmente que un potencial zeta superior a +30 o 30 mV dará lugar a un sistema coloidal estable (Sun, 2016) y el valor potencial zeta para NP-BSA-BMP2 es superior a 30 mV. La estabilidad coloidal en PBS y DMEM, típicamente medios utilizados para el desarrollo de interacciones celulares o *scaffolds*, respectivamente, asegura el uso potencial de estos nanosistemas para entornos de vida in vitro o in vivo. Además, estos sistemas mantuvieron su tamaño bajo almacenamiento en PB, a 4 ° C durante al menos 1 mes (datos no mostrados), lo que demuestra que es un medio adecuado para el almacenamiento de muestras.

•*Liberación de proteínas*

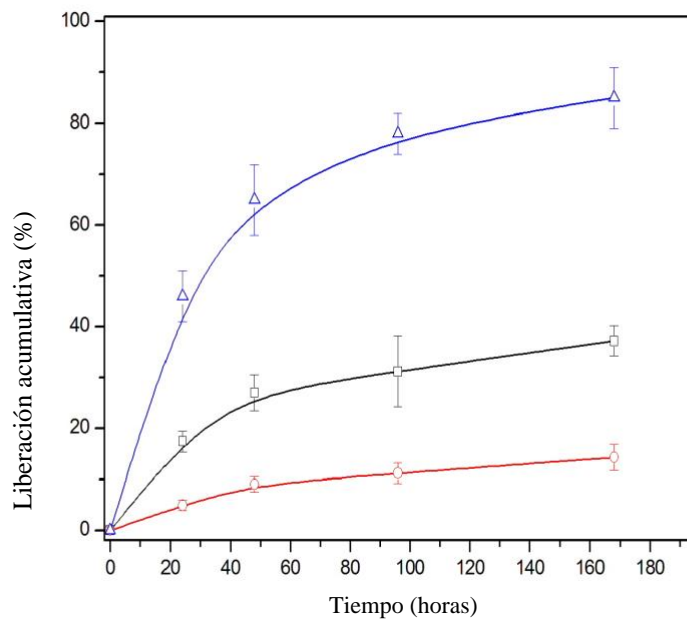
Uno de los principales problemas para los micro o nanosistemas de suministro de fármacos PLGA es encontrar el patrón de liberación apropiado para las moléculas de proteínas encapsuladas / unidas. Un amplio espectro de formulaciones modula esta propiedad mediante el uso de diferentes tipos de procesos de síntesis, polímeros PLGA, copolímeros y estabilizadores (Mir, Ahmed and Rehman, 2017) (Ortega-Oller *et al.*, 2015). Una limitación y control adecuados en la liberación de estallido es fundamental para las BMP a fin de garantizar una liberación continua a largo plazo que, favorecida por la degradación del polímero, proporcione una mejor acción in vivo

para impulsar la regeneración de hueso y cartílago (Begam *et al.*, 2017). Por lo tanto, previamente desarrollamos un nanosistema PLGA dual para la liberación controlada a corto plazo, donde la difusión de proteínas y la interacción proteína-polímero son los principales factores que rigen este proceso (Ortega-Oller *et al.*, 2017). En el presente trabajo, los nanosistemas NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2 representan dos formas diferentes en las que se incorporó rhBMP-2 en el nanoportador. La Figura 27a muestra la liberación acumulativa de ambas proteínas, rhBMP-2 y BSA, para diferentes sistemas en función del tiempo en un período a corto plazo (7 días). La proteína rhBMP-2 encapsulada alcanza una cantidad liberada de alrededor del 30% de la proteína encapsulada inicial, mientras que la rhBMP-2 adsorbida, a pesar de su distribución superficial, es tres veces menor. Sin embargo, BSA muestra cantidades liberadas de hasta el 80% de los adsorbidos iniciales. En todos los casos, las barras de error corresponden a las desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En estas condiciones, el factor de crecimiento encapsulado en NP-BMP2 presenta un patrón de liberación similar al encontrado previamente con la misma formulación pero usando lisozima como proteína (Ortega-Oller *et al.*, 2017). El poloxámero en la fase acuosa del proceso de síntesis puede ser clave para modular las interacciones proteicas interfaciales específicas y no específicas (Del Castillo-Santaella *et al.*, 2019). Por lo tanto, la relación entre la interacción proteína-polímero y la difusión de proteínas parece estar bien equilibrada, evitando un estallido inicial excesivo y al mismo tiempo manteniendo el flujo de proteínas necesario para liberar alrededor de un tercio de la rhBMP-2 encapsulada en 7 días. Aunque se ha informado ampliamente de un estallido inicial excesivo para los NP de PLGA relacionados con moléculas de proteínas cercanas a la superficie (Ding and Zhu, 2018), esta situación no apareció para el sistema NP-BMP2, siendo esto consistente con el comportamiento electrocinético que no mostró la presencia de proteína cerca de la superficie. La literatura ofrece algunos ejemplos con liberación reducida a corto plazo de BMP-2 utilizando más copolímeros PLGA-PEG hidrófilos (Kirby *et al.*, 2011) o un proceso de síntesis diferente (Chang *et al.*, 2017).

El rendimiento de la liberación del sistema NP-BSA-BMP2, que también se muestra en la Figura 27a, presenta diferencias notables. El perfil electrocinético ha justificado previamente la ubicación de la superficie de BSA y rhBMP-2 en la superficie, lo que podría conducir a una liberación rápida de ambas proteínas. Sin embargo, los resultados de la Figura 27a y 27b muestran esta tendencia solo para la proteína BSA que se libera de las NP, con aproximadamente el 20% de la cantidad inicial restante después de siete días. Sin embargo, hasta el 90% de la carga inicial de proteína rhBMP-2, a diferencia de BSA, permanece unida a la superficie. La superficie NP con grupos hidrofílicos forma moléculas de poloxámero y una carga negativa debido a la abundante presencia de grupos carboxílicos (grupos terminales de PLGA y moléculas de ácido desoxicólico) favorecen un proceso de desorción para BSA, cuyas moléculas tienen una carga negativa en condiciones de liberación (pH fisiológico). Esto concuerda con los resultados de otros autores que, incluso después de encapsular BSA en mezclas de PLGA-poloxámero NP, logró una descarga de liberación rápida por encima del 40% o 50% de la cantidad inicial de proteína (Manuel J. Santander-Ortega, Csaba, *et al.*, 2010). Además, la coencapsulación de albúminas con factores de crecimiento podría afectar fuertemente su perfil de liberación, causando un estallido inicial (Balmayor *et al.*, 2009) (d'Angelo *et al.*, 2010). De lo contrario, la atracción electrostática específica entre las moléculas rhBMP-2 positivas y los grupos de superficie negativos ralentiza la liberación a corto plazo de esta proteína. Este resultado está de acuerdo con la baja liberación de BMP adsorbida encontrada previamente usando micro y nanopartículas de PLGA con grupos terminales de ácido sin tapar (Pakulska *et al.*, 2016) (Schrier and DeLuca, 2001). Por lo tanto, la combinación de diferentes métodos para atrapar BMP-2 dentro y alrededor de NP muestra la posibilidad de lograr una liberación controlada adecuadamente, equilibrando las interacciones entre polímeros, estabilizadores y proteínas.



(a)



(b)

Figura 27. (a) Liberación acumulativa de rhBMP-2 para sistemas NP-BMP2 (cuadrado negro) y NP-BSA-BMP2 (círculo rojo); y liberación acumulativa de BSA para el sistema NP-BSA-BMP2 (triángulo azul), incubado por diferentes tiempos a 37°C en tampón de fosfato salino (pH 7.4). (b) Análisis de SDS-PAGE en condiciones reductoras de fracción sólida de NP-BSA-

BMP2 después de la liberación en diferentes momentos en los que el número de cada carril corresponde al tiempo en horas.

5.3.3 Actividad biológica e interacciones

• Migración Celular

La migración celular es el primer y necesario paso en la regeneración de tejidos (Padial-Molina, O'Valle, *et al.*, 2015). Por lo tanto, un agente regenerativo debe acelerar la migración celular o, al menos, no interferir con ella. En el presente estudio, no encontramos diferencias entre los grupos, las dosis y el control en términos de cierre de un área rayada (ANOVA con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey) (Figura 28). En contraste con nuestros hallazgos, los datos publicados anteriormente sugieren un efecto positivo de BMP-2 en la migración celular (Inai *et al.*, 2008) (Gamell *et al.*, 2008). Sin embargo, en esos estudios, las dosis aplicadas y los tipos de células fueron diferentes a los experimentos actuales. Utilizamos dosis más bajas de BMP-2 para evaluar si, incluso a dosis bajas, BMP-2 podría proporcionar beneficios si se protegiera en un sistema de nanopartículas. Como se mencionó, no demostramos ningún efecto negativo del sistema en la migración celular. Sin embargo, nuestros resultados respaldan la idea de que la actividad de BMP-2 está mediada por la activación de la vía de la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), un grupo común de moléculas de señalización que participan en varios procesos con BMP-2 y otras moléculas (Padial-Molina, Volk and Rios, 2014) (Gamell *et al.*, 2008). También debe mencionarse que el plazo de un ensayo de migración es corto. Por lo tanto, las ventajas potenciales de un sistema de liberación controlada como el que se está estudiando podrían ser limitadas. Es decir, la liberación de BMP-2 de las nanopartículas, como se demuestra en la Figura 27, se limita a las primeras 48 h. Por lo tanto, se podría hipotetizar un efecto positivo sostenido sobre la actividad migratoria a lo largo del tiempo.

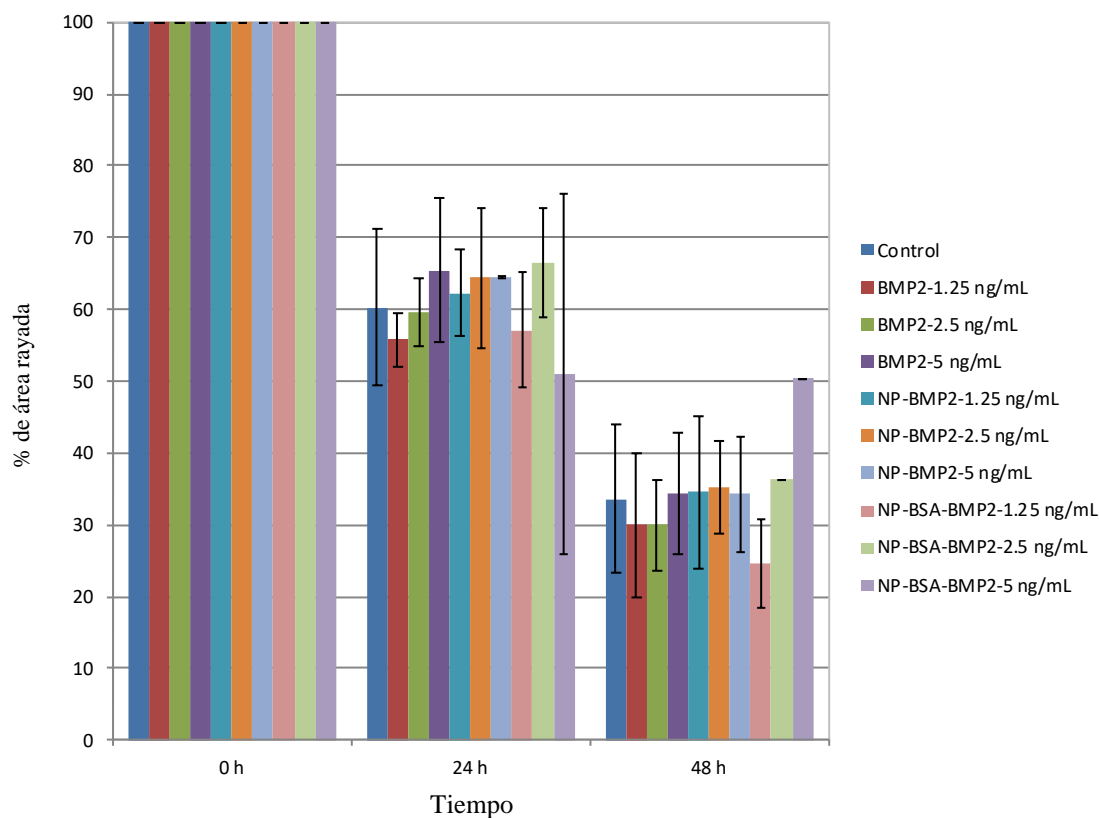


Figura 28. Ensayo de migración. Porcentaje de cierre del área rayada a las 24 y 48 h en diferentes grupos y dosis.

•Proliferación celular

La proliferación es otra de las actividades celulares requeridas para la regeneración de tejidos. Sin embargo, esta propiedad debe equilibrarse con la migración y la diferenciación, y no aumentar las tres características al mismo tiempo y con las mismas proporciones (Friedrichs *et al.*, 2011). De hecho, según los informes, cuando una dosis de BMP-2 induce una mayor proliferación, disminuye la diferenciación (Hrubi *et al.*, 2018). Esta propiedad ha sido ampliamente analizada pero las discrepancias aún se pueden detectar en la literatura. Por lo tanto, Kim y colaboradores. analizó diferentes dosis de BMP-2 y su efecto sobre la proliferación celular y la apoptosis. Se confirmó in vitro que las dosis altas, pero aún más bajas que las utilizadas clínicamente, reducen la proliferación celular y aumentan la apoptosis (Kim, Oxendine and Kamiya, 2013). Esto debe ser evitado. Hemos encontrado que, aunque el BMP-2 libre no induce una proliferación mayor que el control en ninguna de las dosis aplicadas ni en los puntos de tiempo (ANOVA con la prueba

de comparaciones múltiples de Tukey), la misma cantidad de BMP-2 encapsulada o adsorbida en nanopartículas de PLGA aumenta la proliferación, siendo esto estadísticamente significativo cuando se usa una dosis de 2.5 ng / mL o más (ANOVA con prueba de comparaciones múltiples de Tukey) (Figura 29). Estas dosis son aún más bajas que las sugeridas en estudios anteriores. Aparte de esa diferencia, todavía se logró un efecto positivo sobre la proliferación. Además, siguiendo el patrón de lanzamiento de la Figura 27, se espera que se libere más BMP-2 con el tiempo más allá del marco de tiempo de 7 días. Por lo tanto, también podría esperarse un efecto de inducción sostenido hasta la confluencia completa del cultivo celular.

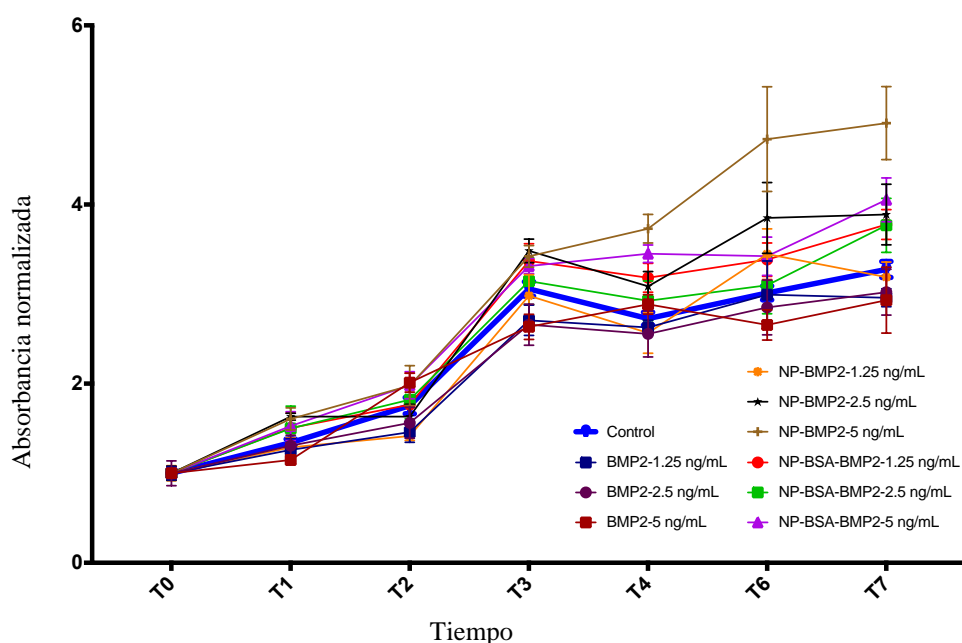


Figura 29. Proliferación de células del estroma mesenquimatoso humano (MSC) medida por absorbancia de sulforamida (SRB). Los resultados se normalizaron a T0 en cada grupo.

•Diferenciación osteogénica

Se ha confirmado que la diferenciación celular inducida por BMP-2 necesita la presencia de componentes osteoinductores permisivos. En particular, se ha demostrado que el beta-glicerofosfato ejerce un efecto sinérgico con BMP-2 para inducir la diferenciación celular (Hrubi *et al.*, 2018). Por lo tanto, para probar la diferenciación osteogénica, analizamos la expresión del ARNm de ALP. Se encontró que la actividad máxima de ALP se produce 10 días después de la estimulación con micropartículas basadas en PLGA que contienen BMP-2 en coencapsulación con albúmina sérica humana (Kirby *et al.*, 2011). Aunque otras pruebas podrían haberse utilizado para reforzar nuestros hallazgos, se sabe que ALP modula la deposición de nódulos mineralizados, lo que indica actividad osteoblástica. Para todo esto, complementamos los medios de diferenciación con Beta-glicerofosfato y BMP-2, NP-BMP2 o NP-BSA-BMP2 libres durante 4 y 7 días para poder capturar la dinámica temprana de la expresión del gen. En nuestro estudio, identificamos un aumento en la expresión de ALP en todos los grupos desde el día 4 hasta el día 7 (Figura 30). Aunque ALP en el día 7 en el grupo BMP-2 parece ser más alto que en los otros dos grupos, el cambio no resultó significativo. De hecho, las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativas en ningún período de tiempo. Sin embargo, cabe destacar que el aumento no fue significativo dentro del grupo BMP-2 ($p = 0.141$, prueba t de Student), pero fue significativo dentro de los otros dos grupos ($p = 0.025$ y $p = 0.003$; NP-BMP2 y NP-BSA- Grupos BMP2, respectivamente). Esto, nuevamente, podría tomarse como una confirmación de la liberación sostenida de la proteína del sistema de nanopartículas más allá de los puntos temporales anteriores.

Esto y los estudios de migración y proliferación descritos a continuación nos llevan a confirmar que el sistema propuesto puede mantener una liberación adecuada de BMP-2 a lo largo del tiempo, manteniendo un efecto positivo en la migración y proliferación celular con dosis iniciales reducidas de BMP-2. El hecho de que se evite el estallido inicial excesivo es importante para la aplicación de esta nanotecnología en la regeneración ósea, como en la odontología. De esta

manera, los efectos negativos de las altas dosis iniciales de BMP-2 se evitan al mismo tiempo que la molécula está protegida contra la desnaturalización dentro del NP. Por lo tanto, los efectos del regenerador se mantienen con el tiempo. Los experimentos in vitro mostraron que las NP de PLGA cargadas con BMP-2 son los nanoportadores con el mejor perfil de liberación a corto plazo sin una explosión inicial y con una liberación moderada y sostenida de proteína activa antes del inicio de la degradación del polímero. Por lo tanto, la actividad biológica es positiva sin interacción negativa con la migración o la proliferación, sino más bien la inducción de la diferenciación celular a través de la expresión de ALP.

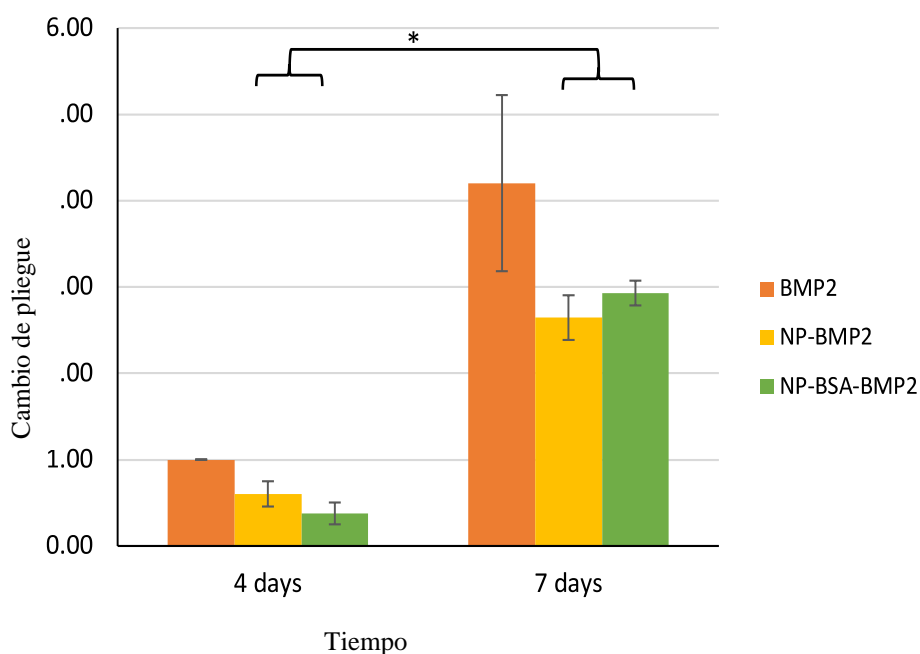


Figura 30. Cambio de pliegue relativo en la expresión de ARNm de ALP (grupo de control: BMP2 a los 4 días). * = Importancia estadística de la comparación a lo largo del tiempo ($p = 0.025$ y $p = 0.003$, prueba *t* del estudiante; grupos NP-BMP2 y NP-BSA-BMP2).

Los experimentos de liberación in vitro muestran un patrón adecuado de administración a corto plazo que al mismo tiempo preserva la bioactividad de la biomolécula encapsulada. Además, la distribución de tamaño de nanopartícula encontrada para este nanosistema W-F68 permite la

posibilidad de una administración de proteína dual, externa e intracelular, como se ha demostrado mediante experimentos celulares *in vitro*. Esta nueva formulación se utilizará en futuros estudios para encapsular y administrar factores de crecimiento *in vitro* e *in vivo* con el fin de explotar el potencial terapéutico de este nanosistema.

Se ha puesto de manifiesto la necesidad de optimización de los métodos y componentes para equilibrar la estructura y morfología de las micropartículas / nanopartículas de PLGA logrando de esta forma una alta eficiencia de encapsulación de BMP-2 y buscando un objetivo principal: el control de la entrega, la reducción de la descarga inicial para alcanzar un perfil de liberación de la proteína sostenido en el tiempo, preservando la actividad biológica, y dirigiéndola a células diana para minimizar la cantidad clínica de proteína necesaria permitiendo al mismo tiempo una correcta regeneración del tejido óseo.

En consecuencia, otro reto futuro es conseguir el direccionamiento específico de estas nanoesferas de PLGA cargadas de agentes activos. Este aspecto se puede desarrollar mediante el uso de unos ligandos que reconozcan específicamente los tipos o líneas celulares a la que queremos dirigir la liberación de biomoléculas encapsuladas. El uso de nanopartículas con una unión covalente de diferentes ligandos da lugar a una técnica con un alto potencial de administración que permite a la ingeniería tisular un gran avance en cuanto a la distribución y administración de diferentes fármacos o biomoléculas, mejorando así las funciones biológicas o regenerativas celulares.

Los anticuerpos específicos que reconocen los receptores de superficie celular, pueden unirse covalentemente a la superficie de nuestras nanopartículas de PLGA, dando lugar a una “inmunonanopartícula”. Para que esta unión se produzca sin ningún inconveniente en muchas ocasiones hay que hacer uso de agentes estabilizadores para proporcionar estabilidad coloidal a las nanopartículas sin que lleguen a afectar al enlace establecido entre los anticuerpos específicos de los receptores celulares y las nanopartículas, que es donde nos encontramos hoy día y donde

muchos investigadores siguen haciendo avances cada día entorno a la mejora de estos enlaces y de estas entregas celulares específicas, a través de las “inmuno-nanopartículas”.

6.CONCLUSIONES

En respuesta al objetivo principal de este trabajo,

Los nanosistemas de partículas poliméricas basados en PLGA son sistemas prometedores para la administración espacial y temporalmente controlada de factores de crecimiento que promueven el desarrollo celular, la diferenciación y regeneración en ingeniería ósea mediante su incorporación junto a las células en estructuras sólidas o hidrogeles.

En respuesta a los objetivos secundarios de este trabajo,

- Ha sido posible optimizar la obtención de diferentes sistemas de NPs de PLGA mediante un procedimiento de doble emulsión con las propiedades superficiales adecuadas que proporcionan estabilidad coloidal y grupos carboxilo superficiales para unir químicamente diferentes ligandos específicos en respuesta al objetivo 1.

- Se ha optimizado una formulación, W-F68, que basada en el procedimiento anterior permite encapsular moléculas hidrofílicas como las proteínas, obteniendo un novedoso nanotransportador de tamaño dual que preserva la actividad biológica de la proteína modelo encapsulada (lisozima), en respuesta al objetivo 2.

- En respuesta al tercer objetivo, el análisis de la interacción proteína-surfactante muestra el papel crucial del solvente orgánico, el surfactante, la relación de volumen entre ambas fases y la carga neta de la proteína encapsulada, sobre las características finales de las NPs transportadoras y el patrón de liberación proteica.

- Las experiencias *in vitro* de suministro proteico muestran una difusión bien equilibrada de la proteína, evitando una descarga inicial excesiva, manteniendo un flujo constante de liberación a corto plazo y permitiendo un suministro dual, extra e intracelular sin citotoxicidad apreciable, en respuesta a los objetivos 4 y 5.

•Se ha desarrollado un nanosistema transportador de BMP2 sobre la base de un sistema modelo formulado previamente mediante un procedimiento de doble emulsión que conduce a un sistema de NPs con una distribución dual de tamaños y estabilidad coloidal y temporal adecuada para aplicaciones biológicas, en respuesta al objetivo 6.

•*In vitro*, el Sistema con BMP2 encapsulada presenta un patrón de liberación en el corto plazo, 7 días, que muestra un suministro moderado y sostenido de proteína biológicamente activa, en respuesta al objetivo 7.

•*In vitro*, la actividad biológica a nivel celular muestra, mediante el análisis de la expresión de ALP, la capacidad de la BMP2 nanotransportada para inducir diferenciación celular sin incidencia negativa en los procesos de migración y proliferación celular, en respuesta al objetivo 8.

7. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses con ninguno de los productos enumerados en el documento.

8. RECURSOS ECONÓMICOS

Beca de investigación obtenida competitivamente y otorgada por la empresa de implantes dentales “MIS IBERICA SL”

Financiación parcial otorgada 1.- por la Consejería de Economía, Innovación, Educación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (España), 2.- los proyectos MAT2013-43922-R – incluyendo soporte europeo FEDER - (MICINN, España), 3.- y los Grupos de Investigación # FQM-115, # CTS-1028 # CTS-138 y # CTS- 583 (Junta de Andalucía, España).

9.BIBLIOGRAFÍA

- Al-Nawas, B. and Schiegnitz, E. (2014) 'Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone - a systematic review and meta-analysis.', *European journal of oral implantology*, 7 Suppl 2, pp. S219-34.
- Arias, J. L. *et al.* (2015) 'Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis.', *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 197, pp. 190–198. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.11.002.
- Avila, G. *et al.* (2010) 'Clinical and histologic outcomes after the use of a novel allograft for maxillary sinus augmentation: a case series.', *Implant dentistry*, 19(4), pp. 330–341. doi: 10.1097/ID.0b013e3181e59b32.
- Balmayor, E. R. *et al.* (2009) 'Starch-poly-epsilon-caprolactone microparticles reduce the needed amount of BMP-2.', *Clinical orthopaedics and related research*, 467(12), pp. 3138–3148. doi: 10.1007/s11999-009-0954-z.
- Bapat, R. A. *et al.* (2019) 'The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry.', *Drug discovery today*, 24(1), pp. 85–98. doi: 10.1016/j.drudis.2018.08.012.
- Barboza, E., Caula, A. and Machado, F. (1999) 'Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration.', *Implant dentistry*, 8(4), pp. 360–367. doi: 10.1097/00008505-199904000-00006.
- Barratt, G. (2003) 'Colloidal drug carriers: achievements and perspectives.', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 60(1), pp. 21–37. doi: 10.1007/s000180300002.
- Baumann, B. *et al.* (2017) 'Control of Nanoparticle Release Kinetics from 3D Printed Hydrogel Scaffolds.', *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 56(16), pp. 4623–4628. doi: 10.1002/anie.201700153.
- Begam, H. *et al.* (2017) 'Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing.', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 70(Pt 1),

pp. 856–869. doi: 10.1016/j.msec.2016.09.074.

Behnia, H. *et al.* (2012) 'Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report.', *Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 40(1), pp. 2–7. doi: 10.1016/j.jcms.2011.02.003.

Blanco, D. and Alonso, M. J. (1998) 'Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants.', *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 45(3), pp. 285–294. doi: 10.1016/s0939-6411(98)00011-3.

Bohr, A. *et al.* (2015) 'Pharmaceutical microparticle engineering with electrospraying: the role of mixed solvent systems in particle formation and characteristics.', *Journal of materials science. Materials in medicine*, 26(2), p. 61. doi: 10.1007/s10856-015-5379-5.

Bouissou, C. *et al.* (2004) 'Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres.', *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 95(3), pp. 557–566. doi: 10.1016/j.jconrel.2003.12.016.

Boyne, P. J. *et al.* (2005) 'De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation.', *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 63(12), pp. 1693–1707. doi: 10.1016/j.joms.2005.08.018.

Boyne, P. and Jones, S. D. (2004) 'Demonstration of the osseoinductive effect of bone morphogenetic protein within endosseous dental implants.', *Implant dentistry*, 13(2), pp. 180–4. doi: 10.1097/01.id.0000127520.06443.42.

Bramwell, V. W. and Perrie, Y. (2005) 'Particulate delivery systems for vaccines.', *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 22(2), pp. 151–214. doi:

10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v22.i2.20.

Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P. (2002) 'Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis.', *Advanced drug delivery reviews*, 54(5), pp. 631–651. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00044-3.

Brown, B. N. *et al.* (2009) 'Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component.', *Biomaterials*, 30(8), pp. 1482–1491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.040.

Brown, B. N. *et al.* (2011) 'Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix.', *Tissue engineering. Part C, Methods*, 17(4), pp. 411–421. doi: 10.1089/ten.TEC.2010.0342.

Bustos-Valenzuela, J. C. *et al.* (2011) 'Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells.', *BMC research notes*, 4, p. 370. doi: 10.1186/1756-0500-4-370.

Cai, C. *et al.* (2008) 'Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein.', *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 69(1), pp. 31–42. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.10.005.

Carragee, E. J., Hurwitz, E. L. and Weiner, B. K. (2011) 'A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned.', *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*, 11(6), pp. 471–491. doi: 10.1016/j.spinee.2011.04.023.

Carreira, A C *et al.* (2014) 'Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives.', *Journal of dental research*, 93(4), pp. 335–345. doi: 10.1177/0022034513518561.

Carreira, Ana Claudia *et al.* (2014) 'Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological

function and therapeutic applications.', *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, pp. 64–73. doi: 10.1016/j.abb.2014.07.011.

Del Castillo-Santaella, T. *et al.* (2019) 'Interaction of surfactant and protein at the O/W interface and its effect on colloidal and biological properties of polymeric nanocarriers.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 173, pp. 295–302. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.09.072.

Chan, J. M. *et al.* (2009) 'PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery.', *Biomaterials*, 30(8), pp. 1627–1634. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.013.

Chang, H.-C. *et al.* (2017) 'Bone morphogenetic protein-2 loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres enhance osteogenic potential of gelatin/hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate cryogel composite for alveolar ridge augmentation.', *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, 116(12), pp. 973–981. doi: 10.1016/j.jfma.2017.01.005.

Chen, G., Deng, C. and Li, Y.-P. (2012) 'TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.', *International journal of biological sciences*, 8(2), pp. 272–288. doi: 10.7150/ijbs.2929.

Cheng, J. *et al.* (2007) 'Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery.', *Biomaterials*, 28(5), pp. 869–876. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.047.

Chou, L. Y. T., Ming, K. and Chan, W. C. W. (2011) 'Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles.', *Chemical Society reviews*, 40(1), pp. 233–245. doi: 10.1039/c0cs00003e.

Chung, V. H.-Y. *et al.* (2012) 'Engineered autologous bone marrow mesenchymal stem cells: alternative to cleft alveolar bone graft surgery.', *The Journal of craniofacial surgery*, 23(5), pp. 1558–1563. doi: 10.1097/SCS.0b013e31825e4e30.

Chung, Y.-I. *et al.* (2007) 'Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional

nanoparticle-hydrogel complex.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 121(1-2), pp. 91-99. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.05.029.

Cleland, J. L. (1997) 'Protein delivery from biodegradable microspheres.', *Pharmaceutical biotechnology*, 10, pp. 1-43. doi: 10.1007/0-306-46803-4_1.

Csaba, N. *et al.* (2004) 'Design and characterisation of new nanoparticulate polymer blends for drug delivery.', *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 15(9), pp. 1137-1151. doi: 10.1163/1568562041753098.

Csaba, N. *et al.* (2005) 'PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery.', *Biomacromolecules*, 6(1), pp. 271-278. doi: 10.1021/bm049577p.

Csaba, N., Garcia-Fuentes, M. and Alonso, M. J. (2006) 'The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery.', *Expert opinion on drug delivery*, 3(4), pp. 463-478. doi: 10.1517/17425247.3.4.463.

d'Angelo, I. *et al.* (2010) 'Nanoparticles based on PLGA:poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors.', *Molecular pharmaceuticals*, 7(5), pp. 1724-1733. doi: 10.1021/mp1001262.

Danhier, F. *et al.* (2012) 'PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 161(2), pp. 505-522. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.

Deschaseaux, F., Sensebe, L. and Heymann, D. (2009) 'Mechanisms of bone repair and regeneration.', *Trends in molecular medicine*, 15(9), pp. 417-429. doi: 10.1016/j.molmed.2009.07.002.

Devine, J. G. *et al.* (2012) 'The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk?', *Evidence-based spine-care journal*, 3(2), pp. 35-41. doi: 10.1055/s-0031-1298616.

Ding, D. and Zhu, Q. (2018) 'Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery

of biomacromolecular therapeutics.', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 92, pp. 1041–1060. doi: 10.1016/j.msec.2017.12.036.

Ertl, B. *et al.* (2000) 'Lectin-mediated bioadhesion: preparation, stability and caco-2 binding of wheat germ agglutinin-functionalized Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-microspheres.', *Journal of drug targeting*, 8(3), pp. 173–184. doi: 10.3109/10611860008996863.

Fang, D.-L. *et al.* (2014) 'Development of lipid-shell and polymer core nanoparticles with water-soluble salidroside for anti-cancer therapy.', *International journal of molecular sciences*, 15(3), pp. 3373–3388. doi: 10.3390/ijms15033373.

Farace, C. *et al.* (2016) 'Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol.', *Scientific reports*, 6, p. 18423. doi: 10.1038/srep18423.

Feczkó, T., Tóth, J. and Gyenis, J. (2008) 'Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 319(1–3), pp. 188–195. doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.07.011.

Feng, S. and Huang, G. (2001) 'Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 71(1), pp. 53–69. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00364-3.

Fraylich, M. *et al.* (2008) 'Poly(D,L-lactide-co-glycolide) dispersions containing pluronics: from particle preparation to temperature-triggered aggregation.', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(15), pp. 7761–7768. doi: 10.1021/la800869u.

Fredenberg, S. *et al.* (2011) 'The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review.', *International journal of pharmaceutics*, 415(1–2), pp. 34–52. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.049.

Friedrichs, M. *et al.* (2011) 'BMP signaling balances proliferation and differentiation of

muscle satellite cell descendants.', *BMC cell biology*, 12, p. 26. doi: 10.1186/1471-2121-12-26.

Froum, S. J. *et al.* (2006) 'Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting.', *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 26(6), pp. 543–551.

Fu, C. *et al.* (2017) 'Enhancing Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Pre-osteoblasts by BMP-2 Delivery in Graphene Oxide-Incorporated PLGA/HA Biodegradable Microcarriers.', *Scientific reports*, 7(1), p. 12549. doi: 10.1038/s41598-017-12935-x.

Fu, R. *et al.* (2013) 'Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis.', *Annals of internal medicine*, 158(12), pp. 890–902. doi: 10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00006.

Fu, Y. *et al.* (2012) 'In vitro sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 microspheres embedded in thermosensitive hydrogels.', *Die Pharmazie*, 67(4), pp. 299–303.

Galindo-Moreno, P. *et al.* (2007) 'Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture.', *Clinical oral implants research*, 18(3), pp. 376–382. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01337.x.

Galindo-Moreno, P. *et al.* (2011) 'Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation.', *Clinical oral implants research*, 22(8), pp. 857–864. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02073.x.

Gamell, C. *et al.* (2008) 'BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity.', *Journal of cell science*, 121(Pt 23), pp. 3960–3970. doi: 10.1242/jcs.031286.

- Gaudana, R. *et al.* (2013) 'Design and evaluation of a novel nanoparticulate-based formulation encapsulating a HIP complex of lysozyme.', *Pharmaceutical development and technology*, 18(3), pp. 752–759. doi: 10.3109/10837450.2012.737806.
- Ghaderi, R. and Carlfors, J. (1997) 'Biological activity of lysozyme after entrapment in poly(d,l-lactide-co-glycolide)-microspheres.', *Pharmaceutical research*, 14(11), pp. 1556–1562. doi: 10.1023/a:1012122200381.
- Giteau, A. *et al.* (2008) 'How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?', *International journal of pharmaceutics*, 350(1–2), pp. 14–26. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.11.012.
- Gref, R. *et al.* (1994) 'Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres.', *Science (New York, N.Y.)*, 263(5153), pp. 1600–1603. doi: 10.1126/science.8128245.
- Hans, M. L. and Lowman, A. M. (2002) 'Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting', *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), pp. 319–327. doi: 10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
- Hassan, P. A., Rana, S. and Verma, G. (2015) 'Making sense of Brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering.', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 31(1), pp. 3–12. doi: 10.1021/la501789z.
- Hines, D. J. and Kaplan, D. L. (2013) 'Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights.', *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 30(3), pp. 257–276. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006475.
- Hong, P. *et al.* (2013) 'Enhancement of bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis: a contemporary review of experimental studies involving adjuvant therapies.', *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 66(7), pp. 883–895. doi: 10.1016/j.bjps.2013.03.030.
- Houghton, P. *et al.* (2007) 'The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to

testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity.', *Methods (San Diego, Calif.)*, 42(4), pp. 377–387. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.01.003.

Hrubi, E. *et al.* (2018) 'Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin.', *Human cell*, 31(2), pp. 139–148. doi: 10.1007/s13577-018-0202-5.

Inai, K. *et al.* (2008) 'BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis.', *Developmental biology*, 315(2), pp. 383–396. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.12.028.

Iqbal, M. *et al.* (2015) 'Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation.', *International journal of pharmaceutics*, 496(2), pp. 173–190. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.057.

Jana, Sougata and Jana, Subrata (2017) 'Natural polymeric biodegradable nanoblend for macromolecules delivery', in *Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends: Preparation and Characterisation*. Elsevier Inc., pp. 289–312. doi: 10.1016/B978-0-08-100408-1.00010-8.

Jeon, O. *et al.* (2008) 'Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery.', *Biochemical and biophysical research communications*, 369(2), pp. 774–780. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.099.

Ji, W. *et al.* (2012) 'Local delivery of small and large biomolecules in craniomaxillofacial bone.', *Advanced drug delivery reviews*, 64(12), pp. 1152–1164. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.003.

Ji, Y. *et al.* (2010) 'BMP-2/PLGA delayed-release microspheres composite graft, selection of bone particulate diameters, and prevention of aseptic inflammation for bone tissue engineering.', *Annals of biomedical engineering*, 38(3), pp. 632–639. doi: 10.1007/s10439-009-9888-6.

Jiang, W. *et al.* (2005) 'Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for

injectable delivery of vaccine antigens.', *Advanced drug delivery reviews*, 57(3), pp. 391–410. doi: 10.1016/j.addr.2004.09.003.

Kao, D. W. K. *et al.* (2012) 'The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation.', *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 32(1), pp. 61–67.

Katranji, A., Fotek, P. and Wang, H.-L. (2008) 'Sinus augmentation complications: etiology and treatment.', *Implant dentistry*, 17(3), pp. 339–349. doi: 10.1097/ID.0b013e3181815660.

Kempen, D. H. R. *et al.* (2008) 'Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering.', *Biomaterials*, 29(22), pp. 3245–3252. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.031.

Kempen, D. H. R. *et al.* (2009) 'Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration.', *Biomaterials*, 30(14), pp. 2816–2825. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.031.

Ki-Bum Lee, Ani Solanki, J Dongun Kim, J. J. (2009) *Nanomedicine: Dynamic Integration of Nanotechnology with Biomedical Science | Request PDF*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/254745458_Nanomedicine_Dynamic_Integration_of_Nanotechnology_with_Biomedical_Science (Accessed: 29 March 2020).

Kim, H. K. W., Oxendine, I. and Kamiya, N. (2013) 'High-concentration of BMP2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells.', *Bone*, 54(1), pp. 141–150. doi: 10.1016/j.bone.2013.01.031.

Kim, Y.-H. and Tabata, Y. (2015) 'Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration.', *Advanced drug delivery reviews*, 94, pp. 28–40. doi: 10.1016/j.addr.2015.06.003.

Kirby, G. T. S. *et al.* (2011) 'PLGA-based microparticles for the sustained release of BMP-2',

in *European Cells and Materials*. AO Research Institute Davos, p. 24. doi: 10.3390/polym3010571.

Kocbek, P. *et al.* (2007) 'Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 120(1-2), pp. 18-26. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.03.012.

Kok, R. J. *et al.* (1998) 'Drug delivery to the kidneys and the bladder with the low molecular weight protein lysozyme.', *Renal failure*, 20(2), pp. 211-217. doi: 10.3109/08860229809045104.

Kumar, B. *et al.* (2017) 'Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery', *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Editions de Sante, pp. 260-268. doi: 10.1016/j.jddst.2017.07.019.

Kumar, T. R. S., Soppimath, K. and Nachaegari, S. K. (2006) 'Novel delivery technologies for protein and peptide therapeutics.', *Current pharmaceutical biotechnology*, 7(4), pp. 261-276. doi: 10.2174/138920106777950852.

Kumari, A., Yadav, S. K. and Yadav, S. C. (2010) 'Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 75(1), pp. 1-18. doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.

La, W.-G. *et al.* (2010) 'The efficacy of bone morphogenetic protein-2 depends on its mode of delivery.', *Artificial organs*, 34(12), pp. 1150-1153. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00988.x.

Lee, J. *et al.* (2013) 'Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model: relative efficacy of autogenous fresh particulate iliac bone grafts.', *Clinical oral implants research*, 24(5), pp. 497-504. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02419.x.

Lee, S.-J. *et al.* (2017) 'Development of Novel 3-D Printed Scaffolds With Core-Shell Nanoparticles for Nerve Regeneration.', *IEEE transactions on bio-medical engineering*, 64(2),

pp. 408–418. doi: 10.1109/TBME.2016.2558493.

Li, B. *et al.* (2009) ‘The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora.’, *Biomaterials*, 30(35), pp. 6768–6779. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.038.

Liang, C.-C., Park, A. Y. and Guan, J.-L. (2007) ‘In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro.’, *Nature protocols*, 2(2), pp. 329–333. doi: 10.1038/nprot.2007.30.

LIN, Y. *et al.* (2007) ‘In vitro Evaluation of Lysozyme-loaded Microspheres in Thermosensitive Methylcellulose-based Hydrogel1 1 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No.20576057) and Fundamental Research Foundation of Tsinghua University (JCqn2005033).’, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(4), pp. 566–572. doi: 10.1016/S1004-9541(07)60125-6.

Lochmann, A. *et al.* (2010) ‘The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres.’, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 147(1), pp. 92–100. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.06.021.

Loureiro, J. A. *et al.* (2016) ‘Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer’s disease treatment.’, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 145, pp. 8–13. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.04.041.

Luginbuehl, V. *et al.* (2004) ‘Localized delivery of growth factors for bone repair.’, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 58(2), pp. 197–208. doi: 10.1016/j.ejpb.2004.03.004.

M. Padial-Molina, P. Galindo-Moreno, G. Á.-M. (2009) ‘Biomimetic ceramics in implant dentistry’, *MINERVA BIOTECNOLOGICA*, 21, p. 173.

Makadia, H. K. and Siegel, S. J. (2011) 'Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier.', *Polymers*, 3(3), pp. 1377–1397. doi: 10.3390/polym3031377.

Maldonado-Valderrama, J. *et al.* (2013) 'In vitro digestion of interfacial protein structures', *Soft Matter*, 9(4), pp. 1043–1053. doi: 10.1039/c2sm26843d.

Mason, S. *et al.* (2014) 'Standardization and safety of alveolar bone-derived stem cell isolation.', *Journal of dental research*, 93(1), pp. 55–61. doi: 10.1177/0022034513510530.

McClements, D. J. (2018) 'Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review.', *Advances in colloid and interface science*, 253, pp. 1–22. doi: 10.1016/j.cis.2018.02.002.

McKay, W. F., Peckham, S. M. and Badura, J. M. (2007) 'A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft).', *International orthopaedics*, 31(6), pp. 729–734. doi: 10.1007/s00264-007-0418-6.

Meinel, L. *et al.* (2001) 'Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 70(1–2), pp. 193–202. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00352-7.

Meng, F. T. *et al.* (2003) 'W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 91(3), pp. 407–416. doi: 10.1016/s0168-3659(03)00273-6.

Mir, M., Ahmed, N. and Rehman, A. U. (2017) 'Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 159, pp. 217–231. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.038.

Misch, C. E. (1987) 'Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans.', *The International journal of oral implantology : implantologist*,

4(2), pp. 49–58.

Mohamed, F. and van der Walle, C. F. (2008) 'Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties.', *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(1), pp. 71–87. doi: 10.1002/jps.21082.

Morille, M. *et al.* (2013) 'New PLGA-P188-PLGA matrix enhances TGF-beta3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 170(1), pp. 99–110. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.017.

Mueller, T. D. and Nickel, J. (2012) 'Promiscuity and specificity in BMP receptor activation.', *FEBS letters*, 586(14), pp. 1846–1859. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.043.

Myeroff, C. and Archdeacon, M. (2011) 'Autogenous bone graft: donor sites and techniques.', *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 93(23), pp. 2227–2236. doi: 10.2106/JBJS.J.01513.

Nair, B. P. and Sharma, C. P. (2012) 'Poly(lactide-co-glycolide)-laponite-F68 nanocomposite vesicles through a single-step double-emulsion method for the controlled release of doxorubicin.', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 28(9), pp. 4559–4564. doi: 10.1021/la300005c.

Nevins, M. *et al.* (1996) 'Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2.', *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, 16(1), pp. 8–19.

Oh, S. H., Kim, T. H. and Lee, J. H. (2011) 'Creating growth factor gradients in three dimensional porous matrix by centrifugation and surface immobilization.', *Biomaterials*, 32(32), pp. 8254–8260. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.07.027.

Ortega-Oller, I. *et al.* (2015) 'Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles.', *BioMed research international*, 2015, p. 415289. doi: 10.1155/2015/415289.

Ortega-Oller, I. *et al.* (2017) 'Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, characterization, and in vitro release.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 159, pp. 586–595. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.08.027.

Padial-Molina, M. *et al.* (2012) 'Methods to validate tooth-supporting regenerative therapies.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 887, pp. 135–148. doi: 10.1007/978-1-61779-860-3_13.

Padial-Molina, M., O'Valle, F., *et al.* (2015) 'Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells and Novel Supportive Therapies for Oral Bone Regeneration.', *BioMed research international*, 2015, p. 341327. doi: 10.1155/2015/341327.

Padial-Molina, M., Rodriguez, J. C., *et al.* (2015) 'Standardized in vivo model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces.', *Nature protocols*, 10(7), pp. 1038–1049. doi: 10.1038/nprot.2015.063.

Padial-Molina, M. *et al.* (2019) 'Expression of Musashi-1 During Osteogenic Differentiation of Oral MSC: An In Vitro Study.', *International journal of molecular sciences*, 20(9). doi: 10.3390/ijms20092171.

Padial-Molina, M. and Rios, H. F. (2014) 'Stem Cells, Scaffolds and Gene Therapy for Periodontal Engineering', *Current Oral Health Reports*, 1(1), pp. 16–25. doi: 10.1007/s40496-013-0002-7.

Padial-Molina, M., Volk, S. L. and Rios, H. F. (2014) 'Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor -alpha and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides.', *Journal of periodontal research*, 49(3), pp. 405–414. doi: 10.1111/jre.12120.

Paillard-Giteau, A. *et al.* (2010) 'Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique.', *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur*

Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V., 75(2), pp. 128–136. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.03.005.

Pakulska, M. M. *et al.* (2016) 'Encapsulation-free controlled release: Electrostatic adsorption eliminates the need for protein encapsulation in PLGA nanoparticles.', *Science advances*, 2(5), p. e1600519. doi: 10.1126/sciadv.1600519.

Pantazis, P. *et al.* (2012) 'Preparation of siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles for sustained release of siRNA and evaluation of encapsulation efficiency.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 906, pp. 311–319. doi: 10.1007/978-1-61779-953-2_25.

Panyam, J. and Labhasetwar, V. (2003) 'Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells.', *Pharmaceutical research*, 20(2), pp. 212–220. doi: 10.1023/a:1022219003551.

Paolicelli, P. *et al.* (2010) 'Surface-modified PLGA-based nanoparticles that can efficiently associate and deliver virus-like particles.', *Nanomedicine (London, England)*, 5(6), pp. 843–853. doi: 10.2217/nnm.10.69.

Park, J. S. *et al.* (2013) 'Multilineage differentiation of human-derived dermal fibroblasts transfected with genes coated on PLGA nanoparticles plus growth factors.', *Biomaterials*, 34(2), pp. 582–597. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.001.

Penaloza, J. P. *et al.* (2017) 'Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of PHBV nanoparticles for targeted delivery in epithelial cell lines.', *Journal of nanobiotechnology*, 15(1), p. 1. doi: 10.1186/s12951-016-0241-6.

Perez, C., De Jesus, P. and Griebenow, K. (2002) 'Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method.', *International journal of pharmaceuticals*, 248(1–2), pp. 193–206. doi: 10.1016/s0378-5173(02)00435-0.

Peula-Garcia, J. M., Hidalgo-Alvarez, R. and De las Nieves, F. J. (1997) 'Protein co-adsorption

on different polystyrene latexes: Electrokinetic characterization and colloidal stability', *Colloid and Polymer Science*, 275(2), pp. 198–202. doi: 10.1007/s003960050072.

Peula-García, J. M., Hidalgo-Alvarez, R. and De Las Nieves, F. J. (1997) 'Colloid stability and electrokinetic characterization of polymer colloids prepared by different methods', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 127(1–3), pp. 19–24. doi: 10.1016/S0927-7757(96)03890-3.

Peula, J.M.; Callejas, J.; de las Nieves, F. J. (1994) 'Adsorption of Monomeric Bovine Serum Albumin on Sulfonated Polystyrene Model Colloids. II. Electrokinetic Characterization of Latex-Protein Complexes.', *Surface Properties of Biomaterials*, pp. 61–69.

Peula, J. M., Hidalgo-Alvarez, R. and de las Nieves, F. J. (1995) 'Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: I. Sequential and competitive coadsorption isotherms.', *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 7(3), pp. 231–240. doi: 10.1163/156856295x00274.

Peula, J. M. and de las Nieves, F. J. (1993) 'Adsorption of monomeric bovine serum albumin on sulfonated polystyrene model colloids 1. Adsorption isotherms and effect of the surface charge density', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 77(3), pp. 199–208. doi: 10.1016/0927-7757(93)80117-W.

Peula, J. M. and de las Nieves, F. J. (1994) 'Adsorption of monomeric bovine serum albumin on sulfonated polystyrene model colloids 3. Colloidal stability of latex-protein complexes', *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 90(1), pp. 55–62. doi: 10.1016/0927-7757(94)02889-3.

Pezennec, S. et al. (2008) *The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface*. Available at: www.elsevier.com/locate/foodhyd (Accessed: 29 March 2020).

Pirooznia, N. et al. (2012) 'Encapsulation of alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: in

vitro characterization as an effective aerosol formulation in pulmonary diseases.', *Journal of nanobiotechnology*, 10, p. 20. doi: 10.1186/1477-3155-10-20.

Poinern, G. E. J. (no date) *A laboratory course in nanoscience and nanotechnology*.

Puppi, D. *et al.* (2014) 'Nano/microfibrous polymeric constructs loaded with bioactive agents and designed for tissue engineering applications: a review.', *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 102(7), pp. 1562–1579. doi: 10.1002/jbm.b.33144.

Qutachi, O., Shakesheff, K. M. and Buttery, L. D. K. (2013) 'Delivery of definable number of drug or growth factor loaded poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) microparticles within human embryonic stem cell derived aggregates.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 168(1), pp. 18–27. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.02.029.

Rafati, A. *et al.* (2012) 'Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 162(2), pp. 321–329. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.05.008.

Rahman, C. V *et al.* (2014) 'Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model.', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 8(1), pp. 59–66. doi: 10.1002/term.1497.

Ramel, M.-C. and Hill, C. S. (2012) 'Spatial regulation of BMP activity.', *FEBS letters*, 586(14), pp. 1929–1941. doi: 10.1016/j.febslet.2012.02.035.

Ratzinger, G. *et al.* (2010) 'Surface modification of PLGA particles: the interplay between stabilizer, ligand size, and hydrophobic interactions.', *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 26(3), pp. 1855–1859. doi: 10.1021/la902602z.

Rescignano, N. *et al.* (2016) 'In-vitro degradation of PLGA nanoparticles in aqueous medium and in stem cell cultures by monitoring the cargo fluorescence spectrum', *Polymer*

Degradation and Stability, 134, pp. 296–304. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2016.10.017.

van Rijt, S. and Habibovic, P. (2017) 'Enhancing regenerative approaches with nanoparticles.', *Journal of the Royal Society, Interface*, 14(129). doi: 10.1098/rsif.2017.0093.

Romagnoli, C., D'Asta, F. and Brandi, M. L. (2013) 'Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering.', *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 10(3), pp. 155–161.

Ronga, M. *et al.* (2013) 'Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs.', *Injury*, 44 Suppl 1, pp. S34-9. doi: 10.1016/S0020-1383(13)70008-1.

Rosca, I. D., Watari, F. and Uo, M. (2004) 'Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 99(2), pp. 271–280. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.07.007.

Sanchez-Moreno, P. *et al.* (2013) 'Synthesis and characterization of lipid immunonanocapsules for directed drug delivery: selective antitumor activity against HER2 positive breast-cancer cells.', *Biomacromolecules*, 14(12), pp. 4248–4259. doi: 10.1021/bm401103t.

Santander-Ortega, M. J. *et al.* (2006) 'Colloidal stability of pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: a variety of stabilisation mechanisms.', *Journal of colloid and interface science*, 302(2), pp. 522–529. doi: 10.1016/j.jcis.2006.07.031.

Santander-Ortega, M. J. *et al.* (2009) 'Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization.', *Journal of biomedical nanotechnology*, 5(1), pp. 45–53. doi: 10.1166/jbn.2009.022.

Santander-Ortega, M J *et al.* (2010) 'Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 141(1), pp. 85–92. doi: 10.1016/j.jconrel.2009.08.012.

- Santander-Ortega, Manuel J., Lozano-López, M. V., *et al.* (2010) 'Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: Stability by hydration forces', *Colloid and Polymer Science*, 288(2), pp. 159–172. doi: 10.1007/s00396-009-2132-y.
- Santander-Ortega, Manuel J., Csaba, N., *et al.* (2010) 'Protein-loaded PLGA-PEO blend nanoparticles: Encapsulation, release and degradation characteristics', *Colloid and Polymer Science*, 288(2), pp. 141–150. doi: 10.1007/s00396-009-2131-z.
- Santander-Ortega, M. J. *et al.* (2011) 'Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 82(2), pp. 571–580. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.10.019.
- Santander-Ortega, M. J., Bastos-Gonzalez, D. and Ortega-Vinuesa, J. L. (2007) 'Electrophoretic mobility and colloidal stability of PLGA particles coated with IgG.', *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 60(1), pp. 80–88. doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.06.002.
- Santo, V. E. *et al.* (2012) 'From nano- to macro-scale: nanotechnology approaches for spatially controlled delivery of bioactive factors for bone and cartilage engineering.', *Nanomedicine (London, England)*, 7(7), pp. 1045–1066. doi: 10.2217/nnm.12.78.
- Sapkota, G. *et al.* (2007) 'Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker.', *Molecular cell*, 25(3), pp. 441–454. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.006.
- Schrier, J. A. *et al.* (2001) 'Effect of a freeze-dried CMC/PLGA microsphere matrix of rhBMP-2 on bone healing.', *AAPS PharmSciTech*, 2(3), p. E18. doi: 10.1208/pt020318.
- Schrier, J. A. and DeLuca, P. P. (2001) 'Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: polymer binding and in vitro release.', *AAPS PharmSciTech*, 2(3), p. E17. doi: 10.1208/pt020317.
- Schwendeman, S. P. *et al.* (2014) 'Injectable controlled release depots for large molecules.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190, pp. 240–253. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.05.057.

- Shankarayan, R., Kumar, S. and Mishra, P. (2013) 'Differential permeation of piroxicam-loaded PLGA micro/nanoparticles and their in vitro enhancement', *Journal of Nanoparticle Research*, 15(3). doi: 10.1007/s11051-013-1496-6.
- Shim, Y. B. *et al.* (2016) 'Fabrication of hollow porous PLGA microspheres using sucrose for controlled dual delivery of dexamethasone and BMP2', *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 37, pp. 101–106. doi: 10.1016/j.jiec.2016.03.014.
- Siafaka, P. I. *et al.* (2016) 'Surface Modified Multifunctional and Stimuli Responsive Nanoparticles for Drug Targeting: Current Status and Uses.', *International journal of molecular sciences*, 17(9). doi: 10.3390/ijms17091440.
- Sieber, C. *et al.* (2009) 'Recent advances in BMP receptor signaling.', *Cytokine & growth factor reviews*, 20(5–6), pp. 343–355. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.007.
- Silva, G. A. *et al.* (2007) 'Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Applications in bone.', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(2), pp. 97–109. doi: 10.1002/term.1.
- Simmonds, M. C. *et al.* (2013) 'Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data.', *Annals of internal medicine*, 158(12), pp. 877–889. doi: 10.7326/0003-4819-158-12-201306180-00005.
- Sneh-Edri, H., Likhtenshtein, D. and Stepensky, D. (2011) 'Intracellular targeting of PLGA nanoparticles encapsulating antigenic peptide to the endoplasmic reticulum of dendritic cells and its effect on antigen cross-presentation in vitro.', *Molecular pharmaceuticals*, 8(4), pp. 1266–1275. doi: 10.1021/mp200198c.
- Spagnoli, D. B. and Marx, R. E. (2011) 'Dental implants and the use of rhBMP-2.', *Dental clinics of North America*, 55(4), pp. 883–907. doi: 10.1016/j.cden.2011.07.014.
- Srinivasan, C. *et al.* (2005) 'Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and

bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles.', *Journal of microencapsulation*, 22(2), pp. 127–138. doi: 10.1080/02652040400026400.

Sturesson, C. and Carlfors, J. (2000) 'Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity.', *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 67(2–3), pp. 171–178. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00205-4.

Sun, D. (2016) 'Effect of Zeta Potential and Particle Size on the Stability of SiO₂ Nanospheres as Carrier for Ultrasound Imaging Contrast Agents', *Int. J. Electrochem. Sci*, pp. 8520–8529.

Tan, J. S. *et al.* (1993) 'Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats.', *Biomaterials*, 14(11), pp. 823–833. doi: 10.1016/0142-9612(93)90004-1.

Tian, Z. *et al.* (2012) 'Synthesis and characterization of UPPE-PLGA-rhBMP2 scaffolds for bone regeneration.', *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao. Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao. Yixue Yingdewen ban*, 32(4), pp. 563–570. doi: 10.1007/s11596-012-0097-4.

Torcello-Gómez, A. *et al.* (2011) 'Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: Link with surface properties', *Soft Matter*, 7(18), pp. 8450–8461. doi: 10.1039/c1sm05570d.

Torrecillas-Martinez, L. *et al.* (2013) 'Effect of rhBMP-2 upon maxillary sinus augmentation: a comprehensive review.', *Implant dentistry*, 22(3), pp. 232–237. doi: 10.1097/ID.0b013e31829262a8.

Tran, M.-K., Swed, A. and Boury, F. (2012) 'Preparation of polymeric particles in CO₂ medium using non-toxic solvents: formulation and comparisons with a phase separation method.', *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 82(3), pp. 498–507. doi: 10.1016/j.ejpb.2012.08.005.

- Tsuji, K. *et al.* (2006) 'BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing.', *Nature genetics*, 38(12), pp. 1424–1429. doi: 10.1038/ng1916.
- Tsuji, K. *et al.* (2008) 'BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb.', *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 90 Suppl 1, pp. 14–18. doi: 10.2106/JBJS.G.01109.
- Tsuji, K. *et al.* (2010) 'Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair.', *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 28(3), pp. 384–389. doi: 10.1002/jor.20996.
- Urist, M. R. (1965) 'Bone: formation by autoinduction.', *Science (New York, N.Y.)*, 150(3698), pp. 893–899. doi: 10.1126/science.150.3698.893.
- Vasir, J. K. and Labhasetwar, V. (2007) 'Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics.', *Advanced drug delivery reviews*, 59(8), pp. 718–728. doi: 10.1016/j.addr.2007.06.003.
- Vo, T. N., Kasper, F. K. and Mikos, A. G. (2012) 'Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration.', *Advanced drug delivery reviews*, 64(12), pp. 1292–1309. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.016.
- Wallace, S. S. and Froum, S. J. (2003) 'Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review.', *Annals of periodontology*, 8(1), pp. 328–343. doi: 10.1902/annals.2003.8.1.328.
- Wan, F. and Yang, M. (2016) 'Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying.', *International journal of pharmaceutics*, 498(1–2), pp. 82–95. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.12.025.
- Wang, E. A. *et al.* (1990) 'Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

87(6), pp. 2220–2224. doi: 10.1073/pnas.87.6.2220.

Wang, H. *et al.* (2012) 'The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration.', *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(1), pp. 24–39. doi: 10.1089/ten.TEB.2011.0184.

Wang, Y. *et al.* (2015) 'PLGA/PDLLA core-shell submicron spheres sequential release system: Preparation, characterization and promotion of bone regeneration in vitro and in vivo', *Chemical Engineering Journal*, 273, pp. 490–501. doi: 10.1016/j.cej.2015.03.068.

Wege, H. A., Holgado-Terriza, J. A. and Cabrerizo-Vilchez, M. A. (2002) 'Development of a constant surface pressure penetration langmuir balance based on axisymmetric drop shape analysis.', *Journal of colloid and interface science*, 249(2), pp. 263–273. doi: 10.1006/jcis.2002.8233.

Wheeler, S. L. (1997) 'Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials.', *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 55(11), pp. 1287–1293. doi: 10.1016/s0278-2391(97)90186-5.

White, L. J. *et al.* (2013) 'Accelerating protein release from microparticles for regenerative medicine applications.', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33(5), pp. 2578–2583. doi: 10.1016/j.msec.2013.02.020.

Wozney, J. M. (1992) 'The bone morphogenetic protein family and osteogenesis.', *Molecular reproduction and development*, 32(2), pp. 160–167. doi: 10.1002/mrd.1080320212.

Xia, Y. *et al.* (2013) 'Protein encapsulation in and release from monodisperse double-wall polymer microspheres.', *Journal of pharmaceutical sciences*, 102(5), pp. 1601–1609. doi: 10.1002/jps.23511.

Xiong, S. *et al.* (2011) 'Cellular uptake of Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation

method.', *Biotechnology journal*, 6(5), pp. 501–508. doi: 10.1002/biot.201000351.

Xu, Y. *et al.* (2017) 'Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories.', *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 105(6), pp. 1692–1716. doi: 10.1002/jbm.b.33648.

Yallapu, M. M. *et al.* (2010) 'Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells.', *Journal of colloid and interface science*, 351(1), pp. 19–29. doi: 10.1016/j.jcis.2010.05.022.

Yameen, B. *et al.* (2014) 'Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 190, pp. 485–499. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.06.038.

Yang, Y. Y., Chia, H. H. and Chung, T. S. (2000) 'Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method.', *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 69(1), pp. 81–96. doi: 10.1016/s0168-3659(00)00291-1.

Yang, Y. Y., Chung, T. S. and Ng, N. P. (2001) 'Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method.', *Biomaterials*, 22(3), pp. 231–241. doi: 10.1016/s0142-9612(00)00178-2.

Yilgor, P. *et al.* (2009) 'Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering.', *Biomaterials*, 30(21), pp. 3551–3559. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.024.

Yilgor, P., Hasirci, N. and Hasirci, V. (2010) 'Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules.', *Journal of biomedical materials research. Part A*, 93(2), pp. 528–536. doi: 10.1002/jbm.a.32520.

Zhang, H.-X. *et al.* (2016) 'In vitro and in vivo evaluation of calcium phosphate composite scaffolds containing BMP-VEGF loaded PLGA microspheres for the treatment of avascular necrosis of the femoral head.', *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 60, pp. 298–307. doi: 10.1016/j.msec.2015.11.055.

Zhang, S. and Uludag, H. (2009) 'Nanoparticulate systems for growth factor delivery.', *Pharmaceutical research*, 26(7), pp. 1561–1580. doi: 10.1007/s11095-009-9897-z.

10.ANEXO MATERIAL SUPLEMENTARIO

<http://rsbweb.nih.gov/ij/>

This is an overview of citations for this author.

Author h-index : 11 [View h-graph](#)

16 Cited Documents from "Ortega-Oller, Inmaculada" + Add to list

Date range: 2017 to 2021 Exclude self citations of selected author Exclude self citations of all authors Exclude citations from books [Update](#)



Sort on: [Date \(newest\)](#)

Documents	Citations	<2017	2017	2018	2019	2020	2021	Subtotal	>2021	Total
<input type="checkbox"/> Page Remove										
<input checked="" type="checkbox"/> 1 Formulation, colloidal characterization, and in vitro biolog...	2019	85	73	77	79	86	3	318	0	403
<input checked="" type="checkbox"/> 2 Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, char...	2017			2	2	1		5		5
<input type="checkbox"/> 3 Cellular, vascular, and histomorphometric outcomes of solven...	2017		1	4	5	1		11		11
<input type="checkbox"/> 4 Significance of the Immunohistochemical Expression of Bone M...	2016		1	1	1	1		4		5
<input type="checkbox"/> 5 Preterm birth and/or low birth weight are associated with pe...	2016		1	3	6	3	5	18		29
<input type="checkbox"/> 6 Abutment height influences the effect of platform switching ...	2016		2	7	10	6	13	36		38
<input type="checkbox"/> 7 Effect of barrier membranes on the outcomes of maxillary sin...	2015		1	5	2		4	11		12
<input checked="" type="checkbox"/> 8 Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles	2015		4	9	7	9	7	32		36
<input type="checkbox"/> 9 Marginal bone loss as success criterion in implant dentistry...	2015		19	15	12	22	21	71		90
<input type="checkbox"/> 10 Effect of cantilevers for implant-supported prostheses on ma...	2014		4	2	3	2		7		11

11.ANEXO DE PUBLICACIONES

Review Article

Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles

Inmaculada Ortega-Oller,¹ Miguel Padial-Molina,¹ Pablo Galindo-Moreno,¹
Francisco O'Valle,² Ana Belén Jódar-Reyes,³ and Jose Manuel Peula-García^{3,4}

¹Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, University of Granada, 18011 Granada, Spain

²Department of Pathology, School of Medicine and IBIMER, University of Granada, 18012 Granada, Spain

³Biocolloid and Fluid Physics Group, Department of Applied Physics, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴Department of Applied Physics II, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain

Correspondence should be addressed to Jose Manuel Peula-García; jmpeula@uma.es

Received 27 March 2015; Accepted 4 June 2015

Academic Editor: Hojae Bae

Copyright © 2015 Inmaculada Ortega-Oller et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) is one of the most widely used synthetic polymers for development of delivery systems for drugs and therapeutic biomolecules and as component of tissue engineering applications. Its properties and versatility allow it to be a reference polymer in manufacturing of nano- and microparticles to encapsulate and deliver a wide variety of hydrophobic and hydrophilic molecules. It additionally facilitates and extends its use to encapsulate biomolecules such as proteins or nucleic acids that can be released in a controlled way. This review focuses on the use of nano/microparticles of PLGA as a delivery system of one of the most commonly used growth factors in bone tissue engineering, the bone morphogenetic protein 2 (BMP2). Thus, all the needed requirements to reach a controlled delivery of BMP2 using PLGA particles as a main component have been examined. The problems and solutions for the adequate development of this system with a great potential in cell differentiation and proliferation processes under a bone regenerative point of view are discussed.

1. Introduction

Bone regeneration is one of the main challenges facing us in the daily clinic. Immediately after a tooth extraction, normal biological processes remodel the alveolar bone limiting in some cases the possibility of future implant placement. Different strategies for the preservation of that bone have been explored in recent years. Other conditions, such as trauma, tumor resective surgery, or congenital deformities, require even higher technical and biological requirements to generate the necessary bony structure for the occlusal rehabilitation of the patient. To overcome these anatomical limitations in terms of bone volume, different approaches have been proposed to either improve the implant osteointegration or to augment the bone anatomy where it will be placed [1, 2]. Autogenous bone graft is still considered the “gold standard” due to its osteogenic, osteoconductive, and osteoconductive properties [3, 4]. However, it also presents several limitations including the need for a second surgery,

limited availability, and morbidity in the donor area [5]. Therefore, other biomaterials such as allogeneic grafts, with osteoconductivity and osteoinductive capacities [6, 7], and xenogeneic grafts [8, 9] and alloplastic biomaterials [10], with osseoconductive potential, were proposed. All these materials, although acceptable, are not suitable in many conditions and usually require additional consideration in the decision process [11]. Additionally, the bone quantity and quality that can be obtained with these materials are often limited.

The use of bioactive molecules, alone or in combination with the previously described materials, has, therefore, become a major area of interest thanks to their high potential. When using this kind of procedures, it is important to consider (1) the delivery method and (2) the molecule itself. Bioactive molecules can be transported into the defect area as a solution or a gel, embedded in sponges, adhered to solid scaffolds and, more recently, included in particles of different sizes. Using these methods, PDGF (platelet-derived growth

factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin growth factor), Runx2, Osterix (Osx), LIM domain mineralization protein (LMP), BMP (bone morphogenetic protein) and, more recently, periostin have been proposed as potential candidates for regeneration procedures within the oral cavity, including bone and periodontal tissues [12, 13]. These molecules have been tested alone or in combination with stem cells [14] using several *in vitro* and *in vivo* strategies [15].

Consequently, within the context of this review, we intend to review the delivery methods of bioactive molecules with the purpose of bone regeneration, with a particular focus on polymeric nano/microparticles, especially those with PLGA as main component, to encapsulate the growth factor BMP-2. An overview of the biological functions of bone morphogenetic proteins and an analysis of the different parameters affecting the physicochemical properties of these systems are presented. Synthesis method, particle size and morphology, use of stabilizers and their incidence in the colloidal stability, protective function, and surface functionality will be discussed. In addition, we explore the different strategies that can be used to optimize the encapsulation efficiency and release kinetics, main parameters that determine the correct development of polymeric carriers used in tissue-engineered bone processes.

2. BMPs: Action and Regulation

For bone regeneration, in particular, bone morphogenetic growth factors (BMP) are probably the more tested group of molecules. Since 1965, when Urist [16] showed that the extracted bone BMPs could induce bone and cartilage formation when implanted in animal tissue, an increasing number of reports have tested its *in vivo* application and biological foundation when used in bone defects [17–19]. BMPs are members of the TGF- β superfamily of proteins [20]. The BMP family of proteins groups more than 20 homodimeric or heterodimeric morphogenetic proteins, which functions in many cell types and tissues, not all of them being osteogenic [21]. BMPs can be divided into 4 subfamilies based on their function and sequence, being BMP-2, BMP-4, and BMP-7 the ones with osteogenic potential [21]. The actions of BMPs include chondrogenesis, osteogenesis, angiogenesis, and extracellular matrix synthesis [22]. Within this family of proteins, BMP-2 has been the most studied. It has osteoinductive properties that promote the formation of new bone by initiating, stimulating, and amplifying the cascade of bone formation through chemotaxis and stimulation of proliferation and differentiation of the osteoblastic cell lineage [5, 17, 19, 20]. The absence of it, as studied in knockout models, leads to spontaneous fractures that do not heal with time [23]. In fact, other models have demonstrated that the absence of either BMP-4 [24] or BMP-7 [25] do not lead to bone formation and function impairment which demonstrate the compensatory effect produced by BMP-2 alone [26].

Many cell types in bone tissue produce BMPs, including osteoprogenitor cells, osteoblasts, chondrocytes, platelets, and endothelial cells. This secreted BMP is then stored in the extracellular matrix where it mostly interacts with collagen type IV [27]. During the repair and remodeling processes,

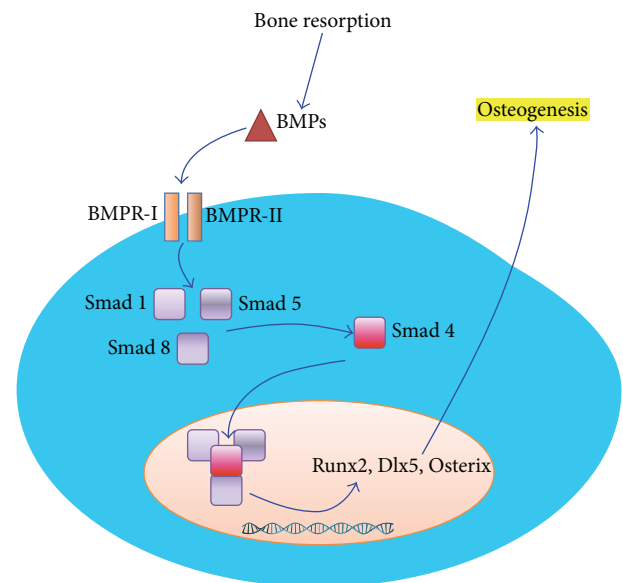


FIGURE 1: Schematic representation of the main BMP molecular pathway to osteogenesis. BMPs interact with cell surface receptors I and II to activate Smads 1, 5, and 8. These activated Smads activate Smad 4. All together as a protein complex activate Runx2, Dlx5, and Osterix.

osteoclast resorptive activity induces the release of BMPs to the medium so that they are suspended and can interact with nearby cells to initiate the subsequent osteogenic process [28].

A BMP in the extracellular matrix binds to cell surface receptors BMPR-I and BMPR-II and activates the Smad cytoplasmic proteins or the MAPK pathway [29]. When BMPR-I is activated, BMPR-II is recruited and activated as well [30]. The activation of the complexes BMPR-I and BMPR-II leads to the activation of several Smads (1, 5, and 8) that also activate Smad 4 and they all form protein complexes that are transported into the nucleus where Runx2, Dlx5, and Osterix genes (important in osteogenesis) are activated [26, 27] (Figure 1). Similarly, when the MAPK pathway is activated, it leads to induction of Runx2 transcription and, therefore, to bone differentiation [31]. A number of extracellular and intracellular antagonists have also been described, including noggin, chordin, and gremlin or Smads 6, 7, and 8b, respectively [32].

2.1. Clinical Use of BMP-2. Today, the BMP-2 is commercially available under different brand names and concentrations. It usually consists of a collagen absorbable sponge embedded with recombinant human BMP-2. In 2002, it was approved by the FDA as an alternative of autogenous bone grafting in anterior lumbar interbody fusion [33]. Later, in 2007, the FDA approved the use of rhBMP-2 as an alternative for autogenous bone grafting in the increase of the alveolar crest defects associated with the tooth extraction maxillary sinus pneumatization [33].

Beside the applications in spine clinical studies, where very high concentrations are used (AMPLIFY, rhBMP-2, 40 mg), clinical studies have supported its use in the oral

cavity. BMPs have been used in periodontal regeneration, bone healing, implant osteointegration, oral surgery with orthodontic purposes, bone pathology sequel repair, distraction osteogenesis, and endodontic reparative surgery [28, 34]. However, it has shown more promising results in cases where only bone tissue is to be regenerated, including preimplant site development, sinus lift, vertical and horizontal ridge augmentation, and dental implant wound healing [35]. In this sense, it has been shown that the use of rhBMP-2 induced the formation of bone suitable for placement of dental implants and their osteointegration [36]. Furthermore, it appears that the newly formed bone has similar properties to the native bone and is, therefore, capable of supporting denture occlusal forces [37]. In the particular case of sinus lifting, where bone deficiency is greater and, therefore, supportive therapies can be more helpful, a recent meta-analysis found a total of 3 human studies and 4 animal trials (Table 1) [38]. In summary, the included studies concluded that rhBMP-2 induces new bone formation with comparable bone quality and quantity of newly formed bone to that induced by autogenous bone graft. In some cases, even higher bone quality and quantity have been reported [39].

Conversely, recent studies report severe complications after its use [61]. Even more, high doses have also associated with carcinogenic effects, which led the authors to emphasize the need for better guidelines in BMP clinical use [62]. Not so drastic, recent studies are highlighting the negative side effects and risks of its application, making high emphasis on potential bias of nonreproducible industry sponsored research, especially when used in spinal fusion [44, 63, 64]. The use of rhBMP-2 has been shown to increase the risks for wound complications and dysphagia with high effectiveness and harms misrepresentation through selective reporting, duplicate publication, and underreporting [44]. Specifically in oral bone regenerative applications, a report in sinus lift concluded that the use of BMP-2 promotes negative effects on bone formation when combined with anorganic bovine bone matrix versus anorganic bovine bone alone [41], in contrast with previous reports and reviews [38]. Taking together this information, it can be concluded that it is of extreme importance to be careful with the clinical use of new products, avoiding off-label applications. It is also important to highlight the need for more and better clinical research.

To overcome these limitations, new strategies, such as the use of *ex vivo* BMP-2-engineered autologous MSCs [65], encapsulation of the protein in different biomaterials, or delivery by gene therapy, are being explored in recent years.

The development of these technologies is based on some biological facts. *In vitro* effects of BMPs are observed at very low dosages (5–20 ng/mL), although current commercially available rhBMPs are used in large dosages (up to 40 mg of some products) [28]. This is probably due to an intense proteolytic consumption during the early postsurgical phases. It is important to know the proper sequence of biological events that lead to normal tissue healing. Then, this knowledge can be used to intervene at the specific time frame where our therapy is intended to act [15]. Effective bone formation, as described above, is a sequential process. Therefore, the inductive agent should be delivered at a maintained concentration

during a timeframe. In this sense, as in many other processes in medicine, it has been recently demonstrated that long-term release of BMP-2 is more effective than short-term over a range of doses [51]. It is also important to note that the role of other molecular pathways and crosstalk between the different components playing in bone regeneration is not perfectly understood yet, and, therefore, more research has to be conducted.

What is known so far, in summary, is that BMPs, specifically BMP-2, is of utility for promoting bone regeneration [28]. However, the currently FDA-approved BMP-2 delivery system (INFUSE, Medtronic Sofamor Danek, Inc.) presents important limitations [66]. Firstly, protein is quickly inactivated. Therefore, its biological action disappears, maybe even before the blood clot that forms after the surgery is being organized. Second, the recombinant protein is delivered in an absorbable collagen sponge. Thus, the distribution of the BMP in a liquid suspension embedded into a collagen sponge makes it impossible to be certain that the protein is reaching the ideal target. Therefore, where, when, and for how long a dose of BMP-2 is reached (determined by the delivery method) are important factors. Because of that, new forms of BMP-2 delivery are being developed. These new technologies have to guarantee a higher half-life of the protein and a stepped release, to increase the effects on the desired cell targets. The biotechnology opens the door to be able to provide a solution to these limitations.

Biodegradable nanoparticles (nanospheres and nanocapsules) have developed as a promising important tool for the delivery of macromolecules via parenteral, mucous, and topical applications [67–70]. Well-established biodegradable polymers such as poly(acid D, L-lactic) or poly(D, L-lactico-glycolic) have been widely used in the preparation of nanoparticles in recent decades because of its biocompatibility and full biodegradability [71]. However, it is known that certain macromolecules, such as proteins or peptides, may lose activity during their encapsulation, storage, delivery, and release [72]. To overcome this problem, the addition of stabilizers such as oxide polyethylene (PEO) or the coencapsulation with other macromolecules and its derivatives seem to be a promising strategy.

3. Polymeric Colloidal Particles to Encapsulate Hydrophilic Molecules

Generally, polymeric colloidal particles are hard systems with a homogeneous spherical shape composed by natural or synthetic polymers. In order to encapsulate hydrophilic molecules as proteins or nucleic acids, it is necessary to optimize the polymeric composition and the synthesis method. In this process, a high encapsulation efficiency, maintenance of the biological activity of the encapsulated biomolecule, and obtaining of an adequate release pattern have to be achieved [73–75]. Several delivery systems of BMP2 (and other growth factors, GFs) using polymeric particles have been described in the literature. Most of them are microparticulated systems using the biocompatible and biodegradable PLGA copolymer as main component [76, 77]. Taking into account the incorporation of BMP2 to the carrier system, encapsulation

TABLE 1: Summary of clinical and animal studies using BMP-2 for sinus floor elevation (adapted from [38]). The included studies overall concluded that rhBMP-2 induces new bone formation with comparable bone quality and quantity of newly formed bone to that induced by autogenous bone graft.

Reference	Study design	Follow-up (months)	Species (subjects)	Core biopsy harvesting (months)	Graft material	% Newly formed bone	Bone height gain (mm)	Bone width gain (mm)	Bone density (mg/mL)	Immune response	Histology
Boyne et al. 2005 [37]	RCT	52	Human (48)	6-11	0.75 mg/mL rhBMP-2/ACS		11.29	Crest: 2.02 Midpoint: 8.54 Apical: 11.86	84	None	NA
					1.50 mg/mL rhBMP-2/ACS	NA	0.47	Crest: 1.98 Midpoint: 7.80 Apical: 10.78	134	None	NA
					Autogenous bone graft; autogenous bone graft + allogeneic bone graft		10.16	Crest: 4.66 Midpoint: 10.17 Apical: 10.56	350		
					1.50 mg/mL rhBMP-2/ACS		7.83 ± 3.52		200		Rich vascular marrow space high in cellular content
Triplett et al. 2009 [40]	RCT	58	Human (160)	6	Autogenous bone graft (iliac crest, tibia or oral cavity); autogenous bone graft + allogeneic bone graft	NA	9.46 ± 4.11	NA	283	None	Osteoclasts still present; higher fibrous tissue
Kao et al. 2012 [41]	Prospective	6-9	Human (22)	6-9	rhBMP-2/ACS + ABB	16.04 ± 7.45	NA	NA	NA	None	Fewer ABB particles; less newly formed bone (woven and mature bone structure) More ABB particles remaining; higher newly formed bone (woven and matured bone structure)
					ABB	24.85 ± 5.82	NA	NA	NA	None	Dense isolated trabeculae and bone marrow; osteoblast and osteoclasts; no cortical bone
Nevins et al. 1996 [36]	Prospective	12	Goat (6)	12	rhBMP-2/ACS	NA	NA	NA	NA	None	Collagenous connective tissue; no evidence of inflammation; no neo-osteogenesis
					ACS/Buffer						
Hanisch et al. 1997 [42]	RCT	24	Nonhuman primate (12)	24	rhBMP-2/ACS	NA	6.0 ± 0.3 2.6 ± 0.3	NA	14.4 ± 2.9 13.9 ± 4.6	NA	Newly formed bone indistinguishable from residual bone
Wada et al. 2001 [43]	Prospective	8	Rabbit (10)	8	rhBMP-2/ACS	22.4 ± 4.4	NA	NA	NA	NA	Cortical bone formation in both groups; trabeculae with clear lamellar structure were embedded in fatty marrow
					Autogenous bone graft (iliac crest)	21.9 ± 4.5	NA	NA	NA	NA	Newly formed cancellous bone; new bone continuous with resident bone; woven bone in fibrovascular and fatty marrow
Lee et al. 2013 [39]	Prospective	8	Mini-pig (8)	8	rhBMP-2/ACS	NA	9.3 ± 0.5	NA	51.9 ± 3	NA	Irregular and variable bone among different subjects
					Autogenous bone graft (iliac crest)		8.6 ± 0.7		32.9 ± 2.5		

NA: not available; RCT: randomized clinical trial; ACS: absorbable collagen sponge; ABB: anorganic bovine bone.

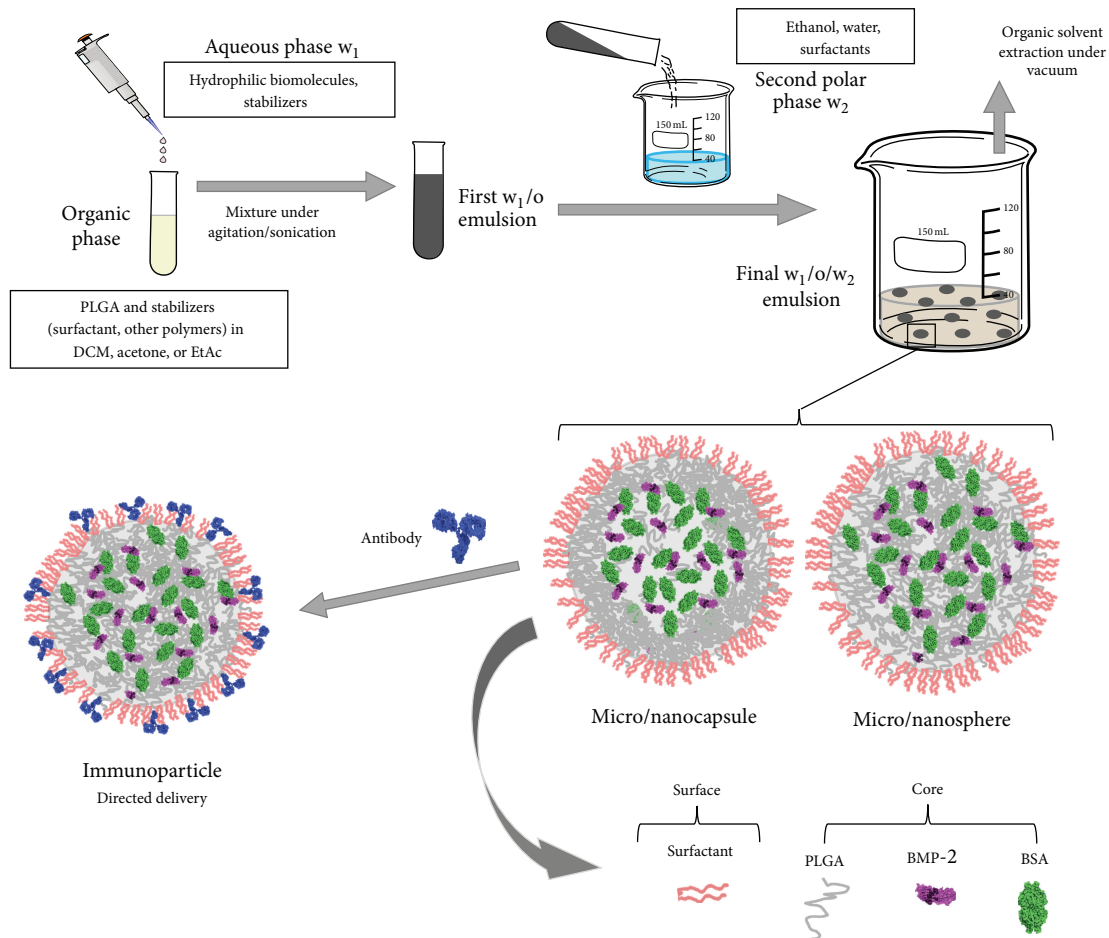


FIGURE 2: Double emulsion procedure (water/oil/water emulsion, $W_1/O/W_2$) to obtain PLGA micro/nanoparticles. Depending on the synthesis conditions (stabilizers, solvents and mixing procedure) it is possible to obtain micro-nanospheres with a uniform matrix or micro-nanocapsules with a core-shell structure. Immunoparticles used for directed delivery can be obtained by attaching specific antibody molecules on the particle surface.

is preferred to absorption because the growth factors are more protected against environmental factors in the medium and may have better control over the delivery and release to achieve the desired concentrations in specific site and time [78].

Normally, if the GFs are related with bone regeneration processes, nano-microparticles are trapped in a second system as hydrogels or tissue engineering scaffolds, which also play an important role in the release profile of GFs from these particles [78]. The nano-microparticles have allowed the development of multiscale scaffold, thereby facilitating control of the internal architecture and adequate patterns of mechanical gradients of cells and signaling factors [79].

All steps, from the synthesis method and its characteristics, the encapsulation process, or the final surface modification for a targeted delivery, determine the characteristics of these systems and their main goal: the controlled release of bioactive GFs.

3.1. Synthesis Methods. It is possible to find several procedures to encapsulate hydrophilic molecules as proteins or nucleic acids in polymeric nano/microparticles. Phase

separation [80] or spray drying [81] techniques have been reported to encapsulate hydrophilic molecules. However, in the case of proteins, the most normally used procedure to encapsulate them into PLGA micro- and nanoparticles is the double-emulsion (water/oil/water, W/O/W) solvent evaporation technique [75, 82]. A schematic description of this technique is presented in Figure 2. In a general way, PLGA is dissolved in an organic solvent and emulsified, using mechanical agitation or sonication, with water containing an appropriate amount of protein. Thus, a primary water/oil (W/O) emulsion is obtained. In the second phase, this emulsion is poured into a large polar phase leading to an immediate precipitation of the particles as a consequence of the polymer shrinkage around droplets of the primary emulsion. This phase may be composed of a water solution of a stabilizer (surfactant) or ethanol-water mixtures [83, 84]. After stirring, the organic solvent is rapidly extracted by evaporation under vacuum. A wide list of different modifications have been tested in this procedure in order to obtain a micro/nanocarrier system with adequate colloidal stability, high encapsulation efficiency, adequate bioactivity, and, finally, a long-time release profile with low “initial burst.”

The goal is to avoid a high amount of protein (>60%) being released very quickly (24 hours), which is one of the biggest problems of a controlled release system [76].

3.2. Organic Solvent. Hans and Lowman show different examples of organic solvents used in multiple emulsion processes. Normally, dichloromethane (DMC), ethyl acetate, acetone and their mixtures can be used [82]. In the first step, a good organic solvent with low water solubility to facilitate the emulsification process and low boiling point for an easy evaporation would be the election. However, the structure of the encapsulated protein molecules can be affected and denaturation processes and loss of biological activity appear when they interact with a typical organic solvent as DMC [73]. Ethyl acetate, on the other hand, exerts less denaturing effects with a lower incidence on the bioactivity of the encapsulated proteins [85].

Other important factors related with the organic solvent are their physical properties that affect how the polymer tails self-organize in the shell of the emulsion droplets and modify the nanoparticle morphology and the encapsulation efficiency [86]. In this way, a higher water solubility of the organic solvent, that is, ethyl acetate, favors a rapid solvent removal. Additionally, the solvent removal rate can be controlled by adjusting the volume of the polar phase as well as the shear stress during the second emulsification step. An increase of these two parameters increases the diffusion rate of ethyl acetate from primary microparticles to outer aqueous phase, resulting in their rapid solidification [87]. It also enhances the encapsulation efficiency and minimizes the contact-time between protein molecules and organic solvent [88], obtaining at the same time a lower burst effect and a slower drug release from the microparticles [87].

3.3. Particle Size and Morphology. Particle size is an important parameter and one of the main goals of the delivery polymeric system. Microspheres, from a few micrometers up to 100 μm , are suitable for oral delivery, mucosal adhesion, or inside scaffold use, that is, for bone regeneration. Nanoscale dimension of the carrier offers enhanced versatility when compared with particles of larger size. This is due to the fact that they have higher colloidal stability, improved dispersibility and bioavailability, more reactive surface and also, can deliver proteins or drugs inside and outside of the corresponding cells [89]. BMP2 promotes bone formation and induces the expression of other BMPs and initiates the signaling pathway from the cell surface by binding to two different surface receptors [22]. Therefore, the BMP2 carrier particles must release it into the extracellular medium. Since cellular intake of PLGA nanoparticles is very fast, the intaking process can be limited by an increase in size from nano- microparticles [90]. However, the interaction between particles and cells is strongly influenced by particle size. If cell internalization is desired, the particle must be comprised in the submicron scale at an interval between 2 and 500 nm [91]. Moreover, this size is needed for a rapid distribution after parenteral administration in order to reach different tissues through different biological barriers. In addition,

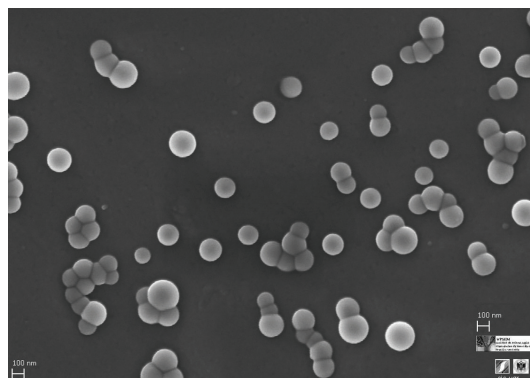


FIGURE 3: Scanning electron microscopy (SEM) photography of PLGA nanoparticles obtained by a double emulsion emulsification procedure. This system with spherical shape, low polydispersity, and nanoscopic scale shows the intended properties for an adequate physiological distribution and cell internalization.

the intake by macrophages is minimized with a diameter of nanoparticles under 200 nm and even smaller [82, 92]. As discussed by Yang et al. [93], slight modifications of the synthesis procedure can suppose drastic effects on the size or particle morphology and, therefore, in the protein encapsulation efficiency and kinetic release.

In double emulsion processes, the first emulsification step largely determines the particle size while the second emulsification step, characterized by the solvent elimination and polymer precipitation, mainly affects the particle morphology [86]. However, the use of surfactant solutions as the polar medium of the second emulsification process and the volume ratio between organic and polar phases in this step has shown an important influence in the final size [94]. Therefore, the correct election of the organic solvent, the polymer concentration, the addition of surfactant, and the emulsification energy allow controlling the size of the system.

The incorporation of poloxamers (F68) in the organic solvent of the primary emulsification helps to increase the colloidal stability of the first dispersion by being placed at the water/oil interface. This reduces the particle size in comparison with pure PLGA nanoparticles in which the only stability source comes from electric charge of the carboxyl groups of the PLGA [95]. It is normal to obtain spherical micro/nanospheres with a polymeric porous core. A typical SEM micrograph of PLGA nanoparticles obtained by W/O/W emulsion using a mixture of organic solvents (DCM/acetone) and ethanol/water as second polar medium is shown in Figure 3, in which the spherical shape and uniform size distribution are the main characteristics. The outer polymeric shell in the second emulsification step pushed the water droplets to the inner core according to their solidification process [96]. This process allows producing particles like capsules with a core-shell structure in which the inner core has a low polymer density. Figure 4 shows a typical core-shell structure in which the polymer precipitates and shrinks around the water droplets during the solvent change of the second phase and the subsequent organic solvent evaporation process [97]. In this case, the process of

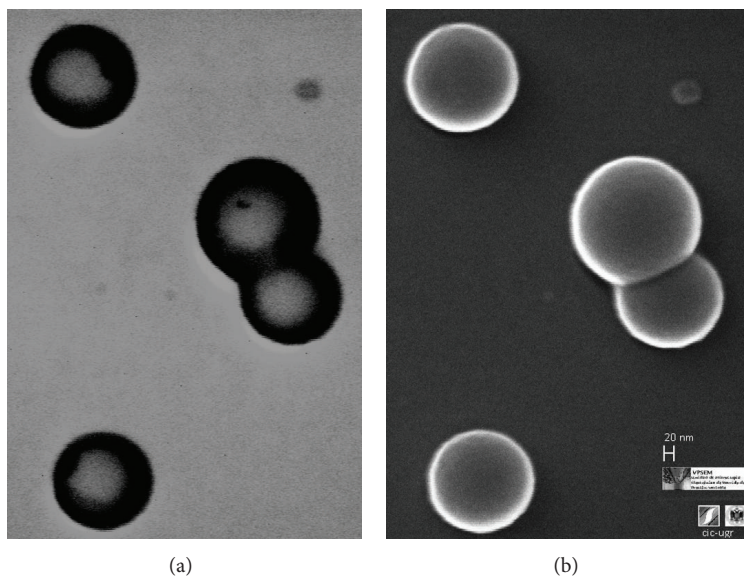


FIGURE 4: PLGA/poloxamers188 blend nanoparticles. (a) Scanning transmission electron microscopy (STEM) photography; (b) scanning electron microscopy (SEM) photography. STEM technique allows the analysis of the nanoparticle structure with an internal region with a low polymer density, which is representative of nanocapsules with core-shell structure.

solidification of the polymer is influenced and determined by the miscibility of the organic solvent with the second polar phase and the removal rate.

The polymeric shell often presents channels or pores as a consequence of the inner water extrusion due to osmotic forces. This can reduce the encapsulation efficiency and favors a fast initial leakage with the unwanted “burst release” [93]. This modification of internal structure of the particles is usually indicated assigning the term “nanosphere” to the system with a core consisting of a homogeneous polymer matrix. The bioactive agent is dispersed within them, while the core-shell structure would be similar to a “nanocapsule” where the biomolecule is preferably in the aqueous cavity surrounded by the polymeric shell [78] (see Figure 2).

3.4. Stabilizer Agents

3.4.1. Colloidal Stability. The double emulsion method normally requires the presence of stabilizers in order to confer colloidal stability during the first emulsification step, to prevent the coalescence of the emulsion droplets, and, later, to maintain the stability of the final nano/microparticles [98]. Polyvinyl alcohol (PVA) and PEO derivate as poloxamers (also named pluronics) have been used in most cases [83, 94]. Others include natural surfactants, such as phospholipids [99, 100]. In some cases, it is possible to avoid surfactants if the particles have an electrostatic stability contribution, that is, from the uncapped end carboxyl groups of the PLGA molecules [101].

As it has been previously commented, PVA and poloxamers have shown their efficiency in synthesizing both nano- and microparticles, affecting not only the stability of the systems but also their size and morphology. Thus, a size reduction effect has been found using PVA in the external water phase, affecting at the same time the surface porosity,

mainly in microsized particles [94]. A comparative study between this and phospholipids (di-palmitoyl phosphatidylcholine, DPPC) as stabilizers showed that DPPC could be a better emulsifier than PVA to produce nano- and microparticles. With this method, a much lower amount of stabilizer was needed to obtain a similar size. In the same study, a higher porosity on the particle surface for the PVA emulsified nanospheres was shown [99].

On the other hand, the combination of PLGA with poloxamers has shown positive effects for the nano- and microsystems in terms of stability [102]. The use of these surfactants in the first or second steps of the W/O/W emulsion procedure leads to different situations. Thus, if poloxamers are blended with PLGA in the organic phase of the primary emulsification, an alteration of the surface roughness is obtained. However, if these are added in the inner water phase, an increase of porosity is found [83]. In addition, their inclusion in the polar phase of the second emulsification step also generates hydrophilic roughness surfaces. A quantification of this is shown in Figure 5, in which the electrophoretic mobility of both PLGA pure and PLGA/pluronic F68 nanoparticles is measured as a function of the pH of the medium. The observed dependence with this parameter is a consequence of the weak acid character of the PLGA carboxyl groups. When poloxamer molecules are present at the interface, a systematic reduction of mobility was found as a consequence of the increase in the surface roughness. The hydrophilic surfactant chains spread out towards the solvent originating a displacement of the shear plane and the consequent mobility reduction [95, 101].

The final PLGA particle size is primarily controlled by electrostatic forces and is not significantly affected by the presence or nature of poloxamer stabilizers [101]. The recognition of the nanocarriers by the mononuclear phagocytic system (MPS) can be significantly altered if the surface of

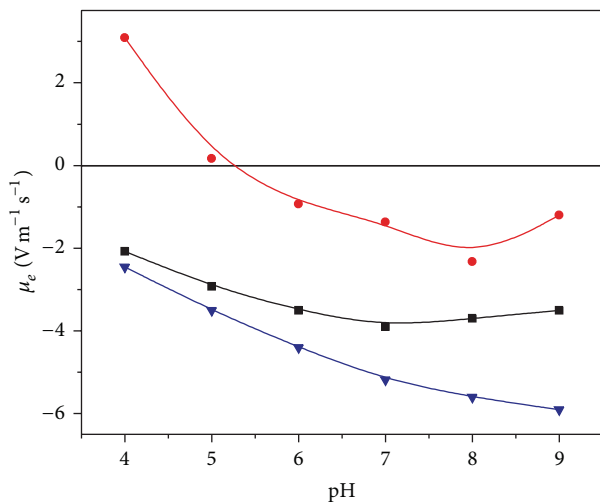


FIGURE 5: Electrophoretic mobility versus pH for PLGA nanoparticles with different characteristics. (\blacktriangledown) PLGA, (\blacksquare) PLGA/poloxamer188 blend, and (\bullet) PLGA covered by Immuno- γ -globulin. The different surface composition affects the electrokinetic behaviour of bare nanoparticles. Surface charge values were screened by the presence of nonionic surfactant as poloxamers, or, in a higher extension, by the presence of antibody molecules attached on the surface.

colloidal particles is modified by using PEO block copolymer of the poloxamer molecules. The steric barrier given by these surfactant molecules prevents or minimizes the adsorption of plasma protein and decreases the recognition by macrophages [103]. The size of microspheres is also unaffected by the coencapsulation of poloxamers. The system containing poloxamer-PLGA blends drive to an inner structure displaying small holes and cavities in relation with microspheres of pure PLGA with a compact matrix-type structure [83].

Microparticles formulated by poloxamer in the second polar medium have completely different surface than the PVA ones, almost without pores [94]. A comparison between different poloxamers shows that the hydrophilic-lipophilic balance (HBL) of the surfactant plays a crucial role determining the surfactant-polymer interactions and controlling the porosity and roughness of the nano-microparticles [83, 104].

In a similar manner to surfactants, polymer characteristics, like the hydrophobicity grade, the molecular weight or the hydrolysis degradation rate, can strongly influence the particle morphology. Therefore, the polymer composition of the particles greatly affects its structure and properties. This is why it is usual to use other polymers in order to modify the behavior and application of the particles. In this way, polyethylene glycol (PEG) of different chain length is frequently used to modify the surface characteristics. With PEG, particles are more hydrophilic and with rougher surfaces which affects the MPS action by increasing the circulating-time and half-life *in vivo*, like the presence of PEO chains [105]. Additionally, PEG chains also provide colloidal stability via steric stabilization. Pegylated-PLGA nano- or microparticles can be normally obtained by using in the

synthesis method PLGA/PEG di- and triblock copolymers [58, 59, 75]. Natural polymers as chitosan, besides modifying the hydrophobicity-hydrophilicity ratio of the surface, also confer them a mucoadhesive character [106].

3.4.2. Encapsulation Efficiency and Bioactivity. Furthermore, the use of stabilizers (surfactants or polymers) also influences the encapsulation efficiency and the protein stability. In fact, for the W/O/W solvent evaporation process, the chlorinated organic solvent used for the first emulsification could degrade protein molecules encapsulated in this step if they come into contact with the organic/water interface, causing their aggregation or denaturation [107]. The polymer-protein interaction, the shear stress for the emulsification process, and the pH reduction derived from PLGA polymer degradation can also produce the same situation with the subsequent loss of biological activity of the encapsulated biomolecules. Different strategies to prevent it have been used. For example, an increase of the viscosity around protein molecules can help to isolate them from their microenvironment [108]. In this way, viscous products, such as starch, have been used to prevent protein instability [109]. These authors coencapsulate BMP2 with albumin inside starch microparticles using other biodegradable polymer, poly- ϵ -caprolactone, instead of PLGA. The BMP2 retained its bioactivity. Despite a low encapsulation rate, beside an initial burst followed by an uncompleted release, the amount of BMP2 needed at the beginning was lower [109]. The combination of PEO surfactants with PLGA (blended in the organic phase) can also preserve the bioactivity of microencapsulated proteins [110] or nucleic acids [84].

However, in most cases, the coencapsulation of GFs with other biomolecules was the preferred strategy. Thereby, serum albumins (SA) have shown the capacity to limit the aggregation-destabilization of several proteins incited by the water/organic solvent interface of the primary emulsification process [111, 112]. White et al. encapsulated lysozyme inside PLGA-PEG microparticles. In addition to the protective function, they also observed an important increase of the entrapment efficiency when human SA was coencapsulated with lysozyme and BMP2 [59]. d'Angelo et al. used heparin as stabilizer because it forms a specific complex with several GFs, stabilizes their tridimensional structure, and promotes their bioactivity. An encapsulation efficiency of 35% was increased to 87% using bovine SA as a second stabilizer to encapsulate two natural proangiogenic growth factors inside PLGA-poloxamer blended nanoparticles. The *in vitro* cellular assays showed the preservation of the biological activity of GFs up to one month [56].

The use of more hydrophilic surfactants (poloxamers) or polymers (PEG) in the inner water phase or blended with PLGA in the organic phase of the primary emulsion reduces the interaction of encapsulated proteins with the hydrophobic PLGA matrix. This prevents disrupting the structure of the protein molecules and helps, at the same time, to neutralize the acidity generated by the hydrolytic degradation of the PLGA [113]. In some cases, the combination of several stabilizers, such as poloxamers, trehalose, and sodium bicarbonate, has been shown to preserve the integrity

of encapsulated proteins but it also reduces the encapsulation efficiency [114].

As a general rule, encapsulation efficiency increases with the size of the particles [82]. Additionally, the adequate stabilization of the primary emulsion by amphiphilic polymers and a rapid solidification (precipitation) of polymer in the second step are favorable parameters for enhancing protein entrapment efficiency in the W/O/W emulsion technique [87].

The tendency of BMP2 to interact with hydrophobic surfaces may decrease the loss of encapsulated protein during the extraction of the solvent phase. This favors a higher entrapment but it lowers the later extraction [58]. An optimal protein encapsulation is obtained when pH of the internal and external water phases is near the isoelectric point of the protein [92]. Blanco and Alonso [83] observed a reduction in the protein encapsulation efficiency when poloxamer was coencapsulated in the primary emulsion. This highlights the main role played by the protein-polymer interaction in the encapsulation efficiency and the later release process. However, too much emulsifier may also result in a reduction of the encapsulation efficiency [99]. Therefore, an equilibrium between the emulsification powder of the surfactant and their concentration is needed.

3.5. Release Profile. The release profile represents one of the most important characteristics of a nano/micro particulate carrier system since their development has a main final objective: the adequate release of the encapsulated bioactive molecules to reach the desired clinical action.

The release pattern of protein encapsulated in PLGA micro/nanoparticles can present different behavior. It is possible to find a continuous release when the diffusion of the biomolecule is faster than the particle erosion. This process involves a continuous diffusion of the protein from the polymer matrix before the PLGA particle is degraded in lactic and glycolic acid monomers by hydrolysis [74]. A biphasic release characterized by an initial burst at or near the particle surface followed by a second phase in which protein is progressively released by diffusion has also been described. The second phase can be enhanced by bulk erosion of PLGA shell and matrix which results in an important increase of pores and channels [75]. A third triphasic release profile has been found when a lag release period occurs after initial burst and until polymer degradation starts [115]. Finally, it is possible to obtain an incomplete protein release as a consequence of additional factors related with the protein-polymer interaction or protein instability. Figure 6 illustrates the different release profiles previously described. The optimal carrier system should be capable of releasing a controlled concentration gradient of growth factors in the appropriate time, preventing or at least reducing or controlling the initial burst effect [116]. A controlled initial burst followed by a sustained release significantly improves the *in vivo* bone regeneration [117–119].

Giteau et al. [108] present an interesting revision on “How to achieve a sustained and complete release from PLGA microparticles.” They begin by analyzing the influence of the release medium and sampling method on the release profile

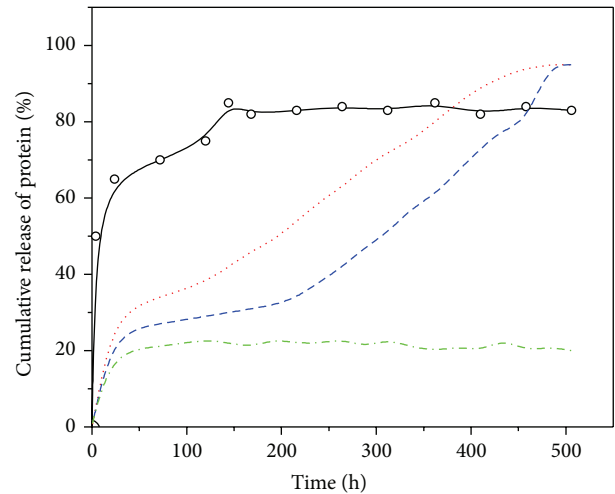


FIGURE 6: Release profiles. (O) BSA release from PLGA nanoparticles with high initial burst release; (red dots line) biphasic model combining a moderate initial burst and a subsequent sustained release; (blue dash line) triphasic model with a lag of release between both initial and sustained release phases; (dash-dot green line) incomplete release.

and highlight the significance of the centrifugation cleaning process or the release medium volume. Adjusting to adequate values the centrifugation speed or the buffer volume, it is possible to separate micro/nanoparticles from protein-containing release medium in a very easy way. This allows for stable and reproducible release patterns. On the other hand, to ensure a better protein release profile, modification of the microparticle formulation and microencapsulation process in order to preserve protein aggregation has to be performed. Protein stability has to be maintained by preventing the formation of harmful medium. For example, the synthesis formulation can be modified to use more hydrophilic polymers, since they have been shown to reduce the initial burst and to deliver bioactive proteins over long time periods.

The most relevant strategies are referenced below. Drug release from PLGA nano/microparticles can be controlled by the polymer molecular weight and the relation between monomers (lactide/glycolide) so that an increase in glycolic acid accelerates the weight loss of polymer due to the higher hydrophilicity of the matrix [75]. A mixture of different PLGA nanoparticles obtained using 50:50 and 75:50 lactide/glycolide ratio has shown a great potential for protein drug delivery with a higher initial burst from PLGA 50:50. A slow release period has been observed for PLGA 75:50 encapsulating a glycoprotein (α -1-antitrypsin) with clinic activity in some pulmonary diseases [60].

On the other hand, a faster erosion of the microspheres with reduction in the PLGA molecular weight due to the facility of water penetration and the subsequent polymer degradation has been described [83]. Schrier et al. working with microspheres prepared by w/o/w using different types of PLGA analyzed the important role of the molecular weight, lactide-glycolide relation, and acid residues [57]. The amount of rhBMP2 adsorbed on the microparticle surface increased

with the hydrophobicity of the polymer. At the same time, the release was in correlation with the degradation profile of the different polymers [57].

Thus, the use of more hydrophilic polymers reduces the hydrophobic protein-polymer interaction. This effect favors a more homogeneous distribution in the polymer matrix and increases the water uptake in the microspheres. Thus, the release rate of rhBMP2 encapsulated in microspheres composed by a PEG-PLGA di-block copolymer is increased with the PEG content of the polymer matrix [58]. A similar result was obtained using PLGA-PEG-PLGA triblock copolymers [59]. In this case, modifying the monomer relation (lactide-glycolide) in the PLGA and increasing the amount of PLGA-PEG-PLGA in the formulations, the release profile of BMP-2 coencapsulated with human SA in microspheres was adjustable. Similarly, the interaction of lysozyme with poloxamer 188 before their encapsulation produces a sustained release over 3 weeks without any burst effect. In the same line, using PLGA-PEG-PLGA as polymer, a sustained release of bioactive lysozyme was extended over 45 days when the protein was complexed with poloxamer 188 previously to the encapsulation [120]. However, the presence of PEG300 as an additive of the inner phase of microparticles during the encapsulation process also influences the protein distribution and the release profile. In this case there is a decrease of the initial burst but with less overall release [58].

On the other hand, the use of PLGA-poloxamers blends is useful to obtain a sustained release for more than one month without any incidence in the high initial burst [56, 92]. However, for an encapsulated plasmid inside nanoparticles obtained by PLGA-poloxamer blends, the hydrophobicity of the surfactant allows prolonging the release up to 2 weeks in a controlled manner. Moreover, a complete release was reached for the PLGA-poloxamer blend instead PLGA nanoparticles, in which the maximum release was around 40% [84].

PLGA and poloxamers (pluronic F68) blends can also be used to obtain nanocomposite vesicles by a double emulsion process. These vesicles are suitable for the encapsulation of hydrophobic and hydrophilic molecules. The presence of pluronic affects the colloidal stability of the vesicles and the release pattern of the encapsulated molecules. These vesicles present a wall of 30 nm and the drug is encapsulated in the presence of the poloxamer [121].

Other strategies include the use of different compounds to increase the release time. Thus, BMP2 encapsulated in PLGA-PVA nanoparticles (around 300 nm) showed higher encapsulation efficiency and a short-time release profile with a very high initial burst. However, with the same synthesis procedure (w/o/w) but using PHBV (Poly(3 hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)), BMP7 loaded nanocapsules had less encapsulation efficiency despite a long-time delivery. Nevertheless, the maximum released amount was lower. This difference in the release profile was due to the difference in hydrophilicity and degradation rates of both polymers [122]. Similarly, PLGA-poloxamer blend nanoparticles were superficially modified by introducing chitosan in the second step of the synthesis. This method showed a sustained release profile for up to 14 days without any initial important burst. In this case, a recombinant hepatitis B antigen was used

[106]. Moreover, the use of heparin conjugated with PLGA porous microspheres has also been described to obtain a long-time delivery system reducing at the same time the initial burst. In these systems, heparin was immobilized onto the nano/microparticle surface. The release was controlled by using the binding affinities of heparin to several growth factors including BMP2. In this case, the initial burst was reduced to 4–7% during first day followed by a sustained release of about 1% per day [51–53].

The initial burst release may be attenuated by the fabrication of double-wall microspheres, that is, core-shell microparticles. The presence of a PLA shell reduces the release rate of BSA encapsulated in the PLGA core and extends the duration of the release profile up to two months. Moreover, an increase in the PLA molecular weight influences the rate of particle erosion, which further slows the protein release [123].

The modification of the viscosity in the environment of microparticles additionally influences the release pattern. Viscosity can control the burst at earliest time point and promote a sustained release. This situation has been shown for rhBMP2-PLGA microspheres embedded in a chitosan-thioglycolic acid hydrogel (Poloxamer 407) [124]. Yilgor et al. also incorporated the nanoparticles of their sequential delivery system into a scaffold composed by chitosan and chitosan-PEO [54]. In other work, PLGA/PVA microspheres with encapsulated BMP2 were combined with different composite biomaterials (gelatin hydrogel or polypropylene fumarate). The sustained release of the bioactive molecule was extended over a period of 42 days. *In vivo* results indicate the importance of the composite characteristics. In this case, an enhanced bone formation was obtained when the PLGA microparticles were incorporated into the more hydrophobic matrix (polypropylene fumarate) [125, 126].

Finally, Table 2 summarizes important information about different parameters related to the use of PLGA based nano- or microparticles to encapsulate, transport, and release growth factors (mainly BMP2).

3.6. Gene Therapy for Bone Tissue Engineering: Directed Delivery. In the last years, gene therapy has begun to play a role in bone tissue regeneration becoming an alternative method for the delivery of BMP2 [127, 128]. Thus, the genes encoding a specific protein can be delivered to a specific cell, rather than the proteins themselves. To reach this purpose, an efficient gene vector is necessary. Viral vectors possess the best transfection efficiency but numerous disadvantages, the most notable of them being the risk of mutagenesis. Nonviral vectors elude these problems but with a significant reduction in the transfection rate [129]. Therefore, intracellular delivery of bioactive agents has become the most used strategy for gene therapy, looking for the adequate transfection and consequent expression of the desired protein [79].

PLGA microspheres obtained by a w/o/w double emulsion process have been used by Qiao et al. to entrap plasmid-BMP2/polyethyleneimine nanoparticles. In this case, a sustained release of these nanoparticles until 35 days without initial burst was found resulting in differentiation of osteoblast

TABLE 2: Nano/microparticles systems to encapsulate GFs, mainly BMP2 growth factor. Most of them are in the microscopic scale and were used to be entrapped into scaffold of different characteristics. PVA has been the more used surfactant-stabilizer. It is possible to find both, encapsulation and surface adsorption of the growth factors with high-moderate efficiency. The use of heparin as stabilizer reduces significantly the initial burst release, favoring a sustained release in the time. The bioactivity of the GF was preserved in most of the systems and coencapsulation with other biomolecules seems to have a similar effect than the use of surfactants as stabilizers.

Polymers	Stabilizer	Size	Encapsulation % EE	Release	Biological activity	Reference
PLGA	PVA	10–20 μm	Adsorbed rhBMP2	20 ng/mL of constant sustained release	Better bone formation after 8 weeks	Fu et al. 2013 [44]
PLGA	PVA	10–100 μm	rhBMP2-BSA 69% (BMP)	Burst (20%) Sustained until 77% (28 days)	BMP2 molecules with bioactivity	Tian et al. 2012 [45]
PLGA 75 : 25	PVA	182 μm	82%	—	Good bone defect repair outcomes within 8–12 weeks	Rodríguez-Évora et al. 2014 [46]
PLGA	PVA	228 μm	60,5%	30% initial burst. Slower release of 4% per week. After 8 weeks 60% released	No loss of bioactivity	Reyes et al. 2013 [47]
PLGA/PEG	No double emulsion synthesis	100–200 μm	Adsorbed BMP2	13% initial burst. Slower release of 0.01–8% per day. After 23 days 70% released	Substantial bone regeneration of the scaffold	Rahman et al. 2014 [48]
Different PLGA	PVA	20–100 μm	30% (uncapped PLGA) 90% (capped PLGA)	26–49% (1 day) Total after 2 weeks	No loss of bioactivity	Lupu-Haber et al. 2013 [49]
PLGA 75 : 25	PVA	5–125 μm	—	Initial burst 30% (1 day) Sustained 35 days	Higher volumes and surface area coverage of new bone	Wink et al. 2014 [50]
PLGA	Heparin	200–800 nm	Adsorbed BMP2 94%	No initial burst. Sustained over 4 weeks	Significant reduction of the BMP2 dose for good bone formation	La et al. 2010 [51]
PLGA	Heparin-Poloxamer	160 nm	Adsorbed BMP2 100%	Initial burst (4–7%) linear profile	Higher matrix mineralization of regenerated bone	Chung et al. 2007 [52]
PLGA	Heparin	100–250 nm	Adsorbed 94%	Initial burst 10% (1 day) 60% after 30 days	No loss of bioactivity Efficacy of administration, amount 50-fold lower	Jeon et al. 2008 [53]
PLGA	PVA	~300 nm	80%	85% initial burst (1 day)	No loss of bioactivity	Yilgor et al. 2009 [54]
PLGA (in rings)	PVA	215 μm	66%	Moderate burst Sustained release over 6 weeks	60% of calvaria defect were healed	Rodríguez-Évora et al. 2013 [55]
PLGA-Poloxamer 188 Blend	Poloxamer	150 nm	FGF-BSA-Heparin 60–80%	40% initial burst (1 day), 60% (30 days)	No loss of bioactivity	d'Angelo et al. 2010 [56]
Different PLGA polymers	PVA	μm order	rhBMP2 adsorption 40–75%	20–80% initial burst (1 day)	—	Schrier et al. 2001 [57]

TABLE 2: Continued.

Polymers	Stabilizer	Size	Encapsulation % EE	Release	Biological activity	Reference
PLGA/PEG	PVA	37–67 μm	72–99%	33% initial burst (1 day)	Little loss of bioactivity	Lochmann et al. 2010 [58]
PLGA/PLGA-PEG-PLGA	PVA	100 μm	HSA-BMP2 60%	70% initial burst (1 day)	No loss of bioactivity	White et al. 2013 [59]
PLGA	PVA	100–1000 nm	A-1-antitrypsin 90%	30% initial burst (1 day) 50% after 24 days	Biological activity was preserved using BSA and β -cyclodextrine.	Pirooznia et al. 2012 [60]

promoted by the correct transfection of the delivered bio-functional BMP2-DNA [130].

In spite of the general caution with gene therapy, the genetic delivery of BMP2 has the potentiality of a better safety compared with the delivery of large amounts of recombinant protein [131]. Lu et al. specify the urgent need to develop more efficient delivery nanoparticles and transfection methods in order to apply the nonviral vectors in stem cell engineering and bone regeneration. Although enhanced bone formation has been shown in several recent studies using genes such as HIF-1 α and miRNAs, new genetic sequences will be discovered and used in bone engineering in the near future that will most likely change our perspective [132].

PLGA nanospheres represent a well-studied biomolecule delivery system that could be applied to cell targeting, in order to enhance the delivery of specific proteins or nucleic acids inside or near the bone engineering reference cells, that is, mesenchymal stem cells [133]. The targeting properties can be supplied by a ligand functionalization strategy: modification of the surface structure of the nanocarrier by conjugating a cell-specific ligand to direct the release of encapsulated biomolecules preferably in close association with the target cells [134]. The use of pegylated nanoparticles with a covalent attachment of different ligands is reported as a potential technique to deliver bone cell-specific biomolecules for bone engineering [135].

Specific antibodies that recognize surface receptors in these cells could be covalently coupled to the surface of PLGA nanoparticles, obtaining “immunonanoparticles.” There are several examples of antibody immobilization on surface of PLGA nanoparticles. Kocbek et al. demonstrated the specific recognition of breast tumor cells by a specific monoclonal antibody attached on PLGA fluorescent nanoparticles obtained by W/O/W emulsion process [136]. For the surface covalent attachment, they used a more simple carbodiimide method, which promotes the formation of an amide bond between free carboxylic end groups of PLGA nanoparticles and primary amine groups of the antibody molecule [81]. This procedure can be highly influenced by the presence of stabilizers frequently used to confer colloidal stability to nanoparticles. The electrophoretic mobility of PLGA nanoparticles with an antibody (immuno- γ -globuline anti-human C-reactive protein) covalently attached on the surface is shown in Figure 5. It is necessary to remark the drastic decrease in the mobility values of the antibody-modified

nanoparticles with respect to bare PLGA nanoparticles, which could imply low colloidal stability and the subsequent aggregation of the nanosystem. Santander-Ortega et al. proposed a lower antibody loading in which the bare PLGA patches must be coated by a nonionic surfactant in order to obtain immunoreactive stable nanoparticles [95]. Ratzinger et al. indicated that the presence of high poloxamer concentrations decreased the coupling efficiency to carboxylic end groups in PLGA nanoparticles, showing that an equilibrium that combines sufficient stability and the best coupling efficiency is necessary [98]. To prevent this problem, Cheng et al. synthesized carboxyl functionalized PLGA-PEG block copolymer, attaching a specific aptamer to the surface of pegylated nanoparticles via carbodiimide method. In this work, an enhanced drug delivery to prostate tumors has been shown in comparison to equivalent nontargeted nanoparticles [137].

3.7. Scaffolds. The data reported in the literature indicate that PLGA micro/nanoparticles are promising to achieve a sustained, spatial, and temporally controlled delivery of growth factors required for cell growth and cell differentiation. They can be incorporated with cells in solid scaffold or injectable hydrogels [73]. Scaffolds are porous 3D structures normally used to improve tissue-engineered bone [28]. According to Tian et al. [45], a scaffold designed with this objective must have (1) appropriate mechanical strength to support the growth of new bone; (2) appropriate porosity to allow ingrowth of bone-related cells; (3) good biocompatibility allowing the growth of cells on its surface without being rejected by the body; and (4) low toxicity to cells and tissues surrounded and (5) must be able to induce osteogenic differentiation of bone-related stem cells and (6) be biodegradable with nontoxic degradation products that can be eventually replaced by new bone. Additionally, the scaffold for bone regeneration must maintain the delivery or release of BMP (growth factors) “*in situ*” for a long time. In this way, nano/microparticles inside scaffolds are being used to release an adequate flow of these signaling biomolecules and preserve their functional structure [138]. The incorporation of colloidal micro/nanoparticles into fibrous scaffolds adds in the possibility of multiple drugs loading. However, this multidrug system could also involve a decrease of the mechanical properties of the structure and a possible loss of nanoparticles entrapped between the fibers [139].

Considering that the *in vivo* half-life of most biomolecules, especially proteins, is relatively short, it is essential that bioactive scaffolds maintain a desired concentration “*in situ*” to direct tissue regeneration. To do so, an initial release of the encapsulated growth factor in the first hours to quickly get an effective therapeutic concentration followed by a sustained long-time release profile is required [139]. Most of the polymeric particles inserted in scaffold structures are in a micron-scale. The main objective of these microparticles is the protection and temporary control of growth factor delivery. However, given the porosity of these structures, nanoparticles and especially particles of a few microns may become more important since it is possible to design systems with a simple and easy diffusion through the structure. This process could allow the specific recognition of a particular cell type, releasing their encapsulated BMPs in the same environment and helping their differentiation to cell/bone tissue. In any case, the larger-size microspheres might not necessarily be useless for bone regeneration scaffolds. As the microspheres gradually degrade, the space they occupied will be conducive to ingrowth of tissue. In addition to affecting the compression modulus of scaffolds because of their hollow feature, the particle size of microspheres can also influence the release of rhBMP2 [45].

4. Conclusion

The use of polymeric particles using PLGA is a promising system for a spatially and temporally controlled delivery of growth factors that promote cell growth and differentiation in bone engineering and regeneration by means of their incorporation beside cells into solid scaffold or hydrogels.

The PLGA is widely used for its biodegradability and biocompatibility and is approved by FDA and the European Medicines Agency for use in drug delivery systems supplied via parenteral. On the other hand, BMPs are potent growth factors for bone repair and specifically BMP2 shows excellent ability to induce bone formation of adequate quality. The procedure for synthesizing PLGA nano- or microparticles can be modified in their different variables to obtain systems with controlled size, in which it is possible to encapsulate hydrophobic or hydrophilic molecules, with an adequate colloidal stability and the possibility of surface functionalization for targeted delivery.

With this scenario, an optimization of methods and components must balance the structure and morphology of PLGA micro/nanoparticles in order to achieve high encapsulation efficiency of BMP2 and looking for a main goal: control of delivery, reducing the initial burst, and reaching a sustained release profile, preserving the biological activity, and directed to the target cells to minimize the clinical amount needed and allowing a correct bone tissue regeneration.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests with any of the products listed in the paper.

Acknowledgments

The authors wish to express their appreciation for the financial support granted by the “Ministerio de Educación y Ciencia” (MEC, Spain), Projects MAT2013-43922-R, and Research Groups no. FQM-115, no. CTS-138, and no. CTS-583 (Junta de Andalucía, Spain). Partial support was also provided by the Andalucía Talent Hub Program from the Andalusian Knowledge Agency, cofunded by the European Union’s Seventh Framework Program, Marie Skłodowska-Curie actions (COFUND, Grant Agreement no. 291780) and the Ministry of Economy, Innovation, Science and Employment of the Junta de Andalucía (Miguel Padial-Molina).

References

- [1] M. Padial-Molina, P. Galindo-Moreno, and G. Avila-Ortiz, “Biomimetic ceramics in implant dentistry,” *Minerva Biotechnologica*, vol. 21, no. 3, pp. 173–186, 2009.
- [2] B. Al-Nawas and E. Schiegnitz, “Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone—a systematic review and meta-analysis,” *European Journal of Oral Implantology*, vol. 7, supplement 2, pp. S219–S234, 2014.
- [3] A. Katranji, P. Fotek, and H.-L. Wang, “Sinus augmentation complications: etiology and treatment,” *Implant Dentistry*, vol. 17, no. 3, pp. 339–349, 2008.
- [4] C. E. Misch, “Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans,” *The International Journal of Oral Implantology: Implantologist*, vol. 4, no. 2, pp. 49–58, 1987.
- [5] C. Myeroff and M. Archdeacon, “Autogenous bone graft: donor sites and techniques,” *The Journal of Bone & Joint Surgery—American Volume*, vol. 93, no. 23, pp. 2227–2236, 2011.
- [6] G. Avila, R. Neiva, C. E. Misch et al., “Clinical and histologic outcomes after the use of a novel allograft for maxillary sinus augmentation: a case series,” *Implant Dentistry*, vol. 19, no. 4, pp. 330–341, 2010.
- [7] S. J. Froum, S. S. Wallace, N. Elian, S. C. Cho, and D. P. Tarnow, “Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting,” *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 26, no. 6, pp. 543–551, 2006.
- [8] P. Galindo-Moreno, G. Ávila, J. E. Fernández-Barbero et al., “Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 18, no. 3, pp. 376–382, 2007.
- [9] P. Galindo-Moreno, I. Moreno-Riestra, G. Avila et al., “Effect of anorganic bovine bone to autogenous cortical bone ratio upon bone remodeling patterns following maxillary sinus augmentation,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 22, no. 8, pp. 857–864, 2011.
- [10] S. L. Wheeler, “Sinus augmentation for dental implants: the use of alloplastic materials,” *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 55, no. 11, pp. 1287–1293, 1997.
- [11] S. S. Wallace and S. J. Froum, “Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review,” *Annals of Periodontology/the American Academy of Periodontology*, vol. 8, no. 1, pp. 328–343, 2003.

- [12] M. Padiál-Molina and H. F. Rios, "Stem cells, scaffolds and gene therapy for periodontal engineering," *Current Oral Health Reports*, vol. 1, no. 1, pp. 16–25, 2014.
- [13] M. Padiál-Molina, S. L. Volk, and H. F. Rios, "Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor -alpha and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides," *Journal of Periodontal Research*, vol. 49, no. 3, pp. 405–414, 2014.
- [14] H. Behnia, A. Khojasteh, M. Soleimani, A. Tehranchi, and A. Atashi, "Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 40, no. 1, pp. 2–7, 2012.
- [15] M. Padiál-Molina, J. T. Marchesan, A. D. Taut, Q. Jin, W. V. Giannobile, and H. F. Rios, "Methods to validate tooth-supporting regenerative therapies," *Methods in Molecular Biology*, vol. 887, pp. 135–148, 2012.
- [16] M. R. Urist, "Bone: formation by autoinduction," *Science*, vol. 150, no. 3698, pp. 893–899, 1965.
- [17] P. Boyne and S. D. Jones, "Demonstration of the osseointegrative effect of bone morphogenetic protein within endosseous dental implants," *Implant Dentistry*, vol. 13, no. 2, pp. 180–184, 2004.
- [18] E. A. Wang, V. Rosen, J. S. D'Alessandro et al., "Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 6, pp. 2220–2224, 1990.
- [19] J. M. Wozney, "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis," *Molecular Reproduction and Development*, vol. 32, no. 2, pp. 160–167, 1992.
- [20] E. Barboza, A. Caúla, and F. Machado, "Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration," *Implant Dentistry*, vol. 8, no. 4, pp. 360–367, 1999.
- [21] A. C. Carreira, G. G. Alves, W. F. Zambuzzi, M. C. Sogayar, and J. M. Granjeiro, "Bone morphogenetic proteins: structure, biological function and therapeutic applications," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 561, pp. 64–73, 2014.
- [22] J. C. Bustos-Valenzuela, A. Fujita, E. Halcsik, J. M. Granjeiro, and M. C. Sogayar, "Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells," *BMC Research Notes*, vol. 4, article 370, 2011.
- [23] K. Tsuji, A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe et al., "BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing," *Nature Genetics*, vol. 38, no. 12, pp. 1424–1429, 2006.
- [24] K. Tsuji, K. Cox, A. Bandyopadhyay, B. D. Harfe, C. J. Tabin, and V. Rosen, "BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb," *The Journal of Bone and Joint Surgery—American Volume*, vol. 90, supplement 1, pp. 14–18, 2008.
- [25] K. Tsuji, K. Cox, L. Gamer, D. Graf, A. Economides, and V. Rosen, "Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 28, no. 3, pp. 384–389, 2010.
- [26] G. Chen, C. Deng, and Y.-P. Li, "TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 8, no. 2, pp. 272–288, 2012.
- [27] M.-C. Ramel and C. S. Hill, "Spatial regulation of BMP activity," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 14, pp. 1929–1941, 2012.
- [28] A. C. Carreira, F. H. Lojudice, E. Halcsik, R. D. Navarro, M. C. Sogayar, and J. M. Granjeiro, "Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives," *Journal of Dental Research*, vol. 93, no. 4, pp. 335–345, 2014.
- [29] F. Deschaseaux, L. Sensébé, and D. Heymann, "Mechanisms of bone repair and regeneration," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 15, no. 9, pp. 417–429, 2009.
- [30] T. D. Mueller and J. Nickel, "Promiscuity and specificity in BMP receptor activation," *FEBS Letters*, vol. 586, no. 14, pp. 1846–1859, 2012.
- [31] C. Sieber, J. Kopf, C. Hiepen, and P. Knaus, "Recent advances in BMP receptor signaling," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 20, no. 5–6, pp. 343–355, 2009.
- [32] G. Sapkota, C. Alarcón, F. M. Spagnoli, A. H. Brivanlou, and J. Massagué, "Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker," *Molecular Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 441–454, 2007.
- [33] W. F. McKay, S. M. Peckham, and J. M. Badura, "A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft)," *International Orthopaedics*, vol. 31, no. 6, pp. 729–734, 2007.
- [34] P. Hong, D. Boyd, S. D. Beyea, and M. Bezuhyly, "Enhancement of bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis: a contemporary review of experimental studies involving adjunct therapies," *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, vol. 66, no. 7, pp. 883–895, 2013.
- [35] D. B. Spagnoli and R. E. Marx, "Dental implants and the use of rhBMP-2," *Dental Clinics of North America*, vol. 55, no. 4, pp. 883–907, 2011.
- [36] M. Nevins, C. Kirker-Head, M. Nevins, J. A. Wozney, R. Palmer, and D. Graham, "Bone formation in the goat maxillary sinus induced by absorbable collagen sponge implants impregnated with recombinant human bone morphogenetic protein-2," *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 16, no. 1, pp. 8–19, 1996.
- [37] P. J. Boyne, L. C. Lilly, R. E. Marx et al., "De novo bone induction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in maxillary sinus floor augmentation," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 63, no. 12, pp. 1693–1707, 2005.
- [38] L. Torrecillas-Martinez, A. Monje, M. A. Pikos et al., "Effect of rhBMP-2 upon maxillary sinus augmentation: a comprehensive review," *Implant Dentistry*, vol. 22, no. 3, pp. 232–237, 2013.
- [39] J. Lee, C. Susin, N. A. Rodriguez et al., "Sinus augmentation using rhBMP-2/ACS in a mini-pig model: relative efficacy of autogenous fresh particulate iliac bone grafts," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 24, no. 5, pp. 497–504, 2013.
- [40] R. G. Triplett, M. Nevins, R. E. Marx et al., "Pivotal, randomized, parallel evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge and autogenous bone graft for maxillary sinus floor augmentation," *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 67, no. 9, pp. 1947–1960, 2009.
- [41] D. W. K. Kao, A. Kubota, M. Nevins, and J. P. Fiorellini, "The negative effect of combining rhBMP-2 and Bio-Oss on bone formation for maxillary sinus augmentation," *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 32, no. 1, pp. 61–67, 2012.
- [42] O. Hanisch, D. N. Tatakis, M. D. Rohrer, P. S. Wöhrle, J. M. Wozney, and U. M. E. Wikesjö, "Bone formation and osseointegration stimulated by rhBMP-2 following subanal augmentation procedures in nonhuman primates," *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, vol. 12, no. 6, pp. 785–792, 1997.
- [43] K. Wada, A. Niimi, K. Watanabe, T. Sawai, and M. Ueda, "Maxillary sinus floor augmentation in rabbits: a comparative

- histologic-histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone," *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, vol. 21, no. 3, pp. 253–263, 2001.
- [44] R. Fu, S. Selph, M. McDonagh et al., "Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis," *Annals of Internal Medicine*, vol. 158, no. 12, pp. 890–902, 2013.
- [45] Z. Tian, Y. Zhu, J. Qiu et al., "Synthesis and characterization of UPPE-PLGA-rhBMP2 scaffolds for bone regeneration," *Journal of Huazhong University of Science and Technology—Medical Science*, vol. 32, no. 4, pp. 563–570, 2012.
- [46] M. Rodríguez-Évora, E. García-Pizarro, C. del Rosario et al., "Smurf1 knocked-down, mesenchymal stem cells and BMP-2 in an electrospun system for bone regeneration," *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 4, pp. 1311–1322, 2014.
- [47] R. Reyes, A. Delgado, R. Solis et al., "Cartilage repair by local delivery of TGF- β 1 or BMP-2 from a novel, segmented polyurethane/polylactic-co-glycolic bilayered scaffold," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2013.
- [48] C. V. Rahman, D. Ben-David, A. Dhillon et al., "Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 8, no. 1, pp. 59–66, 2014.
- [49] Y. Lupu-Haber, O. Pinkas, S. Boehm, T. Scheper, C. Kasper, and M. Machluf, "Functionalized PLGA-doped zirconium oxide ceramics for bone tissue regeneration," *Biomedical Microdevices*, vol. 15, no. 6, pp. 1055–1066, 2013.
- [50] J. D. Wink, P. A. Gerety, R. D. Sherif et al., "Sustained delivery of rhBMP-2 by means of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: cranial bone regeneration without heterotopic ossification or craniosynostosis," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 134, no. 1, pp. 51–59, 2014.
- [51] W.-G. La, S.-W. Kang, H. S. Yang et al., "The efficacy of bone morphogenetic protein-2 depends on its mode of delivery," *Artificial Organs*, vol. 34, no. 12, pp. 1150–1153, 2010.
- [52] Y.-I. Chung, K.-M. Ahn, S.-H. Jeon, S.-Y. Lee, J.-H. Lee, and G. Tae, "Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex," *Journal of Controlled Release*, vol. 121, no. 1–2, pp. 91–99, 2007.
- [53] O. Jeon, S. J. Song, H. S. Yang et al., "Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 369, no. 2, pp. 774–780, 2008.
- [54] P. Yilgor, K. Tuzlakoglu, R. L. Reis, N. Hasirci, and V. Hasirci, "Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 30, no. 21, pp. 3551–3559, 2009.
- [55] M. Rodríguez-Évora, A. Delgado, R. Reyes et al., "Osteogenic effect of local, long versus short term BMP-2 delivery from a novel SPU-PLGA- β TCP concentric system in a critical size defect in rats," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, no. 5, pp. 873–884, 2013.
- [56] I. d'Angelo, M. Garcia-Fuentes, Y. Parajó et al., "Nanoparticles based on PLGA: poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 7, no. 5, pp. 1724–1733, 2010.
- [57] J. A. Schrier, B. F. Fink, J. B. Rodgers, H. C. Vasconez, and P. P. DeLuca, "Effect of a freeze-dried CMC/PLGA microsphere matrix of rhBMP-2 on bone healing," *AAPS PharmSciTech*, vol. 2, no. 3, article E18, 2001.
- [58] A. Lochmann, H. Nitzsche, S. von Einem, E. Schwarz, and K. Mäder, "The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 147, no. 1, pp. 92–100, 2010.
- [59] L. J. White, G. T. S. Kirby, H. C. Cox et al., "Accelerating protein release from microparticles for regenerative medicine applications," *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, vol. 33, no. 5, pp. 2578–2583, 2013.
- [60] N. Pirooznia, S. Hasannia, A. S. Lotfi, and M. Ghanei, "Encapsulation of alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: in vitro characterization as an effective aerosol formulation in pulmonary diseases," *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 10, article 20, 2012.
- [61] M. Ronga, A. Fagetti, G. Canton, E. Pausco, M. F. Surace, and P. Cherubino, "Clinical applications of growth factors in bone injuries: experience with BMPs," *Injury*, vol. 44, supplement 1, pp. S34–S39, 2013.
- [62] J. G. Devine, J. R. Dettori, J. C. France, E. Brodt, and R. A. McGuire, "The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk?" *Evidence-Based Spine-Care Journal*, vol. 3, no. 2, pp. 35–41, 2012.
- [63] E. J. Carragee, E. L. Hurwitz, and B. K. Weiner, "A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned," *The Spine Journal*, vol. 11, no. 6, pp. 471–491, 2011.
- [64] M. C. Simmonds, J. V. E. Brown, M. K. Heirs et al., "Safety and effectiveness of recombinant human bone morphogenetic protein-2 for spinal fusion: a meta-analysis of individual-participant data," *Annals of Internal Medicine*, vol. 158, no. 12, pp. 877–889, 2013.
- [65] V. H.-Y. Chung, A. Y.-L. Chen, L.-B. Jeng, C.-C. Kwan, S.-H. Cheng, and S. C.-N. Chang, "Engineered autologous bone marrow mesenchymal stem cells: alternative to cleft alveolar bone graft surgery," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 23, no. 5, pp. 1558–1563, 2012.
- [66] T. A. Ratko, S. E. Belinson, D. J. Samson, C. Bonnell, K. M. Ziegler, and N. Aronson, *Bone Morphogenetic Protein: The State of the Evidence of On-Label and Off-Label Use*, Agency for Healthcare Research and Quality, Rockville, Md, USA, 2010.
- [67] G. Barratt, "Colloidal drug carriers: achievements and perspectives," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 60, no. 1, pp. 21–37, 2003.
- [68] V. W. Bramwell and Y. Perrie, "Particulate delivery systems for vaccines," *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, vol. 22, no. 2, pp. 151–214, 2005.
- [69] N. Csaba, M. Garcia-Fuentes, and M. J. Alonso, "The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 3, no. 4, pp. 463–478, 2006.
- [70] M. J. Santander-Ortega, T. Stauner, B. Loretz et al., "Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 141, no. 1, pp. 85–92, 2010.
- [71] W. Jiang, R. K. Gupta, M. C. Deshpande, and S. P. Schwendeman, "Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 3, pp. 391–410, 2005.
- [72] T. R. Shantha Kumar, K. Soppimath, and S. K. Nachaegari, "Novel delivery technologies for protein and peptide therapeutics," *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 7, no. 4, pp. 261–276, 2006.

- [73] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–522, 2012.
- [74] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, 2010.
- [75] H. K. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier," *Polymers*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, 2011.
- [76] F. Mohamed and C. F. van der Walle, "Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, no. 1, pp. 71–87, 2008.
- [77] G. A. Silva, O. P. Coutinho, P. Ducheyne, and R. L. Reis, "Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Applications in bone," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 1, no. 2, pp. 97–109, 2007.
- [78] S. Zhang and H. Uludag, "Nanoparticulate systems for growth factor delivery," *Pharmaceutical Research*, vol. 26, no. 7, pp. 1561–1580, 2009.
- [79] V. E. Santo, M. E. Gomes, J. F. Mano, and R. L. Reis, "From nano-to macro-scale: nanotechnology approaches for spatially controlled delivery of bioactive factors for bone and cartilage engineering," *Nanomedicine*, vol. 7, no. 7, pp. 1045–1066, 2012.
- [80] M.-K. Tran, A. Swed, and F. Boury, "Preparation of polymeric particles in CO₂ medium using non-toxic solvents: formulation and comparisons with a phase separation method," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 82, no. 3, pp. 498–507, 2012.
- [81] B. Ertl, F. Heigl, M. Wirth, and F. Gabor, "Lectin-mediated bioadhesion: preparation, stability and Caco-2 binding of wheat germ agglutinin-functionalized poly-(D,L-lactic-co-glycolic acid)-microspheres," *Journal of Drug Targeting*, vol. 8, no. 3, pp. 173–184, 2000.
- [82] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, vol. 6, no. 4, pp. 319–327, 2002.
- [83] D. Blanco and M. J. Alonso, "Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 45, no. 3, pp. 285–294, 1998.
- [84] N. Csaba, P. Caamaño, A. Sánchez, F. Domínguez, and M. J. Alonso, "PLGA: poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 1, pp. 271–278, 2005.
- [85] C. Stureson and J. Carlfors, "Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity," *Journal of Controlled Release*, vol. 67, no. 2-3, pp. 171–178, 2000.
- [86] I. D. Rosca, F. Watari, and M. Uo, "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation," *Journal of Controlled Release*, vol. 99, no. 2, pp. 271–280, 2004.
- [87] F. T. Meng, G. H. Ma, W. Qiu, and Z. G. Su, "W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles," *Journal of Controlled Release*, vol. 91, no. 3, pp. 407–416, 2003.
- [88] R. Ghaderi and J. Carlfors, "Biological activity of lysozyme after entrapment in poly (d,l-lactide-co-glycolide)-microspheres," *Pharmaceutical Research*, vol. 14, no. 11, pp. 1556–1562, 1997.
- [89] H. Wang, S. C. G. Leeuwenburgh, Y. Li, and J. A. Jansen, "The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration," *Tissue Engineering Part B: Reviews*, vol. 18, no. 1, pp. 24–39, 2012.
- [90] S. Xiong, X. Zhao, B. C. Heng, K. W. Ng, and J. S.-C. Loo, "Cellular uptake of Poly-(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method," *Biotechnology Journal*, vol. 6, no. 5, pp. 501–508, 2011.
- [91] L. Y. T. Chou, K. Ming, and W. C. W. Chan, "Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles," *Chemical Society Reviews*, vol. 40, no. 1, pp. 233–245, 2011.
- [92] M. J. Santander-Ortega, M. V. Lozano-López, D. Bastos-González, J. M. Peula-García, and J. L. Ortega-Vinuesa, "Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces," *Colloid and Polymer Science*, vol. 288, no. 2, pp. 159–172, 2010.
- [93] Y.-Y. Yang, T.-S. Chung, and N. Ping Ng, "Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method," *Biomaterials*, vol. 22, no. 3, pp. 231–241, 2001.
- [94] T. Feczko, J. Tóth, and J. Gyenis, "Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 319, no. 1–3, pp. 188–195, 2008.
- [95] M. J. Santander-Ortega, D. Bastos-González, and J. L. Ortega-Vinuesa, "Electrophoretic mobility and colloidal stability of PLGA particles coated with IgG," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 60, no. 1, pp. 80–88, 2007.
- [96] Y.-Y. Yang, H.-H. Chia, and T.-S. Chung, "Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method," *Journal of Controlled Release*, vol. 69, no. 1, pp. 81–96, 2000.
- [97] D.-L. Fang, Y. Chen, B. Xu et al., "Development of lipid-shell and polymer core nanoparticles with water-soluble solidroside for anti-cancer therapy," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 3, pp. 3373–3388, 2014.
- [98] G. Ratzinger, U. Länger, L. Neutsch, F. Pittner, M. Wirth, and F. Gabor, "Surface modification of PLGA particles: the interplay between stabilizer, ligand size, and hydrophobic interactions," *Langmuir*, vol. 26, no. 3, pp. 1855–1859, 2010.
- [99] S.-S. Feng and G. Huang, "Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers," *Journal of Controlled Release*, vol. 71, no. 1, pp. 53–69, 2001.
- [100] J. M. Chan, L. Zhang, K. P. Yuet et al., "PLGA-lecithin-PEG core-shell nanoparticles for controlled drug delivery," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1627–1634, 2009.
- [101] M. Fraylich, W. Wang, K. Shakesheff, C. Alexander, and B. Saunders, "Poly(D,L-lactide-co-glycolide) dispersions containing pluronics: from particle preparation to temperature-triggered aggregation," *Langmuir*, vol. 24, no. 15, pp. 7761–7768, 2008.
- [102] M. J. Santander-Ortega, J. M. Peula-García, F. M. Goycoolea, and J. L. Ortega-Vinuesa, "Chitosan nanocapsules: effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 82, no. 2, pp. 571–580, 2011.
- [103] J. S. Tan, D. E. Butterfield, C. L. Voycheck, K. D. Caldwell, and J. T. Li, "Surface modification of nanoparticles by PEO/PPO block

- copolymers to minimize interactions with blood components and prolong blood circulation in rats," *Biomaterials*, vol. 14, no. 11, pp. 823–833, 1993.
- [104] C. Bouissou, U. Potter, H. Altroff, H. Mardon, and C. van der Walle, "Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 95, no. 3, pp. 557–566, 2004.
- [105] R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer, "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres," *Science*, vol. 263, no. 5153, pp. 1600–1603, 1994.
- [106] P. Paolicelli, C. Prego, A. Sanchez, and M. J. Alonso, "Surface-modified PLGA-based nanoparticles that can efficiently associate and deliver virus-like particles," *Nanomedicine*, vol. 5, no. 6, pp. 843–853, 2010.
- [107] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, no. 5, pp. 631–651, 2002.
- [108] A. Giteau, M. C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouëssel, and J. P. Benoit, "How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles?" *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 350, no. 1-2, pp. 14–26, 2008.
- [109] E. R. Balmayor, G. A. Feichtinger, H. S. Azevedo, M. van Griensven, and R. L. Reis, "Starch-poly- ϵ -caprolactone microparticles reduce the needed amount of BMP-2," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 467, no. 12, pp. 3138–3148, 2009.
- [110] M. J. Santander-Ortega, D. Bastos-González, J. L. Ortega-Vinuesa, and M. J. Alonso, "Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 5, no. 1, pp. 45–53, 2009.
- [111] L. Meinel, O. E. Illi, J. Zapf, M. Malfanti, H. Peter Merkle, and B. Gander, "Stabilizing insulin-like growth factor-I in poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 70, no. 1-2, pp. 193–202, 2001.
- [112] C. Srinivasan, Y. K. Katare, T. Muthukumaran, and A. K. Panda, "Effect of additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles," *Journal of Microencapsulation*, vol. 22, no. 2, pp. 127–138, 2005.
- [113] M. Tobío, S. P. Schwendeman, Y. Guo, J. McIver, R. Langer, and M. J. Alonso, "Improved immunogenicity of a core-coated tetanus toxoid delivery system," *Vaccine*, vol. 18, no. 7-8, pp. 618–622, 1999.
- [114] D. K. Malik, S. Baboota, A. Ahuja, S. Hasan, and J. Ali, "Recent advances in protein and peptide drug delivery systems," *Current Drug Delivery*, vol. 4, no. 2, pp. 141–151, 2007.
- [115] J. L. Cleland, "Protein delivery from biodegradable microspheres," in *Protein Delivery: Physical Systems*, L. M. Sanders and R. W. Hendron, Eds., pp. 1–41, Plenum Press, New York, NY, USA, 1997.
- [116] S. H. Oh, T. H. Kim, and J. H. Lee, "Creating growth factor gradients in three dimensional porous matrix by centrifugation and surface immobilization," *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8254–8260, 2011.
- [117] B. N. Brown, J. E. Valentin, A. M. Stewart-Akers, G. P. McCabe, and S. F. Badylak, "Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component," *Biomaterials*, vol. 30, no. 8, pp. 1482–1491, 2009.
- [118] B. N. Brown, J. M. Freund, L. Han et al., "Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix," *Tissue Engineering—Part C: Methods*, vol. 17, no. 4, pp. 411–421, 2011.
- [119] B. Li, T. Yoshii, A. E. Hafeman, J. S. Nyman, J. C. Wenke, and S. A. Guelcher, "The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora," *Biomaterials*, vol. 30, no. 35, pp. 6768–6779, 2009.
- [120] A. Paillard-Giteau, V. T. Tran, O. Thomas et al., "Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 75, no. 2, pp. 128–136, 2010.
- [121] B. P. Nair and C. P. Sharma, "Poly(lactide-co-glycolide)-laponite-F68 nanocomposite vesicles through a single-step double-emulsion method for the controlled release of doxorubicin," *Langmuir*, vol. 28, no. 9, pp. 4559–4564, 2012.
- [122] P. Yilgor, N. Hasirci, and V. Hasirci, "Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules," *Journal of Biomedical Materials Research—Part A*, vol. 93, no. 2, pp. 528–536, 2010.
- [123] Y. Xia, Q. Xu, C.-H. Wang, and D. W. Pack, "Protein encapsulation in and release from monodisperse double-wall polymer microspheres," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 102, no. 5, pp. 1601–1609, 2013.
- [124] Y. Fu, L. Du, Q. Wang et al., "In vitro sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 microspheres embedded in thermosensitive hydrogels," *Die Pharmazie*, vol. 67, no. 4, pp. 299–303, 2012.
- [125] D. H. R. Kempen, L. Lu, T. E. Hefferan et al., "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 29, no. 22, pp. 3245–3252, 2008.
- [126] D. H. R. Kempen, L. Lu, A. Heijink et al., "Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 30, no. 14, pp. 2816–2825, 2009.
- [127] H. Nie, M.-L. Ho, C.-K. Wang, C.-H. Wang, and Y.-C. Fu, "BMP-2 plasmid loaded PLGA/HAp composite scaffolds for treatment of bone defects in nude mice," *Biomaterials*, vol. 30, no. 5, pp. 892–901, 2009.
- [128] F. Wegman, Y. van der Helm, F. C. Öner, W. J. A. Dhert, and J. Alblas, "Bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA as a substitute for bone morphogenetic protein-2 protein in bone tissue engineering," *Tissue Engineering Part A*, vol. 19, no. 23-24, pp. 2686–2692, 2013.
- [129] J. Fischer, A. Kolk, S. Wolfart et al., "Future of local bone regeneration—protein versus gene therapy," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 39, no. 1, pp. 54–64, 2011.
- [130] C. Qiao, K. Zhang, H. Jin et al., "Using poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres to encapsulate plasmid of bone morphogenetic protein 2/polyethylenimine nanoparticles to promote bone formation in vitro and in vivo," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2985–2995, 2013.
- [131] C. H. Evans, "Gene delivery to bone," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 12, pp. 1331–1340, 2012.
- [132] C.-H. Lu, Y.-H. Chang, S.-Y. Lin, K.-C. Li, and Y.-C. Hu, "Recent progresses in gene delivery-based bone tissue engineering," *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 8, pp. 1695–1706, 2013.
- [133] T. N. Vo, F. K. Kasper, and A. G. Mikos, "Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration,"

- Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 12, pp. 1292–1309, 2012.
- [134] W. Ji, H. Wang, J. J. P. van den Beucken et al., “Local delivery of small and large biomolecules in craniomaxillofacial bone,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 12, pp. 1152–1164, 2012.
- [135] V. Luginbuehl, L. Meinel, H. P. Merkle, and B. Gander, “Localized delivery of growth factors for bone repair,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 58, no. 2, pp. 197–208, 2004.
- [136] P. Kocbek, N. Obermajer, M. Cegnar, J. Kos, and J. Kristl, “Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody,” *Journal of Controlled Release*, vol. 120, no. 1-2, pp. 18–26, 2007.
- [137] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi et al., “Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for *in vivo* targeted drug delivery,” *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–876, 2007.
- [138] C. Romagnoli, F. D’Asta, and M. L. Brandi, “Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering,” *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, vol. 10, no. 3, pp. 155–161, 2013.
- [139] D. Puppi, X. Zhang, L. Yang, F. Chiellini, X. Sun, and E. Chiellini, “Nano/microfibrous polymeric constructs loaded with bioactive agents and designed for tissue engineering applications: a review,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 102, no. 7, pp. 1562–1579, 2014.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

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

Full Length Article

Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, characterization, and *in vitro* releaseInmaculada Ortega-Oller^{a,1}, Teresa del Castillo-Santaella^{b,1}, Miguel Padial-Molina^a, Pablo Galindo-Moreno^a, Ana Belén Jódar-Reyes^b, José Manuel Peula-García^{b,c,*}^a Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, University of Granada, Granada, Spain^b Biocolloid and Fluid Physics Group, Department of Applied Physics, University of Granada, 18071 Granada, Spain^c Department of Applied Physics II, University of Malaga, 29071 Malaga, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 May 2017

Received in revised form 18 July 2017

Accepted 17 August 2017

Keywords:

PLGA

Nanoparticles

Protein encapsulation

Release

ABSTRACT

Because of the biocompatible and biodegradable properties of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), nanoparticles (NPs) based on this polymer have been widely studied for drug/biomolecule delivery and long-term sustained-release. In this work, two different formulation methods for lysozyme-loaded PLGA NPs have been developed and optimized based on the double-emulsion (water/oil/water, W/O/W) solvent evaporation technique. They differ mainly in the phase in which the surfactant (Pluronic® F68) is added: water (W-F68) and oil (O-F68). The colloidal properties of these systems (morphology by SEM and STEM, hydrodynamic size by DLS and NTA, electrophoretic mobility, temporal stability in different media, protein encapsulation, release, and bioactivity) have been analyzed. The interaction surfactant-protein depending on the formulation procedure has been characterized by surface tension and dilatational rheology. Finally, cellular uptake by human mesenchymal stromal cells and cytotoxicity for both systems have been analyzed.

Spherical hard NPs are made by the two methods. However, in one case, they are monodisperse with diameters of around 120 nm (O-F68), and in the other case, a polydisperse system of NPs with diameters between 100 and 500 nm is found (W-F68). Protein encapsulation efficiency, release and bioactivity are maintained better by the W-F68 formulation method. This multimodal system is found to be a promising “dual delivery” system for encapsulating hydrophilic proteins with strong biological activity at the cell-surface and cytoplasmic levels.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Tissue regeneration is a complex biological action involving multiple steps in a sequential, ordered, and controlled manner [1,2]. Classically, bioactive molecules have been proposed to aid in these processes. However, the use of high doses, denaturation and loss of biological activity, uncontrolled timing of action, and diffusion to other tissues have been highlighted as major issues of this therapeutic strategy [3]. To help solve these problems, nanomedicine has been intensively investigated in recent years as an emerging

area. This involves diagnostic, therapeutic, and regeneration methods by means of structures and systems in which size and shape are controlled at the atomic, molecular, and supramolecular levels [4]. The transport and controlled delivery of drugs and/or therapeutic biomolecules improve their pharmacokinetics and pharmacodynamics and, at the same time, minimize harmful side effects. For these purposes, different nanosystems have been described. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) exhibits low cytotoxicity as well as high biocompatibility and biodegradability with the release of non-toxic by-products [5].

In the last decade, the use of PLGA has been investigated to deliver a wide spectrum of active agents, from hydrophobic drug molecules [6–8] to hydrophilic biomolecules as peptides [9], proteins [10–15] or nucleic acids [16,17]. These delivery systems have been produced via different formulation processes for their application in both systemic and local site-specific therapies [18].

* Corresponding author at: Department of Applied Physics II, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain.

E-mail address: jmpeula@uma.es (J.M. Peula-García).

¹ Both authors contributed equally to this work.

However, their design and development as nanocarriers are difficult due to the problematic release pattern when the encapsulated molecules are proteins for which initial bursts and slow or incomplete release might be a problem [18–20]. Moreover, the specific conditions of the release may need to be different depending on the final application of the nanocarrier [20,21].

The water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsion technique is the most widely used protein-encapsulation method for PLGA micro- (MP) and nanoparticles (NP) [22,23]. It allows different factors to be modulated such as the type of PLGA, the use of other polymers blended with PLGA, the addition of surfactants, the mechanical stress or the organic solvent [20]. It is also possible to construct several types of co-polymers to modify the hydrophobicity:hydrophilicity ratio [18,24] and the colloidal stability, size, and release process. PLGA/polyethylene glycol pair and surfactants such as polyvinyl alcohol (PVA) or polyethylene oxides (PEO) are the most widely studied [7,12,25,26].

On the other hand, tissue engineering requires the participation of mesenchymal stromal cells (MSCs) [27]. MSCs are known to have the ability to differentiate into multiple cell types, including osteoblasts. Osteoblasts are the main cells responsible for synthesizing the mineralized compartment of bone tissue. This process is regulated by, among other molecules, BMP-2 [3]. PLGA particles loaded with BMP-2 have been extensively used, as has been described and reviewed elsewhere [3,28–31].

Thus, within this context, it was the aim of the current study to optimize the formulation and properties of a nanoparticle system with potential therapeutic applications. Two different strategies to obtain PLGA-surfactant NPs were tested, by using lysozyme as a model for BMP-2. The size and morphology, polydispersity index, zeta potential, colloidal stability, and encapsulation efficiency (EE) of the protein were analyzed.

Once the physico-chemical characterization was completed, the study was focused on the protein-release process, using different techniques to study the results of *in vitro* experiments and focusing it on the release pattern and the biological activity of the lysozyme released. In this way, a new formulation was established to develop a PLGA nanosystem with a singular dual size distribution and the adequate balance between encapsulation and release of biologically active proteins. Finally, the effects of the proposed PLGA system were tested on primary MSCs *in vitro* as a proof of concept.

2. Materials and methods

2.1. Formulation of the nanoparticles

Poly(lactide-co-glycolide) acid (PLGA 50:50) ($[(C_2H_4O_2)_x(C_3H_4O_2)_y]_x=50, y=50$ (Resomer[®] 503H), 32–44 kDa was used as the polymer. The polymeric surfactant Pluronic[®] F68 (Poloxamer 188) (Sigma-Aldrich) was used as the emulsifier. The structure is based on a poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) and it is expressed as PEOa-PPOb-PEOa with $a=75$ and $b=30$. Lysozyme from chicken egg white (Sigma-L7651) was used as hydrophilic protein. Water was purified in a Milli-Q Academic Millipore system. Two different formulation methods were developed, termed O-F68 and W-F68.

In the O-F68 method, 25 mg of PLGA and 15 mg of F68 were dissolved in 660 μ L of dichloromethane (DMC) and vortexed. Then, 330 μ L of acetone were added and vortexed. Next, 100 μ L of a buffered solution at pH 12.8, with or without lysozyme (5 mg/mL), were added dropwise while vortexing for 30 s. Immediately, this primary water/oil (W/O) emulsion was poured into a glass containing 12.5 mL of ethanol under magnetic stirring, and 12.5 mL of MilliQ water were added. After 10 min of magnetic stirring, the

organic solvents were rapidly extracted by evaporation under vacuum until the sample reached a final volume of 10 mL.

In the W-F68 method, 100 mg of PLGA were dissolved in a tube containing 1 mL of ethyl acetate (EA) and vortexed. 40 μ L of a buffered solution at pH 12.8, with or without lysozyme (20 mg/mL), were added and immediately sonicated (Branson Ultrasonics 450 Analog Sonifier), fixing the *Duty cycle* dial at 20% and the *Output control* dial at 4, for 1 min with the tube surrounded by ice. This primary W/O emulsion was poured into a plastic tube containing 2 mL of a buffered solution (pH 12.8) of F68 at 1 mg/mL, and vortexing for 30 s. Then, the tube surrounded by ice was sonicated again at the maximum amplitude for the micro tip (Output control 7), for 1 min. This second W/O/W emulsion was poured into a glass containing 10 mL of the buffered F68 solution and kept under magnetic stirring for 2 min. The organic solvent was then rapidly extracted by evaporation under vacuum to a final volume of 8 mL.

2.2. Cleaning and storage

After the organic solvent evaporation, the sample was centrifuged for 10 min at 20 °C at 14000 or 12000 rpm for O-F68 and W-F68 methods, respectively. The supernatant was filtered using 100 nm filters for measuring the free non-encapsulated protein. The pellet was then resuspended in PB up to a final volume of 4 mL and kept under refrigeration at 4 °C.

2.2.1. Protein loading and encapsulation efficiency

The initial protein loading was optimized for the nanoparticle formulation, preserving the final colloidal stability after the evaporation step and being different for each nanosystem. Also, 1.6% w/w (Lys/PLGA) was used for O-F68 and 0.8% w/w (Lys/PLGA) for W-F68 one. The amount of encapsulated lysozyme was calculated by measuring the difference between the initial amount added and the free non-encapsulated protein, which was tested by bicinchoninic acid assay (BCA, Sigma-Aldrich). Then, protein encapsulation efficiency (EE) and final drug loading (DL) was calculated as follows:

$$EE = \frac{M_I - M_F}{M_I} \times 100 \quad DL = \frac{M_I - M_F}{M_{polymer}} \times 100$$

where M_I the initial total mass of Lys, M_F is the total mass of Lys in the aqueous supernatant, and $M_{polymer}$ is the mass of PLGA in the formulation.

2.3. Characterization of the nanoparticles

2.3.1. Interfacial characterization of the first water-in-oil emulsion

The surface tension and dilatational rheology measurements at the air-water interface were made in the OCTOPUS [32], a Pendant Drop Surface Film Balance equipped with a subphase multi-exchange device (patent submitted P201001588) described in detail elsewhere [33]. Here, air plays the role of the organic phase. The surface tension is calculated with DINATEN[®] software, based on axisymmetric drop shape analysis (ADSA), and the dilatational modulus (E) of the interfacial layer is determined from image analysis with the program CONTACTO[®]. The *in vitro* model is described in "Supplementary material".

2.3.2. Particle morphology

Nanoparticles were imaged by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) using a Zeiss SUPRA 40VP field emission scanning electron microscope from the Centre for Scientific Instrumentation of the University of Granada (CIC, UGR).

2.3.3. Nanoparticle size and electrokinetic mobility

The hydrodynamic diameter and electrophoretic mobility of the NPs were determined by using a Zetasizer NanoZeta ZS device (Malvern Instrument Ltd, U.K.) working at 25 °C with a He-Ne laser of 633 nm and a scattering angle of 173°. Each data point was taken as an average over three independent sample measurements. The size of the NPs was characterized by Dynamic Light Scattering (DLS). The average hydrodynamic diameter (Z-average or cumulant mean), and the polydispersity index (PDI) were computed. These parameters are calculated through a cumulant analysis of the data, which is applicable for narrow monomodal size distributions [34]. We also determined the intensity size distribution from an algorithm provided by the Zetasizer software (General Purpose).

The electrophoretic mobility was determined by the technique of Laser Doppler Electrophoresis. An electrophoretic mobility distribution as well as an average electrophoretic mobility (μ -average) was established for each sample.

The hydrodynamic size distribution of the NPs with wide size distributions from DLS was also measured by using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) in a NanoSight LM10-HS(GB) FT14 (NanoSight, Amesbury, United Kingdom). All samples were measured more than three times for 60 s with manual shutter, gain, brightness, and threshold adjustments at 25 °C. The average size distribution (particle concentration vs. diameter) was calculated as an average of at least three independent size distributions.

2.3.4. Nuclear magnetic resonance (NMR) of the nanoparticles

The ¹H NMR spectra of free F68, lysozyme-loaded particles from O-F68 method with and without F68, and lysozyme-loaded particles from W-F68 method were measured with a VNMR5 500 MHz spectrometer (Agilent) in the Centre for Scientific Instrumentation (CIC) of the University of Granada.

2.4. Colloidal and temporal stability in biological media

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PDI) by DLS of each system were measured to determine their colloidal stability in different media (Phosphate buffer [PB], Phosphate buffer saline [PBS], and cell culture medium: Dulbecco's modified Eagle's medium, [DMEM] from Sigma) and at different times after (0, 1, and 5 days).

In vitro release experiments were conducted following a similar methodology as described above (*Encapsulation efficiency*) but using 1 mL of each sample suspended in PBS at 37 °C. The protein released from these samples was determined every 24 h by supernatant analysis, and the pellet was suspended in the same volume of buffer to maintain the release conditions. All experiments were developed in triplicate.

2.4.1. Confocal microscopy

Lysozyme was labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) using a method described by Kok et al. [35]. After FITC and lysozyme covalent conjugation, concentrations were estimated spectrophotometrically using the extinction coefficients described for FITC at 494 nm and 280 nm. The lysozyme concentration was calculated measuring optical absorbance at 280 nm and subtracting the corresponding FITC absorbance at this wavelength. Images were made in a Nikon A1 laser scanning confocal microscope from CIC, UGR. All experiments were performed in triplicate and replicated at least twice.

2.5. Biological activity and interactions

2.5.1. Lysozyme biological activity

The biological activity of lysozyme was analyzed by an enzymatic activity kit (Sigma-Aldrich) using *Micrococcus lysodeikticus* cells as the substrate, following the manufacturer's instructions.

2.5.2. Cellular uptake

Primary human mesenchymal stem cells (hMSCs) were taken from healthy maxillary alveolar bone according to previously described protocols [36]. After confirming their phenotype by flow cytometry and trilineage differentiation tests, 12000 cells per well were cultivated in sterile plates with glass bottom (Ibidi cat n° 81158) overnight. These cells were treated with medium without fetal bovine serum (FBS) and Cell Tracker Red (1:5000) (C34552, ThermoFisher) for 30 min. Then, the medium was removed and supplemented with 10% FBS, after which the particles with lysozyme-FITC were added. Then, the hMSCs were incubated 30 min again, washed three times with PBS 1X, and fresh medium supplemented with 2% FBS added. Finally, the hMSCs were examined by a confocal microscope (Nikon Eclipse Ti-E). Cell cultures were in all cases maintained at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere.

3. Results and discussion

3.1. Formulation of the nanoparticles

The methods developed in this work are intended to improve the existing formulation techniques for hydrophilic protein loaded-PLGA NPs based on a double-emulsion process [10,22]. The novelty of these methods is the use of the polymeric surfactant F68, either in the organic phase (O-F68 method) or in the aqueous phase (W-F68). This surfactant reduces the size of the NPs, enhances their stability, and protects the encapsulated protein. In addition, the presence of F68 on the surface of the particles reduces the recognition of the nanocarriers by the mononuclear phagocytic system (MPS) [37].

Additionally, the choice of the organic solvent significantly affects the properties of the final colloidal system, since the organic solvent solubility regulates the inner and surface structure of the particle. In addition, the interaction of the solvent with the encapsulated biomolecule can alter its bioactivity as a consequence of its denaturation, as found for methylene chloride [26]. In the O-F68 method, DMC is chosen as the organic solvent due to its lower water solubility to facilitate the emulsification process, and its low boiling point for easy evaporation. However, a freely water-miscible organic solvent (acetone) and the emulsifier F68 were added in this organic phase to reduce its negative biological effects on the encapsulated protein [24]. This emulsifier also reduces the protein-hydrophobic PLGA matrix interaction, and thus the disruption of the protein structure [3]. By contrast, in the W-F68 method, ethyl acetate was used as the organic solvent, which exerts less denaturing effects on the encapsulated protein [38]. The higher water solubility of this solvent favors rapid solvent removal. The solvent removal rate is also accelerated by increasing the shear stress during the second emulsification step. It also enhances the encapsulation efficiency and minimizes the contact time between the protein and organic solvent [3]. Poloxamer F68 is introduced in the external aqueous phase.

Both formulations (O-F68 and W-F68) (Table 1) gave rise to colloidal stable samples and the encapsulation of lysozyme inside the nanoparticles, in agreement with the double W/O/W emulsion method [23]. Lysozyme was chosen as a model protein due to its biostability, well-known characteristics, and ease in quantifying its biological activity [39,40]. In addition, its molecular size (14.3 kD) and its basic isoelectric point (around pH = 11) make it an appro-

Table 1

Formulation conditions and protein encapsulation results. **PLGA**, **F68** and **LYS_i** are the initial amount of polymer, surfactant and lysozyme respectively; **Initial%** is the initial polymer-protein rate in w:w; **EE** is the encapsulation efficiency; **LYS_F** is the final encapsulated amount of lysozyme; **DL** is the final drug loading rate in w:w.

	PLGA (mg)	F68 (mg)	LYS _i (mg)	Initial%	EE	LYS _F (mg)	DL
O-F68-Lys	25	15	0.4	1.6	62.5	0.25	1
W-F68-Lys	100	2	0.8	0.8	73.1	0.58	0.58

appropriate model for other proteins such as bone-growth factors [15]. Three main objectives drove the optimization of the appropriate relation among the polymer, poloxamer, and protein: (1) to have colloiddally stable nanosystems of submicron sizes; (2) to encapsulate a sufficient amount of protein; and (3) to prevent protein destabilization by maintaining their biological activity.

Therefore, regardless of the formulation method, it was intended to limit the initial protein loading to provide colloiddally stable nanosystems. In our case, as shown in Table 1, Initial% values were the best choice to maintain colloiddal stability without significantly changing the size distribution (see below). In consequence, DL presents relative low values for both formulations, although the encapsulated amount of lysozyme, LYS_F, is greater than those required for therapeutic proteins with lower clinically effective amounts [41]. The value of EE found for O-F68-Lys NPs is in consonance with the formulation characteristics and similar to other reports with different proteins [12,10,42,14], including bovine serum albumin (BSA) or insulin [12,42], and several growth factors [14].

The presence of surfactant stabilizes the emulsion droplets and reduces their size. However, it also alters the protein-polymer interaction, which translates into a reduction of the encapsulation efficiency. This was evidenced by Blanco et al. when encapsulating BSA and lysozyme in different PLGA-poloxamer microparticles [10]. Moreover, the type of protein and its initial theoretical loading are factors directly related with the EE and can affect the colloiddal stability of the primary emulsion, as shown by Santander et al. [12]. The different polymer:surfactant ratio between the two formulations is not comparable since the surfactant is added in a different way. In both cases, we used previous formulations as the starting point [10,22], and tested several polymer:surfactant ratios (data not shown) in order to obtain the best colloiddal stability, EE, and DL. In Table 1 we show the data, for the optimized PLGA:F68 ratios in both systems.

In the W-F68 method, despite the higher EE value with respect to O-F68 system, an almost complete encapsulation was expected, due to the low initial protein:PLGA mass ratio [12] and to the absence of surfactant in the first emulsion step. The characteristics of the modified formulation process may have the key. In this formulation, the relatively high solubility of the ethyl acetate in water promotes rapid diffusion of the organic solvent into the second aqueous phase. An initial small volume of water containing poloxamer is initially added to prevent a rapid, uncontrolled precipitation of the polymer and to control the speed of the process. This is subsequently supplemented with the addition of a larger aqueous volume, as previously described [26]. When this solidification is slow, it favors the escape of the protein and the EE decreases. However, if the solidification is very fast, the contact of protein with the organic solvent is minimized, and the EE increases. On the negative side, it can produce polymer agglomeration, which interferes with the correct formation of the NPs. The introduction of an intermediate step with a reduced volume of aqueous phase with poloxamer can modulate the rate of the process by controlling the diffusion of ethyl acetate into the water and by allowing the diffusion into the organic phase of the poloxamer. A controlled velocity of the polymer pre-solidification process in the presence of surfactant can produce channels or pores in the polymeric shell that, on one hand, could facilitate the protein release and, on the other hand,

could drive down the EE value [43]. As a result of these phenomena, the final DLs (w:w of lysozyme:polymer) shown in Table 1 for both NP systems are suitable for their application as nanotransport systems.

3.2. Characterization of the nanoparticles

3.2.1. Interfacial characterization of the first water-in-oil emulsion

To gain better insight into the effect of the formulation method on the interfacial properties of the first water (lysozyme solution)-in-oil emulsion, we designed surface experiments with lysozyme and Pluronic® F68. The main difference in the two formulation methods is how the Pluronic® F68 is added: in aqueous phase (W-F68) or in organic phase (O-F68). This difference could affect the composition of the surface of the NPs and, as a result, their colloiddal properties.

The surface tension and elasticity at the air-water interface were the properties analyzed (Table 2). At this interface, proteins change their conformation and expose their hydrophobic part to air, depending on their thermodynamic stability, flexibility, amphiphaticity, molecular size, and charge. In our case, lysozyme is a globular protein that is adsorbed at the air-water interface and forms a rigid monolayer due to its internal structure and the presence and number of disulfide bridges [44]. Our measurements were made at pH 12; thus, lysozyme is negatively charged. Table 2 shows the interfacial tension of the lysozyme monolayer at the air-water interface after 50 min of adsorption (45.7 ± 0.4 (mN/m)), and its elasticity (83 ± 4 (mN/m)). The reduction of the interfacial tension when compared with that of the air-water interface (72 mN/m) indicates the surfactant characteristics of the lysozyme. The high value of elasticity was due to the charge and high molecular interactions in the lysozyme monolayer. When the monolayer is formed with Pluronic® F68, the surface tension is slightly lower than with lysozyme when the Pluronic® is added in AP, but similar (taking into account the error) when added in OP.

Pluronic® F68 is an amphiphilic molecule that is adsorbed at the air-water interface when it is dissolved in aqueous phase, and also when it is deposited onto the surface of the drop. Small differences are found when comparing the surface tension of the Pluronic® monolayer from the two methods. The different values of interfacial tension attained in both cases would be due to the different methods to add the Pluronic® F68 at the formed lysozyme monolayer. Pluronic® F68 presents lower elasticity than the lysozyme, as expected since Pluronic® F68 is known to form a flexible monolayer at the air-water interface [45].

Two assays were designed to mimic the formulation methods of the particles. In the first assay, (W-F68 method), a monolayer of lysozyme was formed; then, the bulk of the drop was exchanged with the aqueous solution of Pluronic® F68, and after adsorption the interfacial tension and elasticity of the interface were measured (37.9 ± 0.6 mN/m and 14.2 ± 0.5 mN/m, respectively). This low value of elasticity was very similar to that of the monolayer of Pluronic® F68, indicating that Pluronic® F68 is located at the interface and removes the previously adsorbed lysozyme. In the second assay (O-F68 method) after the monolayer of lysozyme was formed, the Pluronic® F68 dissolved in chloroform is deposited onto the surface of the drop. The chloroform is rapidly evaporated and

Table 2

Interfacial tension and dilatational elasticity (at 1 Hz) of the air–water interface: (a) after adsorbing lysozyme or Pluronic® F68 in the aqueous phase (AP) or Pluronic® F68 in organic phase (OP) in the first step, (b) when Pluronic® F68 is added in AP or OP after adsorption of lysozyme monolayer (mean \pm s.d., $n=3$).

First step	Interfacial Tension (mN/m)	Elasticity ^a (mN/m)	Second step	Interfacial Tension (mN/m)	Elasticity ^b (mN/m)
Lysozyme	45.7 \pm 0.4	83 \pm 4	Pluronic® F68 (AP)	37.9 \pm 0.6	14.2 \pm 0.5
Lysozyme	45.7 \pm 0.4	83 \pm 4	Pluronic® F68 (OP)	38 \pm 2	43 \pm 4
Pluronic® F68 (AP)	42.1 \pm 0.3	15 \pm 3			
Pluronic® F68 (OP)	47.5 \pm 2.1	9.4 \pm 0.5			

the interfacial tension and elasticity of the interface are measured (38 \pm 2 mN/m and 43 \pm 4 mN/m, respectively). The elasticity was half of that of the pure lysozyme monolayer, perhaps because of the coexistence of lysozyme and Pluronic® F68 molecules at the interface. The surface tension of the final interface does not depend on the method of adding the Pluronic®, but it is lower than that of the pure lysozyme or the pure Pluronic®.

Within this context, it has been widely reported that the adsorption of PEO and poloxamers at the interface reduces the protein binding [46,47]. In the O-F68 method, the lysozyme is exposed to the DCM after the formation of the first water-in-oil emulsion, even if Pluronic® is added, as they both coexist at the interface. In the W-F68 method, protein will be in contact with ethyl acetate in this step, as Pluronic® is absent. However, this solvent has weaker biological effects on lysozyme. Pluronic® could reach the interface when added to the aqueous phase in the following step, and displace the protein from the interface, which could diffuse outwards to the aqueous phase.

3.2.2. Particle morphology

The delivery, biodistribution, and action mechanism of a transported drug or biomolecule depend heavily on the size of the particle, concentration, and timing [48]. In general, the micrometric scale is designed for a local supply that allows the formation of reservoirs of the transported molecule and minimizes the action of the phagocytic system [49]. However, nanometric systems are more versatile because they permit a systemic distribution, are more stable and reactive and allow extra- as well as intracellular action. This latter mechanism is essential when the molecule or drug should act in the cytoplasm [50] or any other intracellular structure such as the mitochondria, Golgi apparatus, endoplasmic reticulum or nucleus [48,51,52]. Other parameters to alter the intracellular fate of the particles have also been investigated, mainly by altering their surface decoration [53], for example, with nuclear localization signals (NLS) that use the nucleus as the target of the particle [51]. However, these strategies are still in their very early developmental phase [48,52].

A particle size in the submicron scale (between 2 and 500 nm) was sought, as it is necessary for cell internalization and a rapid distribution after parenteral administration in order to reach different tissues through different biological barriers. Particles under 200 nm minimize their intake by macrophages. The type of organic solvent, the polymer concentration, the addition of surfactant, and the emulsification energy control the size of the system.

The O-F68 method gives rise to a monomodal particle-size distribution with diameters around 100 nm. The addition of Pluronic® F68 in the organic phase bolsters colloidal stability of the first emulsion and reduces the particle size in comparison with PLGA NPs, in which the stability is purely electrostatic due to the carboxylic groups of the PLGA. In the W-F68 method, shear stress and volume of the aqueous phase are taken into account to produce a system with particles of between 100 and 500 nm.

O-F68-Lys NPs have a spherical shape with a monomodal size distribution (diameters around 100 nm) and core-shell structure (Fig. 1a). Empty particles produced with the O-F68 method are

shown in Figs. S1 (without F68) and S2 (with F68). They are also spherical and with a core-shell structure, but slightly larger.

W-F68-Lys NPs also present a spherical shape but a multimodal size distribution with diameters between 140 and 450 nm, the largest population being around 260 nm (Fig. 1b). A core-shell structure is also observed in these particles. Empty particles from the W-F68 method are presented in Fig. S3, corresponding to a more polydisperse system.

3.2.3. Nanoparticle size, electrokinetic mobility, and colloidal stability

The hydrodynamic diameter distribution of the particles was determined firstly by DLS. Table 3 contains the main colloidal properties of particles produced with the O-F68 and W-F68 methods, empty or loaded with lysozyme. The results of empty particles from the O-F68 method, but synthesized without F68 are also included.

The size parameters were calculated through a cumulative analysis of the data, which is applicable for narrow monomodal size distributions [34]. SEM and STEM micrographs indicate that such an approximation could be assumed for particles from the O-F68 method, but not from the W-F68 one. Thus, the intensity size distributions of the different systems are shown in Fig. 2a. The presence of Pluronic® F68 in the O-F68 method significantly reduces the size and polydispersity of the NPs. This agrees with the reduction of the surface tension when the F68 is at the interface (Table 2), which promotes the emulsification process. If the NPs are also loaded with lysozyme, the size is even smaller, but the polydispersity increases slightly compared with the empty particles. The surfactant properties of the lysozyme have been shown with the surface-tension results (Table 2).

Fig. 2a indicates the presence of particles higher than 500 nm with the W-F68, which does not correlate with the SEM micrographs. Thus, a different technique (NTA) was used to gain information on the size distribution of such systems (Fig. 3b). With NTA, the size distribution was consistent with the SEM images. Broad size distributions corresponding to multimodal systems were found with this method, but the addition of lysozyme led to a clear size reduction. This is because lysozyme also acts as an emulsifier in the first emulsion.

The electrokinetic charge of the NPs was analyzed by measuring the electrophoretic mobility. For comparison, all the samples were measured at pH 7 (phosphate buffer). In Fig. 3, the electrophoretic mobility distributions are presented while the corresponding μ -averages are shown in Table 3.

PLGA NPs are usually negatively charged due to the carboxylic groups of the polymer. The use of Pluronic® F68 in the O-F68 method clearly reduces the electrophoretic mobility of the NPs, which indicates that some Pluronic® is located at the NP surface. This reduction was expected after the incorporation of this non-ionic surfactant onto the interface, since the presence of polyethylene oxide chains would cause an outward shift of the shear plane where the ζ -potential is defined, and this would subsequently diminish electrophoretic mobility. Previous results for PLGA particles have shown a significant reduction directly related to the poloxamer coating [54]. If we compare the two systems, the

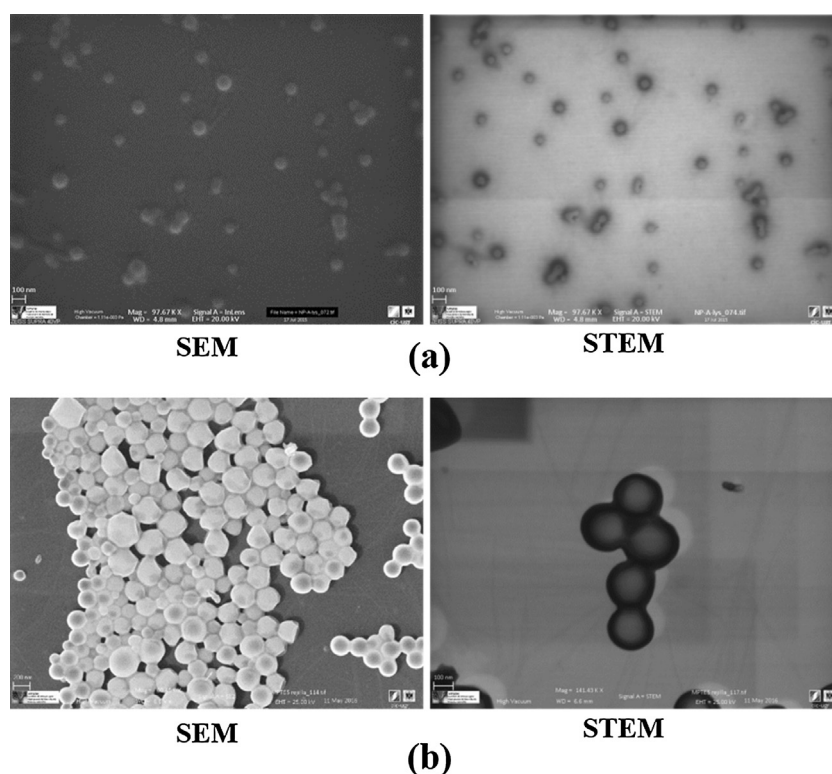


Fig. 1. SEM and STEM micrographs of lysozyme-loaded particles using O-F68 (a) or W-F68 method (b).

Table 3

Colloidal properties of PLGA NPs from different formulation methods. They were measured in phosphate buffer (pH 7). The average hydrodynamic diameter (Z-average or cumulative mean) and the polydispersity index (PDI) are determined from DLS. (Mean \pm s.d., $n = 3$).

		Z-average (nm)	PDI	μ -average ($\mu\text{mcm/Vs}$)
O-F68 method	Empty, without F68	266 \pm 7	0.293	-5.06 \pm 0.15
	Empty	162.7 \pm 2.1	0.081	-4.29 \pm 0.18
	Lysozyme-loaded	121.0 \pm 1.2	0.244	-3.34 \pm 0.07
W-F68 method	Empty	273 \pm 3	0.193	-5.31 \pm 0.11
	Lysozyme-loaded	293 \pm 4	0.169	-4.212 \pm 0.013

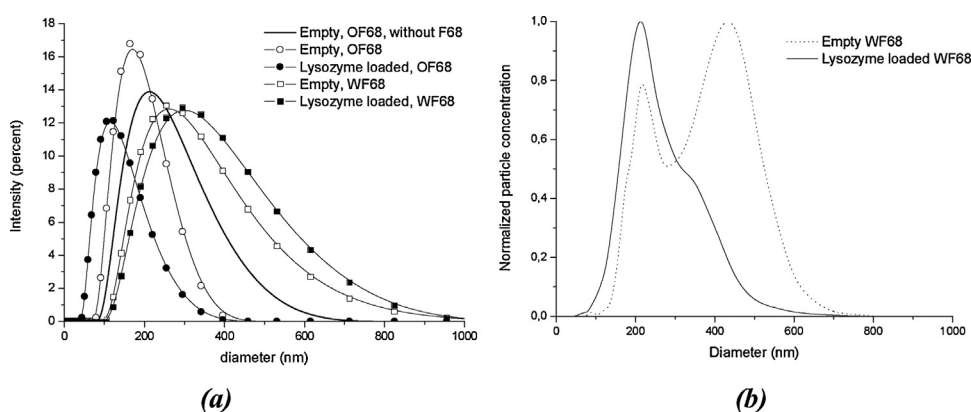


Fig. 2. Hydrodynamic diameter distribution, (a) by DLS at pH 7 (phosphate buffer) of empty and lysozyme-loaded PLGA particles from the O-F68 and W-F68 methods; and (b) by NTA at pH 7 (phosphate buffer) of empty and lysozyme-loaded PLGA particles from the W-F68 method.

less negative surface for OF68 NPs would be related to less density of surface PLGA polymer, bringing the negative electrical charge to the interface. This result would be in line with the greater amount of PLGA in the formulation of WF68 nanosystem.

When the lysozyme is also used in the synthesis, the surface is even less negative, which could be explained by the presence

of some protein (whose net charge is positive) near or at the interface. This latter effect is also found with the W-F68 method. The attractive electrostatic interaction between negative terminal acid residues of PLGA and lysozyme molecules plays a key role in the process of protein encapsulation [41] or adsorption [40] in PLGA NPs, which affects the final protein loading. In relation

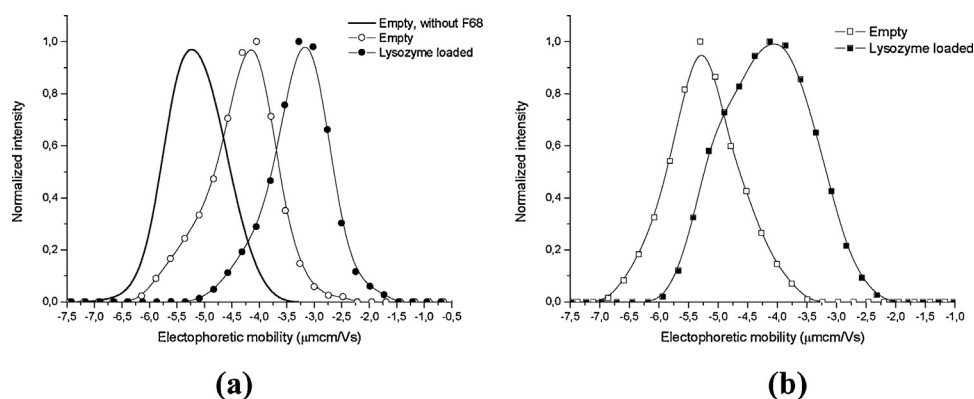


Fig. 3. Electrophoretic mobility distribution at pH 7 (phosphate buffer) of empty and lysozyme-loaded PLGA particles from the (a) O-F68 and (b) W-F68 methods.

to this situation, an important characteristic of the W-F68 encapsulation formulation is that the water phase is at pH 12, which allows a negative net charge of lysozyme and, thus, avoids the electrostatic protein-polymer attraction. This situation can reduce the encapsulation efficiency but at the same time favors the later protein-diffusion process and consequently the short-term release.

Recent studies have proposed the use of nanoparticles embedded in pre-designed 3D-printed scaffolds [55,56], moving us to analyze the stability of the two formulations in several media usually employed during the preparation of other structures. Size distributions similar to the original were found for the two formulations in different media (PB, PBS, and DMEM) and at different times after synthesis (0, 1, and 5 days). The electric charge of PLGA acid end groups and the poloxamer molecules located on the NP surface confers a combined electrostatic and steric, colloidal-stability mechanism, as has previously been described [46,54]. Additionally, the NPs in all cases keep their size under storage at 4 °C at least for 1 month (data not shown). Thus, the media described could potentially be used as storage media or to prepare other solutions or scaffolds before actually placing them in the living environment (*in vitro* or *in vivo*).

3.2.4. NMR of the nanoparticles

In Fig. 3, both empty and protein-loaded NPs present less negative electrophoretic mobility than do empty NPs without F68, which could be explained by the presence of Pluronic® F68 at the surface of the NP. By comparing the ¹H NMR spectra of free Pluronic® F68, and lysozyme-loaded NPs from O-F68 and W-F68 methods, we can check the presence of F68 at the surface of the NPs (Fig. S4) by the peaks shown between 3.25 and 3.75 ppm and at 1 ppm. These peaks are also visible in the spectra of NPs formulated with F68 (O-F68 and W-F68, Figs. S5, and S6, respectively).

3.3. Biological activity and interactions

A controlled release from a PLGA-based delivery system is a difficult task, as it depends on multiple factors: the type of PLGA, solvent, mechanical stress, use of surfactants, etc. [57]. The diffusion of the protein and the polymer erosion are the main mechanisms involved in the protein release in PLGA-based delivery systems. Furthermore, it is typical to find a rapid burst release at the initial stage, followed by a slow release phase, over the short and medium term. In this phase, protein molecules diffuse through the polymer matrix until reaching a final phase in which the polymer degradation by hydrolysis allows a faster release [20].

On the other hand, the short-term release is of special interest for transporting bone morphogenetic growth factors (BMPs). A controlled initial burst followed by a sustained release significantly improves *in vivo* regeneration of bone [3] and cartilage [58] even in

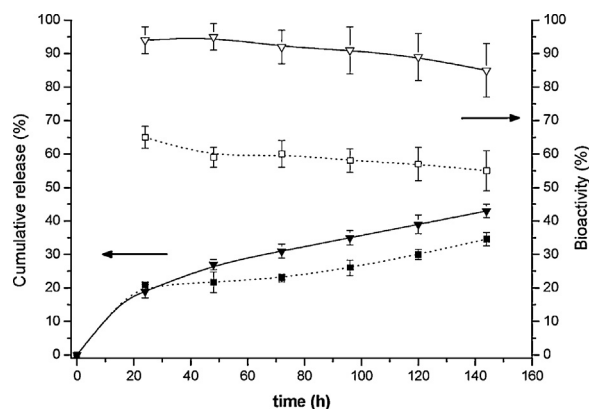


Fig. 4. Cumulative release (filled symbols) and residual bioactivity (open symbols) of O-F68-Lys (square) and W-F68-Lys (triangle) incubated for different times at 37 °C in saline phosphate buffer (pH 7.4) (mean ± s.d., n = 3).

dual-controlled release systems [59]. For these reasons, we focused our analysis on short-term release, taking into account the reduced polymer degradation by hydrolysis found for similar systems for these early steps [60].

Fig. 4 shows the accumulative release of lysozyme from O-F68-Lys NPs over the short term (seven days). These results are consistent with a two-stepped process: an initial burst and a slow-release phase. The first step could correspond to the release of the protein molecules located near surface, whose presence was deduced from the electrophoretic mobility results (Fig. 3). The second part of the release process was limited and slow due to the protein diffusion through the matrix of the polymeric shell. The specific electrostatic interaction between the positive lysozyme molecules and the PLGA negative terminal acid groups can reduce the protein diffusion [10]. When the poloxamer (F68) is added, the interaction between the surfactant and the protein helps the diffusion process, leading to a more complete and sustained release [12]. It also helps to keep the biological activity of the protein [41,61]. The poloxamer reduces the non-specific protein-polymer interactions (i.e. hydrophobic interactions) but not the specific ones (electrostatics); thus, the diffusion through water-filled pores or through the polymer is still limited. In the current study, the protein fraction released and the release pattern are similar to those found in the literature for lysozyme encapsulated in nano- and microparticles of blends of PLGA and other polymers or surfactants [26,15,11].

The protein release curve from W-F68-Lys NPs (Fig. 4) reveals that the initial delivery rate is identical to that of the O-F68 system, which could mean a similar proportion of encapsulated protein close to or at the surface for both NP systems. This would agree with the analogous decrease in the electrophoretic mobility of the

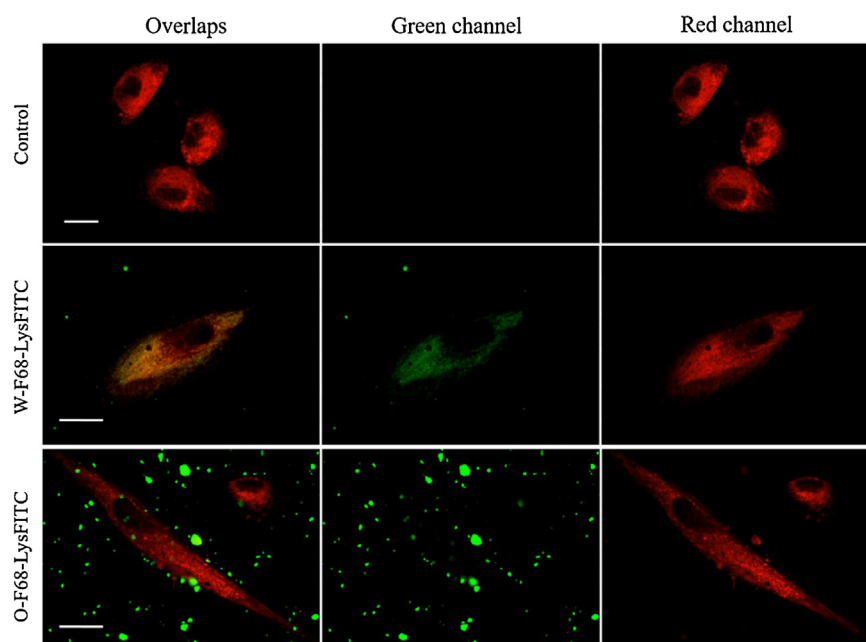


Fig. 5. z-projection of 5 images of hMSCs visualized 30 min after incubation with W-F68-LysFITC NPs or O-F68-LysFITC NPs. hMSCs were previously labeled with cell-tracker red. Scale bar 20 μm .

lysozyme-loaded NPs previously reported (Fig. 3). In the second part of the process, the specific interaction between the protein and the polymer is again present. However, the diffusion process in the W-F68 system appears to be enhanced, allowing a continuous and sustained release after the initial burst and reaching a slightly higher value for the maximum release time studied. This result could be related to the inner structure of the polymer layer that allows better hydration and, therefore, better diffusion of the protein towards the outside. It has been previously reported that the use of less polar organic solvents, such as DCM, for PLGA particles formulations increases the density of the polymer matrix in comparison with more polar organic solvents such as EA. The PLGA matrices prove more resistant in the first case, but reducing at the same time their connectivity and diffusivity [62]. Meng et al. [26] found that faster removal of EA results in a slower kinetic release of the protein due to a decrease in the porosity of the NPs. Regarding the role of the Pluronic[®], Rafati et al. [63] found a higher concentration of protein encapsulated in the surface pores in microparticles synthesized in the presence of surfactant in the second aqueous phase of the emulsion. Since an intermediate step was introduced in our W-F68 formulation in the second aqueous phase of the emulsion, the removal of the EA by diffusion was strongly controlled, so that it was expected that the porosity of these NPs would increase. This porosity improves protein diffusion, which allows a more stable release pattern according to the experimental result found for this system. Despite the unfavorable effect of the specific electrostatic protein-polymer interaction on the release, the amount of released protein in our NPs is substantial, signifying that there are other unspecific interactions that can be modulated by the presence of surfactant allowing a sustained release. The amount of released lysozyme is similar to that found with lysozyme physically adsorbed onto the surface of PLGA nanoparticles despite the electrostatic attraction [40]. Besides other unspecific interactions, the electrolyte concentration in the release medium could modulate this electrostatic attraction between the protein and polymer, diminishing it and facilitating the release process [46].

Another remarkable parameter is the biological activity of the *in vitro* release of lysozyme shown in Fig. 4. While in the O-F68 system the bioactivity is partially reduced by up to 40%, the pro-

tein supplied by the W-F68 system maintains the activity above 90% with respect to that of commercially supplied lysozyme and resuspended in the same release buffer. As discussed above, both the organic solvent and the hydrophobic interaction between the protein and the polymer often cause denaturation of encapsulated proteins [41,64]. Perez et al. [11] describe a partial loss of activity when using DCM and an aqueous PVA solution in the second emulsification step without any additional excipient. The use of poloxamers in the formulation reduces such interactions, enhances the stability of the protein, and maintains an aqueous layer that retains the water molecules necessary for the biological function of the protein, at the same time aiding its diffusion. This situation, together with the use of a weak organic solvent such as EA, helps preserve the biological activity of the lysozyme, as found for the W-F68-Lys system.

Fig. S7 presents different confocal microscopy images related to the release process of lysozyme-loaded W-F68 NPs. A decrease in fluorescence intensity was appreciable over the course of the *in vitro* experiment. In addition, the aggregation of the system is visible as the incubation process progresses. The analysis of these images is consistent with the previously reported results for this NP system.

3.3.1. Cellular uptake

Cellular uptake of PLGA NPs is a known process affected mainly by surface properties and functionalization [9] and particle aggregation [65]. Internalization and subsequent intracellular processing of the particles have been described as an active process; thus, it is energy dependent and can, therefore, be affected by other factors that alter the energy uptake by cells, such as temperature [48]. Particles can be internalized by several endocytosis methods, dependent primarily on the size of the particle: caveolin-dependent particles (diameter \approx 60 nm), clathrin-independent (diameter \approx 90 nm) and clathrin-dependent (diameter \approx 120 nm) [51,52]. Once internalized, about 65% are exported back to the extracellular space before releasing any of their content, while the rest slowly release the encapsulated molecule into the intracellular space [66]. The intracellular release process is affected by the formulation of the particles [48]. We have

demonstrated that the proposed systems follow a pattern similar to others previously published. As early as 30 min after incubation, W-F68-LysFITC NPs were taken up by the cells (Fig. 5). Some W-F68 particles were still in the medium so that the dual activity could happen. In contrast, O-F68-LysFITC NPs were affected by aggregation and, therefore, did not properly reach the intracellular space (Fig. 5; for z-axis images view Fig. S8). This contradicts the previous analyses of the colloidal stability in PB, PBS and DMEM. This finding can be explained by the fact that although the culture media was DMEM, this latter medium was supplemented with fetal bovine serum, and cells release many factors to the extracellular medium that can affect these types of particles. None of the systems were shown to be toxic for the cells (Fig. S9). No studies available have reported any effects of lysozyme on hMSCs.

4. Conclusions

A novel dual-delivery PLGA-nanosystem has been developed in which the formulation and components favor an adequate short-term delivery pattern while preserving the bioactivity of encapsulated molecules. The analysis of the polymer-surfactant-protein interaction shows that the organic solvent, use of surfactant, volume relation of both phases, and the net charge of the protein play important roles in the final characteristics and release behavior of the nanoparticles. The W-F68 formulation balances all of them in order to provide a nanosystem ready to transport and deliver hydrophilic biomolecules such as proteins. *In vitro* release experiments display an adequate short-term delivery pattern that at the same time preserves the bioactivity of the encapsulated biomolecule. Additionally, the singular nanoparticle size distribution found for this W-F68 nanosystem allows the possibility of a dual, outer-, and intra-cellular, protein delivery as has been shown by *in vitro* cellular experiments. This novel formulation will be used in future studies to encapsulate and deliver growth factors *in vitro* and *in vivo* in order to exploit the therapeutic potential of this nanosystem.

Acknowledgements

The authors wish to express their appreciation for the technical support to Dr. Azahara Rata-Aguilar and for the financial support granted by the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (Spain) through research groups FQM-115 and CTS-1028 and by the following research project: MAT2013-43922-R – European FEDER support included – (MICINN, Spain).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.027>.




References

- [1] M. Padiál-Molina, J.T. Marchesan, A.D. Taut, Q. Jin, W.V. Giannobile, H.F. Rios, Methods to Validate Tooth-supporting Regenerative Therapies, 2012, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_13.
- [2] M. Padiál-Molina, J.C. Rodríguez, S.L. Volk, H.F. Rios, Standardized *in vivo* model for studying novel regenerative approaches for multitissue bone-ligament interfaces, *Nat. Protoc.* 10 (2015), <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2015.063>.
- [3] Bone regeneration from PLGA micro-Nanoparticles, *Biomed Res. Int.* (2015) <http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/415289>.
- [4] K.-B. Lee, A. Solanki, J. Kim, J. Jung, Nanomedicine: dynamic integration of nanotechnology with biomedical science, in: *Handb. Clin. Nanomedicine*, Pan Stanford, 2016, 2017, pp. 21–60, <http://dx.doi.org/10.1201/b19915-4>.
- [5] G.E.J. Poinern, *A Laboratory Course in Nanoscience and Nanotechnology*, CRC, Press Taylor & Francis Group, 2015.
- [6] M.M. Yallapu, B.K. Gupta, M. Jaggi, S.C. Chauhan, Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells, *J. Colloid Interface Sci.* 351 (2010) 19–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.05.022>.
- [7] B.P. Nair, C.P. Sharma, Poly(lactide-co-glycolide)-laponite-F68 nanocomposite vesicles through a single-step double-emulsion method for the controlled release of doxorubicin, *Langmuir* 28 (2012) 4559–4564, <http://dx.doi.org/10.1021/la300005c>.
- [8] R. Shankarayan, S. Kumar, P. Mishra, Differential permeation of piroxicam-loaded PLGA micro/nanoparticles and their *in vitro* enhancement, *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1496, <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-013-1496-6>.
- [9] J.A. Loureiro, B. Gomes, G. Fricker, M.A.N. Coelho, S. Rocha, M.C. Pereira, Cellular uptake of PLGA nanoparticles targeted with anti-amyloid and anti-transferrin receptor antibodies for Alzheimer's disease treatment, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 145 (2016) 8–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.041>.
- [10] D. Blanco, M.J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45 (1998) 285–294, [http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411\(98\)00011-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0939-6411(98)00011-3).
- [11] C. Pérez, P. De Jesús, K. Griebenow, Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method, *Int. J. Pharm.* 248 (2002) 193–206, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00435-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00435-0).
- [12] M.J. Santander-Ortega, N. Csaba, L. González, D. Bastos-González, J.L. Ortega-Vinuesa, M.J. Alonso, Protein-loaded PLGA-PEO blend nanoparticles: encapsulation, release and degradation characteristics, *Colloid. Polym. Sci.* 288 (2010) 141–150, <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-009-2131-z>.
- [13] N. Pirooznia, S. Hasannia, A. Lotfi, M. Ghanei, Encapsulation of alpha-1 antitrypsin in PLGA nanoparticles: *in Vitro* characterization as an effective aerosol formulation in pulmonary diseases, *J. Nanobiotechnol.* 10 (2012) 20, <http://dx.doi.org/10.1186/1477-3155-10-20>.
- [14] I. D'Angelo, M. Garcia-Fuentes, Y. Parajó, A. Welle, T. Vántus, A. Horváth, G. Bökönyi, G. Kéri, M.J. Alonso, Nanoparticles based on PLGA: poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1724–1733, <http://dx.doi.org/10.1021/mp1001262>.
- [15] L.J. White, G.T.S. Kirby, H.C. Cox, R. Qodratnama, O. Qutachi, F.R.A.J. Rose, K.M. Shakesheff, Accelerating protein release from microparticles for regenerative medicine applications, *Mater. Sci. Eng. C* 23 (2013) 2578–2583, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.02.020>.
- [16] P. Pantazis, K. Dimas, J.H. Wyché, S. Anant, C.W. Houchen, J. Panyam, R.P. Ramanujam, Preparation of siRNA-Encapsulated PLGA nanoparticles for sustained release of siRNA and evaluation of encapsulation efficiency, *Nanopart. Biol. Med.* (2012) 311–319, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_25, Humana Press, Totowa, NJ.
- [17] J.S. Park, H.N. Yang, D.G. Woo, S.Y. Jeon, K.H. Park, Multilineage differentiation of human-derived dermal fibroblasts transfected with genes coated on PLGA nanoparticles plus growth factors, *Biomaterials* 34 (2013) 582–597, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.001>.
- [18] F. Wan, M. Yang, Design of PLGA-based depot delivery systems for biopharmaceuticals prepared by spray drying, *Int. J. Pharm.* 498 (2016) 82–95, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.025>.
- [19] A. Giteau, M.C. Venier-Julienne, A. Aubert-Pouessel, J.P. Benoit, How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int. J. Pharm.* 350 (2008) 14–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.11.012>.
- [20] S. Fredenberg, M. Wahlgren, M. Reslow, A. Axelsson, The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—a review, *Int. J. Pharm.* 415 (2011) 34–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.
- [21] F. Mohamed, C.F. van der Walle, Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 71–87, <http://dx.doi.org/10.1002/jps.21082>.
- [22] N. Csaba, L. González, A. Sánchez, M.J. Alonso, Design and characterisation of new nanoparticle polymer blends for drug delivery, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15 (2004) 1137–1151, <http://dx.doi.org/10.1163/1568562041753098>.
- [23] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)* 3 (2011) 1377–1397, <http://dx.doi.org/10.3390/polym3031377>.
- [24] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J. Controlled Release* 161 (2012) 505–522, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.
- [25] G. Ratzinger, U. Länger, L. Neutsch, F. Pittner, M. Wirth, F. Gabor, Surface modification of PLGA particles: the interplay between stabilizer, ligand size, and hydrophobic interactions, *Langmuir* 26 (2010) 1855–1859, <http://dx.doi.org/10.1021/la902602z>.
- [26] F.T. Meng, G.H. Ma, W. Qiu, Z.G. Su, W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles, *J. Controlled Release* 91 (2003) 407–416, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00273-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00273-6).
- [27] M. Padiál-Molina, F. O'Valle, A. Lanis, F. Mesa, D.M. Dohan Ehrenfest, H.-L. Wang, P. Galindo-Moreno, Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration, *Biomed. Res. Int.* 2015 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/341327>.

- [28] P. Yilgor, N. Hasirci, V. Hasirci, Sequential BMP-2/BMP-7 delivery from polyester nanocapsules, *J. Biomed. Mater. Res. – Part A* 93 (2010) 528–536, <http://dx.doi.org/10.1002/jbma.a.32520>.
- [29] B. Li, T. Yoshii, A.E. Hafeman, J.S. Nyman, J.C. Wenke, S.A. Guelcher, The effects of rhBMP-2 released from biodegradable polyurethane/microsphere composite scaffolds on new bone formation in rat femora, *Biomaterials* 30 (2009) 6768–6779, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.038>.
- [30] Y. Wang, Y. Wei, X. Zhang, M. Xu, F. Liu, Q. Ma, Q. Cai, X. Deng, PLGA/PDLLA core-shell submicron spheres sequential release system: preparation, characterization and promotion of bone regeneration in vitro and in vivo, *Chem. Eng. J.* 273 (2015) 490–501, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.03.068>.
- [31] Y.B. Shim, H.H. Jung, J.W. Jang, H.S. Yang, H. Bae, J.C. Park, B. Choi, S.H. Lee, Fabrication of hollow porous PLGA microspheres using sucrose for controlled dual delivery of dexamethasone and BMP2, *J. Ind. Eng. Chem.* 37 (2016) 101–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2016.03.014>.
- [32] J. Maldonado-Valderrama, J.A.H. Terriza, A. Torcello-Gómez, M.A. Cabrerizo-Vilchez, In vitro digestion of interfacial protein structures, *Soft Matter* (2013) 1043–1053, <http://dx.doi.org/10.1039/c2sm26843d>.
- [33] M. a Cabrerizo-Vilchez, H. a Wege, J. a Holgado-Terriza, a W. Neumann, Axisymmetric drop shape analysis as penetration Langmuir balance, *Rev. Sci. Instrum.* 70 (1999) 2438–2444, <http://dx.doi.org/10.1063/1.1149773>.
- [34] P.A. Hassan, S. Rana, G. Verma, Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering, *Langmuir* 31 (2015) 3–12, <http://dx.doi.org/10.1021/la501789z>.
- [35] R.J. Kok, M. Haas, F. Moolenaar, D. de Zeeuw, D.K. Meijer, Drug delivery to the kidneys and the bladder with the low molecular weight protein lysozyme, *Ren. Fail.* 20 (1998) 211–217.
- [36] S. Mason, S.A. Tarle, W. Osibin, Y. Kinfu, D. Kaigler, Standardization and safety of alveolar bone-derived stem cell isolation, *J. Dent. Res.* 93 (2014) 55–61, <http://dx.doi.org/10.1177/0022034513510530>.
- [37] C. Farace, P. Sánchez-Moreno, M. Orecchioni, R. Manetti, F. Sgarrella, Y. Asara, J.M. Peula-García, J.A. Marchal, R. Madeddu, L.G. Delogu, Immune cell impact of three differently coated lipid nanocapsules: pluronic, chitosan and polyethylene glycol, *Sci. Rep.* 6 (2016) 18423, <http://dx.doi.org/10.1038/srep18423>.
- [38] C. Stuessen, J. Carlfors, Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity, *J. Controlled Release* 67 (2000) 171–178, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00205-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00205-4).
- [39] L. Ying, S. Jiali, J. Guoqiang, Z. Jia, D. Fuxin, In vitro evaluation of lysozyme-loaded microspheres in thermosensitive methylcellulose-based hydrogel, *Chin. J. Chem. Eng.* 15 (2007) 566–572.
- [40] C. Cai, U. Bakowsky, E. Rytting, A.K. Schaper, T. Kissel, Charged nanoparticles as protein delivery systems: a feasibility study using lysozyme as model protein, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 31–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.10.005>.
- [41] A. Paillard-Giteau, V.T. Tran, O. Thomas, X. Garric, J. Coudane, S. Marchal, I. Chourpa, J.P. Benoît, C.N. Montero-Menei, M.C. Venier-Julienne, Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (2010) 128–136, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.005>.
- [42] M.J. Santander-Ortega, D. Bastos-González, J.L. Ortega-Vinuesa, M.J. Alonso, Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an *in vitro* physico-chemical characterization, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 45–53, <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2009.022>.
- [43] I.D. Rosca, F. Watari, M. Uo, Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *J. Controlled Release* 99 (2004) 271–280, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.007>.
- [44] S. Pezennec, F. Gauthier, C. Alonso, F. Graner, T. Croguennec, G. Brulé, A. Renault, The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface, *Food Hydrocolloids* 14 (2000) 463–472, [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00026-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00026-6).
- [45] A. Torcello-Gómez, M.J. Santander-Ortega, J.M. Peula-García, J. Maldonado-Valderrama, M.J. Gálvez-Ruiz, J.L. Ortega-Vinuesa, A. Martín-Rodríguez, Adsorption of antibody onto pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties, *Soft Matter* 7 (2011) 8450, <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm05570d>.
- [46] M.J. Santander-Ortega, M.V. Lozano-López, D. Bastos-González, J.M. Peula-García, J.L. Ortega-Vinuesa, Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: stability by hydration forces, *Colloid. Polym. Sci.* 288 (2010) 159–172, <http://dx.doi.org/10.1007/s00396-009-2132-y>.
- [47] A. Torcello-Gómez, M.J. Santander-Ortega, J.M. Peula-García, J. Maldonado-Valderrama, M.J. Gálvez-Ruiz, J.L. Ortega-Vinuesa, A. Martín-Rodríguez, Adsorption of antibody onto Pluronic F68-covered nanoparticles: link with surface properties, *Soft Matter* 7 (2011), <http://dx.doi.org/10.1039/c1sm05570d>.
- [48] J.P. Peñaloza, V. Márquez-Miranda, M. Cabaña-Brunod, R. Reyes-Ramírez, F.M. Llancahuén, C. Vilos, F. Maldonado-Biermann, L.A. Velásquez, J.A. Fuentes, F.D. González-Nilo, M. Rodríguez-Díaz, C. Otero, Intracellular trafficking and cellular uptake mechanism of PHBV nanoparticles for targeted delivery in epithelial cell lines, *J. Nanobiotechnol.* 15 (2017) 1, <http://dx.doi.org/10.1186/s12951-016-0241-6>.
- [49] S.P. Schwendeman, R.B. Shah, B.A. Bailey, A.S. Schwendeman, Injectable controlled release depots for large molecules, *J. Controlled Release* 190 (2014) 240–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.057>.
- [50] H. Wang, S.C.G. Leeuwenburgh, Y. Li, J.A. Jansen, The use of micro- and nanospheres as functional components for bone tissue regeneration, *Tissue Eng. Part B Rev.* 18 (2012) 24–39, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0184>.
- [51] J.K. Vasir, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for cytosolic delivery of therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 718–728, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.003>.
- [52] B. Yameen, W. Il Choi, C. Vilos, A. Swami, J. Shi, O.C. Farokhzad, Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting, *J. Controlled Release* 190 (2014) 485–499, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.06.038>.
- [53] H. Sneh-Edri, D. Likhstenshtein, D. Stepensky, Intracellular targeting of PLGA nanoparticles encapsulating antigenic peptide to the endoplasmic reticulum of dendritic cells and its effect on antigen cross-presentation in vitro, *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1266–1275, <http://dx.doi.org/10.1021/mp200198c>.
- [54] M.J. Santander-Ortega, A.B. Jódar-Reyes, N. Csaba, D. Bastos-González, J.L. Ortega-Vinuesa, Colloidal stability of Pluronic F68-coated PLGA nanoparticles: a variety of stabilisation mechanisms, *J. Colloid Interface Sci.* 302 (2006) 522–529, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.031>.
- [55] B. Baumann, T. Jungst, S. Stichler, S. Feineis, O. Wiltschka, M. Kuhlmann, M. Lindtner, J. Groll, Control of nanoparticle release kinetics from 3D printed hydrogel scaffolds, *Angew. Chem. – Int. Ed.* 56 (2017) 4623–4628, <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201700153>.
- [56] S.-J. Lee, W. Zhu, L. Heyburn, M. Nowicki, B. Harris, L.G. Zhang, Development of novel 3-D printed scaffolds with core-shell nanoparticles for nerve regeneration, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 64 (2017) 408–418, <http://dx.doi.org/10.1109/tbme.2016.2558493>.
- [57] D.J. Hines, D.L. Kaplan, Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 30 (2013) 257–276, <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013006475>.
- [58] H. Begam, S.K. Nandi, B. Kundu, A. Chanda, Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing, *Mater. Sci. Eng. C* 70 (2016) 856–869, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.074>.
- [59] Y.H. Kim, Y. Tabata, Dual-controlled release system of drugs for bone regeneration, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 94 (2015) 28–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.06.003>.
- [60] N. Rescignano, L. Tarpani, A. Romani, I. Bicchi, S. Mattioli, C. Emiliani, L. Torre, J.M. Kenny, S. Martino, L. Latterini, I. Armentano, In-vitro degradation of PLGA nanoparticles in aqueous medium and in stem cell cultures by monitoring the cargo fluorescence spectrum, *Polym. Degrad. Stab.* 134 (2016) 296–304, <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.10.017>.
- [61] M. Morille, T. Van-Thanh, X. Garric, J. Cayon, J. Coudane, D. Noël, M.C. Venier-Julienne, C.N. Montero-Menei, New PLGA-P188-PLGA matrix enhances TGF-β3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells, *J. Control. Release.* 170 (2013) 99–110, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.04.017>.
- [62] A. Bohr, F. Wan, J. Kristensen, M. Dyas, E. Stride, S. Baldursdóttir, M. Edirisinghe, M. Yang, Pharmaceutical microparticle engineering with electrospaying: the role of mixed solvent systems in particle formation and characteristics, *J. Mater. Med.* 26 (2015) 61, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-015-5379-5>.
- [63] A. Rafati, A. Boussahel, K.M. Shakesheff, A.G. Shard, C.J. Roberts, X. Chen, D.J. Scurr, S. Rigby-Singleton, P. Whiteside, M.R. Alexander, M.C. Davies, Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications, *J. Control. Release.* 162 (2012) 321–329, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.05.008>.
- [64] R. Gaudana, M. Gokulgandhi, V. Khurana, D. Kwatra, A.K. Mitra, Design and evaluation of a novel nanoparticulate-based formulation encapsulating a HIP complex of lysozyme, *Pharm. Dev. Technol.* 18 (2013) 752–759, <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2012.737806>.
- [65] S. Xiong, X. Zhao, B.C. Heng, K.W. Ng, J.S.C. Loo, Cellular uptake of Poly-(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles synthesized through solvent emulsion evaporation and nanoprecipitation method, *Biotechnol. J.* 6 (2011) 501–508, <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201000351>.
- [66] J. Panyam, V. Labhasetwar, Dynamics of endocytosis and exocytosis of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles in vascular smooth muscle cells, *Pharm. Res.* 20 (2003) 212–220 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12636159>.

Article

Formulation, Colloidal Characterization, and In Vitro Biological Effect of BMP-2 Loaded PLGA Nanoparticles for Bone Regeneration

Teresa del Castillo-Santaella ¹, Inmaculada Ortega-Oller ², Miguel Padial-Molina ², Francisco O'Valle ³, Pablo Galindo-Moreno ², Ana Belén Jódar-Reyes ^{1,4} and José Manuel Peula-García ^{1,5,*}

¹ Biocolloid and Fluid Physics Group, Department of Applied Physics, University of Granada, 18071 Granada, Spain

² Department of Oral Surgery and Implant Dentistry, University of Granada, 18071 Granada, Spain

³ Department of Pathology, School of Medicine & IBIMER, University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁴ Excellence Research Unit “Modeling Nature” (MNat), University of Granada, 18071 Granada, Spain

⁵ Department of Applied Physics II, University of Malaga, 29071 Malaga, Spain

* Correspondence: jmpeula@uma.es; Tel.: +34-952132722

Received: 20 June 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 3 August 2019



Abstract: Nanoparticles (NPs) based on the polymer poly (lactide-co-glycolide) acid (PLGA) have been widely studied in developing delivery systems for drugs and therapeutic biomolecules, due to the biocompatible and biodegradable properties of the PLGA. In this work, a synthesis method for bone morphogenetic protein (BMP-2)-loaded PLGA NPs was developed and optimized, in order to carry out and control the release of BMP-2, based on the double-emulsion (water/oil/water, W/O/W) solvent evaporation technique. The polymeric surfactant Pluronic F68 was used in the synthesis procedure, as it is known to have an effect on the reduction of the size of the NPs, the enhancement of their stability, and the protection of the encapsulated biomolecule. Spherical solid polymeric NPs were synthesized, showing a reproducible multimodal size distribution, with diameters between 100 and 500 nm. This size range appears to allow the protein to act on the cell surface and at the cytoplasm level. The effect of carrying BMP-2 co-adsorbed with bovine serum albumin on the NP surface was analyzed. The colloidal properties of these systems (morphology by SEM, hydrodynamic size, electrophoretic mobility, temporal stability, protein encapsulation, and short-term release profile) were studied. The effect of both BMP2-loaded NPs on the proliferation, migration, and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells from human alveolar bone (ABSC) was also analyzed in vitro.

Keywords: BMP-2; PLGA nanoparticles; Pluronic F68

1. Introduction

In the context of nanomedicine, tissue regeneration using colloidal micro- and nano-structures having unique size and surface activity has received increasing attention over recent years. Many efforts have been made to improve the engineering of these nano-systems in order to reach a “smart” delivery of bioactive molecules in order to optimize their therapeutic advantages and minimize harmful side effects [1]. With this aim, a broad spectrum of biocompatible nanocarriers has been described, showing properties suitable for different biological and therapeutic applications [2]. Among these varied proposals, polymeric nanosystems represent a major group in which poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) is one of the most widely used due to its biocompatibility, biodegradability, and low cytotoxicity, gaining the approval from different drug agencies for human use [3,4].

PLGA-based structures are described as micro- and nanocarriers to deliver a wide variety of active molecules and drugs, synthetic or natural molecules with hydrophilic or hydrophobic properties, and biomolecules from proteins to nucleic acids [5–7]. PLGA micro- and nanosystems can be set up using different formulation techniques, with the possibility of a systemic or local distribution. These systems can be applied not only in tissue regeneration but also in very diverse therapies: Anticancer drug delivery, infections, inflammatory diseases, or gene therapy [3]. Despite this great potential, certain applications, especially in protein encapsulation, are hindered by problems, such as an uncontrolled release profile and protein denaturation [8–11].

The water-in oil-in water (W/O/W) double emulsion method is an “emulsion solvent evaporation” technique frequently used to encapsulate hydrophilic molecules as proteins in PLGA NPs [6,12]. The appropriate choice of organic solvents, the use of polymer-surfactant blends, and the addition of stabilizer-protective agents have proved to be key aspects for optimizing the resulting systems [9,11]. Additionally, a surface specific functionalization can be used to improve their versatility, allowing the chemical surface immobilization of different molecules in order to confer targeting or adhesive properties to these nanocarriers [13].

Within tissue engineering, bone regeneration has a broad range of applications, mostly in the field of dentistry, where PLGA is suggested as a reference polymer to formulate NPs with bone-healing uses [14]. The literature describes the delivery of bioactive molecules, normally growth factors, using polymeric microparticles (MPs) and NPs with PLGA as the main component [13]. Among the bone morphogenetic growth factors, BMP-2 (bone morphogenetic protein 2) has been the most frequently cited, with many examples in which encapsulation or surface adsorption enables adequate entrapment efficiency and diverse release patterns [15–19]. For proteins with a very short half-life, such as BMPs, biodegradable PLGA nanosystems provide protection and optimal dosage for an adequate stimulation of cell differentiation [20,21].

Thus, within this scenario, in the present work, we seek to optimize a nano-particulate system in order to carry out and control the release of BMP-2 using as a starting point the synthesis procedure of a lysozyme-loaded NP system, previously described for the encapsulation of that model protein [11]. Also, to encapsulate BMP-2, we prepared a second system in which this protein was co-adsorbed with bovine serum albumin onto the surface of empty NPs. The size and morphology, the protein encapsulation efficiency, the surface characteristics, and the colloidal and temporal stability were studied to complete the physico-chemical characterization of both NP systems.

The release profile of BMP-2 indicates the potential of a PLGA nanocarrier for bone regeneration and depends heavily on the polymer degradation by hydrolysis [22]. However, over the short term, during which the release does not depend on this chemical degradation, proper control of release is necessary in order to modulate other physical processes. Thus, we focused our release experiments on the short-term using different techniques to compare the two NP samples and establish the corresponding BMP-2 release profiles. Finally, the biological activity (cell migration, proliferation, and osteogenic differentiation) was tested *in vitro* using mesenchymal stromal cells (MSCs) derived from alveolar bone [23].

2. Materials and Methods

2.1. Nanoparticle Synthesis

2.1.1. Formulation

Poly(lactide-co-glycolide) acid (PLGA 50:50) ($[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_x[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_y$), $x = 50$, $y = 50$ (Resomer[®] 503H, (Evonik, Essen, Germany), 32–44 kDa) was used as the polymer, and polymeric surfactant Pluronic F68 (Poloxamer 188) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the emulsifier. Their structure, based on a poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide), is expressed as PEO_a-PPO_b-PEO_a with $a = 75$ and $b = 30$. Human recombinant bone morphogenetic protein, rhBMP-2 (Sigma-H4791), was used as therapeutic biomolecule. Water was purified in a Milli-Q

Academic Millipore system. A double-emulsion synthesis method was used following a procedure previously described with slight modifications [11]. In this method, 100 mg of PLGA and 3 mg of deoxycholic acid (DC) were dissolved in a tube containing 1 mL of ethyl acetate (EA) and vortexed. In total, 40 μ L of a buffered solution at pH 12.8, with or without rhBMP-2 (200 μ g/mL), were added and immediately sonicated (Branson Ultrasonics 450 Analog Sonifier) for 1 min (Duty cycle dial: 20%, Output control dial: 4) with the tube surrounded by ice. This primary W/O emulsion was poured into a plastic tube containing 2 mL of a buffered solution (pH 12) of F68 at 1 mg/mL, and vortexing for 30 s. Then, the tube surrounded by ice was sonicated at the maximum amplitude for the micro tip for 1 min (Output control: 7). This second W/O/W emulsion was poured into a glass containing 10 mL of the buffered F68 solution and kept under magnetic stirring for 2 min. The organic solvent was then rapidly extracted by evaporation under vacuum to a final volume of 8 mL. The resulting empty and BMP-2 encapsulated NP systems were named NP and NP-BMP2, respectively. A detailed scheme of the synthesis procedure, with a yield based on the PLGA component always higher than 85%, is shown in Figure S1 of the Supplementary Materials.

2.1.2. Cleaning and Storage

After the organic solvent evaporation, the sample was centrifuged for 10 min at 20 °C at 12,000 rpm. The supernatant was filtered using Millipore nanofilters, 0.1 μ m for measuring the free non-encapsulated protein. The pellet was then resuspended in phosphate buffer (1.15 mM NaH₂PO₄), PB, to a final volume of 4 mL and kept refrigerated at 4 °C. Under these conditions, the systems kept colloidal stability at least for one month.

2.1.3. Protein Loading and Encapsulation Efficiency

The initial protein loading was optimized for the nanoparticle formulation, preserving the final colloidal stability after the evaporation step and taking into account the amounts shown in the literature for this growth factor when encapsulated inside PLGA NPs [24,25]. Thus, we chose 2 μ g as the initial total mass of rhBMP-2, which means a relation of 2×10^{-5} % *w/w* (rhBMP-2/PLGA). The amount of encapsulated rhBMP-2 was calculated by measuring the difference between the initial added amount, and the free non-encapsulated protein present in the supernatant after the cleaning step, which was tested by a specific enzyme-linked immuno-sorbent assay following the instructions of the manufacturer (ELISA, kit RAB0028 from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Then, protein-encapsulation efficiency (EE) was calculated as follows:

$$EE = \frac{M_I - M_F}{M_I} \times 100$$

where M_I is the initial total mass of rhBMP-2, and M_F is the total mass of rhBMP-2 in the aqueous supernatant.

2.1.4. Physical Protein Adsorption

Bovine serum albumin (BSA) and rhBMP-2 were coupled on the empty nanoparticle surface by a physical adsorption method. The appropriate volume of an aqueous protein solution containing 0.5 mg of BSA and 2 μ g of rhBMP-2 was mixed with 5 mL of acetate buffer (pH 5) containing empty NPs with 12.5 mg of PLGA. This provided a starting amount of proteins corresponding to 0.04% *w/w* (protein/PLGA), while the mass relation between proteins was 0.4 *w/w* (rhBMP-2/BSA). This solution was incubated at room temperature for 2 h under mechanical stirring. The nanoparticles were separated from the buffer solution by centrifugation, and after the supernatants were filtered (Millipore nanofilters, 0.1 μ m), they were qualitatively analyzed by gel electrophoresis while the protein quantification was made by a bicinchoninic acid protein assay (BCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for BSA and the specific ELISA for rhBMP-2. The nanoparticle pellet was resuspended in phosphate buffer (pH 7.4) and stored at 4 °C. This system was named NP-BSA-BMP2.

2.1.5. Protein Separation by Gel Electrophoresis, SDS-PAGE

The protein-loaded NPs and different supernatants were treated at 90 °C for 10 min in the following buffer: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 at 25 °C), 2% (*w/v*) sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.01% (*w/v*) bromophenol blue, 40 mM dithiothreitol (DTT). Samples were then separated by size in porous 12% polyacrylamide gel (1D SDS polyacrylamide gel electrophoresis), under the effect of an electric field. The electrophoresis was run under constant voltage (130 V, 45 min) and the gels were stained using a Coomassie Blue solution (0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol and 10% glacial acetic acid) and destained with the same solution lacking the dye.

2.2. Nanoparticle Characterization: Morphology, Size, Concentration, and Electrokinetic Mobility

NPs were imaged by scanning electron microscopy (SEM) with a Zeiss SUPRA 40VP field-emission scanning electron microscope from the Scientific Instrumentation Center of the University of Granada (CIC, UGR).

The hydrodynamic size distribution of the NPs was evaluated by nanoparticle tracking analysis (NTA) with a NanoSight LM10-HS (GB) FT14 (NanoSight, Amesbury, UK) and an sCMOS camera. The particle concentration according to the diameter (size distribution) was calculated as an average of at least three independent size distributions. The total concentration of NPs of each system was determined in order to control the number of particles used in cell experiments. The measurement conditions for all samples were 25 °C, a viscosity of 0.89 cP, a measurement time of 60 s, and a camera gain of 250. The camera shutter was 11 and 15 ms for the empty and BMP-loaded NPs, respectively. The detection threshold was fixed at 5.

The electrophoretic mobility of the NPs was determined using a Zetasizer[®] NanoZeta ZS device (Malvern Instrument Ltd., Malvern, UK) working at 25 °C with an He-Ne laser of 633 nm, and a 173° scattering angle. Each data point was taken as an average over three independent sample measurements. For each sample, the electrophoretic mobility distribution and the average electrophoretic mobility (μ -average) were determined by the technique of laser Doppler electrophoresis.

2.3. Colloidal and Temporal Stability in Biological Media

The average hydrodynamic diameter and the polydispersity index (PDI) by dynamic light scattering (DLS) of each NP system were measured in different media (phosphate buffer (PB) saline phosphate buffer (PBS), and cell culture medium: Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM (Sigma)). Also, data on temporal stability were gathered by repeating these analyses at different times after synthesis (0, 1, and 5 days) and after 1 month under storage conditions.

In vitro release experiments were conducted as follows: 1 mL of each sample for each incubation time was suspended in PBS at 37 °C. After the corresponding time (24, 48, 96, 168 h), NPs were separated from the supernatant of released proteins by centrifugation for 10 min at 14,000 rpm (10 °C). The NP pellet was suspended in 1 mL of 0.05 M NaOH and stirred for 2 h for a complete polymer degradation. The alkaline protein solution was assayed by BCA and ELISA to quantify the unreleased amount. The protein released was calculated taking into account the total encapsulated amount. All experiments were made in triplicate.

2.4. Cell Interactions

For all biological in vitro studies, a cell population cultured from the maxillary alveolar bone was used. This population was previously characterized and confirmed to present all characteristics of a mesenchymal stromal cell population (MSC) [23]. Cells were taken from healthy human donors after the approval from the Ethics Committee for Human Research from the University of Granada (424/CEIH/2018). Regular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1 g/L glucose (DMEM-LG) (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1:100 of non-essential amino acid solution (NEAA) (Gibco), 0.01 μ g/mL of basic fibroblast growth factor (bFGF)

(PeproTech, London, UK), 100 U/mL of penicillin/streptomycin, and 0.25 µg/mL of amphotericin B was used as culture medium for all experiments. Cultures were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere (2000 cells/well). All biological experiments were repeated in triplicate at least 3 times per condition.

2.4.1. Cell Migration

A cell-migration assay was conducted as previously described [26,27]. Briefly, MSCs were distributed on to three wells for each condition and allowed to grow to a cell confluency close to 99%, in 24-wells/plate at 3000 cells/cm², and in each well three different scratches were made. Then, cells were starved for 24 h by adding culture medium without serum. A scratch was made using a pipette tip along the diameter of the well. A wash step with PBS was performed to remove the scratched cells. Fresh complete culture media was added and supplemented depending on the assigned group (BMP-2, NP- BMP2, and NP-BSA-BMP2 at 1.25, 2.5, and 5 ng/mL of BMP-2). Afterwards, nine images were taken from the same area in each condition until 48 h later. On these images, the scraped area was measured by ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). The reduction in the scratched area over time was measured considering the area at time 0 as 100% open.

2.4.2. Cell Proliferation

Proliferation was evaluated by a sulphorhodamine (SRB) assay [28]. The assay was conducted by seeding the cells at 1500 cells/cm² in a 96-well plate at a confluence not higher than 50%. After cell attachment, the different supplements were added (BMP-2, NP- BMP2, and NP-BSA-BMP2 at 1.25, 2.5, and 5 ng/mL of BMP-2) and the cells were maintained in culture for up to 7 days. At each time point, the cells were washed with 1X PBS and fixed by adding ice-cold 10% trichloroacetic acid for 20 min at 4 °C. Then, the cells were washed 3 times with dH₂O and dried until all time points were collected. Each well received 0.4% SRB in 1% acetic acid for 20 min at room temperature with gentle shaking. The staining was finished by washing each well 3 times with 1% acetic acid and drying it at room temperature for 24 h. The dye was retrieved from the cells by adding 10 mM Tris Base at pH 10.5 and gently shaking for 10 min. The solution recovered was then distributed in a 96-well plate and the optical absorbance was read at 492 nm.

2.4.3. Osteogenic Differentiation

Osteogenic differentiation was evaluated by adding osteogenic media to the cell culture in combination with free BMP-2, NP-BMP2, and NP-BSA-BMP2 at the highest dosages used in previous experiments. Cells were seeded at 3000 cells/cm² and cultured to reach an 85% to 90% confluency. This was followed by the addition of induction media containing 10 mM of β-glycerophosphate (Fluka, 50020), 0.1 µM of dexamethasone (Sigma-Aldrich, D2915) and 0.05 mM of L-ascorbic acid (Sigma-Aldrich, A8960). Cell cultures were maintained for 7 days to analyze early activity. At day 7, cells were collected in 1 mL of TRIzol[®]. Then, RNA was extracted and converted to cDNA. Alkaline phosphatase (ALP) was then evaluated, expression being calculated relative to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein (GAPDH) by the 2^{-ΔΔCt} method. These procedures were conducted as described elsewhere [23]. Forward and reverse primer sequences were AGCTCATTTCCTGGTATGACAAC and TTA CTCTTGGAGGCCATGTG for GAPDH, and TCCAGGGATAAAGCAGGTCTTG and CTTTCTTTCTCTGGCACTAAGG for ALP.

2.4.4. Statistical Evaluation

Cell migration and proliferation were evaluated by ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test for pairwise analysis. Comparison between the levels of ALP at 4 vs. 7 days were analyzed by paired Student's *t* test. In all cases, a *p* value lower than 0.05 was established as statistical significance.

3. Results and Discussion

3.1. Nanoparticle Formulation

Double emulsion-solvent evaporation has been described as a robust and frequently used method to produce biomolecule-loaded PLGA NPs [6,12,13,29]. A formulation previously optimized by our group enabled the preservation of the biological activity of encapsulated biomolecules using a slightly aggressive organic solvent. Moreover, deoxycholic acid has been used in the first step of the formulation in order to improve the colloidal stability of NPs and, simultaneously, to obtain NP surfaces enriched with carboxylic groups, improving their versatility and allowing a subsequent chemical immobilization of different specific ligands [30]. By means of this improved formulation, in the present work, we developed empty nanoparticles (NPs) or nanoparticles encapsulating rhBMP-2 (NP-BMP2). A schematic description of the synthesis procedure is shown in Figure S1 of the Supplementary Data. For NP-BMP2, we achieved a protein-encapsulation efficiency (EE) of $97 \pm 2\%$. This result is consistent with the literature in which several authors have reported similarly high values encapsulating this protein inside PLGA nano- and microparticles [31,32]. Our formulation has several factors leading to this very high EE value: The low protein/polymer relation in mass [33], the affinity of rhBMP-2 to an unspecific interaction with hydrophobic surfaces [31], or the addition of stabilizers (poloxamer) in the second step of the double-emulsion procedure [13]. The absence of rhBMP-2 in the supernatant resulting from the centrifugation step in the cleaning process was verified by ELISA and SDS-PAGE, in which a clear band corresponding to 14 kD of rhBMP-2 polypeptidic chains is shown for lane A in Figure 1, corresponding to NP-BMP2. The mass of protein encapsulated, around 2 μg , is similar to that of different PLGA micro- and nanosystems described in the literature [18,34,35]. Taking into account the storage conditions for our samples, this corresponds to 500 ng/mL, which represents a sufficient concentration for practical applications since this growth factor shows *in vitro* biological activities at very low dosages (5–20 ng/mL) [13].

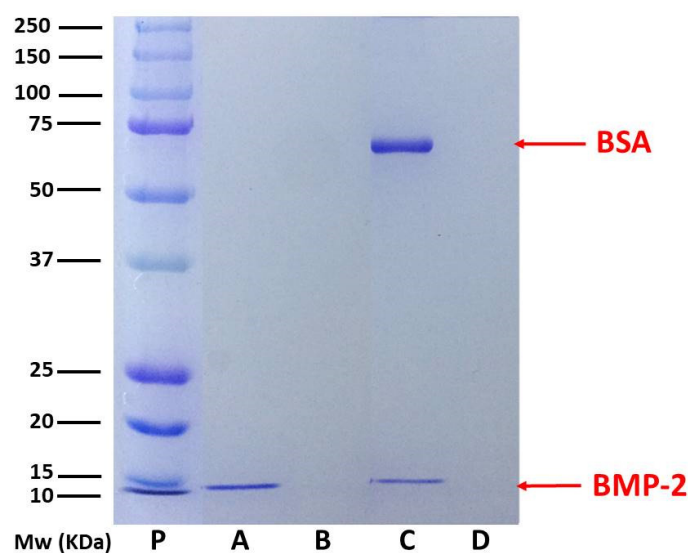


Figure 1. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis under reducing conditions of solid PLGA Nanoparticles (PLGA NPs) and liquid (supernatant) fractions of different NP systems. Lane **P**: Protein standards; lane **A**: NP-BMP2 (bone morphogenetic protein); lane **B**: supernatant of NP-BMP2 after synthesis and encapsulation of rhBMP-2; lane **C**: NP after physical adsorption of BSA/rhBMP-2; lane **D**: supernatant after physical adsorption of BSA(bovine serum albumin)/rhBMP-2 on NP system.

On the other hand, a second nanosystem resulted, modifying the way in which rhBMP-2 is incorporated in the nanocarrier. There are several examples of surface adsorption of different growth factors in micro- and nanoparticles [35–37], and surface immobilization over the encapsulation has

recently been proposed as a way to modulate the later release of biomolecules. This process, which depends on the slow diffusion of biomolecules through the polymeric matrix, is consequently highly influenced by the protein–polymer interaction [38,39] and polymer degradation [3,6]. Thus, this new focus on the use of PLGA NPs for biomolecule delivery was explored by immobilizing the protein rhBMP-2 on the surface of empty NPs by means of simple physical adsorption. This process is known to be governed by electrostatic and hydrophobic interactions between protein molecules and NP surfaces [40].

For this, the surface-charged groups, the hydrophilicity, the net charge of the protein molecules, and the characteristics of the adsorption medium are the reference parameters. Thus, we designed a co-adsorption experiment in which a mixture of rhBMP-2 and BSA (0.4% *w/w*, rhBMP-2/BSA) interact simultaneously with the PLGA NP surface. Albumins are routinely used as protective proteins when growth factors are incorporated in PLGA NPs [13,19]. Moreover, a surface distribution of BSA molecules can improve the colloidal stability of NPs at physiological pH due to their net negative charge under these conditions [41]. Figure S2 from Supplementary Materials shows a scheme of the co-adsorption process. The adsorption efficiency is higher than 95% and in SDS-PAGE from Figure 1, two bands characteristic of both proteins can be seen in lane C, corresponding to the NP-BSA-BMP2 nanosystem. However, lane D, corresponding to the run of the supernatant from the centrifugation of the nanosystem after adsorption processes, shows the absence of any protein. This result is fully explained by taking into account the pH of the medium (pH 5.0), near the isoelectric point of BSA, where the adsorption of this protein onto negatively charged nanoparticles presents a maximum [40,42]. The immobilization of rhBMP-2 on the negatively charged surface of NPs proves they are electrostatically favored due to the positive net charge of this protein at acid and neutral pH.

3.2. Nanoparticle Characterization

3.2.1. Nanoparticle Size

SEM and STEM micrographs (Figure 2) show that the samples consist of spherical particles of different diameters (between 150 and 450 nm), a range similar to that found in a previous work in which NPs were loaded with lysozyme following a similar synthesis protocol [11]. In that work, the DLS technique failed to provide a reliable size distribution. Therefore, the NTA technique was directly used to determine the hydrodynamic size of the BMP2-loaded NPs (see NTA video in the Supplementary Material).

The size distributions for empty (NP) and BMP-loaded NPs (NP-BMP2) from NTA (Figure 3 and videos S1, S2) were consistent with the SEM images. Particles with diameters between 100 and 500 nm were found to have the highest particle concentration at around 200 nm. The loading with BMP had an effect on the size distribution, leading to more defined peaks. These measurements enabled us to determine the concentration of particles in the measured sample: $6.88 \pm 0.09 \times 10^8$ pp/mL and $5.19 \pm 0.12 \times 10^8$ pp/mL for NP and NP-BMP2 nanosystems, respectively. These values were used (by taking into account the corresponding dilution) to control the number of particles added in the cell experiments.

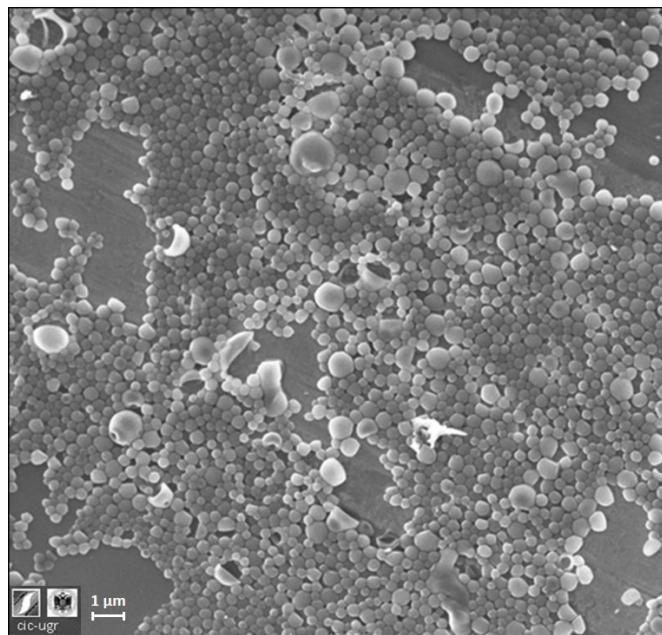


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) micrograph of rhBMP-2-loaded nanoparticles (NP-BMP2).

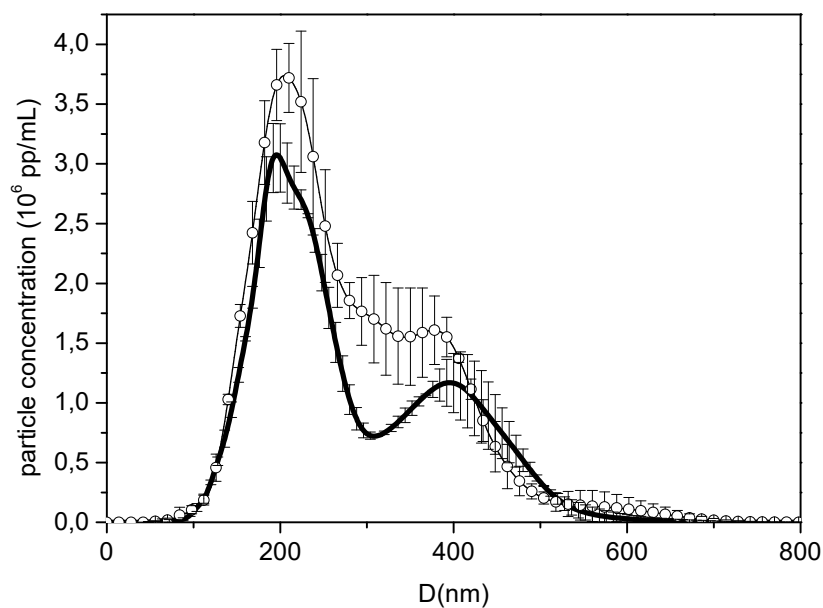


Figure 3. Hydrodynamic diameter distribution of NP (circles) and NP-BMP2 (thick black line) measured at pH 7.0 (phosphate buffer) by nanoparticle tracking analysis (NTA).

3.2.2. Electrokinetic Mobility and Colloidal Stability

The surface charge of nanoparticles can be analyzed using an electrokinetic study by measuring the electrophoretic mobility (μ_e) under different conditions. Figure 4 shows the μ_e and zeta potential values for the three nanosystems: NP, NP-BMP2, and NP-BSA-BMP2, at low ionic strength and different pH values. The electric surface charge of NPs resides in the carboxylic groups of the uncapped PLGA and deoxycholic acid molecules. These functionalized groups are additionally useful due to the possibility of a chemical surface vectorization in order to develop directed delivery nanocarriers [43]. It was previously confirmed that protonation of these acidic surface groups at pH values under their pKa value was tightly correlated with a loss of surface charge and consequently a reduction (in

absolute value) of the electrophoretic mobility of the colloidal system [44,45]. Usually, when colloidal particles are coated by protein molecules, the μ_e values change markedly compared with the same bare surfaces and are influenced by the electrical charge of the adsorbed protein molecules [46,47]. The electrokinetic behavior of the NP-BMP2 system remains similar to that of NP, and encapsulation of rhBMP-2 does not affect the surface charge distribution. A similar result was reported by d'Angelo et al. on encapsulating different growth factors in PLGA-poloxamer blend nanoparticles in the same proportion w/w of protein/polymer [24]. This may be due to the low amount of encapsulated protein and its distribution in the inner part of the NPs (far from the surface). In our system, this internal distribution may be favored by the encapsulating conditions where the basic pH (pH 12.0) of the water phase containing rhBMP-2 allows a negative charge of these protein molecules, thereby preventing their electrostatic specific interaction with acidic groups of the NPs.

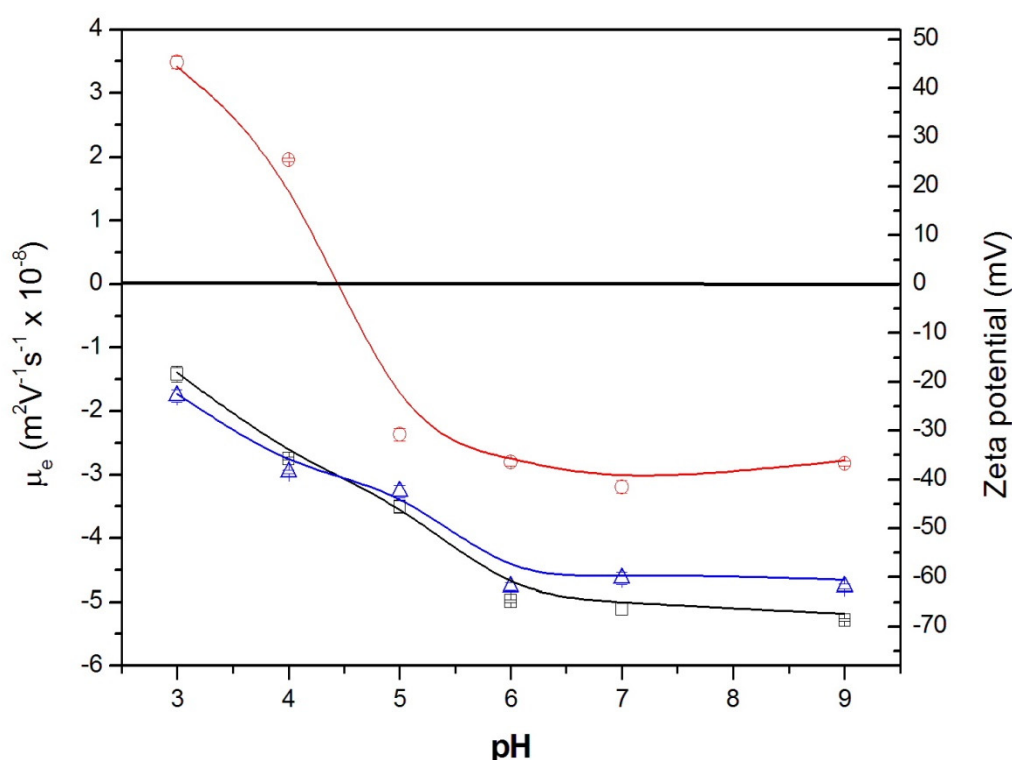


Figure 4. Electrophoretic mobility and zeta potential vs. pH in buffered media of low salinity (ionic strength equal to 0.002 M) for the different nanosystems: (black square) NP; (blue triangle) NP-BMP2; (red circle) NP-BSA-BMP2.

The electrokinetic distribution for the NP-BSA-BMP2 system radically changes. As previously shown, the very high adsorption efficiency leads to NPs with both proteins adsorbed around their surface. This situation is closely correlated with the μ_e values from Figure 4. Taking into account the w/w relation between adsorbed proteins (250 times higher for BSA), albumin molecules modulate the behavior at pH values below their isoelectric point (pI 4.7), where the positive net charge of BSA masks the original surface charge of NPs and even changes their original values to positive ones. This is a typical result found for this protein-covering colloidal particles [42,48]. At neutral and basic pH values, BSA molecules have a negative net charge, and the slight decrease in the absolute μ_e values could be due to the reduction of the negative net surface charge of NPs, which may be shielded, at least in a small part, by the positive charge of rhBMP-2 molecules under their basic isoelectric point (pI 9.0).

The colloidal stability for the different nanosystems (NP, NP-BMP2, and NP-BSA-BMP2) was determined by analyzing the size distributions in various media (PB, PBS, and DMEM) at different times after synthesis (0, 1, and 5 days). Size distributions similar to the original ones were found for

the two formulations, NP and NP-BMP2, in all the media analyzed. This result was similar to that previously found for these types of NPs encapsulating lysozyme [11], in which the combination of electrostatic and steric interactions generated by surface chemical groups of NPs confer the stability mechanism that prevents colloidal aggregation [33]. The decrease of the absolute value of the zeta potential for the NP-BSA-BMP2 system as a consequence of surface protein distribution does not affect its colloidal stability. This system also maintains the same size distribution in the different media. It is commonly accepted that a zeta potential higher than +30 or −30 mV will give rise to a stable colloidal system [49] and the zeta potential value for NP-BSA-BMP2 is above −30 mV. Colloidal stability in PBS and DMEM, typically used media for the development of scaffold or cell interactions, respectively, assures the potential use of these nanosystems for in vitro or in vivo living environments. Additionally, these systems maintained their size under storage in PB, at 4 °C for at least 1 month (data not shown), showing this to be an adequate medium for sample storage.

3.2.3. Protein Release

One of the main problems for micro- or nanosystems of PLGA drug delivery is to find the appropriate release pattern for encapsulated/attached protein molecules. A wide spectrum of formulations modulates this property by the use of different types of synthesis processes, PLGA polymers, co-polymers, and stabilizers [3,13]. An adequate limitation and control in the burst release is critical for BMPs in order to ensure long-term continuous release that, favored by the polymer degradation, provides better in vivo action in driving bone and cartilage regeneration [20]. Therefore, we previously developed a dual PLGA nanosystem for controlled short-term release, where protein diffusion and protein–polymer interaction are the main factors governing this process [11].

In the present work, NP-BMP2 and NP-BSA-BMP2 nanosystems represent two different ways in which rhBMP-2 was incorporated into the nanocarrier. Figure 5A shows the cumulative release of both proteins, rhBMP-2 and BSA, for different systems as a function of time in a short-term period (7 days). The encapsulated rhBMP-2 protein reaches an amount released of around 30% of the initial encapsulated one while adsorbed rhBMP-2, despite its surface distribution, is three times lower. However, BSA shows released amounts up to 80% of the initial adsorbed ones. In all cases, error bars correspond to the standard deviations from three independent experiments. Under these conditions, the growth factor encapsulated in NP-BMP2 presents a release pattern similar to that previously found with the same formulation but using lysozyme as the protein [11]. Poloxamer in the water phase of the synthesis process can be key in modulating both specific and unspecific interfacial protein interactions [50]. Thus, the relation between protein–polymer interaction and protein diffusion appears to be well balanced, preventing an excessive initial burst and simultaneously maintaining the needed protein flux to release around a third of the encapsulated rhBMP-2 in 7 days. Although an excessive initial burst has been widely reported for PLGA NPs related with protein molecules close to the surface [6], this situation did not appear for the NP-BMP2 system, this being consistent with the electrokinetic behavior that did not show the presence of protein near surface. The literature offers some examples with reduced short-term release of BMP-2 using more hydrophilic PLGA-PEG co-polymers [16] or a different synthesis process [25].

The release performance for the NP-BSA-BMP2 system, also shown in Figure 5A, presents notable differences. The electrokinetic profile has previously justified the surface location of BSA and rhBMP-2 on the surface, which could lead to a fast release of both proteins. However, results from Figure 5A,B show this trend only for the BSA protein that is released from NPs, with about 20% of the initial amount remaining after seven days. However, up to 90% of the initial load of rhBMP-2 protein, unlike BSA, remains attached to the surface. The NP surface with hydrophilic groups form poloxamer molecules and a negative charge due to the abundant presence of carboxylic groups (end-groups of PLGA and deoxycholic acid molecules) favor a desorption process for BSA, whose molecules have a negative charge under release conditions (physiological pH). This agrees with the results of other authors who, even after encapsulating BSA in PLGA-poloxamer blend NPs, achieved a fast burst release of above

40% to 50% of the initial protein amount [33]. Moreover, the co-encapsulation of albumins with growth factors could strongly affect its release profile, causing an initial burst [21,24]. Otherwise, the specific electrostatic attraction between positive rhBMP-2 molecules and negative surface groups slows down the short time release of this protein. This result is in agreement with the low release of adsorbed BMP previously found using PLGA micro- and nanoparticles with uncapped acid end groups [38,51]. Thus, the combination of different methods for trapping BMP-2 into and around NPs shows up the possibility of attaining a properly controlled release, balancing the interactions between polymers, stabilizers, and protein.

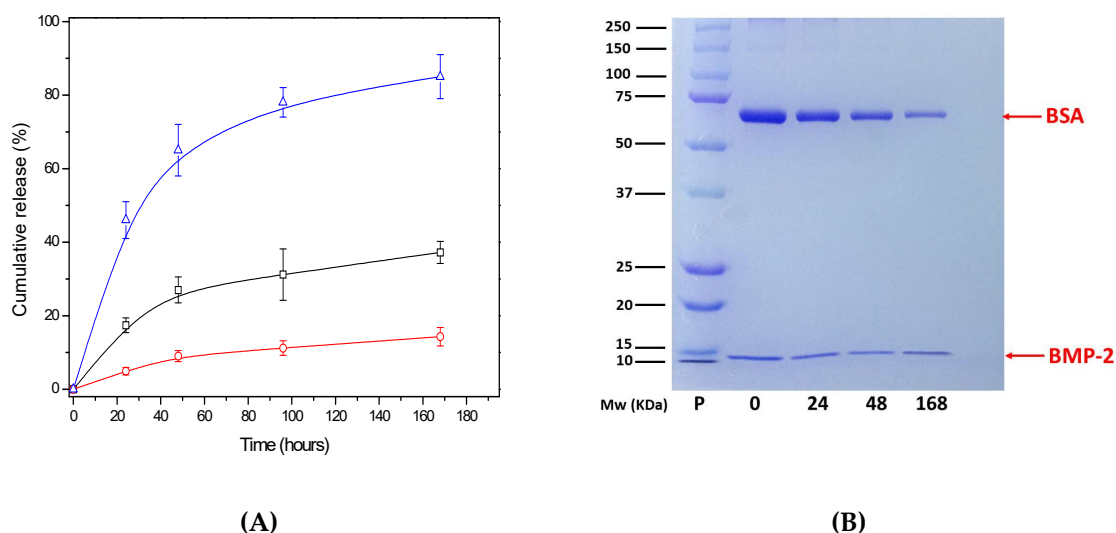


Figure 5. (A) Cumulative release of rhBMP-2 for NP-BMP2 (black square) and NP-BSA-BMP2 (red circle) systems; and cumulative release of BSA for NP-BSA-BMP2 (blue triangle) system, incubated for different times at 37 °C in saline phosphate buffer (pH 7.4). (B) SDS-PAGE analysis under reducing conditions of solid fraction of NP-BSA-BMP2 after release at different times where the number of each lane corresponds to the time in hours.

3.3. Biological Activity and Interactions

3.3.1. Cell Migration

Cell migration is the first and necessary step in tissue regeneration [52]. Thus, a regenerative agent must accelerate cell migration or, at least, not interfere with it. In the present study, we found no differences between the groups, doses, and control in terms of closure of a scratched area (ANOVA with Tukey multiple comparisons test) (Figure 6). In contrast to our findings, previously published data suggests a positive effect of BMP-2 on cell migration [53,54]. However, in those studies, the doses applied, and the cell types were different than in the current experiments. We used lower doses of BMP-2 in order to test whether, even at low dosages, BMP-2 could still provide benefits if protected in a nanoparticle system. As mentioned, we demonstrated no negative effect of the system on cell migration. Our results nonetheless support the idea that BMP-2 activity is mediated by the activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway, a common group of signaling molecules that participate in several process with BMP-2 and other molecules [26,54]. It should also be mentioned that the timeframe of a migration assay is short. Thus, the potential advantages of a controlled-release system as the one under study might be limited. That is, the release of BMP-2 from the nanoparticles, as demonstrated in Figure 5, is limited to the first 48 h. Thus, a sustained positive effect on migration activity over time could be hypothesized.

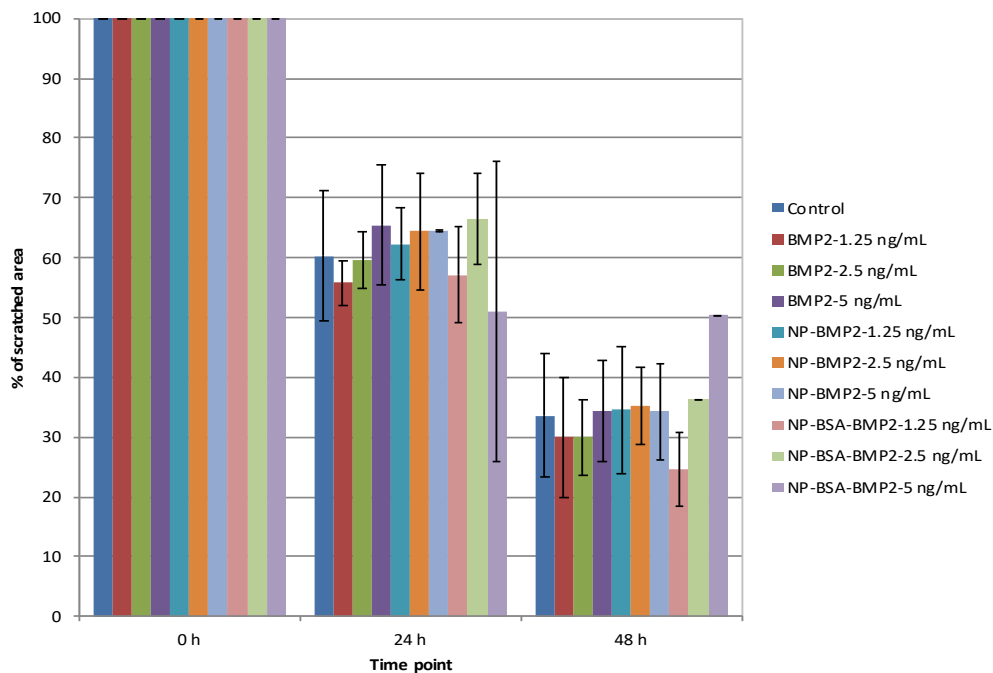


Figure 6. Migration assay. Percentage of scratched area closure at 24 and 48 h on different groups and doses.

3.3.2. Cell Proliferation

Proliferation is another of the cell activities required for tissue regeneration. However, this property must be balanced with both migration and differentiation, and not all three characteristics increase at the same time and with the same ratios [55]. In fact, reportedly, when a dose of BMP-2 induces higher proliferation, it decreases differentiation [56]. This property has been extensively analyzed but discrepancies can still be detected in the literature. Therefore, Kim et al. analyzed different doses of BMP-2 and its effect on cell proliferation and apoptosis. It was confirmed in vitro that high doses, but still lower than those used clinically, reduce cell proliferation and increase apoptosis [57]. This should be avoided. We have found that although free BMP-2 does not induce higher proliferation than the control at any of the doses applied nor time points (ANOVA with Tukey multiple comparisons test), the same amount of BMP-2 encapsulated or adsorbed onto PLGA nanoparticles boosts proliferation, this being statistically significant when using a dose of 2.5 ng/mL or higher (ANOVA with Tukey multiple comparisons test) (Figure 7). These dosages are still lower than those suggested in previous studies. Apart from that difference, a positive effect on proliferation was still achieved. Moreover, following the release pattern from Figure 5, more BMP-2 is expected to be released over time beyond the 7-day time frame. Thus, a sustained induction effect could be expected as well until full confluency of the cell culture.

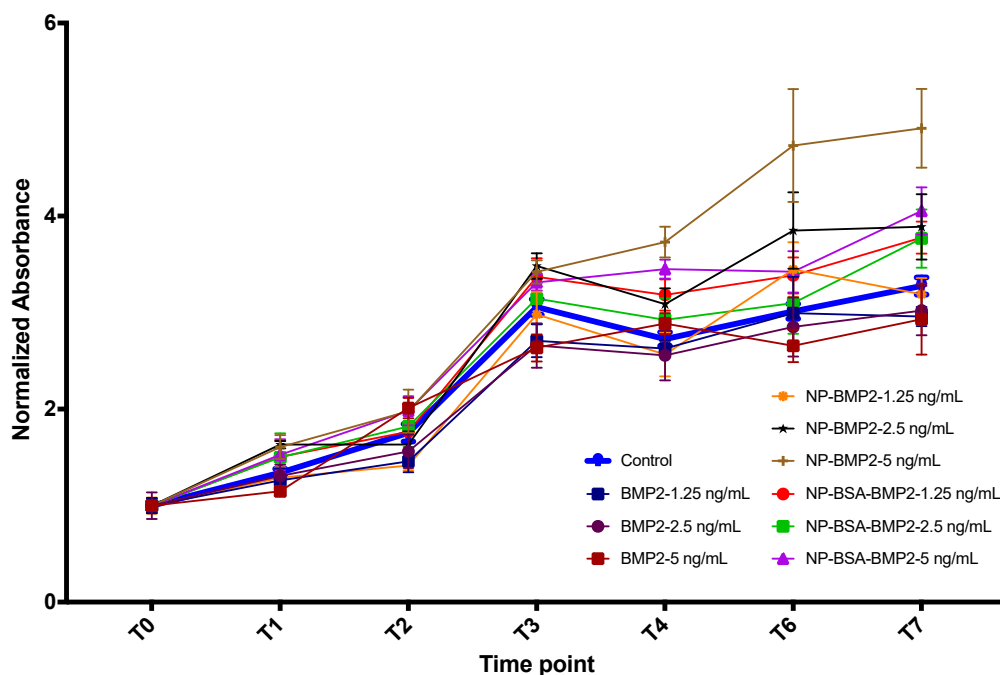


Figure 7. Proliferation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) as measured by sulphorhodamine (SRB) absorbance. Results were normalized to T0 in each group.

3.3.3. Osteogenic Differentiation

It has been confirmed that cell differentiation induced by BMP-2 needs the presence of permissive osteoinductive components. Particularly, β -glycerophosphate has been shown to exert a synergistic effect with BMP-2 in inducing cell differentiation [56]. Thus, to test for osteogenic differentiation, we analyzed the expression of ALP mRNA. Maximum ALP activity was found to occur 10 days after stimulation with PLGA-based microparticles containing BMP-2 in co-encapsulation with human serum albumin [16]. Although other tests could have been used to reinforce our findings, ALP is known to modulate the deposition of mineralized nodules, thus indicating osteoblastic activity. For all of this, we supplemented the differentiation media with β -glycerophosphate and either free BMP-2, NP-BMP2, or NP-BSA-BMP2 for 4 and 7 days so that we could capture the early dynamics of the expression of the gene. In our study, we identified an increase in the expression of ALP in all groups from day 4 to day 7 (Figure 8). Although ALP at day 7 in the BMP-2 group appears to be higher than for the other two groups, the change did not prove significant. In fact, differences between groups were not statistically significant within any time period. Noteworthy though, the increase was not significant within the BMP-2 group ($p = 0.141$, Student's t test), but it was significant within the other two groups ($p = 0.025$ and $p = 0.003$; NP-BMP2 and NP-BSA-BMP2 groups, respectively). This, again, could be taken as a confirmation of the sustained release of the protein from the nanoparticle system beyond the earlier time points.

This and both the migration and proliferation studies described below lead us to confirm that the system proposed can maintain a proper release of BMP-2 over time, sustaining a positive effect on cell migration and proliferation with initial reduced doses of BMP-2. The fact that the excessive initial burst is prevented is important for the application of this nanotechnology in bone regeneration, as in dentistry. In this way, the negative effects of initial high doses of BMP-2 are avoided at the same time as the molecule is protected from denaturalization inside the NP. Thus, the regenerator effects are maintained over time.

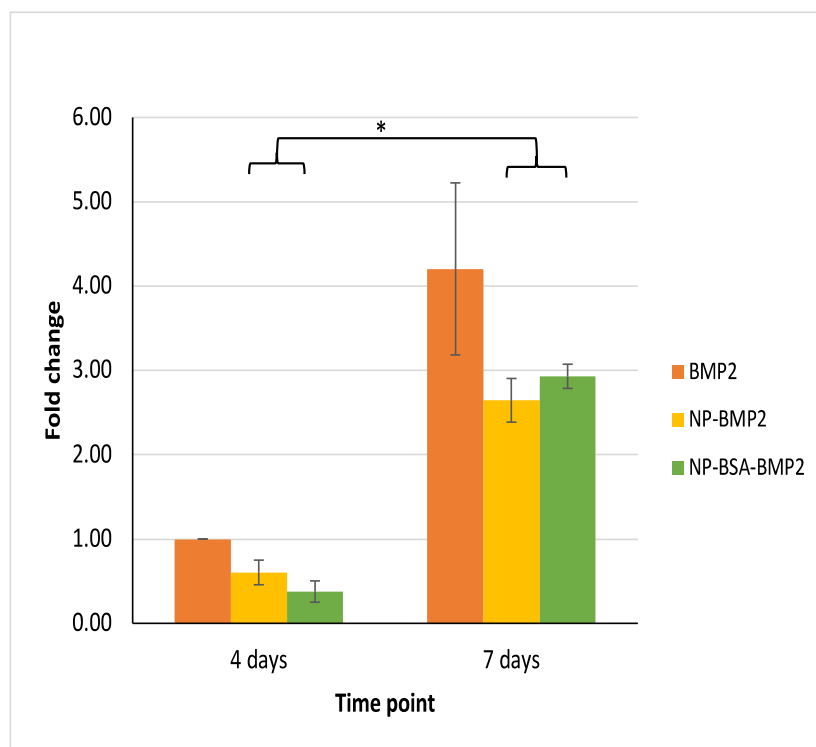


Figure 8. Relative fold change in the expression of ALP mRNA (control group: BMP2 at 4 days). * = Statistical significance of the comparison over time ($p = 0.025$ and $p = 0.003$, Student's t test; NP-BMP2 and NP-BSA-BMP2 groups).

4. Conclusions

In this work, a delivery PLGA-nanosystem previously developed for model proteins was chosen as the reference system to carry and deliver the growth factor BMP-2. This NP system, with a dual size distribution, was developed following a double-emulsion formulation in which the process and the components used were optimized to reach the appropriate colloidal and biological behavior. Encapsulation and adsorption are two different processes to load BMP-2 in PLGA NPs. Both were tested to elucidate the factors controlling them and their influence in the physico-chemical and biological properties of nanosystems. We verified that protein–polymer specific interactions have a major role in the way that protein molecules are carried and delivered from NPs. In vitro experiments showed that BMP-2-loaded PLGA NPs are the nanocarriers with the best release profile over the short-term without an initial burst and with moderate and sustained release of active protein before the onset of polymer degradation. Therefore, the biological activity is positive with no negative interaction with migration or proliferation but rather the induction of cell differentiation through the expression of ALP.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4923/11/8/388/s1>, Figure S1. Scheme of the formulation of NP-BMP2; Figure S2: Scheme of the protein adsorption process for NP-BSA-BMP2; Video S1. NTA experiments for NP-BMP2; Video S2. NTA experiments for empty NPs.

Author Contributions: Conceptualization, J.M.P.-G. and P.G.-M.; methodology, J.M.P.-G., A.B.J.-R. and M.P.-M.; investigation, T.d.C.-S., I.O.-O., J.M.P.-G., A.B.J.-R. and M.P.-M.; resources, A.B.J.-R., P.G.-M., F.O.-R.; writing—original draft preparation, J.M.P.-G. and M.P.-M.; writing—review and editing, J.M.P.-G., M.P.-M., A.B.J.-R., T.d.C.-S.; supervision, J.M.P.-G., P.G.-M. and F.O.-R.; funding acquisition, A.B.J.-R. and P.G.-M.

Funding: This research was funded by the Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (Spain) through research groups FQM-115 and CTS-1028, by the following research project: MAT2013-43922-R—European FEDER support included—(MICINN, Spain) and by MIS Ibérica S.L.

Acknowledgments: The authors wish to express their appreciation for the technical support to D. Darío Abril-García.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Van Rijt, S.; Habibovic, P. Enhancing regenerative approaches with nanoparticles. *J. R. Soc. Interface* **2017**, *14*. [[CrossRef](#)]
2. Kumar, B.; Jalodia, K.; Kumar, P.; Gautam, H.K. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *41*, 260–268. [[CrossRef](#)]
3. Mir, M.; Ahmed, N.; Rehman, A.U.R. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *159*, 217–231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jana, S.; Jana, S. Natural polymeric biodegradable nanoblend for macromolecules delivery. In *Recent Developments in Polymer Macro, Micro and Nano Blends*; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2017; pp. 289–312. ISBN 9780081004081.
5. Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Préat, V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* **2012**, *161*, 505–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Ding, D.; Zhu, Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics. *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *92*, 1041–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Arias, J.L.; Unciti-Broceta, J.D.; Maceira, J.; del Castillo, T.; Hernández-Quero, J.; Magez, S.; Soriano, M.; García-Salcedo, J.A. Nanobody conjugated PLGA nanoparticles for active targeting of African Trypanosomiasis. *J. Control. Release* **2015**, *197*, 190–198. [[CrossRef](#)]
8. Giteau, A.; Venier-Julienne, M.C.; Aubert-Pouëssel, A.; Benoit, J.P. How to achieve sustained and complete protein release from PLGA-based microparticles? *Int. J. Pharm.* **2008**, *350*, 14–26. [[CrossRef](#)]
9. Fredenberg, S.; Wahlgren, M.; Reslow, M.; Axelsson, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *Int. J. Pharm.* **2011**, *415*, 34–52. [[CrossRef](#)]
10. White, L.J.; Kirby, G.T.S.; Cox, H.C.; Qodratnama, R.; Qutachi, O.; Rose, F.R.A.J.; Shakesheff, K.M. Accelerating protein release from microparticles for regenerative medicine applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 2578–2583. [[CrossRef](#)]
11. Ortega-Oller, I.; del Castillo-Santaella, T.; Padial-Molina, M.; Galindo-Moreno, P.; Jódar-Reyes, A.B.; Peula-García, J.M. Dual delivery nanosystem for biomolecules. Formulation, characterization, and in vitro release. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2017**, *159*, 586–595. [[CrossRef](#)]
12. McClements, D.J. Encapsulation, protection, and delivery of bioactive proteins and peptides using nanoparticle and microparticle systems: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2018**, *253*, 1–22. [[CrossRef](#)]
13. Ortega-Oller, I.; Padial-Molina, M.; Galindo-Moreno, P.; O’Valle, F.; Jódar-Reyes, A.B.; Peula-García, J.M. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bapat, R.A.; Joshi, C.P.; Bapat, P.; Chaubal, T.V.; Pandurangappa, R.; Jnanendrappa, N.; Gorain, B.; Khurana, S.; Kesharwani, P. The use of nanoparticles as biomaterials in dentistry. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 85–98. [[CrossRef](#)]
15. Ji, Y.; Xu, G.P.; Zhang, Z.P.; Xia, J.J.; Yan, J.L.; Pan, S.H. BMP-2/PLGA delayed-release microspheres composite graft, selection of bone particulate diameters, and prevention of aseptic inflammation for bone tissue engineering. *Ann. BioMed. Eng.* **2010**, *38*, 632–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kirby, G.T.S.; White, L.J.; Rahman, C.V.; Cox, H.C.; Qutachi, O.; Rose, F.R.A.J.; Huttmacher, D.W.; Shakesheff, K.M.; Woodruff, M.A. PLGA-Based Microparticles for the Sustained Release of BMP-2. *Polymers* **2011**, *3*, 571–586. [[CrossRef](#)]
17. Qutachi, O.; Shakesheff, K.M.; Buttery, L.D.K. Delivery of definable number of drug or growth factor loaded poly(dl-lactic acid-co-glycolic acid) microparticles within human embryonic stem cell derived aggregates. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 18–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Wang, Y.; Wei, Y.; Zhang, X.; Xu, M.; Liu, F.; Ma, Q.; Cai, Q.; Deng, X. PLGA/PDLLA core-shell submicron spheres sequential release system: Preparation, characterization and promotion of bone regeneration in vitro and in vivo. *Chem. Eng. J.* **2015**, *273*, 490–501. [[CrossRef](#)]

19. Zhang, H.-X.; Zhang, X.-P.; Xiao, G.-Y.; Hou, -Y.; Cheng, L.; Si, M.; Wang, S.-S.; Li, Y.-H.; Nie, L. In vitro and in vivo evaluation of calcium phosphate composite scaffolds containing BMP-VEGF loaded PLGA microspheres for the treatment of avascular necrosis of the femoral head. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *60*, 298–307. [[CrossRef](#)]
20. Begam, H.; Nandi, S.K.; Kundu, B.; Chanda, A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 856–869. [[CrossRef](#)]
21. Balmayor, E.R.; Feichtinger, G.A.; Azevedo, H.S.; Van Griensven, M.; Reis, R.L. Starch-poly- ϵ -caprolactone microparticles reduce the needed amount of BMP-2. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2009**, *467*, 3138–3148. [[CrossRef](#)]
22. Xu, Y.; Kim, C.S.; Saylor, D.M.; Koo, D. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories. *J. BioMed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 1692–1716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Padial-Molina, M.; de Buitrago, J.G.; Sainz-Urruela, R.; Abril-Garcia, D.; Anderson, P.; O'Valle, F.; Galindo-Moreno, P. Expression of Musashi-1 during osteogenic differentiation of oral MSC: An in vitro study. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. D'Angelo, I.; Garcia-Fuentes, M.; Parajó, Y.; Welle, A.; Vántus, T.; Horváth, A.; Bökönyi, G.; Kéri, G.; Alonso, M.J. Nanoparticles based on PLGA:poloxamer blends for the delivery of proangiogenic growth factors. *Mol. Pharm.* **2010**, *7*, 1724–1733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chang, H.-C.; Yang, C.; Feng, F.; Lin, F.-H.; Wang, C.-H.; Chang, P.-C. Bone morphogenetic protein-2 loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres enhance osteogenic potential of gelatin/hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate cryogel composite for alveolar ridge augmentation. *J. Formos. Med. Assoc.* **2017**, *116*, 973–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Padial-Molina, M.; Volk, S.L.; Rios, H.F. Periostin increases migration and proliferation of human periodontal ligament fibroblasts challenged by tumor necrosis factor α and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides. *J. Periodontal Res.* **2014**, *49*, 405–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Liang, C.-C.; Park, A.Y.; Guan, J.-L. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 329–333. [[CrossRef](#)]
28. Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hylands, P.J.; Lee, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* **2007**, *42*, 377–387. [[CrossRef](#)]
29. Iqbal, M.; Zafar, N.; Fessi, H.; Elaissari, A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 173–190. [[CrossRef](#)]
30. Sánchez-Moreno, P.; Ortega-Vinuesa, J.L.; Boulaiz, H.; Marchal, J.A.; Peula-García, J.M. Synthesis and characterization of lipid immuno-nanocapsules for directed drug delivery: Selective antitumor activity against HER2 positive breast-cancer cells. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4248–4259. [[CrossRef](#)]
31. Lochmann, A.; Nitzsche, H.; von Einem, S.; Schwarz, E.; Mäder, K. The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres. *J. Control. Release* **2010**, *147*, 92–100. [[CrossRef](#)]
32. Kempen, D.H.R.; Lu, L.; Hefferan, T.E.; Creemers, L.B.; Maran, A.; Classic, K.L.; Dhert, W.J.A.; Yaszemski, M.J. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3245–3252. [[CrossRef](#)]
33. Santander-Ortega, M.J.; Csaba, N.; González, L.; Bastos-González, D.; Ortega-Vinuesa, J.L.; Alonso, M.J. Protein-loaded PLGA-PEO blend nanoparticles: Encapsulation, release and degradation characteristics. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288*, 141–150. [[CrossRef](#)]
34. Chung, Y.I.; Ahn, K.M.; Jeon, S.H.; Lee, S.Y.; Lee, J.H.; Tae, G. Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. *J. Control. Release* **2007**, *121*, 91–99. [[CrossRef](#)]
35. La, W.-G.; Kang, S.-W.; Yang, H.S.; Bhang, S.H.; Lee, S.H.; Park, J.-H.; Kim, B.-S. The Efficacy of Bone Morphogenetic Protein-2 Depends on Its Mode of Delivery. *Artif. Organs* **2010**, *34*, 1150–1153. [[CrossRef](#)]
36. Fu, Y.; Du, L.; Wang, Q.; Liao, W.; Jin, Y.; Dong, A.; Chen, C.; Li, Z. In vitro sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 microspheres embedded in thermosensitive hydrogels. *Die Pharm.* **2012**, *67*, 299–303. [[CrossRef](#)]

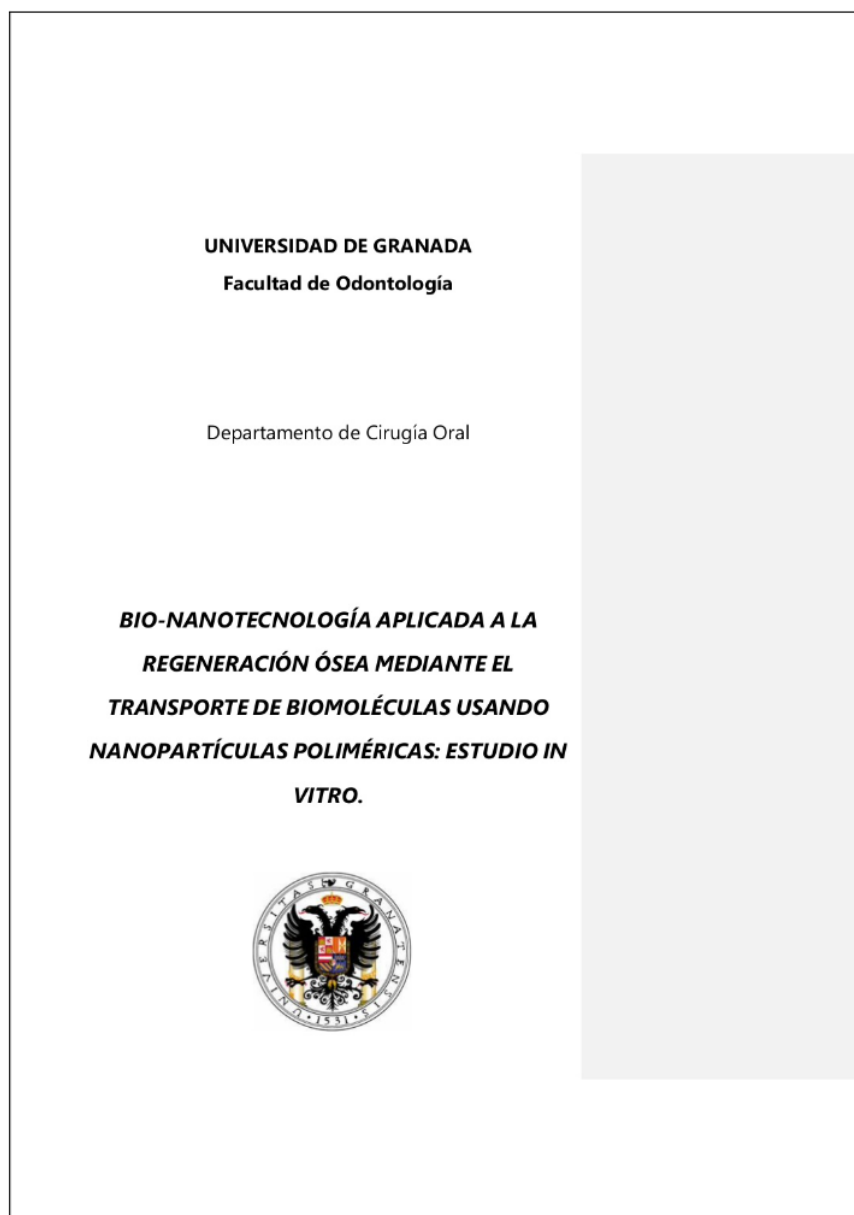
37. Rahman, C.V.; Ben-David, D.; Dhillon, A.; Kuhn, G.; Gould, T.W.A.; Müller, R.; Rose, F.R.A.J.; Shakesheff, K.M.; Livne, E. Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, *8*, 59–66. [[CrossRef](#)]
38. Pakulska, M.M.; Elliott Donaghue, I.; Obermeyer, J.M.; Tuladhar, a.; McLaughlin, C.K.; Shendruk, T.N.; Shoichet, M.S. Encapsulation-free controlled release: Electrostatic adsorption eliminates the need for protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1600519. [[CrossRef](#)]
39. Fu, C.; Yang, X.; Tan, S.; Song, L. Enhancing Cell Proliferation and Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Pre-osteoblasts by BMP-2 Delivery in Graphene Oxide-Incorporated PLGA/HA Biodegradable Microcarriers. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12549. [[CrossRef](#)]
40. Peula, J.M.; de las Nieves, F.J. Adsorption of monomeric bovine serum albumin on sulfonated polystyrene model colloids 1. Adsorption isotherms and effect of the surface charge density. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1993**, *77*, 199–208. [[CrossRef](#)]
41. Peula, J.M.; de las Nieves, F.J. Adsorption of monomeric bovine serum albumin on sulfonated polystyrene model colloids 3. Colloidal stability of latex—Protein complexes. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1994**, *90*, 55–62. [[CrossRef](#)]
42. Peula, J.M.; Hidalgo-Alvarez, R.; De Las Nieves, F.J. Coadsorption of IgG and BSA onto sulfonated polystyrene latex: I. Sequential and competitive coadsorption isotherms. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1996**, *7*, 231–240. [[CrossRef](#)]
43. Siafaka, P.I.; Üstündağ Okur, N.; Karavas, E.; Bikiaris, D.N. Surface modified multifunctional and stimuli responsive nanoparticles for drug targeting: Current status and uses. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1440. [[CrossRef](#)]
44. Peula-García, J.M.; Hidalgo-Alvarez, R.; De Las Nieves, F.J. Colloid stability and electrokinetic characterization of polymer colloids prepared by different methods. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *127*, 19–24. [[CrossRef](#)]
45. Santander-Ortega, M.J.; Lozano-López, M.V.; Bastos-González, D.; Peula-García, J.M.; Ortega-Vinuesa, J.L. Novel core-shell lipid-chitosan and lipid-poloxamer nanocapsules: Stability by hydration forces. *Colloid Polym. Sci.* **2010**, *288*, 159–172. [[CrossRef](#)]
46. Peula-García, J.M.; Hidalgo-Alvarez, R.; De las Nieves, F.J. Protein co-adsorption on different polystyrene latexes: Electrokinetic characterization and colloidal stability. *Colloid Polym. Sci.* **1997**, *275*, 198–202. [[CrossRef](#)]
47. Santander-Ortega, M.J.; Bastos-González, D.; Ortega-Vinuesa, J.L. Electrophoretic mobility and colloidal stability of PLGA particles coated with IgG. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2007**, *60*, 80–88. [[CrossRef](#)]
48. Peula, J.M.; Callejas, J.; de las Nieves, F.J. Adsorption of Monomeric Bovine Serum Albumin on Sulfonated Polystyrene Model Colloids. II. Electrokinetic Characterization of Latex-Protein Complexes. In *Surface Properties of Biomaterials*; Butterworth and Heinemann: Oxford, UK, 1994; pp. 61–69.
49. Sun, D. Effect of Zeta Potential and Particle Size on the Stability of SiO₂ Nanospheres as Carrier for Ultrasound Imaging Contrast Agents. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2016**, 8520–8529. [[CrossRef](#)]
50. del Castillo-Santaella, T.; Peula-García, J.M.; Maldonado-Valderrama, J.; Jódar-Reyes, A.B. Interaction of surfactant and protein at the O/W interface and its effect on colloidal and biological properties of polymeric nanocarriers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *173*, 295–302. [[CrossRef](#)]
51. Schrier, J.A.; DeLuca, P.P. Porous bone morphogenetic protein-2 microspheres: Polymer binding and in vitro release. *AAPS PharmSciTech* **2001**, *2*, 66–72. [[CrossRef](#)]
52. Padiál-Molina, M.; O'Valle, F.; Lanis, A.; Mesa, F.; Dohan Ehrenfest, D.M.; Wang, H.-L.; Galindo-Moreno, P. Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. *BioMed Res. Int.* **2015**, 2015. [[CrossRef](#)]
53. Inai, K.; Norris, R.A.; Hoffman, S.; Markwald, R.R.; Sugi, Y. BMP-2 induces cell migration and periostin expression during atrioventricular valvulogenesis. *Dev. Biol.* **2008**, *315*, 383–396. [[CrossRef](#)]
54. Gamell, C.; Osses, N.; Bartrons, R.; Rückle, T.; Camps, M.; Rosa, J.L.; Ventura, F.; Imamura, T. BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 3960–3970. [[CrossRef](#)]
55. Friedrichs, M.; Wirsdörfer, F.; Flohé, S.B.; Schneider, S.; Wuelling, M.; Vortkamp, A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biol.* **2011**, *12*, 26. [[CrossRef](#)]

56. Hrubí, E.; Imre, L.; Robaszkiewicz, A.; Virág, L.; Kerényi, F.; Nagy, K.; Varga, G.; Jenei, A.; Hegedűs, C. Diverse effect of BMP-2 homodimer on mesenchymal progenitors of different origin. *Hum. Cell* **2018**, *31*, 139–148. [[CrossRef](#)]
57. Kim, H.K.W.; Oxendine, I.; Kamiya, N. High-concentration of BMP2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells. *Bone* **2013**, *54*, 141–150. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

12.ANEXO DE ORIGINALIDAD



Tesis 1

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

6%

FUENTES DE
INTERNET

4%

PUBLICACIONES

3%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

ENCONTRAR COINCIDENCIAS CON TODAS LAS FUENTES (SOLO SE IMPRIMIRÁ LA FUENTE SELECCIONADA)